



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS Y QUÍMICOS DURANTE LA  
FERMENTACIÓN DEL ATOLE ROJO DE TLAXCALA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**THANIA LIBERTAD BARAJAS ZUÑIGA**

**CD.MX.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

Presidente: Profesora: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA  
Vocal: Profesor: GLORIA DÍAZ RUÍZ  
Secretario: Profesor: FRANCISCO RUÍZ TERÁN  
1er. Suplente: Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA  
2do. Suplente: Profesor: HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 321 edificio E, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Ciudad Universitaria, Coyoacán, México DF.

Asesor del tema: Dr. Francisco Ruíz Terán

Sustentante: Thania Libertad Barajas Zúñiga

INDICE .....	1
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCION.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Características del maíz.....	8
2.2 Alimentos fermentados de maíz en el mundo y Microorganismos fermentadores.....	13
2.3 Mecanismos de inhibición de los patógenos.....	18
2.3.1 pH.....	19
2.3.1.1 Efecto que tiene el pH sobre los microorganismos .....	20
2.3.2 Ácido láctico.....	21
2.3.3 Bacteriocinas.....	22
2.3.4 Peróxido de Hidrógeno.....	25
2.4 Características de los microorganismos.....	27
2.4.1 Bacterias lácticas.....	27
2.4.2 Tinción de Gram.....	29
2.4.3 Prueba de la catalasa.....	31
2.5 Metabolismo a partir del almidón de microorganismos fermentadores.....	33

3. Objetivos.....	39
3.1 Objetivos generales.....	39
3.2 Objetivos particulares.....	39
4. Materiales y métodos.....	40
4.1 Toma de muestra.....	40
4.2 Cuantificación de grupos microbianos.....	40
4.3 Técnicas de aislamiento y purificación.....	42
4.4 Clasificación de microorganismos por tinción de Gram.....	42
4.5 Clasificación de microorganismos por la prueba de catalasa.....	42
4.6 Identificación de microorganismos con métodos dependientes de cultivo..	42
4.6.1 Pruebas bioquímicas para bacterias lácticas.....	42
4.6.2 Pruebas bioquímicas para enterobacterias.....	43
4.6.3 Pruebas bioquímicas para levaduras.....	43
4.7 Medición del cambio de la concentración de algunos carbohidratos por Cromatografía de líquidos. Método HPLC.....	44
4.8 Titulación de la acidez durante la fermentación.....	45
4.9 Medición del pH con potenciómetro.....	45
5. Resultados y discusión de resultados.....	46

6. Conclusiones.....	61
7. Apéndice.....	62
8. Bibliografía.....	70

## RESUMEN

En San Juan Ixtenco Tlaxcala se consume un tipo de atole fermentado que se elabora con maíz criollo morado, este atole se elabora remojando el maíz y los olotes durante aprox. dos días en proporción de 1.5 kg en 4 l de agua, el maíz se muele en un molino para obtener una masa la cual se disuelve en el agua de remojo en proporción de 1 kg de masa en 4 l de agua, se deja fermentar 30 h, después se cuele para remover sólidos insolubles obteniendo un líquido color rojo al cual se le agrega piloncillo, canela, y agua de remojo, y se cuece hasta que hierve.

Para hacer el análisis se tomaron muestras durante la fermentación de la masa así como del agua de remojo de la siguiente manera:

Se tomaron en tubos Falcon estériles, 20 ml del agua en donde se remojaron el maíz y los olotes así como a las 0,4,8,18 y 20 h de la fermentación y del producto final.

Se realizaron diluciones decimales en agua peptonada estéril al 0.1% y se realizaron siembras en cajas Petri con agar nutritivo, agar MRS, agar MRS con 2% de almidón como única fuente de carbono, agar papa dextrosa, y agar bilis verde brillante.

Se aislaron y purificaron cinco colonias con morfologías diferentes, para su identificación, las bacterias lácticas, enterobacterias y levaduras se identificaron

por medio de pruebas bioquímicas. El pH se midió en el transcurso de la fermentación con un potenciómetro y se cuantificó el ácido láctico utilizando NaOH 0.1 N.

Se centrifugaron y filtraron las muestras para quitar microorganismos y proteínas, para posteriormente medir el cambio de concentración de los carbohidratos durante la fermentación, por medio de cromatografía de líquidos.



## 1. INTRODUCCION

La elaboración de bebidas fermentadas en las que se utiliza maíz está ampliamente difundida entre diferentes comunidades indígenas en México. A pesar de la importancia que han tenido y tienen estas bebidas fermentadas de maíz en la alimentación de diferentes grupos indígenas y mestizos en México, a la fecha se tiene escasa información acerca de su proceso de fermentación, y de los microorganismos que participan en ésta.

La búsqueda de nuevas alternativas de alimentación en México deberán de tomar en cuenta la riqueza de la diversidad de los alimentos fermentados de maíz ya que en ellos, además de contener microorganismos potencialmente utilizables para la conservación o mejoramiento organoléptico de alimentos, representan una fuente de alimentación importante para algunas comunidades en México, principalmente de bajos recursos económicos (Ulloa *et al.*, 1987).

En San Juan Ixtenco Tlaxcala se consume un tipo de atole fermentado que se elabora con maíz criollo rojo que se cultiva en la región y que se consume principalmente durante las fiestas patronales de las comunidades. Este atole se elabora remojando el maíz rojo junto con los olotes, durante toda la noche en una proporción de 1 a 1.5 kg de maíz en 4 l de agua . El maíz se muele en un molino manual o semi-industrial para elaborar la masa. Una vez que se tiene la masa del maíz rojo, el agua utilizada previamente en el remojo del maíz se entibia (40°C). La masa se disuelve, en el agua tibia, en una proporción de 1 kg de masa en 4 l del agua. La mezcla se deja fermentar durante

aproximadamente 30 h después de lo cual, se cuele para remover los sólidos insolubles del maíz y olote obteniéndose un líquido de color rojo al cual se le agrega piloncillo, canela y el resto del agua de remojo y se cuece a temperatura constante hasta que hierva. Una vez que se obtiene el atole, este se sirve caliente en recipientes hondos a los que se les agrega “ayocotes” (frijoles negros previamente cocidos, o habas cocidas). Se obtiene una bebida ácida y una consistencia igual a la del atole.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ

El maíz es originario de América, los expertos creen que se originó en la meseta de México o en las tierras altas de Guatemala y fue el alimento clave para el desarrollo de las culturas prehispánicas de Meso América como los aztecas, mayas, toltecas y otros; se sabe que fue el principal cereal cultivado por los indígenas del continente. La primera evidencia sobre el cultivo del maíz fue en los granos de polen fosilizados que se encontraron en muestras tomadas de los sedimentos que se depositaron en el lago debajo de la ciudad de México hace más de 80000 años. Los datos sobre variedades silvestres y sobre el teozinte (*Zea mexicana* o *Euchlaena mexicana*) se cree que esta planta silvestre formó parte del ancestro del maíz, indican que este fue domesticado a lo largo de dos mil años, entre el 7000 y 5000 a.C., por las tribus del período formativo o arcaico. Durante dicho período, los indígenas americanos lograron obtener mejores mazorcas mediante selecciones y cruces, para sustentar el desarrollo de los pueblos (Dendy *et al.*, 2004) (Camacho *et al.*, 2007).

En la actualidad se siembran en todo el mundo más de 129 millones de hectáreas de maíz, que sólo es superado por tierras dedicadas al cultivo del trigo y el arroz, como es relativamente barato y fácil de cultivar, tanto el grano como sus subproductos tienen una utilización muy diversa, ya que ha tenido

una influencia primordial en el uso global de la tierra, en nuestra dieta y en la calidad de nuestras vidas (Dendy *et al.*, 2004).

En la actualidad se conocen miles de variedades diferentes de maíz y se le ha asignado más de 200 sinónimos. América cultiva aproximadamente 41% de la producción total de maíz (576 millones de toneladas métricas) equivalente a 30 mil millones de dólares. Los lugares con mayores cosechas son China con 105 millones de toneladas métricas, la Unión Europea con 37,9 millones de toneladas métricas y Brasil con 33 millones de toneladas métricas (Dendy *et al.*, 2004).

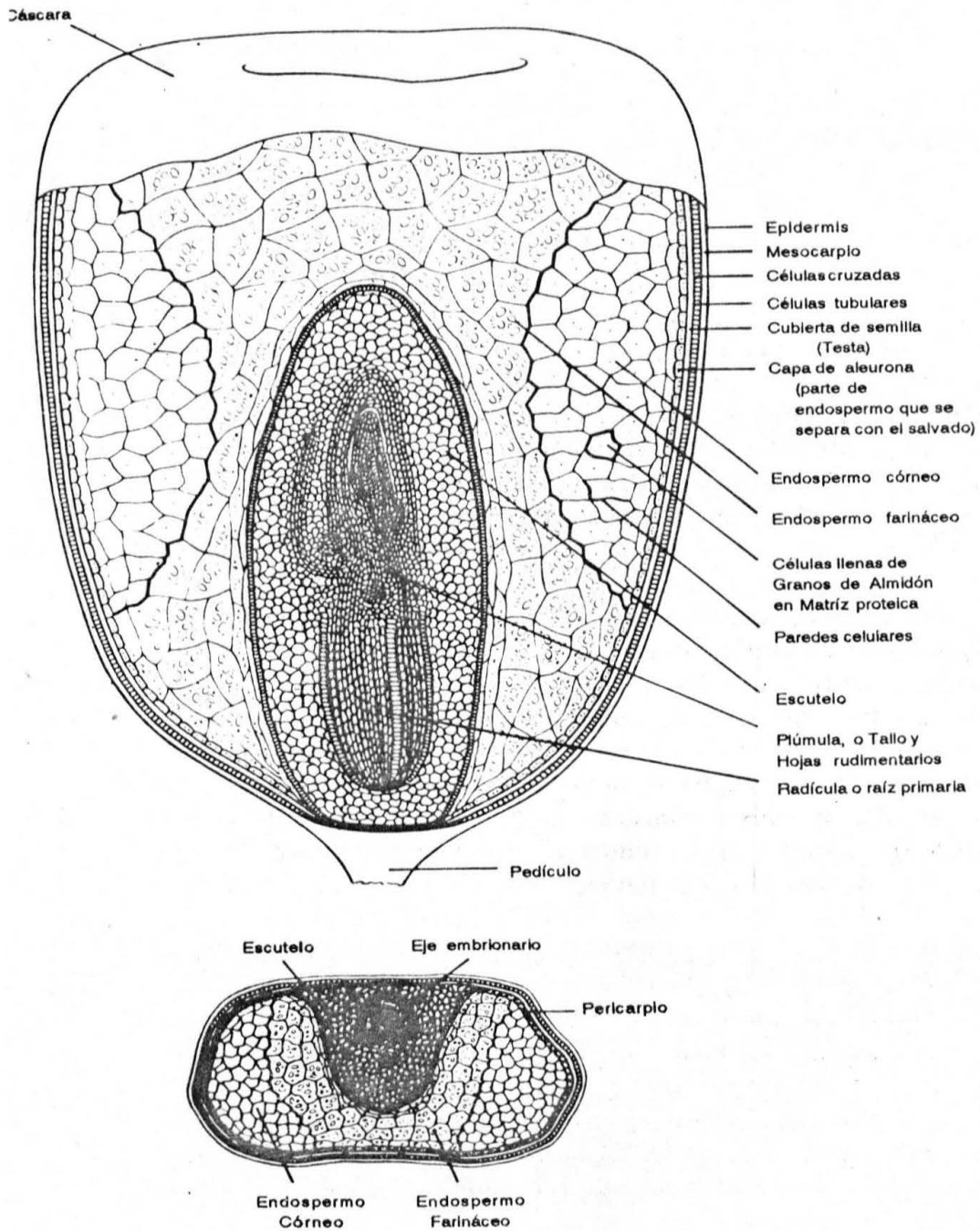
El grano está compuesto por cuatro partes principales: cáscara o salvado (pericarpio o cubierta de la semilla), germen, endospermo y pedículo. El grano de maíz es de color muy variable; puede ser de color uniforme o variegado y abarca desde el blanco al pardo oscuro o púrpura. El salvado constituye el 5-6% del grano, el germen es relativamente grande un 10-14% del grano y el resto corresponde al endospermo. Dentro del grano se encuentra el endospermo translúcido y opaco. En la figura 1 se aprecian las partes de un grano de maíz en cortes longitudinal y transversal (Hoseney *et al.*, 1991).

Los cereales contienen pequeñas cantidades de azúcares, dado que la mayor parte del azúcar transportado a la semilla es convertido en almidón. Así el grano de maíz contiene 0.2-0.5 % de D-glucosa, 0.1-0.4% de D-fructosa y 1-2% de sacarosa. A lo largo del crecimiento, la planta de maíz, como otros cereales convierte una gran parte de su energía fotogenerada en las hojas en sacarosa,

que constituye el azúcar de transporte normal en las plantas. Una parte mayoritaria de la sacarosa generada es transportada a las semillas, donde es transformada en almidón. El almidón es la reserva alimenticia que utiliza el embrión de la planta hasta que puede germinar y comenzar la fotosíntesis de sus propios carbohidratos (Fennema *et al.*, 1993). En la tabla 1 podemos ver las diferencias en su composición por cada 100g en maíz seco y fresco.

Entre los múltiples usos que tiene el maíz, además del consumo directo y del producto del nixtamal como tortillas, totopos, tostadas etc., el maíz se utiliza para forraje, producción de aceite, producción de harina, cereales para desayunos, para aperitivos como las palomitas y aperitivos extruidos, producción de almidón que puede fermentarse en alcohol o hidrolizarse a gran escala para la obtención de glucosa y jarabes de maíz incluyendo jarabes con alto contenido en fructosa que se utilizan como edulcorantes o espesantes (Dendy *et al.*, 2004).

La nixtamalización es un proceso determinante en el mejoramiento del valor nutritivo del maíz y en la diversificación de productos derivados. El efecto de la nixtamalización en el valor nutritivo del maíz incluye: incremento de la digestibilidad, mejoramiento del balance isoleucina/leucina, lo que a su vez favorece el aprovechamiento de la proteína; y liberación de parte de la niacina, que no está biodisponible inicialmente en el grano y que evita la pelagra (Dendy *et al.*, 2004) (Camacho *et al.*, 2007).



**Fig. 1. Cortes longitudinales y transversales de un grano de maíz (Hoseney et al., 1991).**

**Tabla 1. Composición del maíz por cada 100g. (Botanical-online.com)**

	<b>Seco</b>	<b>Fresco</b>
<b>Agua</b>	10.3 g	75.9 g
<b>Energía</b>	365 kcal/1528 kJ	86 kcal/360 kJ
<b>Grasa</b>	4.7 g	1.18 g
<b>Proteínas</b>	9.4 g	3.22 g
<b>Carbohidratos</b>	74.2 g	19.02 g
<b>Fibra</b>	1 g	2.7 g
<b>Potasio</b>	287 mg	270 mg
<b>Fósforo</b>	210 mg	89 mg
<b>Hierro</b>	2.7 mg	0.52 mg
<b>Sodio</b>	35 mg	15 mg
<b>Manganeso</b>	0.48 mg	0.16 mg
<b>Magnesio</b>	127 mg	37 mg
<b>Calcio</b>	7 mg	2 mg
<b>Cinc</b>	2.21 mg	0.45 mg
<b>Selenio</b>	15.5 mcg	0.6 mcg
<b>Vitamina C</b>	0	6.8 mg
<b>Vitamina A</b>	469 UI	281UI
<b>Vitamina B1 (Tiamina)</b>	0.38 mg	0.20 mg
<b>Vitamina B2 (Riboflavina)</b>	0.20 mg	0.06 mg
<b>Vitamina E</b>	0.78 mg	0.090 mg
<b>Niacina</b>	3.62 mg	1.7 mg

## 2.2 ALIMENTOS FERMENTADOS DE MAÍZ EN EL MUNDO, MICROORGANISMOS FERMENTADORES

El pozol mexicano, es una bebida fermentada hecha de maíz nixtamalizado en forma de bolas de masa, envueltas en hojas de plátano, se dejan fermentar a temperatura ambiente de 2 a 7 días, el resultado de esta masa fermentada es suspendida en agua y consumida diariamente como una bebida refrescante.

En la microbiota inicial se encontraron miembros del género *Streptococcus* como *S. bovis*, *S. equinus*, *S. intestinalis* y *S. macedonius* y *Enterococcus spp*, durante el primer día de fermentación estuvieron presentes aerobios estrictos que incluyen las especies de *Exiguobacterium*, después de 24-48h de fermentación se encontraron bacterias lácticas *Leuconostoc citreum* heterofermentativas que incluyen especies de *Leuconostoc* como *Leuconostoc mesenteroides*, y *L. fermentum*, al final de la fermentación después de 48-96h se encontraron bacterias lácticas homofermentativas como *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* y *L. pentosus*, y especies de Bifidobacterias, así como también, *B. mínimum*, *E. aurantiacum*, *Weissella paramesenteroides*, *Pediococcus*, *Acetobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, hongos y levaduras (Ben-Omar et al., 2000).



Poto – poto, es una bebida proveniente del Congo. Se produce lavando los granos de maíz, se deja remojar de 12 – 96h, después se drena y se procede a una molienda húmeda, se hace un tamizado, se adiciona agua a la harina húmeda, se procede a una decantación de 10h- a 5 días, la masa obtenida se mete en una bolsa para que se drene el agua y se lleva a cabo la fermentación de la masa por 10h hasta 7días.

Los microorganismos encontrados fueron bacterias acidolácticas como *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, y *L. fermentum* (Abriouel et al., 2005).

Ogi, es un bebida proveniente de África. Para preparar esta bebida se incluyen varios pasos, lavar el maíz, remojar en agua de 24- 72 horas, después se realiza una molienda húmeda y un tamizado húmedo, se deja filtrar de 12-48 horas. Los microorganismo encontrados son bacterias acidolácticas como *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L.fermentum* (Omemu et al., 2007).

Champús, esta bebida se prepara en Colombia y otros países de América del Sur como Ecuador y Perú. Esta bebida se produce hirviendo los granos de maíz por muchas horas para suavizarlos, después los granos son enfriados a temperatura ambiente, después se agregan frutas junto con panela (piloncillo) y otros ingredientes. Los microorganismos encontrados son las siguientes levaduras: *S. cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri* var. *Kluyveri*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Torulospora delbrueckii*, *Galactomyces geotritichum*, *Hanseniaspora spp* (Osorio et al., 2008).

Atole Agrio, esta bebida se prepara en Villahermosa Tabasco. Esta bebida se produce por medio de varias de etapas de elaboración que incluyen: desgranado de las mazorcas, estos granos se someten a una molienda seca, de esta masa, se forman bolas de aproximadamente 100 g, las cuales se dividen a la mitad, con una mitad se lleva a cabo la fermentación sólida a temperatura ambiente por 12 h y con la otra la fermentación líquida a temperatura ambiente por 6 h, después son colados y puestos a hervir, el tiempo de cocción depende de que tan espeso se desee el atole. Los microorganismos encontrados fueron: las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, bacterias lácticas amilolíticas *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis* y las enterobacterias *Serratia marcescens*, *Raoultella terrigena*, *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Morganella morganii spp. Sibonii*, *Pseudomonas luteola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Valderrama et al., 2012, Esquivel et al., 2012).

Axocotl, conocida como atole de sabor agrio, es de color verdoso debido a que el fermentado de maíz se combina con una hierba conocida como axokoxiuit, la hierba del axokot, se elabora por una parte de la comunidad Náhuatl en la Sierra Norte de Puebla. El proceso consiste en nixtamalizar el maíz, se realiza una molienda y con esta masa se prepara el atole.

Por otra parte las hojas de axokot se muelen con cal y esta mezcla se utiliza para cubrir las paredes de una olla de barro, al cual se le añade el atole caliente y agua hirviendo, se colocan brasas ardiendo en la boca del cántaro, se tapa el cántaro con hojas verdes de plátano y se coloca sobre una cama de hojas secas y costales que también llegan a cubrir los costados hasta lograr una cubierta térmica y se deja fermentar durante 3 días, obteniéndose una bebida ácida efervescente y con poco contenido de alcohol.

Los microorganismos encontrados fueron: *Lactobacillus paracasei paracasei*, *Pedicoccus damnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Aerococcus viridans* (Guadarrama et al., 2007).

Mawe, es una masa de maíz fermentada cruda que se prepara en Benín, sirve como un ingrediente importante para la preparación de bebidas cocidas entre otros alimentos. Esta se prepara por una fermentación natural, el cual puede ser soportado por una reutilización de microorganismos en apoyo a un proceso relativamente estable, dominado por bacterias acidolácticas heterofermentativas como *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. buchneri*, *W. confusa* y levaduras como *Candida krusei*, *C. Kefyr*, *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentación promueve acidificación y sabor.

Uji, es una bebida fermentada de maíz que se prepara en Kenia, en la preparación se suspenden y se remueven las partículas gruesas y el salvado por filtración, este líquido filtrado es el que se somete a fermentación. Las

bacterias acidolácticas que predominan durante la fermentación son *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. buchneri*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*.

Kenkey, es una bebida que se produce en Ghana. Se producen dos tipos de kenkey, con diferentes contenidos de sal y diferente material de empaque. El maíz se remoja y se somete a una molienda húmeda, la mitad se amasa con algo de agua, y la masa se deja fermentar por 3 o 4 días, y la otra mitad es mezclada con agua y cocida hasta obtener una masa gelatinizada llamada aflata. En iguales cantidades tanto de aflata como de masa fermentada, se lleva a un proceso de amasado hasta obtener una masa pegajosa, de la cual se forman bolas que se envuelven en hojas de plátano o maíz y se cosen por varias horas. Esta bebida tiene una vida útil de varios días y se consume como un alimento “listo para comer” junto con otros alimentos. Los microorganismos dominantes son las bacterias acidolácticas *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri* y *P. pentosaceus* y levaduras *C. krusei* y *S. cerevisiae*. (Lahtinen *et al.*, 2012)

### 2.3 MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LOS PATÓGENOS

En muchos alimentos fermentados el desarrollo de las bacterias lácticas crea en el medio unas condiciones desfavorables para otros microorganismos. En estos productos la acidificación es el factor selectivo determinante.

Sin embargo, en muchos otros productos se puede comprobar que en presencia de determinadas cepas lácticas y a pesar de que las condiciones del medio permitan su crecimiento, algunos microorganismos contaminantes no pueden desarrollarse.

El estudio de estos fenómenos debidos a las bacterias lácticas condujo en los años cuarenta al descubrimiento de inhibidores específicos como la diplococina producida por *S. cremoris*, la nisina producida por *S. lactis* y a la puesta en evidencia de la acción inhibidora del peróxido de hidrógeno producido por muchas cepas lácticas.

Después de este periodo se manifestó un considerable interés por el estudio de las posibilidades de utilización de las bacterias lácticas como agentes para eliminar microorganismos contaminantes indeseables en los alimentos (Bourgeois *et al.*, 1995).

### 2.3.1 pH

El pH es igual al logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno. La acidez o alcalinidad de un medio tiene una gran influencia en la estabilidad de macromoléculas tales como las enzimas, debido a esto, tanto el crecimiento como el metabolismo de los microorganismos están influidos por el pH.

En general las bacterias crecen con mayor rapidez en una escala de pH comprendida entre los valores 6.0 y 8.0, las levaduras entre los valores 4.5 y 6.0 y los hongos filamentosos entre los valores 3.5 y 4.0 lo mismo que sucede en todas las generalizaciones, existen excepciones, de modo especial en aquellas bacterias que producen grandes cantidades de ácidos como consecuencia de su metabolismo productor de energía, como por ejemplo los lactobacilos y las bacterias acéticas cuyo crecimiento óptimo tiene lugar a un pH ente 5.0 y 6.0 (Adams *et al.*, 1997).

La mayoría de los alimentos son, cuando menos, ligeramente ácidos, ya que los materiales cuyo pH es alcalino generalmente tienen un sabor bastante desagradable. La acidez de un producto puede tener importantes implicaciones tanto en su ecología microbiana como en la rapidez y naturaleza de su alteración.

La capacidad del pH para limitar el crecimiento microbiano ha sido aprovechada deliberadamente desde los tiempos más antiguos en la conservación de alimentos con los ácidos acético y láctico (Adams *et al.*, 1997).

### **2.3.1.1 EFECTO QUE TIENE EL PH SOBRE LOS MICROORGANISMOS**

En los productos fermentados el descenso de pH depende del poder tampon del medio, de la concentración de sustratos fermentables y del pH límite tolerado por los fermentos. Los pH alcanzados en algunos de estos productos son suficientes para eliminar algunos microorganismos contaminantes.

En principio algunas funciones celulares esenciales, como por ejemplo la síntesis de ATP en las bacterias, activan el transporte de nutrientes y la regulación citoplásmica tiene lugar a nivel de la membrana celular y de aquí que las citadas funciones dependan de la energía potencial acumulada en la membrana en forma de fuerza protón motriz, esta fuerza es un potencial electroquímico producido por el transporte de electrones desde el interior de la célula al medio. A diferencia de otros protones y de otras moléculas dotadas de carga eléctrica, las moléculas ácidas lipófilas no disociadas pueden atravesar libremente la membrana; al atravesarla pasan desde un medio externo de bajo pH en el que el equilibrio favorece las moléculas no disociadas al elevado pH del citoplasma de un valor en torno a 7.5 en los neutrófilos. A este pH más elevado el equilibrio se desvía a favor de la molécula no disociada, de modo que el ácido se ioniza produciendo protones, que tenderán a acidificar el protoplasma y a desdoblar el componente de pH de la fuerza protón motriz. La célula intentará mantener su pH interno por medio de la expulsión de los protones que se producen en su interior, pero esto enlentecerá el crecimiento ya que desvía la energía de las funciones relacionadas con el crecimiento. Si el pH externo es suficientemente bajo y la concentración extracelular de ácido

elevada, la carga de trabajo de la célula se hace excesivamente grande, el pH del citoplasma desciende hasta un valor en el que el crecimiento ya no es posible, y finalmente la célula muere (Adams *et al.*, 1997).

### **2.3.3 ACIDO LÁCTICO**

El ácido láctico, o su forma ionizada, el lactato, también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanoico, desempeña importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica. Es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo, lo que lo convierte en un ácido  $\alpha$ -hidroxílico (AHA) de fórmula  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$  ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ). En solución puede perder el hidrógeno unido al grupo carboxilo y convertirse en el anión lactato.

Las bacterias ácido lácticas con frecuencia se comportan como inhibidoras de otros microorganismos y este comportamiento es la base de su capacidad para mejorar la calidad de conservación y la inocuidad de productos alimenticios. Los factores más importantes son por mucho la producción de los ácidos láctico y acético. Junto con la consiguiente disminución del pH (Adams *et al.*, 1997).

El efecto inhibidor específico de los ácidos orgánicos se atribuye generalmente a su forma no disociada. Esta forma penetra libremente en la célula donde se ioniza, lo que provoca un descenso en el pH interno y el bloqueo de algunos mecanismos de transporte.



En el caso del ácido láctico, las concentraciones en ácido no disociado necesario para obtener una inhibición en medio de cultivo son para levaduras, Enterobacterias y Micrococaceas superiores a 0.01%, para los mohos superiores a 0.02% y para los Bacilos superiores a 0.03%.

La acumulación de lactato en la célula puede también suponer una modificación del potencial redox que perturbe el metabolismo.

Las bacterias lácticas heterofermentativas pueden producir cantidades importantes de ácidos orgánicos además del ácido láctico. Los *Leuconostoc* y los *Lactobacilos* heterofermentativos producen la misma cantidad de acetato que de lactato.

La presencia simultánea de ácido láctico y de acético podría además tener un ligero efecto de sinergismo la acción inhibidora (Bourgeois *et al.*, 1995).

#### **2.3.4 BACTERIOCINAS**

La producción de bacteriocinas por bacterias acidolácticas ha sido estudiada y el interés por las mismas deriva del hecho de que son producidas por organismos que se encuentran en los alimentos, por lo que se consideran como naturales y, por lo tanto más admisibles que los conservadores alimentarios.

Hasta hoy la única bacteriocina que encuentra aplicación en la industria alimentaria es la nisina, producida por determinadas cepas del *Lactococcus lactis* (Adams *et al.*, 1997).

Se denominan bacteriocinas a las moléculas que responden a los cinco criterios siguientes:

- Tienen un estrecho espectro de acción; solo las especies taxonómicamente próximas a la cepa productora pueden ser inhibidas.
- Poseen una parte proteica necesaria para su actividad.
- Para actuar las bacteriocinas se fijan sobre un receptor específico localizado sobre la célula diana.
- La célula productora sintetiza igualmente una molécula que la inmuniza contra su propia bacteriocina; el soporte genético de las dos moléculas, bacteriocinas y moléculas de inmunidad es un plásmido.

En el caso de compuestos inhibidores producidos por bacterias Gram positivas, principalmente lactobacilos y estreptococos del grupo N, no se ha demostrado que todas las condiciones hayan sido cubiertas.

La nisina, descubierta en 1944 por Mattick y Hirsch, es un péptido de 3500 daltons de peso molecular, es producida por cepas de *Lactococcus lactis* contienen aminoácidos no habituales y tienen un espectro de acción muy amplio. Estas características determinan su no inclusión dentro de las bacteriocinas. Contiene una molécula de lantionina, un aminoácido que contiene un grupo tioéter raramente encontrado en el metabolismo bacteriano. Otros aminoácidos inhabituales entran en la composición de la nisina, especialmente dos aminoácidos  $\beta$ -insaturados, la dehidroalanina y la

dehidrobutirina. Estos aminoácidos forman 4 anillos intramoleculares. La nisina es resistente a las enzimas proteolíticas excepto a la  $\alpha$ -quimotripsina. Su estructura en anillos le confiere una remarcable termorresistencia. Es muy inestable en medio básico. En un tampón a pH 10, la nisina es inactivada al 80%, el pH isoeléctrico de la nisina es superior a 10.5.

La nisina sintetizada en forma de una pro-nisina que sufre a continuación modificaciones después de la trasducción. Ninguna enzima de las que intervienen en estas modificaciones ha podido aislarse, pero la transformación de pro-nisina en nisina ha sido obtenida *in Vitro* con extractos celulares de cepas productoras de nisina.

La nisina se utiliza como agente de conservación de la industria alimentaria, y su uso como aditivo ha sido aceptado por el Comité de expertos de la FAO/WHO. Las condiciones de aplicación de la nisina están ligadas a sus propiedades y a su espectro de acción.

En la práctica las aplicaciones de la nisina son limitadas, las razones por las que se puede permitir su utilización como aditivo alimentario son las siguientes:

- está producida por un organismo normalmente utilizado en las fermentaciones alimentarias.
- La nisina residual en los alimentos es digerida, efectivamente es sensible a la  $\alpha$ -quimotripsina.

- Los análisis efectuados en Inglaterra y en Rusia han demostrado ausencia de toxicidad.

La aplicación de esta propiedad de *L. lactis* de producir nisina ha sido al principio considerada para inhibir a *Clostridium tyrobutiricum* en los quesos y distintos trabajos realizados han confirmado esta posibilidad. Pero la sensibilidad de las cepas nisinógenas a los fagos junto con la sensibilidad de los fermentos a la nisina hace problemática la utilización del procedimiento. Sin embargo utilizando cepas productoras de nisina en combinación con fermentos resistentes a la nisina, obtuvo un 90% de los quesos de muy buena calidad, mientras que el lote testigo, el 59% presentaron alteraciones butíricas (Bourgeois *et al.*, 1995).

#### **2.3.4 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

El peróxido de hidrógeno es muy conocido por sus propiedades antimicrobianas. Las bacterias acidolácticas poseen varias oxidasas de las flavoproteínas pero carecen de la enzima degradadora catalasa, en presencia de oxígeno producen peróxido de hidrógeno. La producción de este compuesto les conferirá cierta ventaja competitiva ya que se ha comprobado que son menos sensibles que otras bacterias a sus efectos. La acumulación de peróxido de hidrógeno ha sido demostrada en algunos alimentos fermentados pero, en general es probable que sus efectos sean ligeros. Las fermentaciones con producción de ácido láctico son esencialmente reacciones anaeróbicas por

lo que la formación de peróxido de hidrógeno será limitada por la cantidad de oxígeno disuelto en el sustrato al iniciarse la fermentación (Adams *et al.*, 1997).

El consumo del oxígeno disuelto por las bacterias conduce en presencia de un sustrato oxidable a la formación de compuestos de reducción del oxígeno: anión superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  y agua. Los dos primeros compuestos son muy tóxicos para la célula, y los microorganismos aerobios disponen de equipos enzimáticos que permiten su eliminación.

En las bacterias lácticas solamente se han identificado enzimas conducentes a la formación de  $H_2O_2$  y de agua pero el anión superóxido puede aparecer como compuesto intermedio. La formación del peróxido de hidrógeno se produce en diversas reacciones en los estreptococos lácticos, la NADH oxidasa es la principal fuente de  $H_2O_2$ ; en el *Lactobacillus plantarum* es una piruvato oxidasa la que provoca la liberación de  $H_2O_2$  en aerobiosis a expensas de la glucosa. El peróxido de hidrógeno puede también acumularse durante el crecimiento sobre los medios sin azúcar conteniendo glicerol, bajo la acción de una  $\alpha$ -glicerofosfato oxidasa. De igual forma con *Lactobacillus plantarum* es posible una producción de  $H_2O_2$  a partir del metabolismo del lactato en un medio donde la glucosa está agotada. En presencia de oxígeno disuelto hay por lo tanto muchas vías de formación de peróxido de hidrógeno por las bacterias lácticas.

La capacidad de acumulación de  $H_2O_2$  en determinadas condiciones de cultivo varía mucho según las especies e incluso en algunos casos entre la cepa de una misma especie. Las concentraciones máximas se obtienen de

*Lactobacillus lactis*. La importancia de la acumulación depende mucho del sustrato glucídico disponible, así para *Lactobacillus lactis* la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es más importante en presencia de galactosa que en presencia de glucosa o lactosa. Las concentraciones máximas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cultivos son muy variables; pueden sobrepasar 1 mM (Bourgeois *et al.*, 1995).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS

### 2.4.1 BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias acidolácticas son bacilos o cocos Gram positivos catalasa negativos, no esporulados, sintetizan su ATP en la fermentación láctica de los glúcidos. Todas estas bacterias crecen anaeróbicamente. No obstante, al contrario que las anaerobias, no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él; por lo que son aerotolerantes. La mayoría de las bacterias lácticas obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares.

El grupo de las bacterias lácticas ha sido sujeto a controversia ya que los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* han sido el núcleo del grupo, pero revisiones taxonómicas de esos géneros y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias ácido lácticas comprenden los siguientes: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*.

La clasificación de las bacterias ácido lácticas dentro de los diferentes géneros está basada en gran parte por la morfología, modo de fermentación de la glucosa, crecimiento en diferentes temperaturas, configuración de la producción de ácido láctico, capacidad de crecimiento en altas concentraciones de sal, y tolerancia a la acidez o alcalinidad (Wright *et al.*, 1998).

Una diferencia importante entre los subgrupos de las bacterias lácticas radica en que tipos de productos de fermentación genera a partir de los azúcares.

El grupo llamado homofermentativo produce ácido láctico como único producto de la fermentación de la glucosa. Las bacterias homolácticas son capaces de extraer de una determinada cantidad de glucosa aproximadamente el doble de energía de la que son capaces de extraer las bacterias heterolácticas. Todos los representantes de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*, junto con algunos lactobacilos, son homofermentativos. Las bacterias lácticas que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y de etanol a partir de las hexosas se denominan heterofermentativas. Las especies que pertenecen a este grupo son del género *Leuconostoc* así como algunos lactobacilos. Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de producción de componentes de aroma y sabor tales como acetaldehído y el diacetilo.

La diferencia a cuanto a productos finales de la fermentación existentes entre las bacterias acidolácticas homofermentativas y las heterofermentativas cuando

es atacada la glucosa, son consecuencia de diferencias básicas de tipo genético y fisiológico.

La diferencia viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, que es la enzima clave de la glucólisis. Las bacterias homolácticas poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, pero carecen de fosfoacetolasa. Utilizan la vía Embden-Meyerhof para producir 2 moléculas de lactato por molécula de glucosa.

Las bacterias heterolácticas carecen de las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa y no pueden romper la fructosa difosfato. Poseen la enzima fosfoacetolasa, en lugar de degradar la glucosa por la vía Embden-Meyerhof estos microorganismos utilizan la vía de las pentosas, oxidan la glucosa-6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta pentosa fosfato que se escinde hasta triosa fosfato y acetil fosfato por medio de la fosfoacetolasa ( Madigan *et al.*, 2008 ) (Jay *et al.*, 1994).

La identificación de los microorganismos se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas, y para ello se usan características como las pruebas Gram y catalasa.

#### **2.4.2 GRAM**

Para poder identificar a las bacterias se puede utilizar la tinción de Gram que es una tinción diferencial, dividiendo a las bacterias en Gram positivos y Gram negativos.



La pared celular de las bacterias Gram positivos posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano también conocido como mureína.

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativos es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido (Roger *et al.*, 1996).

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivos lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativos (Roger *et al.*, 1996).

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglucano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración morada. Pero por el contrario, las Gram

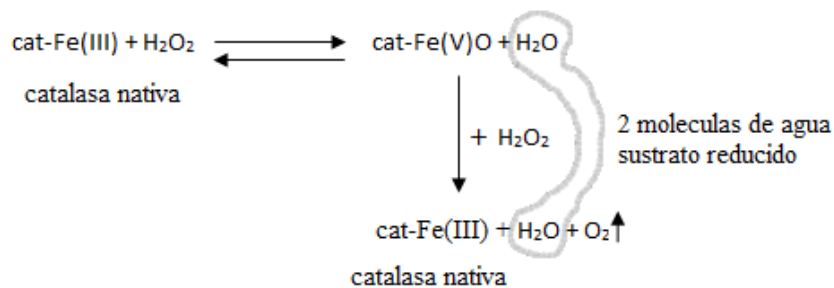
positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglucanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración morada (Roger *et al.*, 1996).

### **2.4.3 CATALASA**

Es una enzima considerada hidroxidrolasa. Las catalasas están presentes en los animales y vegetales. El centro activo de la catalasa es una clase de proteína hemo denominada citocromo. El hemo de la catalasa es un complejo de hierro y porfirina de alto giro de protoporfirina, (protoporfirina es una nomenclatura alternativa para el grupo hemo de la catalasa: define sus propiedades químicas). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1.1% y 0.09% respectivamente del peso molecular total de la enzima.

La catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos. Las excepciones principales son las especies de *Streptococcus* y los anaerobios estrictos, que carecen de catalasa (Mc Faddin *et al.*, 2003).

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene entre otras una función protectora contra microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos. Esta función la efectúa esta enzima que cataliza su descomposición en agua y oxígeno junto con la ayuda de cualquier peroxidasa, y también oxida sustratos secundarios, pero no tiene ninguna acción contra otros peróxidos (Mc Faddin *et al.*, 2003).



**Fig. 2 Reacción catalítica de la catalasa (Mc Faddin *et al.*, 2003).**

Para comprobar que en el microorganismo está presente la catalasa, se agrega una gota de peróxido de hidrógeno sobre un frotis de una colonia aislada, la prueba será positiva cuando ocurre un burbujeo vigoroso o formación de espuma debido al desprendimiento del oxígeno (Mc Faddin *et al.*, 2003).

Bacilos catalasa negativo: el grupo principal está constituido por los lactobacilos, que se encuentran en hábitats similares a los de las corinebacterias. Son facultativamente anaeróbicos y requieren con frecuencia

factores de crecimiento y dióxido de carbono. Se clasifican en dos grupos: homofermentativos que solamente producen lactato y heterofermentativos, que producen menores cantidades de lactato, además de etanol, acetato y dióxido de carbono (Mossel *et al.*, 2003).

## **2.5 METABOLISMO A PARTIR DEL ALMIDÓN DE LOS MICROORGANISMOS FERMENTADORES**

Almidón: está compuesto fundamentalmente por glucosa, los almidones de los cereales contienen pequeñas cantidades de grasas, los lípidos asociados al almidón son generalmente lípidos polares, el nivel de estos lípidos en cereal está entre 0.5 y 1%. Los gránulos de almidón en el maíz se encuentran incluidos en proteínas. La unión proteína almidón es mucho más fuerte en el maíz que en otros cereales como el trigo (Hoseney *et al.*, 1991) (Dendy *et al.*, 2004).

El almidón en los cereales está constituido básicamente por polímeros  $\alpha$ -D-glucosa, químicamente se pueden distinguir dos tipos de polímeros: en el maíz amilosa en un 25% y amilopectina en un 75%. La amilosa que fundamentalmente es un polímero lineal de  $\alpha$ -D-glucosa unida en  $\alpha$ -1-4, con 1500 a 2000 unidades de glucosa, aunque se admita generalmente, que el polímero es lineal esto parece ser cierto para una parte de la amilosa, siendo ligeramente ramificado el resto, las ramificaciones de la amilosa son tan largas

y tan escasas que en varios sentidos la molécula actúa como una entidad sin ramificar (Hoseney *et al.*, 1991) (Huges *et al.*, 2004).

La naturaleza lineal y de gran longitud, confiere a la amilosa algunas propiedades como su capacidad de formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos, el conocido color azul producido por el yodo con el almidón, se atañe a iones poliyodados en el núcleo central de la hélice de la amilosa. La amilopectina que está fuertemente ramificada, está formada al igual que la amilosa por  $\alpha$ -D-glucosa, concatenada fundamentalmente por enlaces  $\alpha$ -1-4, la amilopectina está mucho más ramificada que la amilosa con 4-5% de enlaces  $\alpha$ -1-6 (dan lugar a la cadena ramificada) y por enlaces  $\alpha$ -1-4 (dan lugar a la cadena lineal), este nivel de ramificación indica que, en promedio, la cadena unitaria de la amilopectina tiene de longitud solamente 20-25 unidades de glucosa, con 595.238 restos de glucosa. Se cree que la amilopectina está ramificada al azar, tiene tres tipos de cadenas: cadenas A, compuestas por glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4; cadenas B compuesta por glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6; y cadenas C de glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 además de un grupo reductor (Hoseney *et al.*, 1991).

Algunos microorganismos fermentadores con capacidad amilolítica contienen dos enzimas que degradan al almidón, la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa, ambas enzimas pueden hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4. La  $\beta$ -amilasa ataca desde los

extremos no reductores exteriores de las moléculas de amilosa y amilopectina, liberando maltosa, pero se detiene cuando alcanza un enlace  $\alpha$ -1,6, la maltosa liberada es el isómero  $\beta$ , la enzima origina una inversión (llamada walden), la maltosa puede ser hidrolizada en glucosa por la maltasa (Huges *et al.*, 2004) (Cheftel *et al.*, 1992). Algunas de las bacterias amilolíticas se describen en la tabla 2.

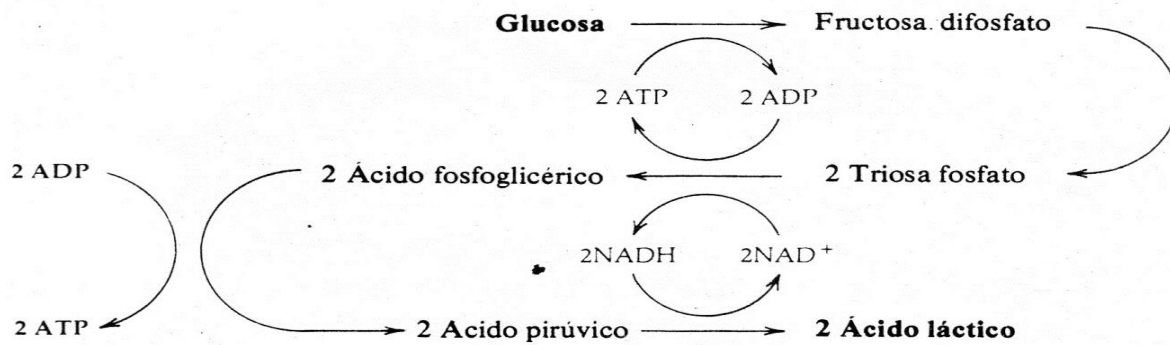
Por el contrario la  $\alpha$ -amilasa ataca la cadena lineal de enlaces  $\alpha$ -1,4 entre los puntos de ramificación, liberando dextrinas más pequeñas y ramificadas con largas cadenas laterales lineales, provocando un descenso rápido de la viscosidad de las soluciones y dando polisacáridos de tamaño pequeño pero con muy pocos disacáridos o glucosa. Estas proporcionan más sustratos para la acción de la  $\beta$ -amilasa. Las amilasas  $\alpha$  y  $\beta$  actuando juntas reducen la amilosa a maltosa, maltotriosa y glucosa, pero la amilopectina da lugar a un aumento de numerosas dextrinas pequeñas ramificadas (Huges *et al.*, 2004).

**Tabla 2. Bacterias Lácticas amilolíticas (Díaz *et al.*, 2003) (Betancourt *et al.*, 2013) (Betancourt *et al.*, 2014).**

Bacteria Láctica Amilolítica	Características encontradas
<i>L. plantarum</i>	Amilolítico, proteolítico, potencial inhibitorio frente a patógenos y hongos, heterofermentativo facultativo.

<i>L. amylophilus</i>	Amilolítico
<i>L. amylovorus</i>	Amilolítico
<i>L. acidophilus</i>	Amilolítico
<i>L. manihotivorans</i>	Amilolítico, homofermentativo
<i>L. fermentum</i>	Amilolítico, heterofermentativo
<i>S. bovis</i>	Amilolítico
<i>S. macedonicus</i>	Amilolítico
<i>L. lactis</i>	Amilolítico, termorresistente
<i>E. sulfureus</i>	Amilolítico
<i>S. infantarius</i>	Amilolítico
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Amilolítico, heterofermentativo

Cuando ya se redujo el almidón a glucosa se lleva a cabo la fermentación de la glucosa a ácido láctico, una fermentación es una reacción de oxidación-reducción interna equilibrada en la que algunos átomos de la fuente de energía se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel sustrato. Una ruta bioquímica muy usada para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también denominada vía de Embden –meyerhof. En la fermentación ácido láctica, la oxidación ocurre como consecuencia directa de la reducción del ácido pirúvico a ácido láctico ( Madigan *et al.*, 2008 ).



**Fig. 3 Fermentación de la glucosa a ácido láctico ( Madigan *et al.*, 2008 ).**

La glucólisis se puede dividir en tres etapas principales, cada una de las cuales comprende una serie de reacciones individuales catalizadas enzimáticamente. La etapa I incluye una serie de reacciones preparatorias que no implican ni oxidación ni reducción y que no liberan energía, pero que conducen a la producción a partir de glucosa de dos moléculas de intermediario clave gliceraldehído-3-fosfato. En la etapa II ocurre un proceso redox, la energía se conserva en forma de ATP, y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III tiene lugar una segunda reacción redox y se originan los productos de fermentación como el ácido láctico ( Madigan *et al.*, 2008 ).

Para el organismo, el producto importante es el ATP, que se usa en multitud de reacciones que requieren energía, y los otros productos de fermentación son



meros productos de desecho. Sin embargo estos últimos no son considerados como tales por los destiladores, cerveceros, productores de derivados de lácteos etc. Por ello la fermentación no es sólo un proceso que produce energía, sino un medio de obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano ( Madigan *et al.*, 2008).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GENERALES**

Caracterizar por medio de métodos dependientes de cultivo a los microorganismos que participan en la fermentación del atole rojo procedente de San Juan Ixtenco, Tlaxcala.

Analizar los cambios fisicoquímicos que se llevan a cabo durante la fermentación del atole.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Utilizando métodos dependientes de cultivo, cuantificar de manera diferencial a las poblaciones microbianas, levaduras, enterobacterias, bacterias lácticas amilolíticas y no amilolíticas, durante la fermentación del atole

Identificar, por medio de pruebas metabólicas, a las levaduras presentes en la fermentación del atole.

Identificar por medio de pruebas metabólicas, a las bacterias aisladas durante el remojo del maíz, la fermentación del atole y en el producto final.

Analizar los cambios químicos como pH, producción de ácido láctico, y producción de azúcares a partir del almidón durante la fermentación del atole rojo.

## **4.MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 TOMA DE MUESTRA**

Las muestras se tomaron el 8 de febrero de 2010.

En tubos Falcon estériles, se tomaron muestras de aproximadamente 20mL del agua de remojo del maíz y de los diferentes tiempos de la fermentación 0, 4, 8, 18, 20h y del producto final

Las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido y se transportaron en un termo, después se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador revco (Harris) hasta su procesamiento.

### **4.2 CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS MICROBIANOS**

Para la cuenta en placa se realizaron diluciones decimales en agua peptonada (Bioxon) estéril al 0.1%. La inoculación de las muestras se realizó por extensión en superficie y vertido en placa, utilizando diferentes medios de cultivo selectivos para la diferenciación y aislamiento de los microorganismos existentes, AN (Oxoid), MRS [(BD difco) 1% agar ( Fluka )], MRSA [1% de peptona (Bioxon), 1% de extracto de carne (Bioxon), 0.5% de extracto de levadura (Bioxon), 2% de almidón (J.T.Baker), 0.1% de tween polisorbato, 0.2% de citrato de amonio (Sigma), 0.5% de acetato de sodio (J.T.Baker), 0.01% de sulfato de magnesio (J.T.Baker), 0.2% de fosfato dipotasico (J.T.Baker), 1% de agar (Fluka)], VRBGA (Oxoid), PDA (Bioxon).

Se inocularon por triplicado, bajo condiciones de asepsia de las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ , y posteriormente las cajas se incubaron en una estufa (Riossa).

**Tabla 3. Condiciones de incubación y características típicas de las colonias para cada medio utilizado.**

Medio	microorganismo	Temperatura incubación °C	Tiempo de incubación	Rango de UFC	Características de las colonias
PDA, papa dextrosa	levaduras	28 °C	3,4 o 5 días	>10 <150	Lisas, de color crema o blanco
VRBGA, bilis, rojo, violeta glucosa	enterobacterias	35-37 °C	18-24 h	0>30 <300	Fermentadoras: color rojo púrpura, no fermentadoras: incoloras
MRS, Man Rogosa Sharpe	Acidolácticas	35-37 °C	24-72 h	>30 <300	Pequeñas, blanco grisáceas, lisas o rugosas
MRSA, almidón	Amilolíticas	35-37 °C	24-72 h	>30 <300	Halo de hidrólisis alrededor de la colonia
AN, agar nutritivo	Mesófilos aerobios	35-37 °C	24-48 h	>25 <250	diversas

### **4.3 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN**

Se tomaron 5 colonias de cada morfología encontrada, tomando como criterio sus características fenotípicas, se purificaron en su correspondiente medio diferencial.

### **4.4 SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS POR TINCIÓN DE GRAM**

Se tomaron colonias aisladas y purificadas de las diferentes morfologías; sobre un portaobjetos, se hizo un frotis de cada colonia, procediendo con el método de la tinción de Gram (Roger *et al.*, 1996).

### **4.5 SEPARACIÓN DE MICROORGANISMOS POR LA PRUEBA DE CATALASA**

De la misma colonia usada para la tinción de Gram, se realizó otro frotis, se agregó a cada uno, una gota de peróxido de hidrógeno para clasificar a las catalasa positivo de las negativo ( Mac Faddin *et al.*, 2003)

### **4.6 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO**

#### **4.6.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA BACTERIAS LÁCTICAS API 50 CH**

De cada cepa aislada se tomó una asada y se incubaron en agar MRS por 24 h a 27°C, las colonias de 24h de incubación, se lavaron con agua destilada estéril centrifugando durante 10 min a 13000 revoluciones por minuto en una micro centrifuga (Eppendor centrifuge 5417 R), se realizó una suspensión de las bacterias en una solución de cloruro de sodio con una turbidez igual a la del

patrón 2 de McFarland. Se preparó la solución correspondiente con el inóculo de cada cepa de las bacterias, se llenó cada cúpula de la galería y se incubó por 48 h a 27°C. Se registró el crecimiento a las 24 y 48 h observándose las pruebas positivas comparativamente con el control. Los resultados se reunieron en un patrón de datos y se verificó su identidad en el API web.

#### **4.6.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ENTEROBACTERIAS API 20 E**

De cada cepa aislada se tomó una asada y se incubó en medio VRBGA por 24 h a 27°C, las colonias de bacterias jóvenes de 18-24 h se lavaron con agua destilada y se centrifugaron durante 10 min a 13000 revoluciones por minuto en una micro centrífuga (Eppendor centrifuge 5417 R), se realizó una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio con 0.85 % de cloruro de sodio. Se llenaron las cúpulas de la galería, teniendo en cuenta las especificaciones de llenado para cada prueba. Se incubaron a 36°C por 24 h, se realizó la lectura de la galería utilizando los reactivos correspondientes que indican pruebas positivas comparándose con el control. Los resultados se reunieron en un patrón de datos y se verificó su identidad en el API web.

#### **4.6.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LEVADURAS API 20 C AUX**

Se tomó una asada de cada una de las diferentes cepas aisladas tomando como referencia sus características fenotípicas, se incubaron a 29°C en medio PDA, las colonias de levaduras jóvenes (24 h dependiendo del crecimiento hasta 48 h) se lavaron con agua destilada estéril centrifugando durante 5 min a

velocidad de 13000 rpm en una micro centrifuga (Eppendor centrifuge 5417 R), se realizó una suspensión de las levaduras en una solución de 0.85 % de cloruro de sodio con una turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. Después de preparar el inóculo con los medios indicados para las tiras, se procedió a llenar cada cúpula, se incubó a 30°C durante 48-72 h. La turbidez en los medios se registró después de 48 y 72 h de incubación, el crecimiento de las levaduras se observó comparativamente en la cúpula de control. Los resultados se reunieron en un patrón de datos y se verificó su identidad en el API web.

#### **4.7 MEDICIÓN DEL CAMBIO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGUNOS CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN**

Cada muestra se centrifugó durante 20 minutos a 14000 rpm para quitar microorganismos y proteínas presentes en la muestra. Se hizo una microfiltración utilizando un microfiltro de tamaño de poro de 0.4  $\mu\text{m}$ .

Para medir el cambio de la concentración de los carbohidratos, las muestras de los diferentes tiempos se congelaron y descongelaron por tres días en un ultracongelador para que coagulen y precipiten las proteínas, se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos para quitar microorganismos y proteínas presentes en la muestra, y después se filtraron a través de un microfiltro de tamaño de poro de 0.4  $\mu\text{m}$ , para asegurar una eliminación total de los microorganismos y las proteínas.

Se utilizó el equipo para HPLC (Waters) con una bomba (Waters 1525 Binary HPLC Pump) y con un detector (Waters 2414 Refractive index Detector), se colocaron las muestras en los tubos, se utilizó una columna para carbohidratos (sugarpack) con las condiciones de temperatura a 80°C y una fase móvil de agua, se hicieron las curvas patrón de glucosa, maltosa, maltotriosa, maltopentosa y maltohexosa, para obtener la cantidad de cada uno y ver cuales se encontraban en los diferentes tiempos de la fermentación.

#### **4.8 TITULACIÓN DE LA ACIDEZ DURANTE LA FERMENTACIÓN**

Las muestras de los diferentes tiempos de la fermentación se trataron con carbón activado para eliminar a las antocianinas presentes causantes del color rojo en el atole. Se tituló en un matraz Erlenmeyer de 50mL 1mL de muestra con hidróxido de sodio 0.1N en una bureta de 25mL, como indicador se utilizó fenolftaleína, se agregó hidróxido de sodio hasta que se observó el vire del indicador a color rosa. (Apéndice D)

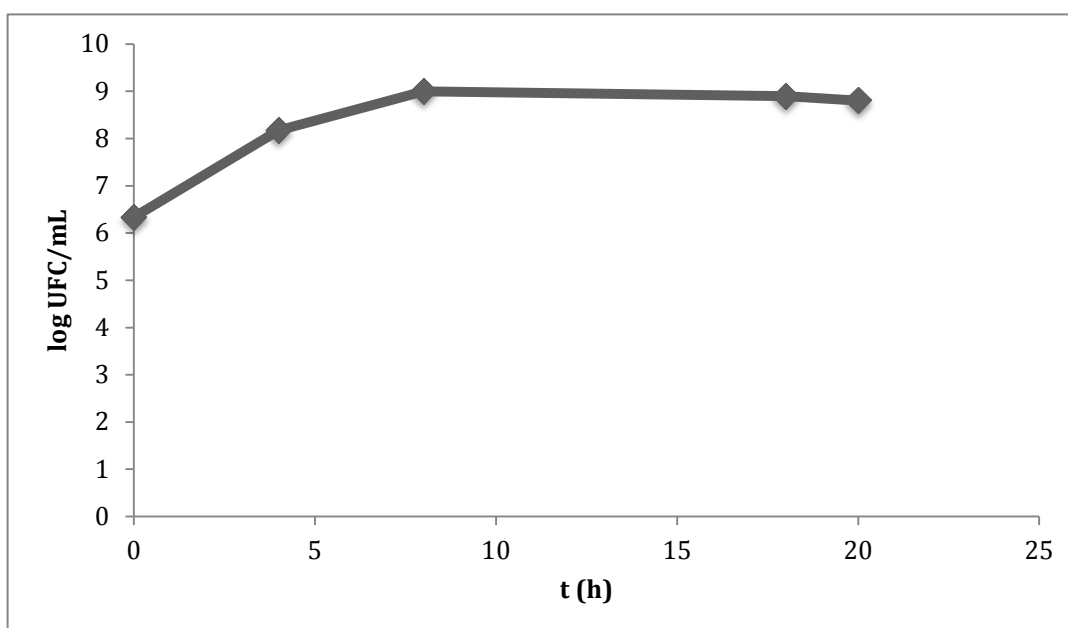
#### **4.9 MEDICIÓN DEL PH CON POTENCIÓMETRO**

Se colocaron 10mL de muestra de cada etapa de la fermentación en un vaso de precipitados de 50mL y se midió el pH con un potenciómetro (Accument AB 15), se registró el valor de pH directamente del potenciómetro.



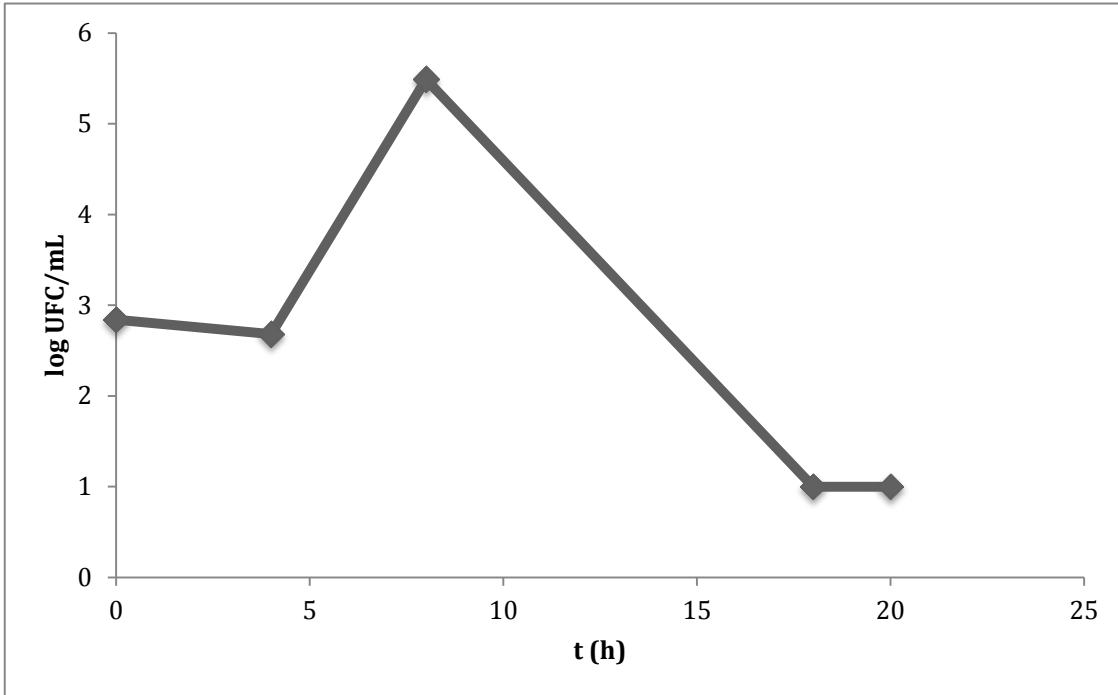
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó cuenta en placa del crecimiento de los microorganismos en los diferentes medios. A las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación. En todos los casos se consideraron placas mayores a 30 y menores a 300 UFC.



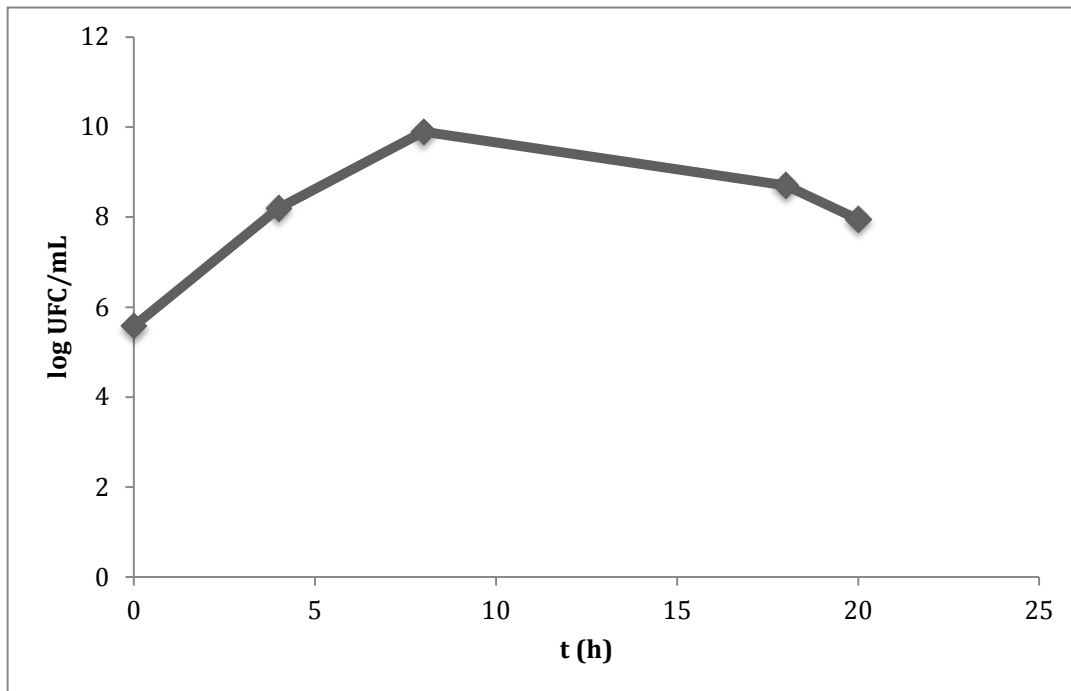
**Gráfico 1. Cuenta en placa en MRS de las bacterias lácticas durante las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación del atole.**

Se muestra una cuenta alta, no se observa la fase de latencia o lag, inician inmediatamente con la fase de crecimiento exponencial o log entre las 0 y 18 h llevando simultáneamente la fermentación, a partir de las 18 h comienza la fase estacionaria.



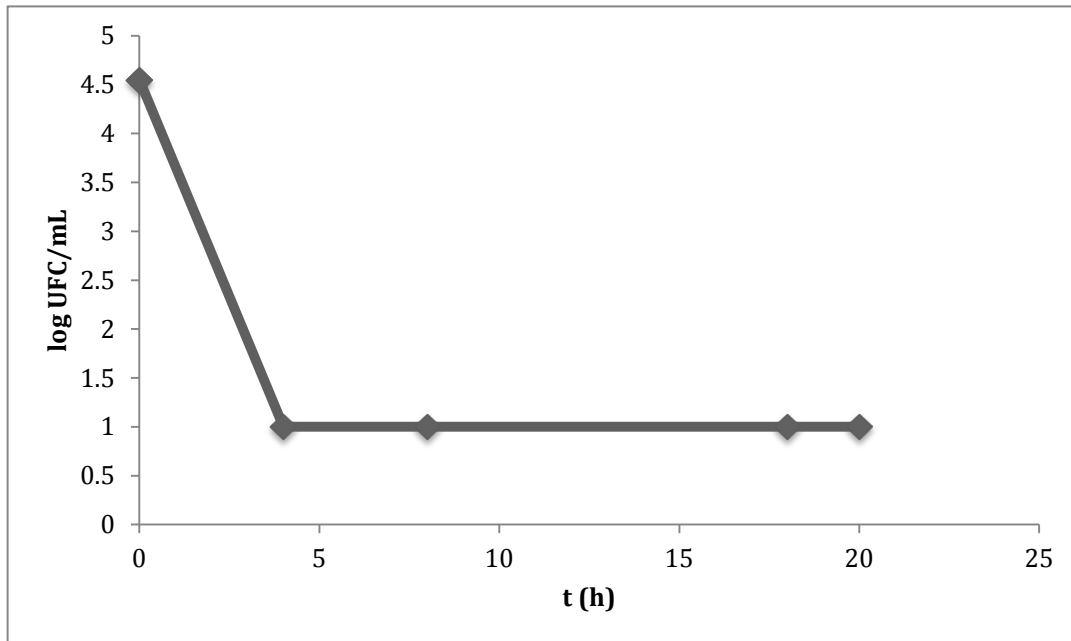
**Gráfico 2. Cuenta en placa en PDA de las levaduras durante las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación del atole.**

En el medio PDA que es diferencial para levaduras ya que está acidificado, se pueden apreciar 3 fases de crecimiento bacteriano, comenzando con la fase lag de las 0 a las 4 h, de las 4 a las 8 h se inicia con la fase log y a partir de las 8 h se observa que pasan directamente a las fase de muerte, no dando oportunidad a la fase estacionaria.



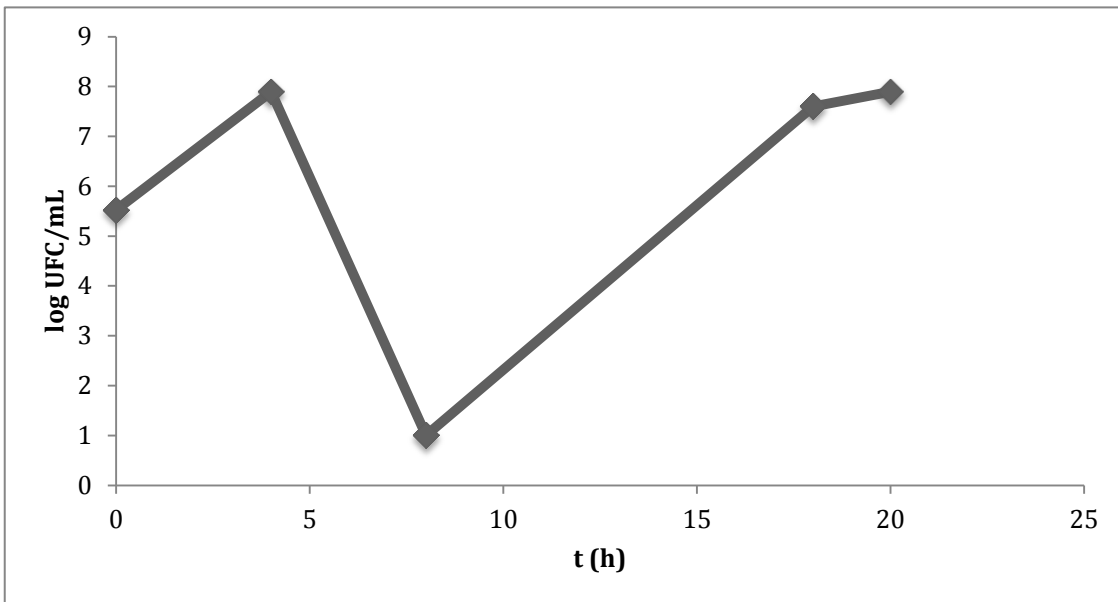
**Gráfico 3. Cuenta en placa en AN de mesófilos aerobios durante las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación del atole.**

El medio AN es para el crecimiento de mesófilos aerobios, este gráfico muestra que los microorganismos empezaron con la fase log de las 0 a las 8 h seguido por la fase de muerte, aunque no es tan marcado de las 8 a las 18 h, teniendo otro descenso de las 18 a las 20 h.



**Gráfico 4. Cuenta en placa en VRBGA de enterobacterias durante las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación del atole.**

En este gráfico se observa un comportamiento ideal, ya que desde las 0 h inicia con la fase de muerte de las enterobacterias, manteniendose este comportamiento hasta el final de la fermentación.



**Gráfico 5. Cuenta en placa en MRSA de bacterias lácticas amilolíticas durante las 0, 4, 8, 18 y 20 horas de la fermentación del atole.**

En este medio que es especial para bacterias lácticas se agregó almidón, para ver la actividad enzimática de las bacterias amilolíticas, por lo que las UFC que se tomaron para el conteo son las que mostraban un halo de hidrólisis que son las que tienen la producción de la enzima, al inicio de la fermentación hay una alta actividad enzimática, debido a que en el medio hay almidón disponible, generando glucosa, después de la 4 horas de fermentación, pasando este punto se muestra un descenso y esto se debe a que la enzima no se transcribe, hay una represión catabólica ya que hay una fuente de carbono más fácil de digerir que es la glucosa y la maltosa, cuando el sustrato comienza a disminuir, se vuelve a observar un incremento en la actividad enzimática a partir de las 8 h.

En los gráficos podemos observar el comportamiento del crecimiento de los microorganismos encontrados durante la fermentación del atole, en el gráfico 1 al igual que en el gráfico 5 podemos ver que las bacterias lácticas y las amilolíticas respectivamente, comienzan inmediatamente con la fase log, ya que las condiciones son óptimas para su crecimiento, no habiendo necesidad de la fase lag o período de adaptación (Madigan *et al.*, 2008).

En el gráfico 2, se muestra que la fase lag de las levaduras es de las 0 a las 4 h ya que solo hay almidón en el medio y no lo pueden usar como fuente de energía, la fase log es de las 4 a las 8 h y esto va ligado a la actividad enzimática de las bacterias amilolíticas, ya que en el gráfico 5, que es donde se aprecia su actividad enzimática, de las 0 a las 4 h de la fermentación hay una alta actividad de las bacterias amilolíticas, están llevando a cabo la degradación del almidón a glucosa, este aumento se puede apreciar en el gráfico 7, la glucosa la utilizan las levaduras, las bacterias lácticas y las amilolíticas como fuente de carbono, entrando en un estado de competencia, en este punto disminuye considerablemente la glucosa, que se aprecia en el gráfico 7, dejando a las levaduras sin una fuente de carbono biodisponible, ya que en el medio queda en su mayoría almidón, provocando que a las 8 h las levaduras entren en la fase de muerte (Ampe *et al.* 1999) ( Tortora *et al.* 1993).

En el gráfico 4 se observa que desde el inicio de la fermentación entran directamente a la fase de muerte, debido a que la membrana de las Gram- son susceptibles a la disminución del pH, ya que en ese lugar se llevan funciones celulares esenciales, la célula al intentar mantener su pH interno por medio de

la expulsión de protones que se producen en su interior debido al medio ácido en el que se encuentran, enlentecerá el crecimiento de la célula ya que desvía la energía de las funciones relacionadas con el crecimiento, conforme disminuye el pH extracelular, el pH del citoplasma disminuye hasta un valor en el que el crecimiento ya no es posible y la célula muere (Adams *et al.*, 1997) (Ampe *et al.*, 1999).

Para la identificación de bacterias lácticas en las tiras API se escogieron 15 colonias que presentaron un Gram positivo y catalasa negativo.

**Tabla 4. Bacterias lácticas identificadas en las diferentes etapas de la fermentación con API 50 CH**

Etapa de la fermentación	Cepa	Microorganismos identificados % id
AR	1	<i>Carnobacterium divergens</i> 99.9%
	2	<i>Pediococcus pentosus</i> 84.3 %
	3	<i>Lactobacillus plantarum</i> 99.8%
T0	4	<i>Lactobacillus brevis</i> 70%
	5	<i>Lactobacillus pentosus</i> 98.6%
	6	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> 96.7%
	7	<i>Leuconoctoc mesenteroides mesenteroides dextranum</i> 99.9%
	8	<i>Lactobacillus plantarum</i> 98.3 %
T2	9	<i>Lactobacillus lindneri</i> 68.8 %
	10	<i>Lactobacillus pentosus</i> 83.2 %
	11	<i>Lactobacillus plantarum</i> 90.8 %
T4	12	<i>Lactobacillus brevis</i> 99.4 %
	13	<i>Lactobacillus lactis lactis</i> 92.7 %



	14	<i>Lactobacillus plantarum</i> 95.2 %
	15	<i>Lactobacillus pentosus</i> 84.3 %

AR= agua de remojo, T0= inicio de la fermentación, T2= 8 h de fermentación, T4= 20 h de fermentación.

Las bacterias lácticas que se identificaron en las diferentes etapas del atole se han encontrado en diferentes alimentos fermentados de maíz de diversas comunidades, y son de gran importancia en la industria láctea como *L. delbrueckii* y cárnica como *C. divergens* ya que confieren al producto final propiedades organolépticas específicas como vida de anaquel gracias a que no pueden desarrollarse microorganismos contaminantes o patógenos por las condiciones que crean en el medio. En todas las etapas de la fermentación incluida el agua de remojo el microorganismo que predomina es *Lactobacillus plantarum* con un ID arriba del 90% este microorganismo es de los más estudiados, ya que dentro de sus características más importantes destacan que es amilolítico, proteolítico, tiene un potencial inhibitorio contra patógenos y hongos y es heterofermentador por lo que lo convierte en uno de los microorganismos más importantes en este proceso ya que es iniciador de la hidrólisis del almidón, lo que da lugar al desarrollo de otras bacterias lácticas. Tenemos otras bacterias amilolíticas, al inicio de la fermentación se identificó a *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides dextranum* con un ID del 99.9% y a las 20 h a *L. lactis lactis* con un ID del 92.7% (Betancourt *et al.*, 2013) (Díaz *et al.*, 2003) (Betancourt *et al.*, 2014).

Para la identificación de las levaduras se escogieron colonias con diferentes características morfológicas y de crecimiento del medio selectivo para levaduras PDA.

**Tabla 5. Levaduras identificadas en las diferentes etapas de la fermentación con API 20 C AUX**

Etapa de la fermentación	Cepa	Microorganismo encontrado
AR	1	<i>Candida kefir</i>
To	2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
T1	3	<i>Rhodotorula mucilaginosa,</i>
	4	<i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Candida kefir</i>
T2	5	<i>Candida kefir,</i>
	6	<i>Cryptococcus laurentii</i>
T3	7	<i>Cryptococcus laurentii</i>

AR= agua de remojo, T0= inicio de la fermentación, T1= 4 h de fermentación, T2= 8 h de fermentación, T3= 18 h de fermentación.

Se identificaron únicamente tres levaduras en agua de remojo y a las 4,8, y 18 h de la fermentación, a las 20 h ya no se registró crecimiento, debido a que se genera competencia por el sustrato con las bacterias acidolácticas. *Candida kefir* se encontró en el agua de remojo y a las 4 y 8 h de la fermentación, esta es una levadura fermentadora que se utiliza en fermentación industrial para producir xilitol y etanol. *Rhodotorula mucilaginosa* solo se identificó al inicio de la fermentación y a las 4 h no es fermentadora y se considera una levadura ubicua capaz de colonizar ambientes naturales y artificiales, es de interés industrial por sus pigmentos carotenoides, por lo que resulta de interés ampliar este estudio para confirmar la presencia de carotenoides producidos por esta levadura. *Criptococcus laurentii* se identificó a las 4,8 y 18 h de la fermentación no es fermentadora y es una levadura que se encuentra en vegetales y en agua, estas dos últimas pueden causar infecciones solo en individuos inmunocomprometidos. (Reyes *et al.*, 2014; Robles *et al.*, 2012; Guamán *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014)

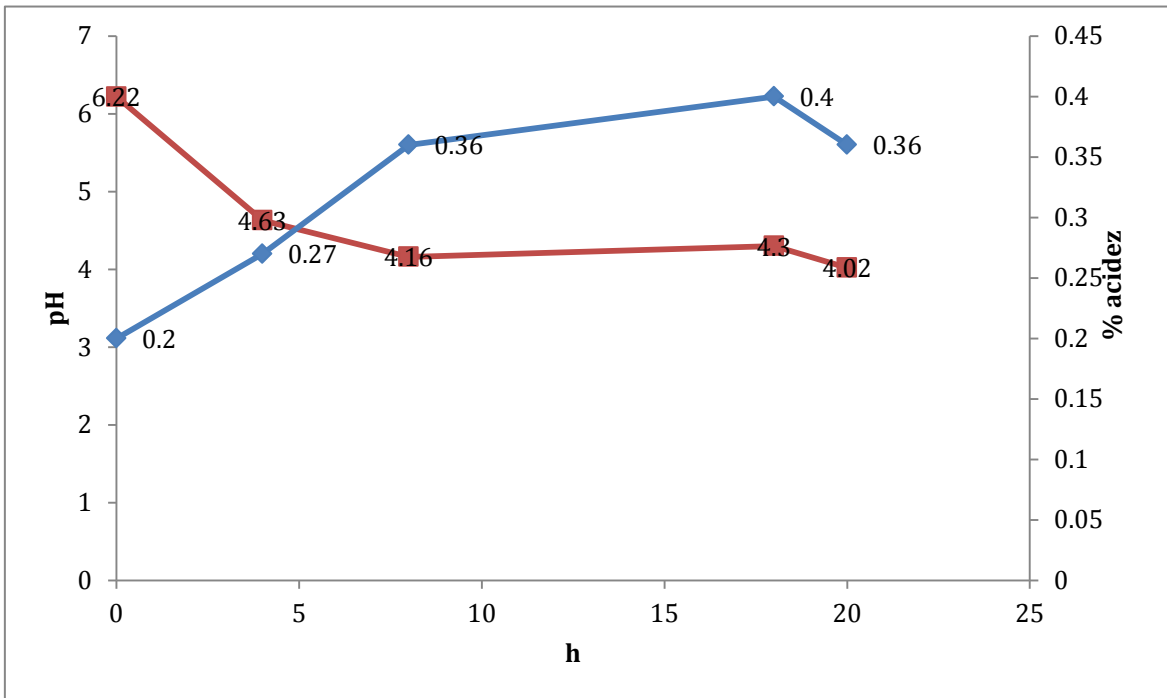
Para identificar a las enterobacterias, se tomaron las colonias con diferentes características morfológicas y de crecimiento en el medio selectivo VRBGA.

**Tabla 6. Enterobacterias identificadas en las diferentes etapas de la fermentación con API 20 E. PF= producto final.**

Etapa de la fermentación	Cepa	Microorganismos encontrados %id
AR	1	<i>Pantoea spp</i> 98.9 %
T0	2	<i>Rahnella aqualitis</i> 70 %
	3	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> 99.9%
	4	<i>Pantoea spp</i> 99.6 %
T1	5	<i>Klebsiella oxytoca</i> 98 %
T4	6	<i>Klebsiella oxytoca</i> 98 %
PF	7	<i>Ent. sakazakii</i> 98.4 %

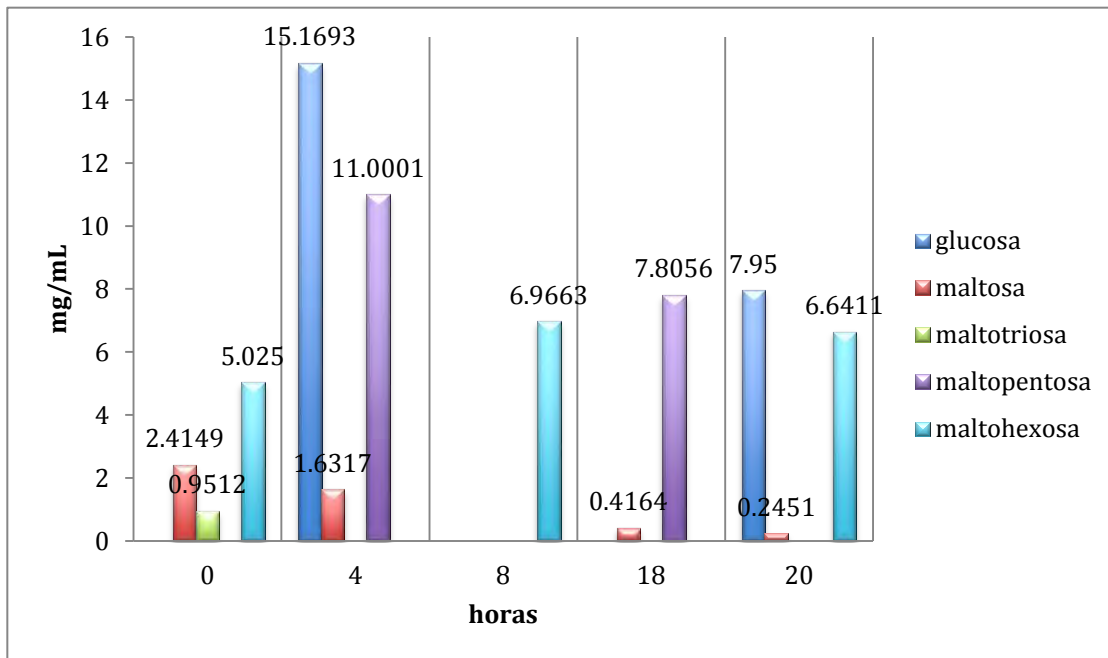
AR= agua de remojo, T0= inicio de la fermentación, T1= 4 h de fermentación, T4= 20 h de fermentación, PF= producto final.

Las enterobacterias encontradas con un ID arriba del 90 % durante la fermentación del atole no se consideran patógenas, además que después de las condiciones ácidas y del tratamiento térmico final ya no se encuentran en el producto final. En este caso la enterobacteria de mayor interés es *Ent. sakazakii* ya que se identifica en el producto final con un ID del 98.4 %, este microorganismo está asociado a enfermedad en neonatos y lactantes, en general, *Enterobacter* es un patógeno oportunista de ambientes hospitalarios y las infecciones más frecuentemente producidas son las urinarias, en torrente circulatorio, respiratorias, quemaduras, etc. Aunque este microorganismo puede ser destruido con tratamiento térmico, resulta de interés investigar la fuente de contaminación, ya que esta enterobacteria se relaciona con enfermedades en los lactantes (Domínguez *et al.*, 2004) (Tennessee *et al.*, 2001).



**Gráfico 6. Cambio de pH y acidez durante la fermentación del atole.**

En este gráfico podemos observar la relación inversamente proporcional que existe entre la acidez y el pH, ya que a medida que aumenta el porcentaje de acidez durante la fermentación, el pH disminuye, debido al ácido láctico producido durante la fermentación por las bacteria acidolácticas (Adams *et al.*, 1997).



**Gráfico 7. Cambio de la concentración de los carbohidratos durante la fermentación del atole, por medio de HPLC.**

En este gráfico podemos observar la concentración de algunos carbohidratos que se encuentran en los diferentes tiempos de la fermentación, el carbohidrato que presenta un cambio más significativo es la glucosa, a las 0 h de la fermentación no hay glucosa disponible, en este punto empieza la actividad enzimática de las bacterias amilolíticas degradando el almidón a glucosa, a las 4 h se observa que hay glucosa disponible, la cual utilizan los microorganismos que se encuentran en el atole, ya que hay suficiente glucosa disponible, las bacterias amilolíticas dejan de producirla por una represión enzimática, cuando ya no hay glucosa disponible, la actividad enzimática de las bacterias amilolíticas vuelve a degradar el almidón, se observa este aumento a las 18 h (Madigan et al., 2008) ( Tortora et al., 1993).

## 6. CONCLUSIONES

- Se cuantificó la microbiota durante la fermentación del atole rojo, encontrándose una disminución de levaduras y de enterobacterias, manteniendo una concentración elevada de las bacterias lácticas.
- Se seleccionaron colonias por sus características fenotípicas para aislamiento y purificación, durante la fermentación del atole, se realizaron las pruebas metabólicas encontrándose una microbiota en el atole muy compleja por ser una fermentación abierta ya que se relacionaron diversos grupos microbianos tales como levaduras, entre las que se encontraron *Candida kefir*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus laurentii*, enterobacterias entre las que se encontraron *Pantoea spp*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, y en el producto final *Ent. sakazakii* y las bacterias lácticas *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides dextranum*.
- El aumento de la acidez y la consecuente disminución del pH durante la fermentación del atole, contribuyeron a la disminución de las enterobacterias.
- Por medio de HPLC pudimos observar los cambios en los carbohidratos en cada etapa de la fermentación, se registraron los cambios en la acidez por la producción de ácido láctico y la disminución del pH durante la fermentación.



## 7. APÉNDICE

### Apéndice A Tinción de Gram

- 1.- Hacer un frotis de la muestra sobre un portaobjetos y fijarlos por calentamiento.
- 2.- Agregar una gota de cristal violeta por 1 minuto, que se denomina tinción primaria.
- 3.- Lavar con agua hasta que ya no salga colorante.
- 4.- Cubrir la extensión con yodo por 3 minutos que es un mordente y su función es la de formar compuestos insolubles a disolventes orgánicos como el alcohol acetona, con colorantes y determine su fijación a las células.
- 5.- Lavar con agua.
- 6.- Lavar con alcohol acetona por 30 segundos, que es un agente decolorante que elimina el color a morado de algunas especies, en este punto se pueden apreciar que las células Gram positivos son púrpura y las Gram negativos son incoloras.
- 7.- Lavar con agua.
- 8.- Aplicar un colorante de contraste como la safranina por 1 o 2 minutos por lo que se apreciaran de color rojo.
- 9.- Lavar con agua.

10.- Secar. Agregar una gota de aceite de inmersión, observar al microscopio con un objetivo 100x. (Roger *et al.*, 1996)

### Apéndice B patrón de McFarland

El patrón de McFarland se utilizó como patrón de turbidez para la preparación de la suspensión de microorganismos con que se inocularon las galerías API para lo cual se utilizó el patrón 2.

Los patrones se preparan añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario que produce la formación de sulfato de bario suspendido.

Escala de McFarland	BaCl <sub>2</sub> al 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1% (ml)	UFC/ml (x10 <sup>8</sup> )
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,8	9,1	27
10	1,0	9,0	30

### Apéndice C inoculación de las galerías API

Para inocular las diferentes galerías API 20 E, API 50 CH, API 20 C AUX:

Repartir la suspensión bacteriana con la ayuda de una pipeta estéril en todos los tubos de la galería teniendo en cuenta las precauciones siguientes:

Inclinar ligeramente hacia adelante la cámara de incubación.

Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.

Cuando sólo se inocule el tubo, no rebasar el límite superior del mismo con el fin de conservar una buena anaerobiosis.

Cuando el tubo y la cúpula deban llenarse correctamente, evitar la formación de un menisco cóncavo o convexo.

Incubar las galerías a temperatura óptima según el microorganismo en estudio.

#### **Apéndice D Fórmula para cuantificar el Ácido Láctico**

$$\% \text{Ac Lác} = \frac{\text{N NaOH} \times \text{PM Ac Lac} \times \text{mL NaOH}}{1 \text{ mL}}$$

**N NaOH** = Normalidad del hidróxido de sodio = 0.1

**PM Ac Lac** = Peso Molecular del ácido láctico = 0.09

**mL NaOH** = mililitros de hidróxido de sodio utilizados en la titulación

## Apéndice E Curvas patrón utilizadas para la cuantificación de azúcares en el HPLC

Curvas patrón para el HPLC ejemplo de cálculos:

Tabla 7. Tiempos de retención y áreas bajo la curva patrón de glucosa. Se midieron en el HPLC los tiempos de retención de cada uno de los compuestos así como el área bajo la curva. Esto se realiza en diferentes concentraciones para poder obtener una curva patrón de cada compuesto.

Gluc 0.5 mg		Gluc 5 mg		Gluc 10 mg		Gluc 15 mg		Gluc 20 mg		Gluc 25 mg	
t. retención	área	t. retención	área	t. retención	área	t. retención	área	t. retención	área	t. retención	área
12.933	38,453	13.008	937,743	12.998	1,869,246	12.939	2,928,879	12.91	3,693,741	12.92	4,322,995
12.994	38,647	13.008	936,759	12.989	1,798,654	12.94	2,875,837	12.915	3,764,746	12.923	4,432,764
12.993	38,657	13.006	933,749	12.99	1,787,937	12.941	2,987,784	12.913	3,694,776	12.921	4,382,746
Prom. 12.973	38,585	13.007	936,083	12.992	1,818,612	12.94	2,930,833	12.912	3,051,087	12.921	4,379,501

Tabla 8 . Concentración de glucosa y promedios de área para realizar la curva patrón de sacarosa. Se obtienen los promedios de las áreas bajo la curva de cada concentración para graficar las curvas patrón.

Gluc. (mg/mL)	Áreas promedio
0.5	38,585
5	936,083
10	1,818,612
15	2,930,833
20	3,051,087
25	4,379,501

Se obtuvieron las siguientes curvas patrón para la determinación de azúcares durante la fermentación del atole rojo, utilizando la ecuación de la recta para obtener los mg/mL de cada azúcar en cada tiempo de la fermentación.

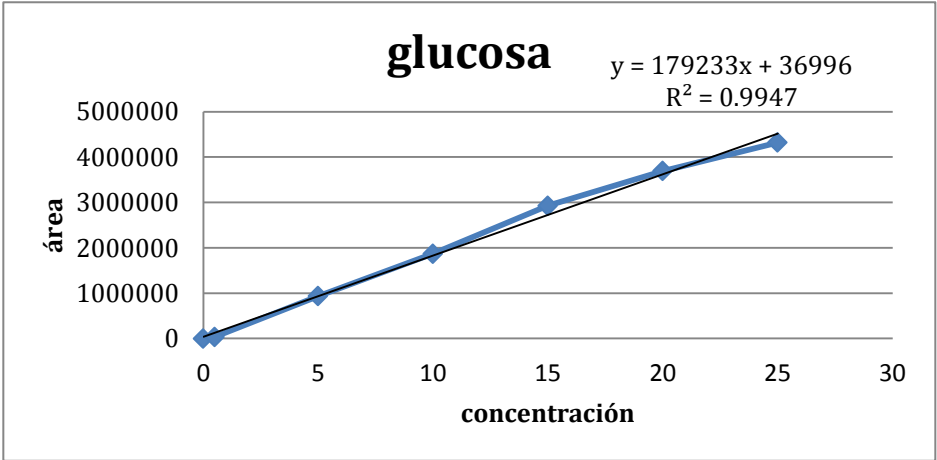


Gráfico 8. Curva patrón de glucosa

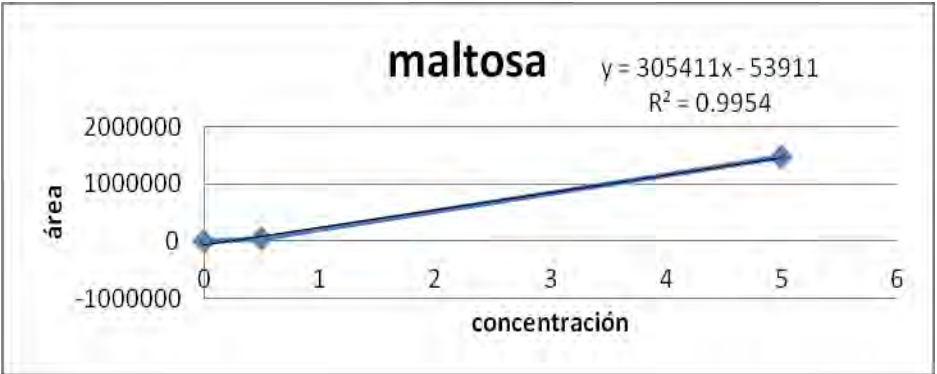


Gráfico 9. Curva patrón de maltosa

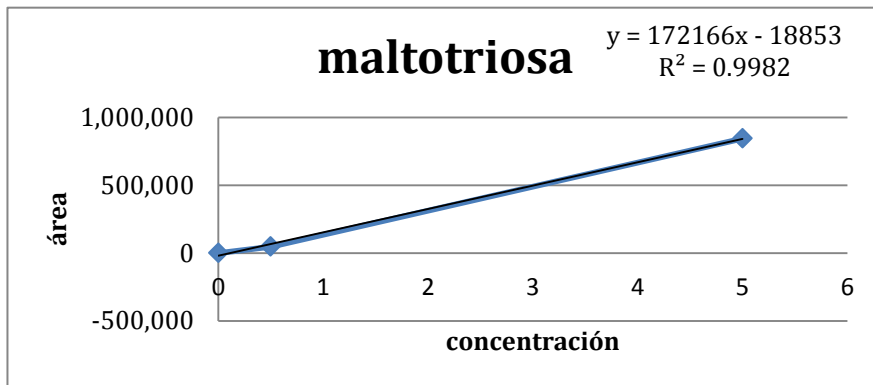


Gráfico 10. Curva patrón de maltotriosa

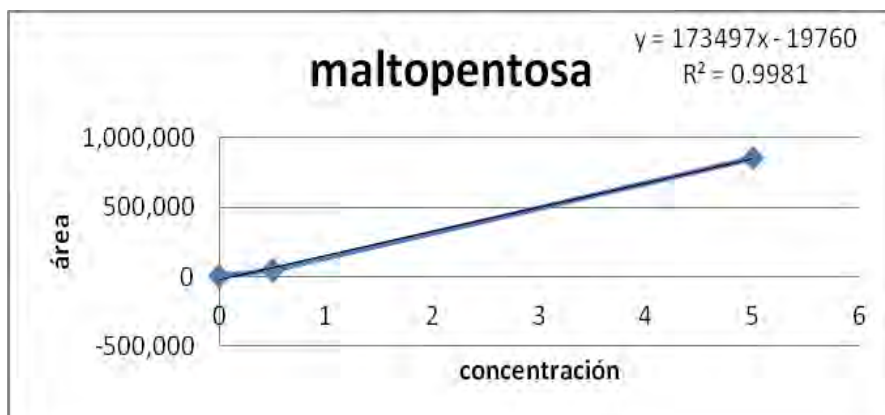


Gráfico 11. Curva patrón de maltopentosa

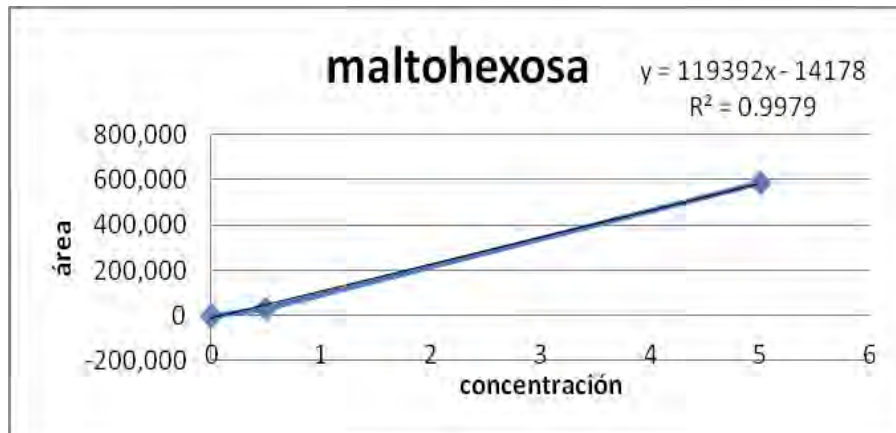


Gráfico 12. Curva patrón de maltohexosa



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abriouel Hikmate, Ben Omar Nabil, Lucas López Rosario, Martínez-Ca. amero Magdalena, Keleke Simón, Gálvez Antonio (2005). Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and dégué by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111: 228–233.

Adams M.R., Moss M.O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. Acribia, S.A. Zaragoza España.

Ampe Frédéric, Ben Omar Nabil, Moizan Claire, Wachter Carmen, Jean – Pierre Guyot (1999). Polyphasic Study of the Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the need for Cultivation – Independent Methods to Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 5464-5473.

Betancourt Sandra P., Bolívar Germán A., Ramírez Cristina (2013). Fermentación de maíz de alta calidad proteica con *L. plantarum* (CPQBA087-11 DRM) aislado en Colombia de masas tradicionales fermentadas. *Revista Argentina de microbiología*. 282-283.

Betancourt Sandra P., Ayala Alfredo, Ramírez Cristina (2014). Efecto del proceso de fermentación con bacterias acidolácticas sobre propiedades reológicas de masas de maíz QPM. *17(2)*: 503-511.

Bourgeois C. M., Carpent J. P. (1995). Microbiología Alimentaria volumen II. Acribia, S.A. Zaragoza España.

Brock Thomas D., Madigan Michael T. 2008. Microbiología 6<sup>a</sup> edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

Camacho de la Rosa Norma Angélica, Díaz Gutiérrez Karla, Santillana Hinojosa María del Rocío, Velázquez Madrazo Olga del Carmen (2007). Productos de cereales y leguminosas. Manual de prácticas 4<sup>a</sup> edición. Comité editorial de la Facultad de Química.

Chávez-López Clemencia, Serio Amalisa, Delgado-Ospina Johannes, Rossi Chiara, Grande-Tovar Carlos D., Paparella Antonello (2016). Exploring de Bacterial Microbiota of Colombian Fermented Maize Dough “masa agria” (Maíz Añejo). Frotiers in Micrbiology.

Cheftel Jean-Claude (1992). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia Zaragoza España.

Dendy David A.V., PhD, Dobraszczyk Bogdan J., PhD (2004). Cereales y productos derivados. Acribia, S.A. Zaragoza España.

De Oliveira Faria Gabriel, Goncalves Martins Adriana, Amante Benatli Mario Paulo (2014). Características in vitro de aislados do complexo *Cryptococcus laurentii* em diferentes meios de cultura. 43(3):290-302.

Díaz-Ruíz G., Guyot J.P., Ruíz Terán F., Morlon-Guyot J., Wachter C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylyolytic but Fast-

Growing Lactic acid Bacteria: A Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. 4367-4374.

Domínguez O., Hernández JC., Piedrahíta N., Saldarriaga N, Vanegas DM., González JC. (2004) Epidemiological profile of enterobacter infections in the clinica cardiovascular in Medellin.

*Enterobacter sakazakii* infections Associated with the use of powdered infant formula. Tennessee, 2001.

Edema Mojisola O., Sanni Abiodun I. (2008). Functional Properties of Selected Starter Cultures four Sour Maize Bread. *Food Microbiology*. 25:616-625.

Esquivel Medina Alicia Karina (2012). Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa Tabasco.

Fennema Owen R. (1993). *Química de los Alimentos*. Acribia, S.A., Zaragoza España.

Gamazo Carlos, López-Goñi Ignacio, Díaz Ramón (2005). *Manual Práctico de Microbiología* 3ª edición. Masson.

Guadarrama Orozco Katya Dafne (2007). Tipificación de bacterias lácticas aisladas del Axocotl, atole agrio de la sierra norte de Puebla, por medio de Ardra.

Guamán-Buneo Cristina, Carvajal-Barriga Javier (2009). Characterization and identification of isolates of carotenogenic yeast strains from several natural zones of Ecuador.

Hoseney R. Carl (1991). Principios de Ciencia y tecnología de los cereales. Acribia, S.A. Zaragoza España.

Hughes Paul S. (2004). Cerveza calidad e higiene y características nutricionales. Acribia.

Jay James M. (1994). Microbiología moderna de los alimentos. Acribia S.A. Zaragoza España.

Kanpiengjai Apinun, Rieantrakoonchai Wannisa, Pratanaphon Ronachai, Pathom-aree Wasu, Lumyong Saisamorn and Khanongnuch Chartchai (2014). High Efficacy Bioconversion of starch to LActic Acid Using an Amylolytic Lactic Acid Bacterium from Thai Indigenous Fermented Rice Noodles. Food Sci. Biotechnol. 23(5): 1541-1550.

Lahtinen Sampo, Ouwehand Arthur C., Seppo Salminen, Atte VonWright (2012). Lactic Acid Bacteria Microbial and Functional aspects. Fourth edition.

Libkind D. (2007). Evaluación técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia occidental.

Lorenz Klaus J., Kulp Karel (1991). Handbook of Cereal Science and Technology. Marcel Dekker, INC.

Madigan Michael T., Martinko John M., Parker Jack (2008). Brock Biología de los microorganismos 10<sup>a</sup> edición. Pearson Prentice Hall.

Mossel D.A.A., Moreno García B y Sttuij K C.B.. (2003). Microbiología de los Alimentos. Edit. Acribia.

Nguyen Thi Thanh Thuy, Loiseau Gérard, Icard-Vernière Christèle, Rochette Isabelle, Serge, Guyot Jean-Pierre (2007). Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: A new method for preparing high energy density complementary foods for young children. Food Chemistry. 100:623-631.

Mc Faddin Jean F (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias 3<sup>a</sup> edición. Médica Panamericana.

Olivares – Illana V, Wachter – Rodarte Carmen, Le Borgne S, López – Munguía A (2002). Characterization of a cell – associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. Journal industrial Microbiology & Biotechnology. 28:112-117.

Ben Omar Nabil, Ampe Frédéric (2000). Microbial community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. Applied and Environmental Microbiology. 3664-3673.

Omemu A.M., Oyewole O.B., Bankole M.O. (2007). Significance of yeast in the Fermentation of maize for Ogi Production. Food Microbiology. 24:571-576.

Osorio-Cadaud Esteban, Chaves-López Clemencia, Tofalo Rosanna, Paparella Antonello, Suzzi Giovanna (2008). Detection and Identification of Wild Yeast in Champus, a fermented Colombian maize Beverage. *Food Microbiology*. 25:771-777.

Reddy Gopal, Altaf Md., Naveena B.J., Venkateshwar M., Vijay Kumar E. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – a review. *Biotechnology Advances*. 26: 22-34.

Reyes Pineda Henry, Rosero Bibiana, Cardona Carolina (2014). Determinación de la eficiencia del proceso de fermentación realizado por las levaduras *Candida kefyr* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de xilitol. P.34-42.

Robles Castillo Heber, Miranda Chávez Helí, Lora Carmen (2012). Isolation of yeast producing ethanol from chicha de jora from Mayorista market Trujillo Peru. 32 (2):48:55.

Salminen Seppo, Atte Von Wright (1998). *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspect*. Marcel Dekker INC.

Stainer Roger Y., Ingraham John C., Wheelis Mark L., Painter Page R. (1996). *Microbiología* 2ª edición. Reverté S.A. España.

Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L. (1993). *Introducción a la microbiología* 3ª edición. Acribia S.A. Zaragoza España.

Wacher Carmen, Cañas Ana, Bárzana Eduardo, Lappe Patricia, Ulloa Miguel,  
Owens David (2000). Microbioly of Indian and Mestizo pozol fermentations.  
Food Microbiology. 17:251-256.