



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**"CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL ATOLE
AGRIO DE MAÍZ"**

TRABAJO RECEPCIONAL QUE PRESENTA:

JADE ISABEL DAMIÁN NOTARIO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

BAJO LA MODALIDAD DE:

TESIS

ASESORAS:

M.A. JUDITH ESPINOSA MORENO

M.C. DORA CENTURIÓN HIDALGO

ASESORA EXTERNA:

DRA. MARIA DE LOS DOLORES REYES DUARTE

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **“Caracterización Microbiológica del Atole Agrio de Maíz”**, de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 30 días del mes marzo del año dos mil doce.

AUTORIZO

**JADE ISABEL DAMIÁN NOTARIO
TESISTA**

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| Agradecimientos..... | iii |
| Índice de Cuadros..... | v |
| Índice de Figuras..... | vi |
| Resumen..... | vii |
| Introducción | 1 |
| 1. Antecedentes | 2 |
| 1.1. Calidad microbiológica de los alimentos..... | 2 |
| 1.2. Fuentes de microorganismos en los alimento..... | 3 |
| 1.3. Fermentación de los alimentos..... | 3 |
| 1.3.1. Proceso de fermentación..... | 4 |
| 1.3.1.1. Fermentación en estado sólido..... | 5 |
| 1.3.2. Alimentos y bebidas fermentadas..... | 10 |
| 1.3.3. Flora microbiana en fermentaciones lácticas..... | 12 |
| 1.4. Etnobotánica de maíz..... | 13 |
| 2. Materiales y métodos | 16 |
| 2.1. Materia prima (maíz)..... | 16 |
| 2.2. Proceso del Atole agrio | 16 |
| 2.2.1. Deshojado y raspado del maíz..... | 16 |
| 2.2.2. Molienda de los granos de maíz..... | 16 |
| 2.2.3. Preparación para la fermentación natural del atole agrio..... | 17 |
| 2.2.3.1. Fermentación Sólida..... | 17 |
| 2.2.3.2. Fermentación Líquida..... | 17 |
| 2.3. Monitoreo de la fermentación..... | 17 |
| 2.4. Análisis microbiológicos..... | 18 |
| 2.4.1. Cuantificación de bacterias lácticas..... | 18 |
| 2.4.2. Cuantificación de bacterias lácticas amilolíticas..... | 18 |
| 2.4.3. Cuantificación de coliformes totales..... | 19 |
| 2.4.4. Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias..... | 19 |

| | Páginas |
|---|-----------|
| 2.4.5. Cuantificación de hongos y levaduras..... | 19 |
| 2.5. Determinación de pH..... | 20 |
| 2.6. Determinación de Temperatura..... | 20 |
| 2.7. Diseño experimental..... | 20 |
| 3. Resultados y discusión..... | 21 |
| 3.1. pH durante la fermentación..... | 21 |
| 3.1.1. Maíz tuxpeño Tacotalpa (mtT)..... | 21 |
| 3.1.2. Maíz tornamil Macuspana (mtM)..... | 22 |
| 3.1.3. Maíz tornamil Cunduacán (mtC)..... | 22 |
| 3.2. Crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación..... | 25 |
| 3.2.1. Bacterias lácticas..... | 25 |
| 3.2.2. Bacterias lácticas amilolíticas..... | 27 |
| 3.2.3. Bacterias coliformes totales..... | 29 |
| 3.2.4. Bacterias mesófilas aerobias..... | 30 |
| 3.2.5. Hongos y levaduras..... | 32 |
| 4. Conclusiones..... | 34 |
| 5. Referencias bibliográficas..... | 35 |

Agradecimientos

A Dios

Gracias a Dios por darme la fortaleza, fuerzas, sabiduría, confianza y fe, de lograr este éxito tan anhelado a lado de mis padres.

A mis padres

Francisco e Isabel por todos sus esfuerzos, entrega y confianza por compartir mi dicha y sacrificio, su amor, y apoyo incondicional, agradezco a Dios infinitamente por regalarme a mis padres los más valiosos de mi vida, que sin ellos no podría realizar este gran proyecto mi tesis muchas gracias, los amo mucho.

A mis hermanos

Miguel Ángel, Blanca Francisca, Eric Jesús, Cristo Rey, por su apoyo incondicional y comprensión a lo largo de mis estudios.

A mis Maestras

Judith Espinosa Moreno y Dora Centurión Hidalgo por brindarme la confianza y su apoyo incondicional, por ser unas verdaderas asesoras y amigas, que respeto y quiero mucho.

A mis compañeros y amigos

Quiero agradecer a Ricardo Dillinger, Luis Alberto M, Alberto Alonso, verónica Guadalupe, Juan Francisco, Moisés, Aura del Carmen, Marlene, Daniel C. por haberme brindado su confianza, su apoyo incondicional, en alguna etapa del desarrollo de tesis, así como también por compartir momentos agradables, mis dichas y tristezas, y por supuesto que de igual manera cuentan conmigo incondicionalmente para lo que necesiten.

Agradecimiento especial

Por financiamiento del proyecto de Ciencia Básica de CONACYT CB-2008-01 No. 101784 titulado "Metagenómica funcional de alimentos fermentados tradicionales de maíz: Búsqueda de enzimas de interés biotecnológico y estudio de la diversidad microbiana" cuya Directora es la Dra. María de los Dolores Reyes Duarte de la UAM-Cuajimalpa.

ÍNDICE DE CUADROS

| | Páginas |
|---|---------|
| Cuadro 1. pH de las fermentación sólida y líquida del maíz tuxpeño de Tacotalpa..... | 21 |
| Cuadro 2. pH de la fermentación sólida y líquida de maíz de tornamil de Macuspana..... | 22 |
| Cuadro 3. pH de la fermentación sólida y líquida del maíz de tornamil de Cunduacán..... | 23 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1. pH de la fermentación sólida de las tres variedades criolla de maíz..... | 23 |
| Figura 2. pH de la fermentación líquida de las tres variedades criolla de maíz..... | 24 |
| Figura 3. Crecimiento de bacterias lácticas en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz..... | 26 |
| Figura 4. Crecimiento de bacterias lácticas amilolíticas en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz..... | 28 |
| Figura 5. Crecimiento de coliformes totales en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades de criolla de maíz..... | 30 |
| Figura 6. Crecimiento de bacterias mesofilas aerobias en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz..... | 31 |
| Figura 7. Crecimiento de Hongos y levaduras en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz..... | 33 |

Resumen

Los microorganismos se introducen en los alimentos por medios naturales o añadidos con los que tiene contacto desde el momento de la producción hasta su consumo. La fermentación del alimento implica un proceso de crecimiento y actividad metabólica de microorganismos. El atole agrio es una bebida regional ácida no alcohólica producida por fermentación natural del maíz. El objetivo del presente trabajo es la caracterización microbiológica del atole agrio de maíz. El maíz tuxpeño, y el maíz tornamil (elotes maduros) fueron colectadas en las comunidades de los municipios de Cerro Blanco 5^a Sección de Tacotalpa(mtT), de Melchor Ocampo 2^aSección de Macuspana (mtM), y la Piedra 2^a sección de Cunduacán(mtC). El proceso del atole agrio se inició en forma manual con el deshojado, raspado y molido. Se dejó fermentar, en forma sólida y líquida, a temperatura ambiente Se tomaron muestras cada 2 h, durante 12 h, para determinar pH y cuantificar los distintos grupos microbianos: (bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, lácticas, lácticas amilolíticas, hongos y levaduras). En la fermentación sólida (FS)se encontró que al inicio el pH para cada variedad de maíz fue diferente, desde 6.38 hasta 7.49 al finalizar la fermentación el pH disminuyó a 4.46, 4.64, y 4,74 para los maíces de Macuspana, Tacotalpa, Cunduacán, respectivamente.En la fermentación sólida del atole agrio de maíz, los maíces mtM y mtT presentaron valores similares de pH al inicio de la fermentación, mientras que el mtC presentó un valor mayor de pH en una unidad. En cuanto a la fermentación líquida, el mtC presentó mayor pH de 4.81 a la 12 h de la fermentación. Los maíces mtM y mtC presentaron mayor carga microbiana en la fermentación sólida, mientras que para el mtT, presentó menor carga microbiana para ambas fermentaciones.

Introducción

En México nuestros antepasados nos legaron una fuente de nuevas enzimas que aun no se ha explorado, de los alimentos fermentados tradicionales. Es bien sabido que la diversidad microbiana es la mayor reserva de productos y procesos aplicables a las industrias biotecnológicas y aunque el estudio sobre las funciones enzimáticas desarrollados por lo microorganismos presentes en los alimentos fermentados tradicionales han sido pocos, los resultados son muy prometedores. La fermentación es un proceso en el cual se descomponen sustancias orgánicas complejas en otras simples; este proceso de fermentación es producido por acción de las enzimas, lo cual conlleva cambios químicos en las sustancias orgánicas. Es así donde la fermentación juega un papel muy importante en los alimentos fermentados, desde antes de la llegada de los españoles en México se contaba con una gran variedad de productos alimenticios. La base de su alimentación era el maíz, que consumían de diferentes maneras: tostado, hervido, reventado, en forma de tortillas, sopes, gorditas, tostadas, tamales, bebidas como el pozol y el atole agrio. Muchos pueblos han desarrollado su propio sistema culinario alrededor de un alimento básico en el caso de México este alimento siempre ha sido el maíz.

El atole agrio es una bebida regional ácida, no alcohólica preparada con masa elaborada con maíz de dobla no nixtamalizado y fermentado. Para su preparación, se utiliza maíz de dobla cuando los granos se encuentran en madurez fisiológica al 30% de humedad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización microbiológica del atole agrio de maíz, por medio de la cuantificación de bacterias lácticas, mesófilas aerobias totales, coliformes, lácticas amilolíticas, mohos y levaduras durante las fermentaciones líquida y sólida.

1. Antecedentes

1.1. Calidad microbiológica de los alimentos

La pérdida de la calidad microbiológica de los alimentos puede ocasionar infecciones e intoxicaciones alimentarias, por un lado, y alteraciones de los alimentos, por otro lado. La pérdida de calidad en cuanto a los caracteres organolépticos de los alimentos tiene lugar cuando se da una proliferación masiva de los microorganismos que contaminaron inicialmente estos productos. La garantía de la inocuidad microbiológica y de la calidad higiénica de los alimentos se basa en la aplicación de los principios de la denominada microbiología ecológica de los alimentos. Entre los diversos aspectos que abarca la microbiología de los alimentos destacan dos áreas de interés: Por un lado la protección del consumidor frente a las enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos, y por otro, la prevención de las alteraciones de estos productos debida a la presencia los microorganismos. Por lo general, resulta muy difícil evitar la contaminación de los alimentos, por lo que las medidas prácticas tienden fundamentalmente a inhibir o reducir la multiplicación de los microorganismos contaminantes, asegurando así la calidad microbiológica de los alimentos. Ocurre, sin embargo, que el margen de seguridad entre el predominio de las poblaciones microbianas deseables, agentes de las fermentaciones de los alimentos, y el de los microorganismos alterantes es frecuentemente muy estrecho. La garantía de la calidad microbiológica de los alimentos podría asegurarse por el llamado sistema retrospectivo. Este sistema consiste en tomar muestras de alimentos y hacer un análisis microbiológico para determinar la posible presencia de microorganismos patógenos, el número de microorganismos alterantes y adoptar las medidas pertinentes cuando los resultados sean desfavorables (Mossel y Moreno, 1994).

1.2. Fuentes de microorganismos en los alimentos

Los tejidos internos de las plantas (frutas y vegetales) y los animales (carne) sanos son estériles en esencia. Aun así, los alimentos crudos y procesados contienen diferentes tipos de mohos, levaduras, bacterias y virus. Los microorganismos se introducen en los alimentos por medios naturales (incluyendo internos) y por fuentes externas con las que tiene contacto el alimento desde el momento de la producción hasta su consumo. Las fuentes naturales de la contaminación microbiana de los alimentos de origen vegetal incluyen las superficies de frutas, vegetales y granos, y los tejidos dañados. La microflora natural mantiene un equilibrio ecológico con sus huéspedes, varía sus tipos y niveles ampliamente con el tipo de plantas y animales y también con su ubicación geográfica y condiciones ambientales. Además de los microorganismos naturales, un alimento puede contaminarse con diferentes microorganismos que provienen de fuentes externas como aire, suelo, aguas residuales, forraje, seres humanos, equipo, empaques e insectos. Los tipos microbianos y los niveles de estas fuentes que se introducen en los alimentos varían ampliamente y depende del grado de higiene usada durante el manejo de los alimentos. Se espera que los alimentos que se producen en condiciones higiénicas y con métodos de conservación apropiadas tengan una menor carga microbiana. La información acerca de la carga microbiana normal ayuda a determinar la calidad microbiológica de un alimento y también establece estándares y especificaciones microbiológicas (Ray y Bhunia, 2010).

1.3. Fermentación de alimentos

La fermentación del alimento implica un proceso en que se convierten las materias primas a alimentos fermentados por medio del crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos deseables.

Estos utilizan algunos componentes presentes en las materias primas, como sustratos, para generar energía y componentes celulares, aumentar la población y producir muchos productos secundarios útiles (también llamados productos finales) que se excretan al ambiente. Los componentes que no se usan en la materias primas y los productos metabolitos secundarios (y a veces las células microbianas) constituyen, en conjunto, los alimentos fermentados (bebidas alcohólicas, atole agrio, yogurt, etc.). Las materias primas pueden ser leche, carne, pescado, vegetales, frutas, granos de cereal, semillas y frijoles, que se fermentan individualmente o combinados. En todo el mundo se producen más de 3500 tipos de alimentos fermentados. Los seres humanos de antiguas civilizaciones han producido y consumidos por miles de años muchos alimentos fermentados que se consumen hoy en día, desarrollando habilidades en la producción de alimentos fermentados a partir de leche, frutas, granos de cereal y vegetales. El proceso no solo producía alimentos nuevos, sino también ayudaba a conservar el exceso de materias primas de origen animal y vegetal (Ray y Bhunia, 2010).

1.3.1. Proceso de fermentación

Los alimentos se pueden fermentar de tres maneras, según las fuentes de donde provienen los microorganismos deseables (como bacterias lácticas y amilolíticas): fermentación natural, re-inoculación y fermentación controlada. La re-inoculación se añade algunos productos de una fermentación exitosa previa (derivados de la leche, bebidas alcohólicas, bebidas de frutas, cereales y panes leudados) a los materiales de inicio, y se establecen las condiciones lo que se enfoque para facilitar el crecimiento de los microorganismos provenientes de la anterior fermentación. Este método aun se usa en la producción de muchos productos (yogur, queso, atole, etc.) étnicos en volúmenes pequeños. Es posible que resulte difícil la conservación de las

características del producto por los cambios en los tipos de microorganismo. En la fermentación controlada, las materias primas o de inicio (pueden ser tratadas con calor o no) son inoculadas con altas poblaciones (10^6 células/ml o mayores) de cultivos microbianos iniciadores puros, de una sola cepa o de cepas mezcladas. Las condiciones de incubación se establecen para el crecimiento óptimo de dichos cultivos, así cada día se pueden elaborar grandes volúmenes de productos alimenticios con características consistentes y predecibles; por lo regular, hay menos posibilidades de fallas y de contaminación por bacterias infecciosas. Sin embargo, se corre el riesgo de que no crezca la flora secundaria deseable y, como resultado, el producto puede perder sus delicadas características sensoriales. En la fermentación natural, muchas de las materias primas usadas en por lo regular no tratadas con calor) contienen microorganismos asociados: primero se establecen las condiciones de incubación para propiciar el crecimiento rápido de los microorganismos deseables o impedir o retrasar el crecimiento de los tipos indeseables. Un producto elaborado por fermentación natural puede tener un aroma agradable como resultado del metabolismo de la flora asociada. No obstante, en virtud de que la flora microbiana natural en las materias primas no siempre es la misma, se dificulta elaborar productos con características consistentes que perduren por periodos prolongados (Ray y Bhunia, 2010).

1.3.1.1. Fermentaciones en estado sólido

Saucedo (2008) describió la fermentación en medio sólido (FMS) que existe de manera natural desde el comienzo de la vida del planeta. El objetivo es múltiple: aumentar el contenido proteico de alimentos, mejorar su conservación y mejorar sus características organolépticas. Ejemplos de ella son la fermentación de cacao, koji, soya, beneficio de café, pozol, quesos roquefort, camembert, quesos madurados, ensilaje;

fermentación de rastrojos y pajas, aplicaciones en control biológico, aplicaciones ambientales.

Entre las principales ventajas se encuentran los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas.
- La baja actividad del agua evita contaminaciones indeseables.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños.
- Tienen mayor productividad volumétrica.
- La aireación es facilitada por la porosidad del soporte.
- Alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Conidios como inoculó en el crecimiento de hongos (disminuye los costos y las manipulaciones).
- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistente y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- Los productos son utilizados integralmente, como alimento humano o animal productos para el control biológico.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismo que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción de calor metabólico es el mayor problema a gran escala.
- Dificultad en la instrumentación en línea y tiempo real.
- Los procesos de transferencia de masa están acoplados a la reacción biológica.

- Poco desarrollo en aspectos de ingeniería como el diseño de reactores y el escalamiento.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismo que presenta bajas velocidades específicas de crecimiento.

La fermentación en estado sólido se define como aquella en la cual el crecimiento microbiano y la formación ocurren en la superficie del sustrato sólido. En este tipo de fermentación se incluye procesos microbianos bien conocidos tal como: microbiología del suelo, cultivo en superficie, composteo, pudrición de la madera, cultivo de hongos y la producción de alimentos del Oeste, por ejemplo; pan, quesos y embutidos madurados por mohos y salchichonería (Mudgett, 1986).

Entre los sustratos tradicionales utilizados en la fermentación sólida se incluyen una variedad de productos agrícolas tales como arroz, trigo, mijo, cebada, maíz y soya. Estos sustratos incluyen una gran variedad de desechos agrícolas forestales y de industrias alimentarias que proveen una mezcla compleja de nutrientes que requieren hidrólisis enzimática para usarla como fuente de carbono y energía, que requieren mecanismos de inducción, inhibición o represión en el metabolismo microbiano. La principal característica de la fermentación en sustrato sólido es su habilidad de proveer un ambiente selectivo de baja humedad para organismo miceliales que producen una variedad de enzimas extracelulares. Estos organismos incluyen un número amplio de hongos filamentosos y pocas bacterias actinomicetos al menos una cepa de *Bacillus* que pueden crecer a altas concentraciones cerca de la superficie sólida.

Para estimar la tasa de formación de biomasa la presencia de sustrato sólido se deben tomar en cuenta las siguientes características.

- La fermentación tradicional en sustrato sólido puede comprender cultivos mixtos de la flora microbiana nativa o de semillas o ambas.
- Sustratos sólidos proveen un ambiente selectivo para hongos filamentosos y pocas bacterias que crecen en forma micleal.
- Los hongos comúnmente empleados en la fermentación en sustrato sólidos son aerobios estrictos y necesitan obtener oxígeno de la fase gaseosa bajo condiciones relativamente difíciles para transferencias de gas.

Ventajas y desventajas

- Los sustratos sólidos pueden requerir solo la adición de agua y otros nutrientes y pueden también ser adicionados.
- La baja humedad reduce el problema de contaminación
- El rendimiento del producto puede ser más alto que el obtenido en medio líquido (Mudgett, 1986).

Desventajas:

- La fermentación con sustrato sólido puede requerir de altos requerimientos de energía para la rotación o agitación continua.
- La adición de agua en las etapas iniciales de la fermentación puede aumentar el riesgo de contaminación bacteriana.
- Los sustratos agrícolas pueden requerir de algún tipo de pretratamiento.

Los procesos de fermentación también mejoran la seguridad de los alimentos por la reducción de compuestos tóxicos tales como aflatoxinas y cianógenos, la producción de factores antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol que facilita la inhibición o eliminación de patógenos de origen

alimentario. Una de las razones del aumento en el consumo de los alimentos fermentados es que el consumidor los considera como saludables y naturales. El siguiente paso en su estudio sería la incorporación de los mismos componentes antimicrobianos naturales encontrados en los alimentos fermentados en otros alimentos en sustitución de conservadores químicos (Giraffa, 2004).

Los principales microorganismos de la fermentación incluyen bacterias lácticas (BAL), mohos y levaduras. En particular las bacterias lácticas la principal microflora presente en productos lácteos, vegetales fermentados, y fermentación masa agria. Los *lactobacilos* y *pediococo* forman parte de los cultivos iniciadores en la fermentación de la carne y que producen ácidos y saborizantes deseables (Giraffa, 2004).

La fermentación espontánea natural, por ejemplo procesos sin un inóculo iniciador, se aplico para la conservación de alimentos por milenios. En una fermentación natural, las condiciones son establecidas para que los microorganismos deseables crezcan y produzcan metabólicos, que dan las características únicas al producto. La mayoría de las fermentaciones en pequeña escala, en países en desarrollo, tales como la fermentación de la col ácida aún se lleva a cabo como procesos espontáneos. Sin embargo, la microflora natural de la materia cruda es ineficiente, incontrolable, e impredecible, o es destruida con el tratamiento térmico dado a los alimentos. Por otro lado, si el desarrollo ha sido bajo en acidez o el pH no disminuye lo suficiente, los microorganismos contaminantes podrían ser capaces de crecer. En algunos alimentos fermentados, el pH puede aumentar durante la maduración de los mismos permitiendo el crecimiento de otras bacterias. Estos fenómenos, junto con la evidencia bien conocida de que muchas bacterias patógenas de origen alimentario se adaptan al estrés químico subletal pueden permitir el crecimiento de organismos indeseables (patogénicos o la descomposición) en los alimentos fermentados (Giraffa, 2004).

Las consecuencias económicas y sociales de microorganismos en los alimentos dependen no solo de las especies presentes, sino de su número principalmente. Los cambios en las poblaciones son descritos principalmente en referencia a los grupos microbianos (por ejemplo, cuenta total en placa, coliformes, bacterias lácticas) en lugar de hacerlo para especies o cepas particulares que podrían ser más útiles para la comprensión de las propiedades microbiológicas de los alimentos fermentados. Las dinámicas de crecimiento, sobrevivencia y actividad bioquímica de los microorganismos en los alimentos son el resultado de reacciones de estrés en respuesta a los cambios condiciones físicas y químicas en el microambiente del alimento (gradiente pH, oxígeno, a_w , sal, temperatura) y la habilidad para colonizar la matriz del alimento y crecer con heterogeneidad espacial: microcolonias y biopelículas (Giraffa, 2004).

1.3.2. Alimentos y bebidas fermentadas

Los alimentos fermentados involucran el crecimiento y actividad de microorganismos como: bacterias, mohos y levaduras. Los alimentos fermentados probablemente surgieron de forma accidental y es gracias a estos afortunados errores que muchos alimentos se pueden conservar en buen estado por grandes períodos de tiempo. Diariamente se consume una gran cantidad de alimentos fermentados, aunque tal vez no se esté muy consciente de su cantidad y variedad. Entre los alimentos fermentados más comunes se tienen por ejemplo: cerveza, vino, vinagre, quesos, yogurt y pan. Estos se preparan desde hace años. Muchos de estos procesos de fermentación se han tecnificado y en la actualidad, poderosas empresas los controlan por medio de la ingeniería bioquímica y frecuentemente usan microorganismos mejorados genéticamente. Muchos grupos étnicos de diversas partes del mundo han encontrado en los alimentos fermentados no solamente una fuente

de nutrientes sino también elementos propios de su cultura (Lappe y Ulloa, 1989).

Las bebidas fermentadas pueden ser divididas en su sentido más amplio en dos grupos: los vinos y la cerveza. Los vinos son fermentados de jugos de diversas frutas que contienen azúcares fermentables mientras que las cervezas provienen de productos que contienen almidón, que se someten a la división enzimática por la diastasa, malteado, maceración y, los azúcares fermentables disponibles son utilizados por las levaduras y las bacterias. Pero estas no son las dos únicas bebidas fermentadas existentes, de acuerdo a las culturas y su historia existen muchas bebidas (como la sidra, el vinagre, el té de Kombucha, el yogur, el atole agrio y otras más) originadas de la fermentación de productos naturales. Por ello, también es importante la investigación relacionada con los alimentos fermentados tradicionales para obtener productos consistentes y de buena calidad higiénica, tanto a nivel rural como para industrializarlos y expandir su distribución, así como utilizarlos en el desarrollo de nuevos productos o para aprovechar las características especiales de su microbiota en otros procesos (Lappe y Ulloa, 1989).

Wacher-Rodarte (2002) recomienda que se debe establecer qué microorganismos son importantes para elaborar un alimento para lo cual es necesario recolectar muestras del producto recién elaborado de diferentes productores. También se obtiene información útil si se colectan muestras de diferentes lotes del mismo productor. Además, obtener información sobre la manera como se procesó el alimento, examinar las muestras lo más pronto posible después de la recolección, identificar hasta especie los microorganismos aislados e investigar en la literatura si son patógenos o producen alguna toxina, elaborar el producto utilizando una tras otra las cepas predominantes. Se debe tomar en cuenta que comúnmente un mismo alimento recibe diferentes nombres en una región.

1.3.3. Flora microbiana de fermentaciones lácticas

Las bacterias lácticas tienen un papel muy importante en la fermentación de muchos alimentos y poseen actividad antimicrobiana al producir ácidos, bacteriocinas, diacetilos y peróxidos de hidrógeno. Se ha demostrado que son las responsables de la fermentación ácido láctico al tener la capacidad de producir ácidos orgánicos con efectos de conservación sobre los alimentos, debido a sus propiedades inhibitorias y germicidas. La mayoría de las bacterias lácticas son mesófilas aunque pueden crecer en un rango de temperatura de 5-45°C, su pH óptimo es cercano a 6.0 pero se han encontrado que algunas crecen a pH 9.0 (Nuraida *et al.*, 1995).

Debido al gran número de bacterias lácticas, sólo son de interés para la industria alimentaria los géneros altamente productores de ácido láctico. Para la producción industrial de ácido láctico son de mayor importancia las bacterias lácticas homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico (González-Varra *et al.*;2000; Fooet *al.*, 1993). Los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias Streptococcaceae (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y Lactobacillaceae (género *Lactobacillus*) (Ben *et al.*, 2007; Fooet *al.*, 1993).

Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias no esporuladas, Gram positivas y que metabolizan un amplio rango de azúcares para producir principalmente ácido láctico (Holt *et al.*, 1998). El género *Lactobacillus* está comprendida por bacterias en forma bacilar comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobias facultativas ó microaerófilas, catalasa y citocromo negativos (Fooet *al.*, 1993). Excepcionalmente pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos periticos. Los lactobacilos son autótrofos

quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos está entre 30 – 40 °C (Fooet *al.*, 1993; Morishita *et al.*, 1981). Su hábitat natural es variado pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen alimentos de origen vegetal y animal (Holt *et al.*, 1998).

1.4. Etnobotánica del maíz

La agricultura es una actividad dinámica, cambiante, que depende de factores físicos, económicos, sociales y políticos internos y externos que inciden en la intensidad de la actividad, en la cantidad y calidad de la producción. La economía campesina se caracteriza porque se lleva a cabo en unidades de producción de tipo familiar en las que la finalidad última es la reproducción de sus condiciones de vida. No se trata de una economía de autoconsumo en el momento actual, porque todo campesino entra al círculo del mercado, pero la producción va destinada fundamentalmente al consumo familiar y solo se ponen en venta los excedentes o en su consumo de necesidad, parte de lo que se dedica a la familia.

La agricultura opera simultáneamente en el campo de ecología y la economía, aunque cada uno tiene diferentes tiempos de respuestas. La producción está ligada a la variedad de los ciclos de producción de los bienes, desde las hortalizas y cereales, estacionales y anuales, hasta especies perennes como los arbustos y árboles. Los recursos naturales son satisfactorios de necesidades no solo básicos o económicos sino de los valores intangibles sociales, ambientales y culturales (Amo, 1997).

La milpa data de tiempos prehispánicos y mantiene su vigencia hasta nuestros días. Aunque el termino se aplica comúnmente a cualquier campo cultivado de maíz de asociación con diversas plantas (Aguilar *et al.*, 2003).

Ruz (2006), describe el método utilizado por los mayas denominado roza, tumba y quema, o milpa itinerante como “el campo de maíz que camina” que consiste en despejar los terrenos de la vegetación primaria o secundaria una vez desbrozados, se procede a prenderles fuego, buscando con ello fertilizar el terreno. Las variedades de maíz que se utilizan son locales, principalmente las denominadas cuarentano y mejen; ambas de ciclo corto, con un periodo de maduración de dos y medio a 3 meses. Después de transcurridos, entre 2.5 a 3 meses de la siembra, cuando las cañas de maíz están maduras, se realiza la dobla. Cada planta se dobla justamente abajo del crecimiento de las mazorcas, de tal manera que están cuelguen. Esta labor, facilita el secado final del grano, evita la entrada de humedad en la punta de la mazorca y sirve de preparación a la cosecha, que se realizará entre 15 y 30 días después de la dobla dependiendo de la sequedad del clima (Orozco, 1999). El calendario de las actividades agrícolas de la denominada milpa de año, que significa la principal cosecha de maíz, inicia en mayo y junio para cosechar en septiembre y octubre. La otra siembra, conocida como tornamil, inicia a la segunda quincena de noviembre, prolongándose hasta finales de abril en función de la humedad del suelo y se cosecha desde marzo hasta agosto (Cabrera, 1994).

Para al menos una tercera parte de los mexicanos de hoy, el maíz sigue siendo el rector de la vida cotidiana. Alrededor de él, se tejen las tareas y celebraciones de hombres, mujeres y niños, en la milpa de lo mismo que en el hogar: la atención de la parcela, la preparación de nixtamal, la masa y las tortillas, la conservación y cuidado de la cosecha, el desgrane de la mazorca, la alimentación de los animales, la comida cotidiana, las fiestas, los rituales, todo guarda relación con el maíz, hasta en aquellos que dedican una porción central de tiempo a otras actividades (Esteva, 2003).

En los poblados rurales lo primero que destaca son las milpas, aun en las pendientes más inclinadas y en los predios más pequeños. Al entrar en las casas se distingue un lugar donde se almacena la mazorca. En los corrales de los animales hay hojas y restos de planta. Alguien de la familia está desgranando, preparando nixtamal o echando tortillas al comal. Semillas de distintos colores se secan al sol, sobre un petate. Comen elotes y pozole o preparan huitlacoche, tostadas o tamales. Elaboran bebidas como el atole y el téjate y algunas embriagantes a partir del grano fermentado. Todas las partes de la planta, incluyendo raíces y horcones, sirven como abono o combustible. La caña se usa en la fabricación de artesanías y en la construcción. La hoja sirve como envolturas de tamales y cigarro, para fabricar objetos rituales o artesanales, como recipientes para amarrar manojos de hierbas o especias. El olote, corazón de la mazorca, se emplea como combustible y alimento para animales, como tapón de botellas u otros recipientes. El maíz también se emplea con propósitos medicinales, para curar diversos males del cuerpo y el alma (Esteva, 2003).

2. Materiales y métodos

2.1. Materia prima (maíz)

La elaboración del atole agrio, fue a partir de mazorcas de maíz con madurez fisiológica del grano, que expresa alrededor del 30% de humedad (Tinoco *et al.*, 2002), conocido en el dominio público como “maíz de dobla o maíz maduro”. Las muestras de maíz para elaborar el atole agrio fueron colectadas en las comunidades de los municipios de Cerro Blanco 5ª Sección de Tacotalpa de la variedad criolla tuxpeño, de Melchor Ocampo 2ª Sección de Macuspana, y la Piedra 2ª sección de Cunduacán de la variedad criolla tornamil (Narez, 2011).

2.2. Proceso del atole agrio

2.2.1. Deshojado y raspado del maíz

A las mazorcas de maíz (elotes) se les eliminaron las hojas que las cubren y el estigma de forma manual, y se seleccionaron con base en las recomendaciones de las normas del Codex alimentarios (Codex STAN 1993) para el maíz enano: enteras, sanas, limpias de cualquier materia extraña visible, exentas de daños causados por plagas, tener un aspecto fresco, estar prácticamente exenta de estigmas. Para obtener los granos de maíz, se realizó el raspado en cada elote manualmente mediante el empleo un cuchillo de acero inoxidable, depositándolo en recipientes cilíndricos de PVC, sin tapa, de 24 x 18 cm, y 20 x 30 cm.

2.2.2. Molienda de los granos de maíz

Los granos raspados se molieron en un molino eléctrico marca Siemens, de potencia 0.50 HP. Se homogenizó manualmente la masa para continuar con el inicio de las fermentaciones.

2.2.3 Preparación de la fermentación natural del atole agrio

De acuerdo a la información obtenida de las personas que preparan y consumen el atole agrio, se encontró que lo fermentan en forma sólida y líquida, comunicación personal de la Sra. Susana López Hernández del municipio Cerro Blanco 5^a Sección de Tacotalpa, Tabasco. Por esta razón se decidió en este trabajo realizar los dos tipos de fermentación.

2.2.3.1. Fermentación Sólida

Para la fermentación sólida, la masa se dividió en porciones de aproximadamente 100 g, para cada tiempo de muestro (2, 4, 6, 8, 10, 12 hrs.) cada porción se depositó, en un recipiente cilíndrico de 24 x 18 cm de PVC sin tapa, y se incubaron a temperatura ambiente cubierto el recipiente con gasa.

2.2.3.2. Fermentación Líquida

Para la fermentación líquida, se adicionó agua en una relación 3:1 de masa-agua (V/V), se mezcló y depositó en un recipiente cilíndrico 20 x 30 cm de PVC, sin tapa, durante las 12 hrs. y se incubaron a temperatura ambiente cubierto el recipiente con gasa.

2.3. Monitoreo de la fermentación

Para el proceso de fermentación se tomaron muestras de 100 g para cada tiempo de fermentación, es decir, cada dos horas durante las 12 h que dura la fermentación. Al mismo tiempo se registró la temperatura con un termómetro de escala de -10 a 260 °C, e inmediatamente se

inició el análisis microbiológico y se realizó la medición de pH de acuerdo a las técnicas descritas en las (NMX-F-317-S-1978).

2.4. Análisis microbiológicos

La preparación y dilución de la muestra para el análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, se tomó con una espátula de acero inoxidable y se pesó 10 g de muestra en una bolsa Ziploc de cierre hermético condiciones asépticas. Preparando una dilución primaria de la muestra, se agregaron 90 ml de agua peptonada al 0.1% estéril y se homogenizó moviendo la bolsa con las manos. Se prepararon diluciones decimales consecutivas utilizando agua peptonada. Se sembró 0.1 ml por duplicado en los diferentes medios de cultivo para la cuantificación de los distintos grupos microbianos, de acuerdo a las técnicas descritas en las (NOM-113-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994).

2.4.1. Cuantificación de bacterias lácticas

La cuantificación de bacterias lácticas se realizó en Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y se incubaron a 29 ± 1 °C durante 18 a 24 h. Se consideraron para la cuantificación, las cajas que contuvieran el número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo (25-250 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log \text{UFC ml}^{-1}$) considerando la dilución de la muestra (Díaz y Wachter, 2003).

2.4.2. Cuantificación de bacterias lácticas amilolíticas

La cuantificación de bacterias lácticas amilolíticas se realizó en Agar MRS con almidón se incubaron a 29 ± 1 °C durante 18 a 24 h. Se consideraron para la cuantificación, las cajas que contuvieran el

número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo (25-250 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el logaritmo unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log \text{UFC ml}^{-1}$) considerando la dilución de la muestra (Díaz y Wachter, 2003).

2.4.3. Cuantificación de coliformes totales

Para la cuantificación de coliformes totales se utilizó Agar Bilis Rojo Violeta, y se incubaron 31 ± 1 °C durante 24 h. Se consideraron para la cuantificación las cajas que contenían el número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo de colonias de (30-150 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log \text{UFC ml}^{-1}$) considerando la dilución de la muestra (NOM-113-SSA1-1994).

2.4.4. Cuantificación de bacterias mesófilas aerobias

La cuantificación de bacterias mesófilas aerobias se realizó en Agar para cuenta estándar y se incubaron 31 ± 1 °C durante 24 h. Se consideraron para la cuantificación las cajas que contenían el número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo de colonias de (30-300 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calcula el logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log \text{UFC ml}^{-1}$) considerando la dilución de la muestra (NOM-092-SSA1-1994).

2.4.5. Cuantificación de hongos y levaduras

La cuantificación de hongos y levaduras se realizó en Agar Papa Dextrosa y se incubaron 25 °C durante 48 h. Se consideran para la cuantificación las cajas que contenían el número de colonias dentro del rango estadísticamente significativo de colonias de (0-30 colonias). Se promedió el resultado obtenido en cada duplicado y se calculó el

recuento total mohos y levaduras, el logaritmo unidades formadoras de colonias por mililitro ($\log \text{ UFC ml}^{-1}$) considerando la dilución de la muestra (NOM-111-SSA1-1994).

2.5. Determinación de pH

Se calibró el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 de acuerdo a las instrucciones del mismo. Se tomó una porción de la muestra de 5 ml y se mezcló por medio de un agitador ajustando su temperatura a 20 ± 0.5 °C. Se sumergió el electrodo en la muestra de manera que lo cubriera perfectamente. Se realizó la medición del pH. Se retiró el electrodo y se lavó con agua destilada. El valor del pH de la muestra se leyó directamente en la escala del potenciómetro de 0-14 pH (NMX-F-317-S-1978).

2.6. Determinación de la temperatura

Durante el proceso de ambas fermentaciones, se tomaron muestras de 15 ml para la líquida y 15 g para la sólida, en un vaso precipitado de 50 ml e inmediatamente se registró la temperatura con un termómetro de escala de -10 a 260 °C, cada 2 h, durante 12 h.

2.7. Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 x 2 (tres razas de maíz con dos tipos de fermentaciones) con un total de 6 tratamientos, con tres repeticiones. Las variables de respuesta fueron el pH, bacterias mesofilas totales, hongos y levaduras, coliformes totales, bacterias lácticas y bacterias lácticas amilolíticas. Se calculó la media y la desviación estándar del pH.

3. Resultados y Discusión

3.1 pH durante la fermentación

3.1.1. Maíz tuxpeño Tacotalpa (mtT)

En la fermentación sólida, el pH de los granos del maíz tuxpeño de Tacotalpa (mtT) fue de 6.38 y en la líquida de 6.44 unidades. Conforme transcurrió el tiempo de fermentación, las unidades de pH disminuyeron tanto en la fermentación sólida (FS) como en la fermentación líquida (FL). Como se muestra en el Cuadro 1. Sin embargo, el valor final de pH alcanzado a las 12h de fermentación fue de 4.05 en la FL, mientras que para el FS fue de 4.46.

Cuadro 1. pH de las fermentaciones sólida y líquida del maíz tuxpeño de Tacotalpa.

| Tiempo (h) | Fermentación sólida (FS) | Fermentación líquida (FL) |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 6.38 ± 0.02 | 6.44± 0.07 |
| 2 | 6.31± 0.17 | 6.51± 0.02 |
| 4 | 5.59± 0.09 | 6.41± 0.02 |
| 6 | 4.91± 0.02 | 5.53± 0.00 |
| 8 | 4.71± 0.05 | 4.39±0.05 |
| 10 | 4.55± 0.04 | 4.14± 0.01 |
| 12 | 4.46± 0.02 | 4.05± 0.01 |

3.1.2. Maíz de tornamil de Macuspana (mtM)

El valor de pH al inicio de la fermentación del maíz de tornamil de Macuspana (mtM) fue para la FS de 6.59 y para la FL de 6.64, respectivamente. Sin embargo, a las 2 h de fermentación se alcanzó el mismo valor de pH en ambas fermentaciones indicado en el (Cuadro 2). No obstante, la fermentación líquida disminuyó 2.2, mientras que la sólida disminuyó 1.85 durante las 12 h de fermentación.

Cuadro 2. pH de la fermentación sólida y líquida de maíz de tornamil de Macuspana.

| Tiempo (h) | Fermentación sólida | Fermentación líquida |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0 | 6.59±0.02 | 6.64 ± 0.01 |
| 2 | 6.55± 0.01 | 6.55 ± 0.02 |
| 4 | 6.45 ±0.02 | 6.20 ± 0.01 |
| 6 | 6.27± 0.01 | 5.72 ± 0.04 |
| 8 | 5.77±0.12 | 4.76 ±0.01 |
| 10 | 4.90±0.06 | 4.56 ±0.02 |
| 12 | 4.74±0.01 | 4.44 ±0.02 |

3.1.3. Maíz de tornamil de Cunduacán (mtC)

Al inicio de la fermentación líquida el pH fue de 7.73 y 7.49 en la sólida. El comportamiento del pH de la FS fue disminuir conforme aumento el tiempo de fermentación y alcanzó el menor valor con pH de 4.64 a las 12 h, mientras que en la líquida aumentó a las 6 h con pH 6.91 y el pH final fue mayor en 4.81.

Cuadro 3. pH de la fermentación sólida y líquida del maíz de tornamil de Cunduacán.

| Tiempo(h) | Fermentación sólida | T° | Fermentación líquida | T |
|-----------|---------------------|------|----------------------|--------|
| 0 | 7.49 | 27°C | 7.73 | 31.9°C |
| 2 | 7.51 | 33°C | 7.26 | 32°C |
| 4 | 7.0 | 33°C | 7.68 | 32.3°C |
| 6 | 6.16 | 33°C | 6.91 | 33.1°C |
| 8 | 5.03 | 34°C | 6.37 | 34°C |
| 10 | 4.69 | 33°C | 5.82 | 33.7°C |
| 12 | 4.64 | 34°C | 4.81 | 34°C |

Al comparar los tres razas de maíz en la fermentación sólida se encontró que a 0 h se inició con diferentes valores de pH, y la tendencia de pH fue disminuir conforme trascurrió la fermentación, hasta alcanzar valores entre 4.46 a 4.74 unidades (Figura. 1).

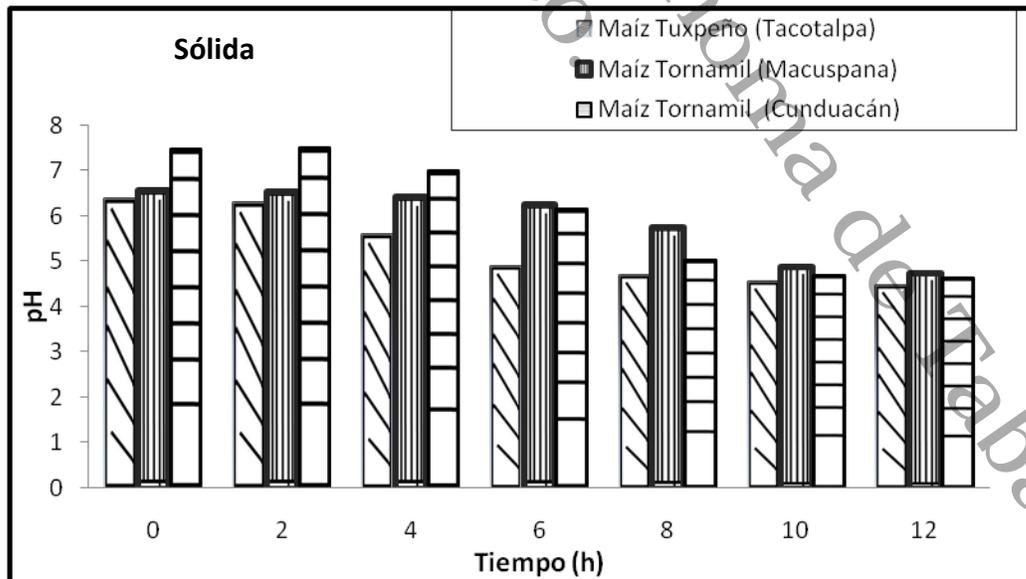


Figura 1. pH de la fermentación sólida de las tres variedades criolla de maíz

El pH de la fermentación líquida de los maíces mtT y mtM se comportaron con valores similares entre 6.44 y 4.44, el único que no se comportó igual fue el mtC pues disminuyó el pH conforme transcurrió el tiempo de fermentación y, además el valor de pH final fue mayor con 4.81 (Figura 2).

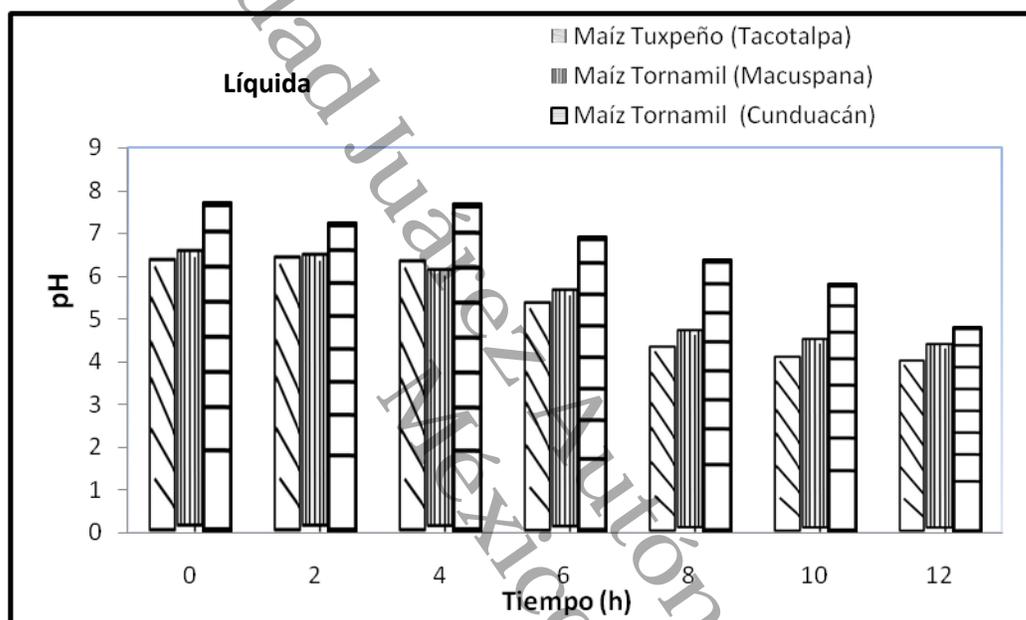


Figura 2. pH de la fermentación líquida de las tres variedades criolla de maíz.

En estudios realizados por Beltrán-Orozco *et al.* (2001) sobre el proceso de la fermentación del pozol, reportaron que el pH de la masa de maíz inició con un valor de 6.71 y a las 10 h de fermentación alcanzó un valor de 3.78. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que al inicio de la fermentación el mtT como para el mtM hubo valores similares en 6.45 y 6.66, mientras que el mtC presentó un pH inicial mayor aproximadamente de 7.73 terminando con pH de 4.81, los valores del atole agrio al final de la fermentación fueron mayores encontrándose en 4.05 a 4.81 en las tres razas de maíz.

De igual manera, Lappe y Ulloa (1989) en una fermentación del tesgüino de maíz, reportaron que durante el proceso de fermentación se inicio con pH de 5, conforme avanzó el tiempo de fermentación a las 24 h redujo hasta con pH de 4.7. Comparando con el proceso de fermentación del maíz maduro (atole agrio) éste presentó valores mayores al inicio con pH de 6.44 a 7.73 y a las 12 h disminuyo con pH de 4.05 a 4.81.

Al respecto, Alvarado *et al.* (2006) evaluaron 27 alimentos artesanales fermentados de origen vegetal y animal mexicanos sin marca comprados en los mercados de Querétaro, Hidalgo y México y aislaron 94 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a 4 géneros que mostraron diferente capacidad acidificante: las cepas de *Lactobacillus* mostraron una reducción de pH significativamente más alta alcanzando valores de 3.9 ± 0.2 y las cepas de *Leuconostoc* mostraron un pH final de 4.7 ± 0.6 significativamente diferente de la cepas anteriores.

3.2 Crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación

3.2.1 Bacterias lácticas

En la Figura 3 se describe el crecimiento de las bacterias en la fermentación sólida de los tres tipos de maíz. Se encontró que al inicio la carga microbiana de bacterias lácticas fue $8 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ tanto para el maíz tornamil de Macuspana (mtM) como para el maíz tornamil de Cunduacán (mtC), mientras que para el maíz tuxpeño de Tacotalpa (mtT) presentó $5 \log \text{ UFC ml}^{-1}$. Sin embargo, durante la fermentación el mayor número de bacterias fue a las 6 h con $10 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ para el mtC.

En cuanto a la fermentación líquida, el mayor número de bacterias lácticas se presentó a las 6 h, fue muy similar en el tiempo a la fermentación sólida, alcanzando el máximo a las 8 h aproximadamente en 8 log UFCml⁻¹ para las tres razas de maíz. El resultado de la reducción de pH se ha sido atribuido a la cantidad y tipos de ácidos orgánicos producidas por las bacterias lácticas partir de los carbohidratos del maíz durante la fermentación (Alvarado *et al.*, 2006).

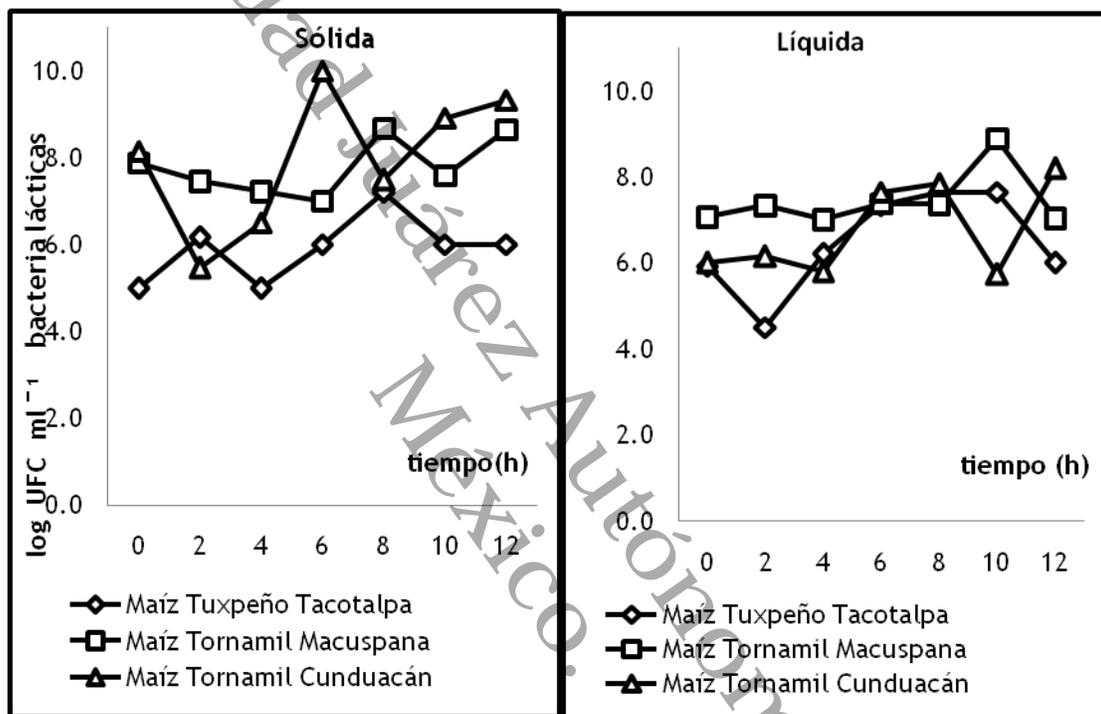


Figura 3. Crecimiento de bacterias lácticas en la fermentación sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz

En estudios realizados por Díaz-Ruiz *et al.* (2003) en pozol fermentado, reportaron que el crecimiento inicial de bacterias lácticas fue de 4.9 log UFC ml⁻¹ y a las 6 h con 8.2 log UFC ml⁻¹.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que en la fermentación sólida, hubo mayor crecimiento de bacterias lácticas al inicio con 8 log UFC ml⁻¹ para el mtC y mtM, el tiempo para alcanzar el número de bacterias lácticas fue a las 6 h solo para el mtC con 10 log UFC ml⁻¹, a excepción del mtT que presentó

menor número de bacterias en $5 \log \text{UFCml}^{-1}$ durante la fermentación. Al respecto, en la fermentación líquida a las 6 h se obtuvo valores cercanos en $7.7 \log \text{UFC ml}^{-1}$ para las tres razas de maíz.

Por otra parte los resultados obtenidos en ambas fermentaciones, las bacterias lácticas alcanzaron mayor número de colonias en la fermentación sólida en las tres razas, y al comparar con lo reportado por Wachter (1995) en el pozol en los Altos del estado de Chiapas, México, las bacterias lácticas alcanzaron sus cuentas máximas en el intervalo de 8 a $9 \log \text{UFC ml}^{-1}$ a las 9 h de fermentación, valores cercanos a los de la fermentación sólida realizada en el presente trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que al pozol que se elabora con maíz de grano seco, se le realiza un proceso de nixtamalización (alcalino-térmico) y que el atole agrio es de maíz maduro sin nixtamalizar, aunque ambas son fermentaciones lácticas cabe destacar que no se encontraron reportes de estudios microbiológicos sobre atole agrio que se elabora en el estado de Tabasco en lo revisado en la literatura, a pesar de ser un producto de consumo tradicional en las comunidades rurales cuando se dobla el maíz durante la finalización de la milpa y antes de la cosecha final del grano.

3.2.2 Bacterias lácticas amilolíticas

En la fermentación sólida de bacterias lácticas amilolíticas se observó que al inicio de la fermentación la carga microbiana fue diferente: para el mtM, mtT y mtC con valores de 0.7, 5.8 y $8.9 \log \text{UFC ml}^{-1}$, respectivamente (Figura 4). Sin embargo, la carga microbiana de bacterias lácticas amilolíticas para el mtT permaneció constante durante el transcurso de la fermentación, mientras el mtC a las 10 h alcanzó el máximo valor en $10.6 \log \text{UFCml}^{-1}$. No obstante, mtM inició con el menor número de bacterias lácticas amilolíticas pero conforme

transcurrió el tiempo de fermentación a las 6 h alcanzó el mayor número en 8.6 log UFC ml⁻¹ hasta el final de la fermentación.

Durante la fermentación líquida, las bacterias lácticas amilolíticas para el mtT se inició y permaneció durante la fermentación con 5 log UFC ml⁻¹. Mientras para el mtM inició con 9 log UFC ml⁻¹ y termino con 8.7 log UFCml⁻¹. El mtC inicio igual que el mtM, pero al transcurso del tiempo de fermentación alcanzó el máximo número de bacterias lácticas amilolíticas a las 10 h con 8 log UFC ml⁻¹. Al comparar ambas fermentaciones, en la fermentación sólida, el crecimiento de bacterias lácticas amilolíticas fue mayor en las tres razas de maíz.

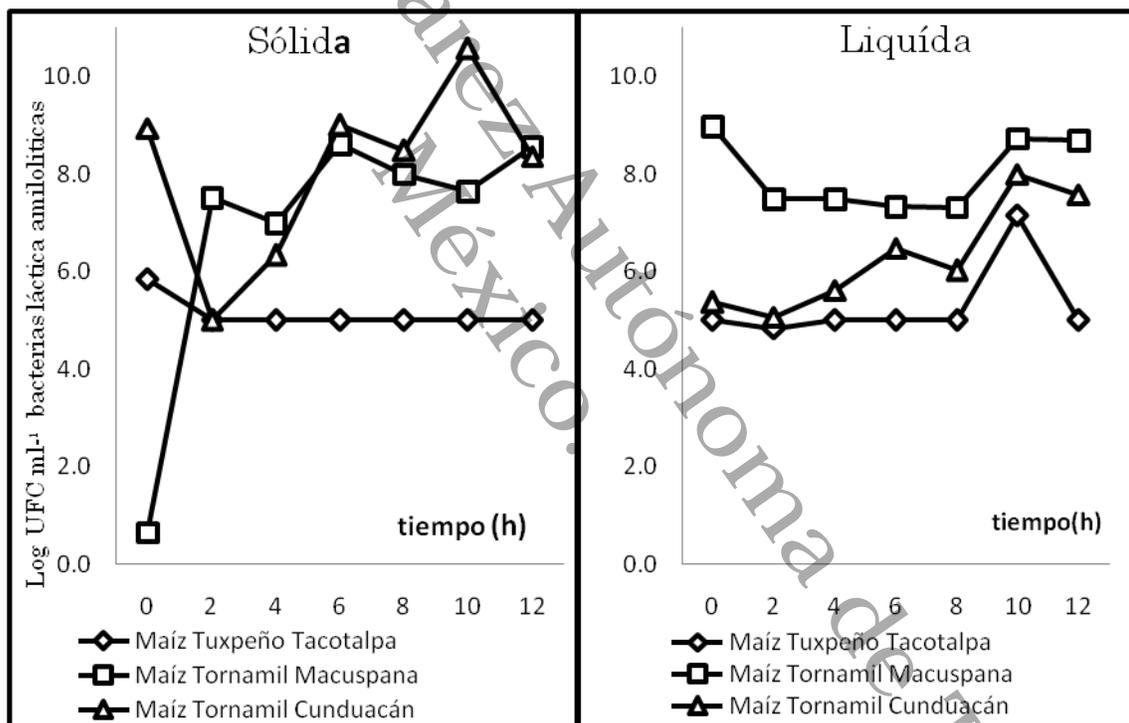


Figura 4. Crecimiento de Bacterias lácticas amilolíticas en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz.

De igual manera, Díaz-Ruiz *et al.* (2003) en un estudio del pozol fermentado (bebida) encontraron que el crecimiento de bacterias lácticas amilolíticas al inicio de la fermentación fue de 4.5 log UFCml⁻¹ después de 6 h el número de bacterias lácticas aumento hasta 7.6 log UFC ml⁻¹.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio, en la fermentación sólida, se encontraron valores mayores durante fermentación para el mtM y mtC valores similares aproximadamente en $8.8 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, el mejor valor fue del mtC en 10 UFC ml^{-1} a las 10 h.

Respecto a la fermentación líquida los valores fueron cercanos a los rangos encontrados en la literatura a excepción del mtM. En otro estudio realizado por Castillo-Morales *et al.* (2005) para la evaluación de pozol con chorote en estado sólido, la fermentación se realizó en un tiempo de 0 a 9 días, se inicia con $8.7 \log \text{ UFC ml}^{-1}$. Los resultados obtenidos en la fermentación sólida del atole agrio fueron semejantes a la literatura.

Omar y Ampe (2000) reportaron que la masa del pozol fermentado hubo un crecimiento de $8 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ en la periferia del pozol hasta alcanzar $9 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ y estos datos coinciden con los de la fermentación del atole agrio para los dos maíces de tornamil en la fermentación sólida.

3.2.3 Coliformes totales

En la Figura 5 se observa que la fermentación sólida mtT inició con $4 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ y permaneció constante durante 12 h de fermentación, el mtM presentó un comportamiento similar de $7.4 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ durante la tiempo de fermentación, en cuanto el mtC el máximo crecimiento fue a las 8 h con $10 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ y las 12 h terminó en cero.

En la fermentación líquida, se observó que el número coliformes totales, el mtT presentó un comportamiento similar con valores iguales a la fermentación sólida, el mtM y el mtC inicia aproximadamente $7.2 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, sin embargo, su comportamiento durante la fermentación mtM aumentó y mtC disminuyó en el número de coliformes aunque a pesar de ello, terminaron en el mismo número de bacterias en $7 \log \text{ UFC}$

ml⁻¹. Al comparar las dos fermentaciones, el mayor crecimiento de bacterias coliformes totales se presentó en la fermentación sólida, en cuanto al número de bacterias permaneció constante podría ser debido al cambio de pH durante la fermentación.

Sainz *et al.*(2001) reportaron que la cantidad de enterobacterias en la fermentación del pozol fue de 4.2 y 7.8 log UFC ml⁻¹. a las 6 h y se redujo a las 48h hasta 3.7 y 4.7 log UFC ml⁻¹, siendo mayores los valores obtenidos en éste trabajo. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que los valores obtenidos de coliformes totales son similares, para ambas fermentaciones.

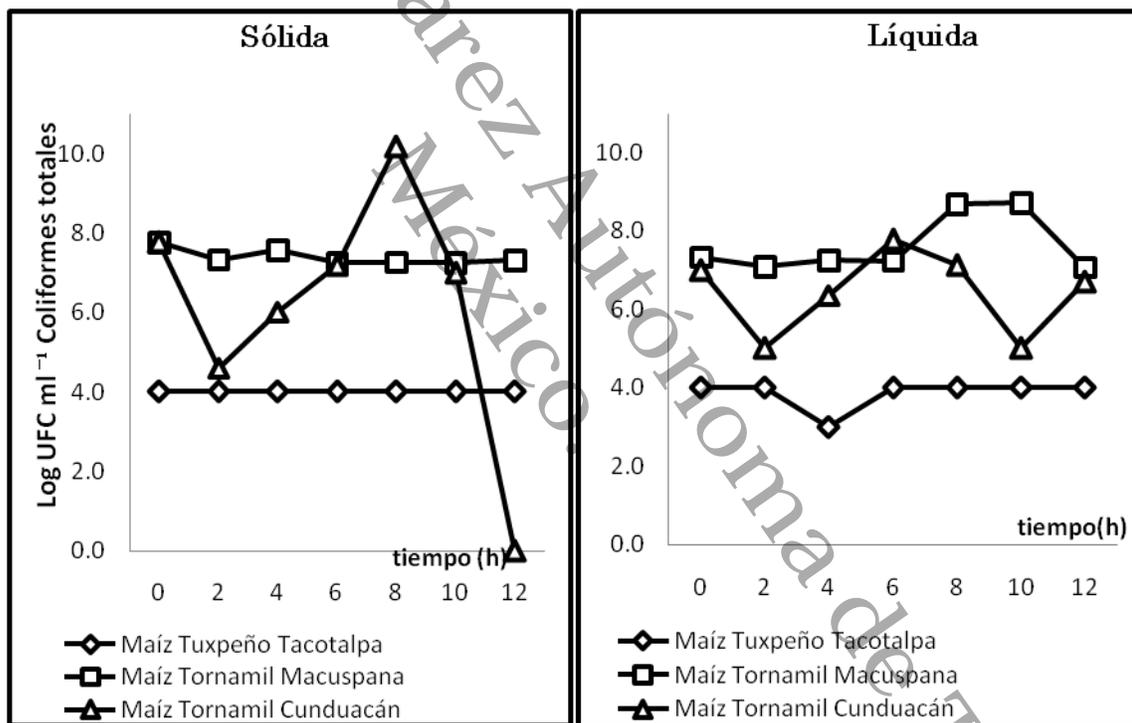


Figura 5. Crecimiento de coliformes totales en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz.

3.2.4. Bacterias mesófilas aerobias

Se observa en la Figura 6 el comportamiento de las bacterias mesófilas aerobias en la fermentación sólida durante las dos primeras horas de

fermentación tanto para mtM y mtC presentaron valores similares de 7.7 a 8 log UFC ml⁻¹, y durante el transcurso de la fermentación no se comportaron igual, pero al final de la fermentación terminaron en 8.8 log UFC ml⁻¹. En cuanto al mtT permaneció con valores en 5.5 log UFC ml⁻¹ durante la fermentación sólida.

En la fermentación líquida, las bacterias mesófilas aerobios se observó que al inicio de la fermentación la carga microbiana fue diferente para los maíces en el orden siguiente: el mtM en 0 log UFC ml⁻¹, el mtT en 5 log UFC ml⁻¹ y el mtC con 8 log UFC ml⁻¹. Se observó que conforme avanzó el tiempo de fermentación hubo aumento y disminución para las tres razas quedando valores casi iguales a las 12 h para el mtT 6 log UFC ml⁻¹, mtM 7 log UFC ml⁻¹, mtC 8 log UFC ml⁻¹.

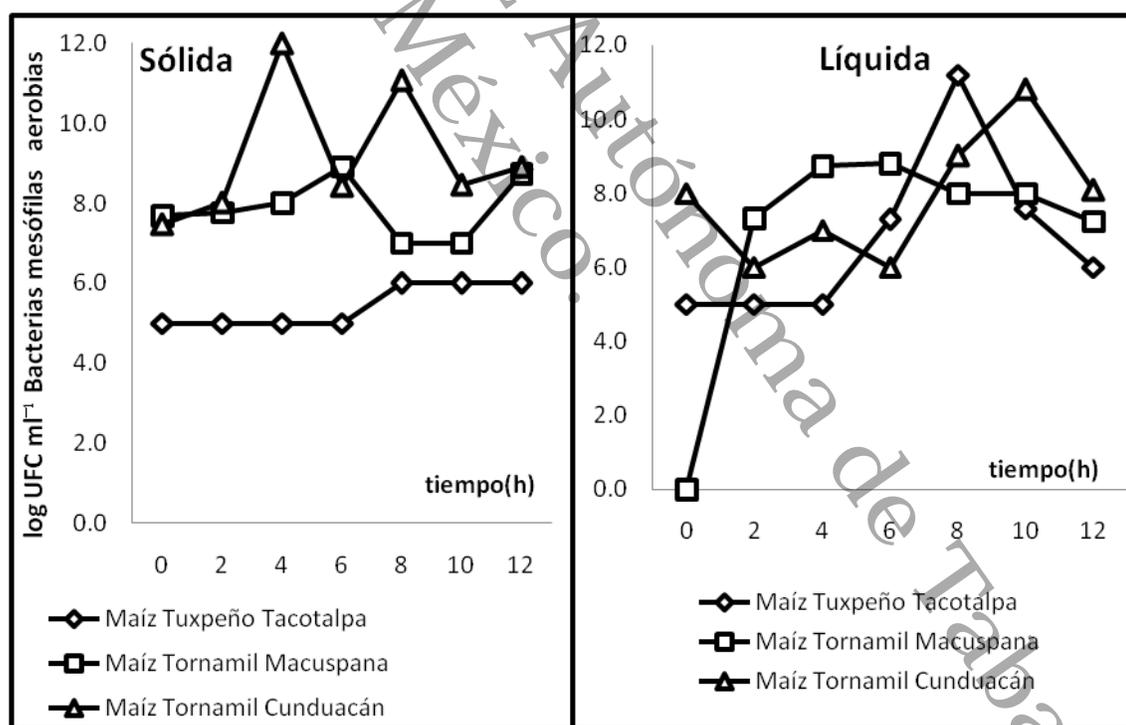


Figura 6. Crecimiento de bacterias mesofilas aerobias en las fermentaciones sólida y líquida de las tres variedades criolla de maíz.

En otro trabajo, Castillo-Morales *et al.* (2005) realizaron un estudio del pozol de chorote encontrando que las bacterias mesófilas aerobias a 0 h inicia con $9.2 \log \text{ UFC ml}^{-1}$. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que los valores de bacterias mesófilas aerobias son menores en ambas fermentaciones, lo que puede deberse al pH de la fermentación del atole agrio.

Bahiruet *al.* (2006), en una investigación sobre 200 muestras de *tej*, vino de miel etíope indígenas, con diferentes tiempos de producción de su flora microbiana encontraron que los promedios de producción fueron menores de $3 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, a diferencia del atole agrio que obtuvo valores arriba de $4.6 \log \text{ UFC ml}^{-1}$.

3.2.5. Hongos y Levaduras

En la Figura 7 se observa el comportamiento de hongos y levaduras de la fermentación sólida, y se observa que inician con valores diferentes, el mtM inicia con 7.4 y alcanza el máximo valor a la 12 h con $8.5 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, en cuanto al mtC inicia en $8.9 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, y a la 12 h alcanza el mayor número de $11.7 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, por lo contrario para el mtT no presento crecimiento durante la fermentación iniciando $5 \log \text{ UFC ml}^{-1}$. Respecto a la fermentación líquida, para el mtC y mtT se observó que presentaron valores menores que la FS a excepción del mtM que obtuvo en $8 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, las 8 h se observa el máximo crecimiento para el mtC con $9.9 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ y mtM con $8.8 \log \text{ UFC ml}^{-1}$, pero el mtT presentó comportamiento similar a la FS durante las 12 h fermentación. Al comparar ambas fermentaciones el número mayor de hongos y levaduras se presentó en la fermentación sólida y esto coincide con lo reportado con Mudgett (1986) encontró que en la fermentación el sustrato sólido provee de una baja humedad por organismos miceliales que incluye un número amplio de hongos filamentosos.

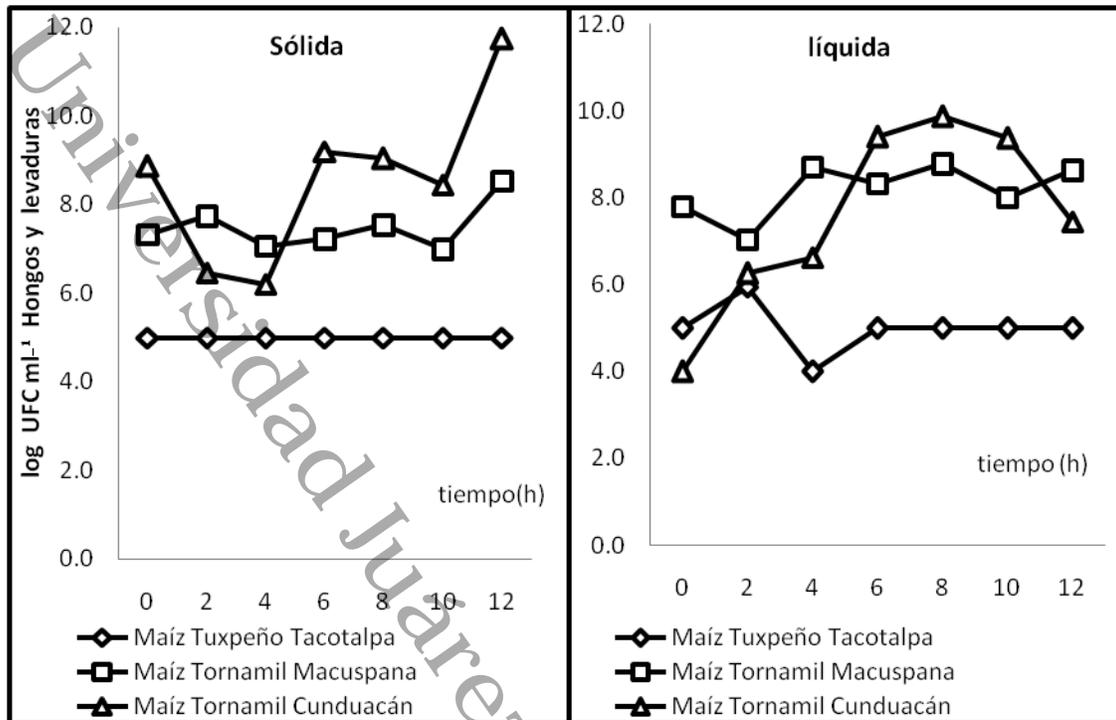


Figura 7. Crecimiento de Hongos y Levaduras de las tres variedades criolla de maíz.

De igual manera, Castillo-Morales *et al.* (2005) en el estudio que realizaron en el pozol de chorote encontraron que los hongos y levaduras a las 0h inició con 7.3 log UFC ml⁻¹ y 8.3 log UFC ml⁻¹, valores similares a la fermentación sólida en el presente del atole agrio.

En un estudio realizado por Bahiru *et al.* (2006) sobre la producción de vino de miel, encontraron que las levaduras y hongos fueron predominantes en la muestras con crecimiento de 6 log UFC ml⁻¹. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que el atole agrio se obtuvo valores mayores en la fermentación sólida. En otro estudio realizado por Omar y Ampe 2000. La dinámica de la comunidad microbiana durante la fermentación de la masa de pozol se observó que a los 4 días de fermentación hubo un crecimiento en las primeras horas de 8 log UFCml⁻¹ estos valores fueron parecidos a los del atole agrio en la fermentación sólida con valores de 7 log UFC ml⁻¹ y 8.3 log UFCml⁻¹.

4. Conclusiones

- En la fermentación sólida del atole agrio de maíz, los maíces mtM y mtT presentaron valores de pH similares al inicio de la fermentación, mientras que el mtC presentó un valor de pH mayor en una unidad.
- En la fermentación líquida, el mtC presentó mayor pH al final de la fermentación debido que el pH inicial del maíz fue mayor a diferencia de los otros dos maíces.
- La fermentación sólida de atole agrio presentó mayor crecimiento de bacterias lácticas, mesófilas aerobias y lácticas amilolíticas que la fermentación líquida de las tres variedades criolla de maíz.
- El número de bacterias coliformes fue similar en ambas fermentaciones del atole agrio de las tres variedades criolla de maíz estudiadas.
- En cuanto a los hongos y levaduras, la fermentación líquida presentó un mayor crecimiento que la sólida de las tres variedades criolla de maíz.
- En la fermentación sólida los maíces mtM y mtC presentaron mayor carga microbiana.
- El mtT presentó menor carga microbiana en ambas fermentaciones.

5. Referencias bibliográficas

- Aguilar, J., Ilcley, C., Marielle, C. 2003. Los sistemas agrícolas de maíz y sus procesos técnicos. En: Esteva, G. y Marielle, C. (Coordinadores). Sin maíz no hay país. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México. 83p
- Alvarado, C., García, A. E., Martín, S.E., Regalado, C. 2006. Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(3-4):260-268.
- Amo, R. S. 1997. La sostenibilidad desde el punto de vista biológico. En: Enkerlin E.C., Cano, G., García, A.R. Vogel, E. *Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible*. International Thomson Editores, México. pp: 554-545
- Bahiru, B., Mehari, T., Ashenafi, M. 2006. Yest and lactic acid flora of tejan indigenous Ethiopian honey wine: Variations Within and Between production units. *Foodmicrobiology* 23. p 277-282
- Beltrán-Orozco, M.C., Cruz, E.E., Wachter, C., Centurión, D., Espinosa, J. 2001. Comportamiento cinético del pH, acidez titulable y contenido proteico del pozol, durante el proceso de fermentación. *Revista Bebidas Mexicanas* octubre - noviembre.
- Ben, A., Vaughan, K. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic Acid bacteria *Journal of Nutrition* 137(3):741-747
- Cabrera, H.H.M., 1994. Cambio Tecnológico en la agricultura maicera de un pueblo Chontal de Tabasco *América Indígena* 54(1-2)

- Castillo-Morales, M., Wachter-Rodarte, C., Hernandez-Sanchez H. 2005. Preliminary studies on chorote a traditional Mexican fermented product. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 293-296.
- Codex STAN, 1993. Norma del Codex para el maíz enano (Codex STAN 188- 1993, Emd. 1-2005). *Codex Alimentarius*. Frutas y hortalizas frescas. Primera edición OMS y FAO, Roma. Consultado en la página: http://books.google.com.mx/books?id=q_LefvdAOAMC&pg=PA72&dq=maiz+mazorca+estigmas&hl=es&ei=fuZOTsmzMeSfsQK6nNG_Bg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&sqi=2&ved=0CDkQ6AEwAw#v=onepage&q&f=true 19 de Agosto 2011.
- Díaz, G., Wachter, C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana Microbiológica*: 45 (1-2):30-40
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*. Pp. 4367-4374.
- Esteva, G. 2003. Los árboles de las culturas mexicanas. En: Esteva, G. y Marielle, C. (Coordinadores). Sin maíz no hay país. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México. pp:21-22
- Foo, E. L., Griffin, H. G., Mollby R., Heden, C. G. (Editors). 1993. *The Lactic Acid Bacteria*. Horizon Scientific Press. United Kingdom, pp. 89-91
- González-Varra, A.G., Vaccari, E., Dosi, A., Trilli, M. 2000. Enhanced production of L(+) - lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei*

- DSM 20011 using ion – exchange resins and cross – flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(2):147–156
- Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of Microbial Populations During Food Fermentation. *FEMS microbiology reviews* 28:251-260.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T. 1998. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* pp.528-566
- Lappe, P.,Ulloa, M. 1989. Estudios étnicos: microbiano y química del tesgüino tarahumara. Universidad Nacional Autónoma México. México, pp. 9-58.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., Yura T. 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology* 148(1):64–71
- Mossel, D. A. A. y Moreno, G. B.1994. *Microbiología de los alimentos, Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Editorial Acribia, España 375p.
- Mudgett, E.R. 1986. Solid-state fermentations. In: Arnold, L.D., Nadine, A.S. *Manual of Industrial Microbiology and biotechnology*. John Wiley sons, inc. New York. Pp.66-81
- Narez, J. C. 2011. Colecta y caracterización morfológica de maíces criollo del Estado de Tabasco Tesis de licenciatura de la carrera Ingeniería en Agronomía. Universidad Juárez Autónoma Tabasco, México. 65p
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in Foods. Normas Mexicanas.Dirección General de Normas.

- NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Métodos para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Norma Oficial Mexicana, México.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.
- Nuraida, I.C., Wachter, C., Owens, J.D. 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. World J. Microbial. Biotechnol. 11:567-571.
- Omar, B., Ampe, F. 2000. Microbial Community Dynamics during production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. Applied and Environmental Microbiology. pp.3664-3673
- Orozco, S.A.D. 1999. El marceño en las zonas de Tabasco. En: Gonzales, J. A. y Amo R. S. del (Compiladoras) Agricultura y Sociedad en México. Universidad iberoamericana, Gestión de Ecosistemas, Plaza y Valdez y Consejo Nacional para la Enseñanza de la biología, México. Pp.118-119
- Ray, B., Bhunia, A. 2010. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos Editorial McGraw-Hill México, pp.21-70
- Ruz, M. H. 2006. Mayas. Editorial Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, México. 91p.
- Sainz, T., Wachter, C., Espinoza, J., Centurión, D. Navarro, A., Molina, A., Inzunza A., Cravioto, A., Eslava, C. 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexicana

- cid-fermented food. International Journal of Food microbiology 71 (2001) 169-176.
- Saucedo, C. G. 2008. Aplicaciones de la fermentación en medio sólido en el área de alimentos. IV Simposio Internacional de Ciencia y tecnología de alimentos. 26 al 26 Septiembre 2008. Villahermosa, Tabasco.
- Tinoco, A.C.A.2002. Rodríguez M.F.A., Sandoval R J.A., Barrón F.S., Palafox, C., Esqueda, E.V.A., Sierra, M.M., Romero, M.J. Manual de producción de maíz para los estados de Veracruz y Tabasco. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Papaloapan. Libro Técnico Núm. 9. Veracruz, México.98p.
- Wacher, M. C.1995. Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis del Doctorado. México: Universidad Nacional Autónoma de México
- Wacher-Rodarte, C. 2002. Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. En: García, Quintero, López-Munguía, A.(Compiladores). Biotecnología Alimentaria. Limusa Noriega Editores, México, pp.313-346

Caracterización microbiológica del atole agrio de maíz

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|----|--|-------------------|
| 1 | issuu.com Internet | 163 palabras — 2% |
| 2 | idoc.pub Internet | 158 palabras — 2% |
| 3 | mx.answers.yahoo.com Internet | 127 palabras — 2% |
| 4 | documents.mx Internet | 86 palabras — 1% |
| 5 | docplayer.es Internet | 85 palabras — 1% |
| 6 | pdfs.semanticscholar.org Internet | 59 palabras — 1% |
| 7 | vsip.info Internet | 58 palabras — 1% |
| 8 | ri.ujat.mx Internet | 52 palabras — 1% |
| 9 | www.geo.mtu.edu Internet | 48 palabras — 1% |
| 10 | ankamesaybar.blogspot.com Internet | 42 palabras — 1% |

| | | |
|----|--|--------------------|
| 11 | sired.udenar.edu.co Internet | 31 palabras — < 1% |
| 12 | www.researchgate.net Internet | 31 palabras — < 1% |
| 13 | repositorio.chapingo.edu.mx Internet | 30 palabras — < 1% |
| 14 | hdl.handle.net Internet | 25 palabras — < 1% |
| 15 | oxanalazo.blogspot.com Internet | 24 palabras — < 1% |
| 16 | pt.scribd.com Internet | 24 palabras — < 1% |

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 20 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.