



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MICOFLORA DE TRES TIPOS DE POZOL FERMENTADO BLANCO,
CON CACAO (*Theobroma cacao* L.) Y CON PIMIENTA (*Pimenta dioica*
L.)

TRABAJO RECEPCIONAL BAJO LA MODALIDAD DE TESIS

QUE PRESENTA:

ROMÁN LÓPEZ JIMÉNEZ

ASESORES INTERNOS:

M.A. JUDITH ESPINOSA MORENO

M.C. DORA CENTURIÓN HIDALGO

ASESORES EXTERNOS:

DR. JOSÉ EDMUNDO ROSIQUE GIL

M.C. ANA KAREN MARTÍNEZ RIVERA

VILLAHERMOSA, TABASCO, JUNIO DE 2014.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

"2014, Conmemoración del 150 Aniversario de
la Gesta Heroica del 27 de febrero de 1864"

19 de mayo de 2014

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT
PRESENTE.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del (la) interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) C. Román López Jiménez, con matrícula 082C11025, egresado(a) de la licenciatura de Ingeniería en Alimentos, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis** Titulado: **"Microflora de tres tipos de pozol fermentado blanco, con cacao (*Theobroma cacao* L.) y con pimienta (*Pimienta dioica* L.)"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR



DIVISION ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno.

G.G.A.

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada “**Micoflora de tres tipos de pozol fermentado blanco, cacao (*Theobroma cacao L.*) y con pimienta (*Pimenta dioica (L.)*”**”, 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 más no limitativa 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 19 de mayo del año 2014.

A U T O R I Z O



IAA. ROMÁN LÓPEZ JIMÉNEZ

TESISTA

AGRADECIMIENTOS

En estos momentos de mi vida doy gracias al Creador por alcanzar este triunfo, por forjarme metas en la vida y cumplirlas, y esta es una de ellas la cual la superé con altas y bajas, y esta es una de ellas como profesionista y seguir adelante con la frente muy en alto agradezco a:

La M.C. Dora Centurión Hidalgo por todo su apoyo incondicional, por todo su cariño y confianza para concluir este proyecto, esos conocimientos que me impartió durante todo la carrera y formarme profesionalmente mil gracias por todo.

La M.C. Judith Espinosa Moreno, por darme su confianza, cariño y por consentirme tanto esos consejos tan confortantes que me sirven en mi vida y por la gran formación académica que me brindó la quiero mucho.

Las M.C. Areli, Blanquita, Mayanin, Leo, Ana Maria, Lulú, Ramiro, Dra. Edith, por su amistad y conocimientos adquiridos y fueron parte importante en este proyecto.

Al Dr. Ricardo García Herrera, por su gran amistad, apoyo incondicional, a mis amigos veterinarios, Emanuel, Héctor, Antonio, Jesús Manuel.

A mis amigos y amigas Elsy, Yanahi, Daniel, Anahi, Omar, Maximino, Ramón, Yuli, Maritza, Jhonatan, Pedro Luis, Pedro, por sus hazañas vividas en la carrera por la bardita que nos dio tantas alegrías y momentos maravillosos y por ser mis grandes amigos.

A mis amigos externos Faby, Piolo, Cuca, Vale, Arturo, Vale, Pili, Miki y a Vivi palo por su apoyo para realizar este proyecto.

DEDICATORIA

En Dios por darme la vida, por protegerme, darme cariño, sabiduría, una enorme fortaleza y poder llegar a mi vida profesional.

Mas a esta persona en especial que a lo largo de mi vida me formó como gran persona y me guio durante todo este tiempo para ti (Yolanda Jiménez +), por tus consejos que los llevaré, pero tu estarás siempre en mi corazón y mi mente nunca te olvidaré no estarás presente conmigo este día pero en mi mente sí.

A mi padre Manuel López que es un hombre excepcional y me brinda todo su cariño y amor en la vida.

No podía faltar al gran pilar Guadalupe que a lo largo de mi vida me ha apoyado, me levanta en los momentos más difíciles y siempre está pendiente de mi TRM. A mis tesoros Ivonne y Analía que son parte fundamental en esta vida que aunque sean tremendas las quiero mucho y seguirán presentes en mi corazón.

ÍNDICE

	Página
Índice de Cuadros	iii
Índice de Figuras	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1. Fermentación de alimentos	2
2.1.1. Fermentación líquida	3
2.1.2. Fermentación sólida	4
2.3. Procesos de fermentación	6
2.4. Microorganismos en los alimentos fermentados	7
2.5. Bebida de pozol	11
2.6. Hongos y Levaduras	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Nixtamalización del pozol	17
3.2. Preparación del pozol	17
3.3. Fermentación del pozol	17
3.4. Determinación de pH en pozol	18
3.5. Determinación de Acidez titulable en pozol	18
3.6. Cuantificación del crecimiento de hongos y levaduras	18
3.7. Aislamiento de hongos y levaduras	19
3.8. Purificación de cultivos de hongos	19
3.9. Identificación taxonómica de hongos	19
VI. RESULTADOS	22
4.1. Fermentación del pozol blanco	22
4.2. Fermentación del pozol con pimienta	23
4.3. Fermentación del pozol con cacao	25
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	34
VII. LITERATURA CITADA	35

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Alimentos orientales fermentados tradicionales por hongos.....	4
Cuadro 2. Diversidad fúngica en la actualización 2011 de microorganismos con uso benéfico.....	8
Cuadro 3. Principales productos obtenidos industrialmente con la participación de hongos.....	10
Cuadro 4. pH y % de acidez titulable durante la fermentación del pozol blanco.....	23
Cuadro 5. Hongos durante la fermentación del pozol blanco.....	23
Cuadro 6. pH y % de acidez titulable durante la fermentación del pozol con pimienta.....	24
Cuadro 7. Hongos presentes en el pozol con pimienta.....	25
Cuadro 8. pH y % de acidez titulable durante la fermentación del pozol con cacao.....	22
Cuadro 9. Hongos presentes durante la fermentación del pozol con cacao.....	26
Cuadro 10. Especies aisladas en los tres tipos de pozol estudiados.....	31

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Crecimiento de hongos y levaduras durante la fermentación del pozol blanco.....	22
Figura 2. Crecimiento de hongos y levaduras durante la fermentación del pozol con pimienta.....	24
Figura 3. Crecimiento de hongos y levaduras durante la fermentación del pozol con cacao.....	25
Figura 4. Hongos y levaduras en la fermentación de tres tipos de pozol (PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).....	27
Figura 5. pH en la fermentación de tres tipos de pozol(PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).....	28
Figura 6. Acidez titulable en la fermentación de tres tipos de pozol (PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).....	30

RESUMEN

La fermentación natural de los alimentos tradicionales, se lleva a cabo por la diversidad microbiana (bacterias, hongos y levaduras). En el caso del pozol fermentado, que forma parte de la cultura alimentaria en el estado de Tabasco, es prioritario estudiar los microorganismos presentes, en especial los hongos, para garantizar la inocuidad alimentaria para los consumidores o encontrar un hongo con potencial para el desarrollo tecnológico posterior de los alimentos. Con la finalidad de evidenciar lo anterior se llevó a cabo la investigación en el pozol blanco, pozol con cacao (*Theobroma cacao*) y pozol con pimienta (*Pimenta dioica*), utilizando un medio de cultivo específico para el crecimiento de hongos los cuales se aislaron por el método de punción y se resembraron hasta obtener un cultivo puro para la posterior identificación de cada cepa encontrada. El pH disminuyó en forma similar desde el inicio de la fermentación del pozol blanco y del pozol con cacao hasta las 72 h de 5.42 a 4.61. Sin embargo, en el pozol con pimienta se mantuvo estable el pH a partir de las 48 h en 4.7. Al final de la fermentación, los tratamientos con pimienta y con cacao alcanzaron cantidades de acidez titulable alrededor de 4.5%. En el pozol con cacao se aislaron cinco cepas del género *Curvularia* de las cuales se logró la identificación a especie de dos de ellas: *C. affinis* y *C. lunata*; mientras que en el pozol de pimienta se aislaron cinco cepas identificando el género de tres de ellas y en las otras dos cepas sólo se obtuvo el micelio estéril por lo que no se logró la identificación de éstas. Finalmente, en el pozol blanco se aislaron ocho cepas de hongos de las cuales cinco pertenecen al género *Aspergillus* y tres al género *Alternaria*.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la época prehispánica, los alimentos y bebidas fermentados tuvieron una gran importancia en la vida diaria y ceremonial de los grupos indígenas de la región mesoamericana (México y América Central) y andina (desde Colombia a Chile). La tradición de prepararlos y consumirlos ha persistido hasta la época actual, al grado de no sólo ser aceptados por los grupos indígenas, sino por los mestizos y los de inmigración reciente, quienes los aceptaron para acompañar los platillos tradicionales. Estos alimentos se elaboran localmente a nivel doméstico (para autoconsumo) o a pequeña escala (para su venta) mediante técnicas que se han transferido por generaciones hasta la actualidad y que involucran una fermentación espontánea o inducida (por la adición de inóculo o “pie” de una fermentación previa) en la que predominan microorganismos específicos cuya naturaleza, en general, es desconocida (Lappe *et al.*, 2011). El pozol fresco y fermentado, ya sea blanco o con cacao, es parte de la cultura alimentaria en el estado de Tabasco, sin embargo, los estudios referentes a la micología del pozol fermentado se han realizado principalmente al pozol blanco por lo que es prioritario estudiar los microorganismos responsables, en especial los hongos, de la fermentación natural en los diferentes tipos de pozol para garantizar la seguridad, inocuidad y la salud de los consumidores de pozol. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar la micoflora del pozol blanco, con cacao y con pimienta para la identificación de la diversidad fúngica presente durante la fermentación en relación con el pH y la acidez titulable.

II. ANTECEDENTES

2.1. Fermentación de alimentos

La fermentación de los alimentos es una práctica muy antigua presente en todas las culturas del mundo. Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos. Algunos alimentos fermentados han trascendido sus fronteras de origen para convertirse en productos de consumo cotidianos en más de un continente; sin embargo, aquellos que se producen en forma artesanal o semicomercial, o bien para el consumo de culturas particulares, se denominan “tradicionales” (Astiasarán y Martínez, 2000).

La producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente. Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos) y están constituidos por microbiotas complejas, que son difíciles de describir mediante el uso de métodos convencionales. Recientemente, sin embargo, ha habido la necesidad de tomar en cuenta el ecosistema completo, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies. Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el control de microorganismos indeseables como para el uso racional de microorganismos en la producción de alimentos y bebidas fermentadas; así como para su uso como probióticos (Díaz y Wachter, 2003). Como consecuencia de esto, es muy difícil obtener productos higiénicamente controlados que, además, presenten las características apreciadas por los grupos indígenas y mestizos que los consumen de forma habitual (Ulloa y Herrera, 1984).

La fermentación del alimento implica un proceso en que las materias primas se convierten a alimentos por medio del crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos deseables. Éstos utilizan algunos componentes presentes en las materias primas, como sustratos, para generar energía y componentes celulares, aumentar la población y producir muchas sustancias secundarias útiles (también

llamadas productos finales) que se excretan al ambiente. Los componentes que no se usan de las materias primas y los productos del metabolismo secundario (y a veces las células microbianas) constituyen, en su conjunto, los alimentos fermentados (bebidas alcohólicas, atole agrio, yogurt, entre otros). 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 3,500 tipos de alimentos fermentados. Los seres humanos de antiguas civilizaciones han producido y consumido 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 (Ray y Bhunia, 2010).

En África existen varios alimentos fermentados basados en una masa que se prepara remojando el maíz durante varios días antes de molerlo. Entre éstos se encuentra el “kenkey”, en el que se deja fermentar la masa de 1 a 3 días, y el “ogi”, en el que la masa se diluye con agua, se filtra y el filtrado se somete a fermentación. Las bacterias responsables de estas fermentaciones son *Corynebacterium* sp, *Aerobacter cloacae* y *Lactobacillus plantarum*. Se han aislado también levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida micoderma* (Wacher-Rodarte, 2002).

Los alimentos se pueden fermentar de tres maneras, según las fuentes de donde provienen los microorganismos deseables: natural, re-inoculación y controlada, estas fermentaciones se llevan a cabo en cultivo sumergido (líquido) y sólido (superficie) (Ray y Bhunia, 2010).

2.1.1. Fermentación líquida

Se puede definir a la fermentación líquida o sumergida como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede o no ser aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa

y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos (Henzler y Schedel, 1991).

2.1.2. Fermentación sólida

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

La fermentación en medio sólido existe de manera natural desde el comienzo de la vida del planeta. El hombre ha descubierto que este proceso aumenta el contenido proteico de alimentos y mejora su conservación y sus características organolépticas. Ejemplos de ella son la fermentación de cacao, koji, soya, beneficio de café, pozol, quesos roquefort y camembert, quesos madurados, ensilaje, fermentación de rastrojos y pajas, aplicaciones en control biológico, aplicaciones ambientales (Saucedo, 2008). Entre los sustratos tradicionales utilizados en la fermentación sólida se incluye una variedad de productos agrícolas tales como arroz, trigo, mijo, cebada, maíz y soya (Cuadro 1).

Cuadro 1. Alimentos orientales fermentados tradicionalmente por hongos.

Producto	Género	Sustrato
Salsa de soya	<i>Aspergillus</i>	Soya-trigo
Miso	<i>Aspergillus</i>	Arroz-soya
Tempe	<i>Rhizopus</i>	Soya
Sufu	<i>Actinomucor</i>	Tofu
Sake	<i>Aspergillus</i>	Arroz

Fuente: Mudgett, 1986.

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, 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 organismos miceliales que producen una variedad de enzimas extracelulares. Estos organismos incluyen un número amplio de hongos filamentosos y pocas bacterias (al menos una cepa de *Bacillus*) y actinomicetos que pueden crecer a altas concentraciones cerca de la superficie sólida (Mudgett, 1986).

Otro sustrato como el camote (*Ipomoea batatas*) se ha utilizado para desarrollar un alimento fermentado con tres especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Pleurotus ostreatus*) usando una fermentación sólida (Abu et al., 2000).

Para estimar la tasa de formación de biomasa en 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.
- Los sustratos sólidos proveen un ambiente selectivo para hongos filamentosos y pocas bacterias que crecen en forma micelial.
- Los hongos comúnmente empleados en la fermentación en sustrato sólido son aerobios estrictos y necesitan obtener oxígeno de la fase gaseosa bajo condiciones relativamente difíciles para transferencia de gases.
- La baja humedad reduce el problema de contaminación.
- El rendimiento del producto puede ser más alto que el obtenido en medio líquido (Mudgett, 1986).

2.3. Procesos de fermentación

Los alimentos fermentados tradicionales constituyen microambientes para el desarrollo de una flora microbiana diversa, capaz de efectuar numerosas reacciones metabólicas (Farrés *et al.*, 1999).

En un estudio de los microorganismos presentes en pozol comercial y pozol elaborado en condiciones estériles de laboratorio se encontró la presencia de bacterias mesófilas aerobias, bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos (Wacher *et al.*, 1993).

Los procesos de fermentación mejoran la seguridad de los alimentos por la reducción de compuestos tóxicos tales como aflatoxinas y cianógenos o por la producción de factores antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol, que facilitan 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 en otros alimentos de los mismos componentes antimicrobianos naturales encontrados en los alimentos fermentados en sustitución de conservadores químicos (Giraffa, 2004).

La mayoría de estos alimentos fermentados son alimentos funcionales ricos en fitoquímicos, fibra dietaria, compuestos antioxidantes (β -carotenos y antocianinas, entre otros) y componentes probióticos (bacterias ácido lácticas, levaduras) (Ray y Sivakumar, 2009).

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

2.4. Microorganismos en los alimentos fermentados

Los cultivos alimentarios microbianos han sido directa o indirectamente objeto de distintos marcos regulatorios en el curso de las últimas décadas. Bourdichon *et al.* (2012) reportan que varios de esos marcos normativos pusieron énfasis en la historia de uso, en el concepto de alimento tradicional o en el reconocimiento general de la seguridad. Por lo tanto, las listas autorizadas de microorganismos con un uso documentado en los alimentos han alcanzado una alta demanda. Una de estas listas fue publicada en 2002 como resultado de un proyecto conjunto entre la Federación Internacional de Lechería (IDF por sus siglas en inglés) y la Asociación Europea de Cultivos en Alimentos para Humanos y Animales (EFFCA, por sus siglas en inglés). El inventario IDF 2002 se ha convertido en una referencia *de facto* para los cultivos alimentarios en el uso práctico. Sin embargo, como la atención se centró principalmente en los cultivos lácteos disponibles comercialmente, había una necesidad insatisfecha de una lista con un alcance más amplio. La lista de los microorganismos con una historia de uso en alimentos incluyó originalmente 82 especies bacterianas y 31 especies de levaduras y hongos en el inventario IDF 2002 y que se limitó esencialmente a la utilización microbiana en matrices lácteas.

Por lo anterior, Bourdichon *et al.* (2012) presentaron en 2011 un inventario actualizado de los microorganismos utilizados en las fermentaciones alimentarias que cubre una amplia gama de matrices de alimentos (lácteos, carne, pescado, verduras, leguminosas, cereales, bebidas y vinagre). También revisaron y actualizaron la taxonomía de los microorganismos utilizados en las fermentaciones alimentarias con el fin de llevar un acuerdo a la taxonomía con la situación actual en la nomenclatura. Estos autores, mencionan que, al incluir otras matrices alimentarias, consideraron 69 especies de hongos y levaduras en la actualización de 2011 (Cuadro 2).

Cuadro2. Diversidad fúngica en la actualización 2011 de microorganismos con uso benéfico.

Phylum	Familia	Género	Especies
Ascomycota	Cordycipitaceae	<i>Lecanicillium</i>	1
	Dipodascaceae	<i>Geotrichum</i>	1
		<i>Yarrowia</i>	1
		<i>Galactomyces</i>	1
	Microascaceae	<i>Scopulariopsis</i>	1
	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	2
	Saccharomycetaceae	<i>Candida</i>	10
		<i>Cyberlindnera</i>	2
		<i>Debaryomyces</i>	1
		<i>Dekkera</i>	1
		<i>Hanseniaspora</i>	3
		<i>Kazachstania</i>	2
		<i>Kluyveromyces</i>	1
		<i>Lachancea</i>	2
		<i>Metschnikowia</i>	1
		<i>Pichia</i>	4
		<i>Saccharomyces</i>	4
		<i>Schwanniomyces</i>	1
		<i>Starmerella</i>	1
		<i>Trigonopsis</i>	1
<i>Wickerhamomyces</i>	1		
<i>Zygosaccharomyces</i>	1		
<i>Zygorulasporea</i>	1		
<i>Kluyveromyces</i>	1		
Sarcosomataceae	<i>Torulasporea</i>	1	
Schizosaccharomycetaceae	<i>Schizosaccharomyces</i>	1	
Sordariaceae	<i>Neurospora</i>	1	
Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	4	
	<i>Penicillium</i>	7	
Ascomycota-especies			59
Basidiomycota	Cystofilobasidiaceae	<i>Cystofilobasidium</i>	1
		<i>Guehomyces</i>	1
Basidiomycota-especies			2
Zygomycota	Mucoraceae	<i>Mucor</i>	4
		<i>Rhizopus</i>	4
Zygomycota-especies			8
Número total de especies			69

Fuente: Bourdichon *et al.*, 2012

Uno de los géneros iniciales fue rechazado porque su uso en alimentos no ha sido documentado y la referencia inicial en el inventario IDF 2002 fue insuficiente. La evolución de la taxonomía, la extensión de varios usos en otras matrices, las fermentaciones por levaduras y los alimentos por hongos también han dado lugar a un número creciente de especies: de 113 a 264 especies con uso demostrado en alimentos (Bourdichon *et al.*, 2012).

Las fermentaciones espontaneas naturales, por ejemplo, en procesos sin un inóculo iniciador, se han aplicado para la conservación de alimentos por milenios. Herrera y Ulloa (2004) mencionan que en una fermentación natural, las condiciones son establecidas tradicionalmente para que los microorganismos deseables crezcan y produzcan metabolitos que dan las características únicas al producto. En el Cuadro 3 se indican algunos metabolitos que han sido obtenidos por fermentación.

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 de la fermentación 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 de descomposición) en los alimentos fermentados. Las consecuencias económicas y sociales de microorganismos en los alimentos dependen no sólo de las especies presentes, sino principalmente de su número. 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 (Giraffa, 2004).

Cuadro 3. Principales productos obtenidos industrialmente con la participación de hongos.

Alimentos y bebidas fermentados	Ácidos orgánicos	Vitaminas
Queso Pan Cerveza Vino	Cítrico Gálico Glucónico Oxálico	Riboflavina Tiamina Ácido nocotínico Biotina
Otros alimentos y bebidas fermentados (tradicionales de México)	Láctico Fumárico Itacónico	Ácido pantoténico Ácido paraminobenzoico
Pozol Tesgüino Pulque Tuba Colonche Tepache Tibicos	Kójico Giberélico Ustilágico Grasas Glicerina	Enzimas Lactasa Invertasa Poligalacturonasa Amilasas Proteasas Pectinasas Lipasas
De otras partes del mundo	Proteínas Antibióticos Penicilina Cefalosporina Griseofulvina	Celulasas Renina Glucosa-oxidasa
Salsa de soya (shoyu) Miso Hamanatto Tape ketella Ang-kak Idli Ogi Tempeh (tempeh kedeleee) Sufu Ontjom (oncom) Lao-Chao (tape ketan) Cerveza de sorgo Arroz fermentado	Esteroides Cortisona Hidrocortisona Prednisona Testosterona Estradiol Espironolactona	Alcaloides Ergotamina Pigmentos Astaxantina β-Caroteno

Fuente: Herrera y Ulloa, 2004.

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 en las condiciones físicas y químicas del microambiente

del alimento (gradiente pH, oxígeno, a_w , sal, temperatura) y a la habilidad para colonizar la matriz del alimento y crecer con heterogeneidad espacial: microcolonias y biopelículas (Giraffa, 2004).

Es importante la investigación relacionada con los alimentos fermentados tradicionales, para obtener productos consistentes y de buena calidad higiénica a nivel rural, industrializar y expandir su distribución, utilizarlos en el desarrollo de nuevos productos o para aprovechar las características especiales de su microbiota en otros procesos (Hesseltine, 1979 citado por Wachter-Rodarte, 2002). El estudio de los alimentos fermentados tradicionales se ha llevado a cabo durante años. Entre los productos que destacan por fermentación del grano de maíz, y que son consumidos en los estado de la República Mexicana, se encuentran los siguientes: agua agria, atole agrio, charagua, ostoche, pozol, quebranta huesos, sendechó, tepache, tescüino y otros más (García *et al.*, 2002).

2.5. Bebida de pozol

La elaboración de alimentos fermentados no requiere de conocimientos biológicos, es de manera natural porque los microorganismos responsables están presentes en el medio ambiente (Scott y Sullivan, 2008). Un ejemplo de alimento fermentado de forma natural es el pozol, bebida fermentada no alcohólica a base de maíz (*Zea mays* L.), consumidas en el sureste de México, principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas. Su consumo tradicional es con maíz sólo o adicionado con algún aditivo como el cacao (*Theobroma cacao*), la pimienta (*Pimenta dioica*), el camote (*Ipomoea batatas*) o el chile (*Capsicum annum*) (Ulloa y Herrera, 1984). En los procesos de fermentación del pozol se desarrolla una gran variedad de microorganismos, dentro de los cuales destacan las bacterias lácticas que acidifican la masa, al igual que los hongos y levaduras que contribuyen a la producción de aromas y sabores (Wachter *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1999).

El pozol es una bebida refrescante preparada con masa fermentada de maíz nixtamalizado. Algunos grupos étnicos del sureste de México, como los chontales y choles de Tabasco, los mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, los lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas y

los zapotecos de Oaxaca, lo consumen como alimento básico. Algunos de ellos llevan masa de pozol como provisión para viajes largos. El pozol se utiliza con fines medicinales para controlar diarreas, con adición de miel de abeja se usa para reducir la fiebre y los mayas preparaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales de la piel. Los mayas también lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz (Ulloa y Herrera, 1984).

Cañas *et al.* (1993) han descrito las diferentes etapas para la obtención del pozol de la región de los altos de Chiapas de México y reportaron que existen varias formas de elaboración dependiendo de cada productor, aunque destacan que lo más importante es el tratamiento térmico adicional de los granos de nixtamal el cual marca la diferencia entre el pozol indígena y el mestizo.

Ulloa *et al.* (1971) consideran que el pozol es un alimento básico y, en ciertas ocasiones, casi único en la dieta de algunos grupos indígenas del sureste de México; el estudio de las capacidades metabólicas de los microorganismos que lo producen puede ser de gran importancia para explicar las propiedades nutritivas del pozol y la preferencia que tienen por él los grupos indígenas antes mencionados.

En determinados lugares del estado de Tabasco y Chiapas, los consumidores lo envuelven en hoja de plátano (*Musa spp*) cuando realizan viajes cortos para posteriormente consumirlo durante el almuerzo (Barros y Buenrostro, 2011; Ulloa y Herrera, 1984). Esta masa de pozol también se lleva envuelta en hoja de platanillo (*Heliconia spp*) o de hoja blanca (*Calathea lutea*), con el objeto de reducir la desecación de la masa durante el tiempo que dure la fermentación, el cual varía de uno a cinco días o más; algunos grupos indígenas como los lacandones y chamulas, dejan fermentar el pozol dos o más semanas y lo consumen ya enmohecido (Ulloa y Herrera, 1984). El pozol, masa de maíz fermentada que es disuelto en agua y consumida en el sureste del país por diversos grupos indígenas, como los lacandones, y por mestizos, no es una bebida alcohólica sino ácida y con mejores cualidades nutritivas que la masa de maíz sin fermentar (Herrera y Ulloa, 2004).

La microbiota del pozol está constituida por bacterias, hongos y levaduras. Al principio de la fermentación predominan las bacterias que pueden ser las responsables de la producción de ácido en las primeras horas de la fermentación. Entre las bacterias que se han aislado del pozol se encuentran *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes*, ambas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y la primera presenta antagonismo contra varias especies de hongos, levaduras y bacterias. Ambas especies fijan el nitrógeno individualmente o en cultivos mixtos, cuando se cultivan en medios con diferentes fuentes de carbono. Así, el incremento de proteína cruda durante la fermentación del pozol, que no se ha registrado en alimentos similares, puede deberse a la fijación de nitrógeno atmosférico que llevan a cabo algunos microorganismos del pozol. En las primeras horas de fermentación se encuentran *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida*, y en etapas posteriores *Cladosporium cladosporioides*, *Monilia sitophila* y *Mucor racemosus* (Wacher-Rodarte, 2002).

Se ha registrado el efecto antagónico *in vitro* del pozol y de *Agrobacterium azotophilum*, bacteria aislada del mismo, sobre 22 especies de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, la mayoría de las cuales son patógenas o parcialmente patógenas del hombre. Pequeños trozos de pozol inhibieron, con diferente intensidad, el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* ssp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium claviforme* y *Rhizopus stolonifer*. *Agrobacterium azotophilum* inhibió también, en distinto grado, el crecimiento de *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Geotrichum candidum*, *Monilia sitophila*, *Penicillium claviforme*, *P. cyclopium*, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. lanoso-viride*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viride* (Herrera y Ulloa, 1975).

2.6. Hongos y Levaduras

La evolución de las técnicas de recolección y de transformación de los productos agrarios, el transporte de los alimentos a largas distancias y el escalonamiento del

consumo que trae consigo un almacenamiento prolongado, constituyen condiciones que, si no se controlan, son favorables para la multiplicación de microorganismos indeseables, particularmente de hongos. Una evaluación de la FAO, ha estimado en varias decenas de millares de dólares las pérdidas anuales producidas por la contaminación de los alimentos por hongos (Moreau, 1997).

En efecto, los hongos no corresponden a un grupo sistemático homogéneo, aunque se sitúan dentro de diversas familias de hongos microscópicos. Como las levaduras, los hongos son “micromicetes” que se desarrollan a expensas de sustratos inertes o en vías de descomposición. Pero mientras las levaduras se presentan bajo forma de elementos unicelulares que brotan de individuos semejantes, los hongos poseen un aparato vegetativo constituido por un talo filamentoso, el micelio, cuyos filamentos se denominan hifas; el micelio puede diferenciarse en órganos muy variados según los grupos especializados en la multiplicación y en la diseminación, que se conocen con la denominación global de esporas (Moreau, 1997).

Los hongos tienen un metabolismo activo en relación con su forma de nutrirse por absorción. Cada una de las hifas en crecimiento, instalada en el sustrato, toma las moléculas indispensables a través de su superficie parietal. En efecto, en todos los hongos, a partir de una spora caída en un medio nutritivo en condiciones favorables, se desarrolla un micelio cuyo crecimiento es el mismo en todas las direcciones del espacio y las hifas se ramifican armoniosamente. En el caso de *Rhizopus*, el crecimiento puede alcanzar 50 mm de radio por día, lo que representa un incremento exponencial de la superficie del sustrato invadido. En el caso de *Penicillium*, el crecimiento radial es más restringido. Por otra parte, dos hifas próximas en crecimiento dan la vuelta rápidamente a sus ápices, uno hacia el otro, y se fusionan. Este fenómeno de anastomosis es particularmente importante en casos de déficit nutritivo. En el caso de algunos hongos, los filamentos se agregan en montones más o menos globosos, “bulbos” o “esclerocios”, y particularmente resistentes a las condiciones ambientales adversas (Moreau, 1997).

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos. En general, las células de las levaduras son conidios formados según diferentes tipos de conidiogénesis. En *Saccharomyces* una célula madre da lugar a la formación de yemas en diferentes puntos de la superficie produciendo en cada uno sólo una célula hija (blastoconidio o blastospora), pero en *Rhodotorula* o *Cryptococcus* todos los brotes surgen desde un solo punto. La célula apiculada de *Saccharomyces* brota repetidamente de cada extremo, extendiéndose un poco con cada conidio formado. En el caso de *Schizosaccharomyces* la célula es casi cilíndrica y los conidios tienen una base muy ancha. Las levaduras hifales, como *Trichosporon* o *Geotrichum* producen artroconidios (o artrosporas) por formación de septos dobles en las hifas, que luego se escinden (Moreau, 1997).

Las levaduras pertenecen a dos clases de hongos: ascomicetos o basidiomicetos, aunque muchas de ellas se presentan comúnmente en la forma imperfecta. Las levaduras ascomicéticas forman ascas libres, con 1 a 8 ascosporas, y en las especies hifales las ascas están desnudas. Las ascosporas de las levaduras son algo más resistentes al calor y la desecación que las células vegetativas, si bien tienen mucha menor resistencia térmica que las esporas bacterianas, por lo que mantienen la viabilidad de la especie durante los cambios adversos del medio ambiente. El modo de diploidización en las levaduras ascomicéticas se efectúa entre una célula y su brote, como es el caso de *Schwanniomyces*, *Debaryomyces* y otras, o puede efectuarse entre dos células independientes, por fusión directa (*Schizosaccharomyces*) o por medio de un tubo de conjugación Ancestral (EG) (*Zygosaccharomyces*). En el caso de levaduras estabilizadas en el estado diploide, éste se restaura por conjugación de las ascosporas dentro del asca (*Saccharomyces*). En ciertos casos, si el cigoto se reproduce por mitosis,

existen en el mismo ciclo las fases vegetativas haploide y diploide (*Saccharomyces*) (Moreau, 1997).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Nixtamalización del pozol

El maíz blanco se obtuvo en la tienda comunitaria Conasupo de la Ranchería La Huasteca 1ª Sección, Municipio de Centro, Tabasco. La limpieza se realizó eliminando el material extraño y los granos incompletos se separaron por medio de inmersión en agua descartando los granos que flotaban. El paso siguiente fue la nixtamalización que consistió en sumergir 5 kg de maíz seleccionado en agua potable en una relación 1:3 (p/v) de maíz:agua y con 3% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (cal), aplicando un tratamiento térmico hasta ebullición por aproximadamente 10 min. Después se procedió a cocer el maíz por 2 h a una temperatura de 80 °C hasta que los granos se hincharon y se desprendió el pericarpio; finalmente, se enfrió a temperatura ambiente. El lavado del maíz cocido se llevó a cabo con agua potable, con el fin de eliminar la cal y el pericarpio. La molienda se realizó en un molino eléctrico marca Estrella (Pérez, 2013).

3.2. Preparación del pozol

Inmediatamente después de la molienda de maíz, éste se amasó manualmente con la adición de 0.5 L de agua potable hasta obtener una masa homogénea y tersa que se dividió en tres porciones dejando una como pozol blanco (PB). Para la preparación del pozol con cacao (PC), se adicionó a la segunda porción de masa el 4% de cacao tostado y molido amasando hasta homogeneizar completamente. Para el pozol con pimienta (PP), se adicionó 2.5% de pimienta molida a la última porción de masa y se preparó igual que el anterior. El cacao y la pimienta se obtuvieron en el mercado municipal “José María Pino Suárez” de la Ciudad de Villahermosa, Tabasco, México.

3.3. Fermentación del pozol

Para llevar a cabo la fermentación de cada tipo de pozol, se tomaron porciones de cada pozol formando bolitas de 100 g que se envolvieron en hoja de plátano y se incubaron a 30 °C por cinco días. Para cada tipo de pozol se prepararon tres

repeticiones. Se realizaron muestreos cada 24 h (a partir del tiempo 0) durante cinco días retirando una bolita de masa en cada ocasión para cuantificar el número de hongos y levaduras presentes durante la fermentación de cada tipo de pozol; además, se determinó el pH y la acidez titulable en cada tiempo de muestreo.

3.4. Determinación de pH

Se utilizó un potenciómetro marca HANNA Instruments PHR12 Microprocessor PH Meter el cual se calibró con las soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10 de acuerdo a las instrucciones del mismo. Se tomó una muestra de 5 g en un vaso de precipitados de 50 ml y se agregaron 15 ml de agua destilada, se mezcló por medio de un agitador de vidrio y se ajustó su temperatura a 20 ± 0.5 °C. Se sumergió el electrodo en la muestra de manera que lo cubriera perfectamente. Una vez que se realizó la medición del pH, el electrodo fue retirado y lavado con agua destilada. El valor de pH de la muestra fue leído directamente en la escala de 0-14 del potenciómetro (NMX-F-317-S-1978).

3.5. Determinación de acidez titulable

La acidez titulable se determinó por titulación con NaOH 0.1 N; para ello se tomó una muestra de 25 g de cada pozol y se disolvió en 50 ml de agua destilada; el valor de la acidez titulable se expresó en equivalente de ácido láctico (AOAC, 2000) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez titulable} = \text{ml NaOH} \times 0.1 \times 0.009008 \times 100 \times (\text{ml muestra titulada})^{-1}$$

3.6. Cuantificación del crecimiento de hongos y levaduras

El aislamiento y cuantificación de hongos y levaduras se llevó a cabo en las instalaciones de la División Académica de Ciencias Agropecuarias. Fue realizado por el método de dilución en placa para lo cual se tomó, en condiciones de esterilidad, una muestra de 25 g de cada pozol y se colocó en una bolsa de plástico con cierre hermético, se adicionaron 225 ml de agua peptonada al 0.1%

estéril para obtener una dilución 1:10 y se homogenizó manualmente. Se pipeteó 0.5 ml de esta primera dilución a un tubo con 4.5 ml de agua peptonada al 0.1%, repitiendo esta operación hasta completar una serie de cinco diluciones (NOM-111-SSA1-1994). Después se tomó 0.1 ml de cada dilución y se sembró en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) con rosa de bengala al 5% (p/v) y Amikacina al 1% (Carrillo, 2003), ajustando el pH a 5.8 con ácido tartárico al 10%. Las cajas se incubaron por tres días a 30 °C observándose el crecimiento fúngico y contando las colonias de hongos y levaduras presentes.

3.7. Aislamiento de hongos y levaduras

Para el aislamiento de estas especies se seleccionaron las colonias visualmente diferentes que crecieron de cada tipo de pozol en PDA resembrando cada una de ellas por punción, con un asa de inoculación recta, en el centro de una caja Petri de 5 cm de diámetro con PDA. Las cajas se incubaron a 30 °C de 3 a 5 días o hasta observar un crecimiento (Méndez *et al.*, 2007).

3.8. Purificación de cultivos

Para obtener cultivos puros de los hongos aislados se realizaron resiembras de las colonias seleccionadas realizando una punción única en el centro de cada caja Petri con PDA, se incubaron a 30 °C las cajas hasta observar que el crecimiento de la colonia fuese suficiente para proceder a su identificación. Se consideró un cultivo puro cuando creció solo una colonia en cada caja Petri (Méndez *et al.*, 2007).

3.9. Identificación taxonómica

Para la identificación taxonómica, se realizó la observación de la morfología macroscópica en caja Petri y de la morfología microscópica empleando la técnica de microcultivo en lámina. Las cepas aisladas se conservaron en Agar Extracto de Malta (AEM) a temperatura ambiente (Méndez *et al.*, 2007).

Los estudios morfológicos se realizaron en las cajas Petri donde fueron localizadas colonias únicas, determinándose el grado de crecimiento y las

características de las mismas (tipo de micelio) con las claves para identificación de Barnett y Hunter (1987) y Watanabe (1994). Los cultivos se examinaron a intervalos frecuentes, anotando los siguientes detalles (Klich y Pitt, 1988):

1. Grado de crecimiento. Se midieron los diámetros de las colonias con un vernier digital cada 24 h por 5 días. Se describió como lento, muy lento, moderado, discreto, rápido, etc.
2. Color de la colonia y cambios de la misma, ya sea uniforme, en zonas o en mosaico. Se anotaron también los colores fugaces que se observan a menudo en el contorno de las colonias.
3. Color y cambios del mismo en el reverso de las colonias.
4. Cambios de color en el medio, en el área cubierta por la colonia o difundido en el medio.
5. Textura superficial, sea suelta o compacta, plana, rugosa o curvada, aterciopelada, enmarañada, flocosa, vellosa, filamentosa, gelatinosa, coriácea, etc.
6. Olor, si existe. En general, los olores son muy difíciles de describir. Muchas especies presentaron un olor que se describió como mohoso pero otras presentaron olores característicos y a veces fragantes y, naturalmente, otras muchas carecieron de olor.
7. Características de las vacuolas de líquido transpirado que se presentan a veces en el crecimiento aéreo.
8. Características de las hifas sumergidas: color, presencia o ausencia de septos, diámetro aproximado, caracteres distintivos de estructuras especiales si se presentaron.
9. Grado de desarrollo de las estructuras de fructificación.
10. Características y disposición de los órganos de fructificación maduros: esporangios, peritecios, picnidios, esporodoquios, coremios o conidióforos sueltos; ya sea se encuentren en el substrato, en la superficie o en el micelio aéreo. Se anotó especialmente la presencia de más de un tipo de estructuras de esporulación.
11. Color, tamaño y forma de los órganos de fructificación maduros.

12. Detalles sobre la estructura de las fructificaciones, incluyendo medidas de las partes esenciales y disposición en ellas de las esporas.

13. Detalles completos de las esporas: color, forma, tabicación, marcas superficiales, tamaño (comprendido el promedio y las medidas extremas).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

IV. RESULTADOS

En el estudio de la fermentación de los tres tipos de pozol, se observó que ésta se alcanzó a los tres días y no a los cinco como se había planeado. Por esta razón, los resultados de la cuantificación de hongos y levaduras sólo se reporta para las 72 h que duró la fermentación en los tres tipos de pozol.

4.1. Fermentación del pozol blanco

Durante la fermentación del pozol blanco se observó que los hongos y levaduras estuvieron presentes desde el tiempo cero, con 4.6 Log UFC g⁻¹, presentando el máximo crecimiento a las 24 h de fermentación con 4.80 Log UFC g⁻¹ (Figura 1).

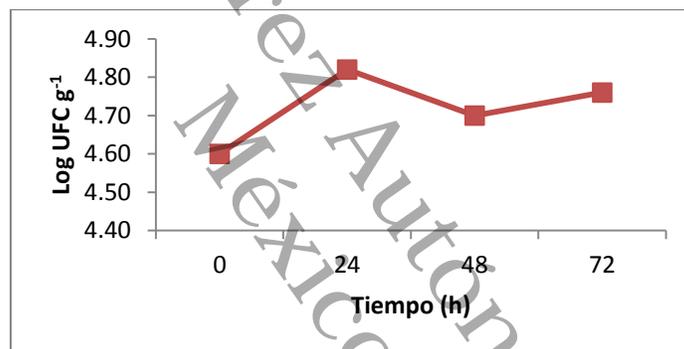


Figura 1. Crecimiento de hongos y levaduras durante la fermentación del pozol blanco.

El valor de pH inicial(0 h) del pozol blanco fue de 5.42 unidades presentando una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo de fermentación hasta alcanzar el valor de 4.61 a las 72 h.El porcentaje de acidez titulable (expresada como % de ácido láctico) de la fermentación del pozol blanco presentó una tendencia creciente, iniciando con 1.92 % y finalizando a las 72 h con 4.41 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. pH y % de acidez titulable durante la fermentación del pozol blanco.

Tiempo	pH	% Acidez titulable
0	5.42	1.92
24	5.02	2.52
48	4.74	3.12
72	4.61	4.41

En el pozol blanco se aislaron y purificaron ocho cepas de hongos logrando su identificación hasta género y especie perteneciendo cinco cepas al género *Aspergillus*, distribuidas en dos especies, y tres cepas a tres especies diferentes del género *Alternaria* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Hongos presentes durante la fermentación del pozol blanco.

Hongo 1	<i>Aspergillus flavus</i>
Hongo 2	<i>Aspergillus japonicus</i>
Hongo 3	<i>Aspergillus japonicus</i>
Hongo 4	<i>Aspergillus flavus</i>
Hongo 11	<i>Aspergillus flavus</i>
Hongo 13	<i>Alternaria alternata</i>
Hongo 14	<i>Alternaria brassicola</i>
Hongo 15	<i>Alternaria chlamydospora</i>

4.2. Fermentación del pozol con pimienta

Al inicio de la fermentación del pozol con pimienta, se encontraron 4.5 Log UFC g⁻¹ de hongos y levaduras y el máximo crecimiento se presentó a las 48 h de fermentación con 4.8 Log UFC g⁻¹ (Figura 2).

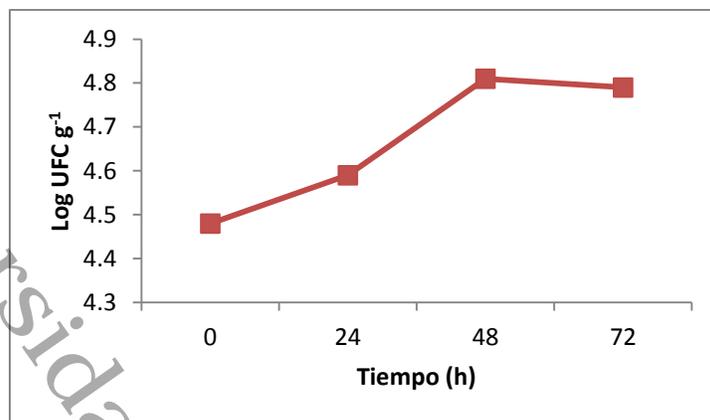


Figura 2. Crecimiento de hongos y levaduras en la fermentación del pozol con pimienta.

El valor inicial de pH del pozol con pimienta fue de 5.38 unidades presentándose una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo de la fermentación hasta alcanzar un valor de 4.68 a las 72 h. La acidez titulable (expresada como % de ácido láctico) de la fermentación del pozol con pimienta inició con 2.25% y presentó una tendencia a aumentar conforme transcurrió el tiempo de fermentación alcanzando 4.56% a las 72 h (Cuadro 6).

Cuadro 6. pH % de acidez titulable durante la fermentación del pozol con pimienta.

Tiempo	pH	% Acidez titulable
0	5.38	2.25
24	4.92	2.74
48	4.71	2.88
72	4.68	4.56

En el pozol de pimienta se aislaron y purificaron cinco cepas de hongos logrando la identificación hasta género en tres de ellas; en dos sólo se obtuvo el micelio estéril por lo que no se logró la identificación de ellos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Hongos presentes en el pozol con pimienta.

Hongo 9	<i>Penicillium</i> sp
Hongo 10	<i>Neosartorya fischeri</i>
Hongo 6	Micelio estéril 1
Hongo 7	Micelio estéril 2
Hongo 16	<i>Bipolaris</i> sp

4.3. Fermentación del pozol con cacao

Al inicio de la fermentación del pozol con cacao, la cantidad de los hongos y las levaduras fue de 4.48 Log UFC g⁻¹, presentando el mayor crecimiento a las 72 h con 4.99 Log UFC g⁻¹ (Figura 3).

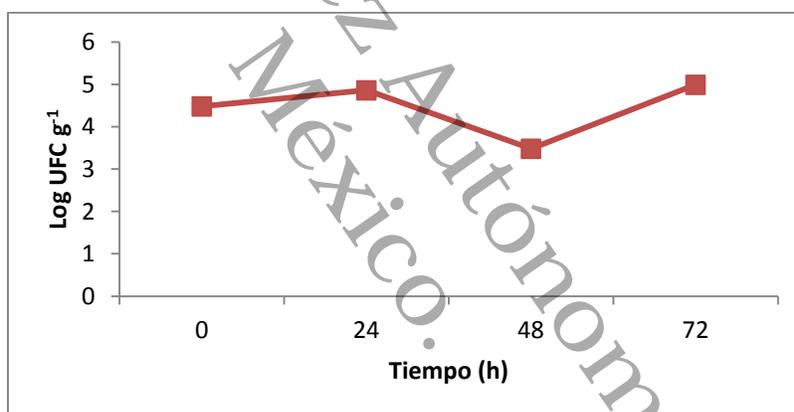


Figura 3. Crecimiento de hongos y levaduras en la fermentación del pozol con cacao.

El pH durante la fermentación del pozol con cacao presentó una tendencia a disminuir iniciando con un valor de 5.40 unidades presentando una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo de la fermentación hasta alcanzar el valor de 4.6 a las 72 h. Con respecto a la acidez titulable (expresada como % de ácido láctico) del pozol con cacao, ésta inició con un valor de 3.36% presentando una tendencia creciente durante la fermentación hasta alcanzar un valor de 5.22% a las 72 h (Cuadro 8).

Cuadro 8. pH y % de acidez titulable durante la fermentación del pozol con cacao.

Tiempo	pH	% Acidez titulable
0	5.40	3.36
24	4.98	3.36
48	4.77	4.08
72	4.6	5.22

En la fermentación del pozol con cacao se aislaron y purificaron cinco cepas de hongos pertenecientes al género *Curvularia* de las cuales se logró la identificación hasta especie de dos de ellas: *C. affinis* y *C. lunata* (Cuadro 9).

Cuadro 9. Hongos presentes durante la fermentación del pozol con cacao.

Hongo 5	<i>Curvularia affinis</i>
Hongo 8	<i>Curvularia</i> sp
Hongo 12	<i>Curvularia clavata</i>
Hongo 17	<i>Curvularia</i> sp
Hongo 18	<i>Curvularia lunata</i>

Durante el seguimiento la fermentación, se encontró que la cantidad inicial de hongos y levaduras fue de alrededor de 4.5 Log UFC g⁻¹ para los tres tratamientos (Figura 4), esto debido probablemente a que la masa para preparar el pozol se nixtamalizó en un mismo lote para cada repetición y bajo las mismas condiciones de preparación. A este respecto, Nuraida *et al.* (1995) reportaron que los objetos utilizados son la principal fuente de microorganismos durante cualquier proceso de fermentación natural. Por otro lado, el máximo crecimiento se presentó a las 24 h en el pozol blanco con 4.8 Log UFC g⁻¹, sin embargo, este valor se presentó a las 48 h en la fermentación del pozol con pimienta. Finalmente, el pozol con cacao presentó su máximo valor con 4.99 Log UFC g⁻¹ a las 72 horas de fermentación.

Estas diferencias pueden deberse a que esta es una fermentación sólida y por lo tanto el crecimiento no es homogéneo en todo el sistema (Mudgett, 1986). En el trabajo realizado por Pérez (2013) encontró valores de 5.4 y 5.5 Log UFC g⁻¹ a las 36 de fermentación en el pozol blanco y con pimienta, respectivamente, siendo mayores a los encontrados en este trabajo. Por otro lado, Ben y Ampe (2000) encontraron 8 Log UFC g⁻¹ de hongos y levaduras en la periferia del pozol blanco a las 48 h de fermentación y en este trabajo se encontró una cantidad casi la mitad.

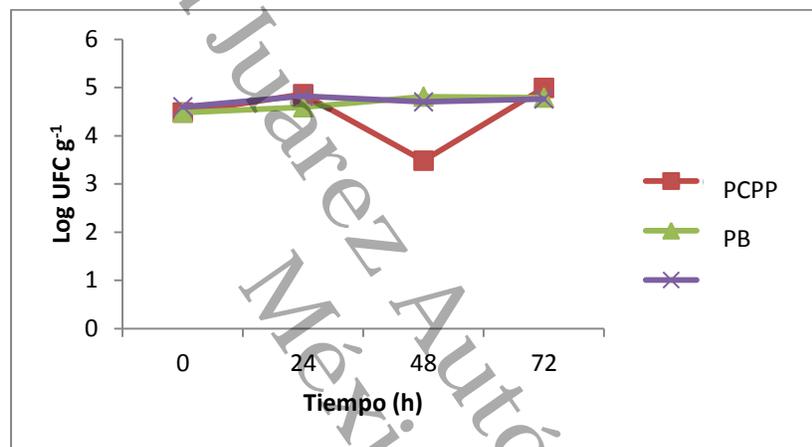


Figura 4. Hongos y levaduras presentes durante la fermentación de tres tipos de pozol (PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).

Durante la fermentación del PB, PC y PP, el valor de pH disminuyó de forma similar hasta las 72 h, en un intervalo de 5.42 al inicio hasta 4.61 al final. Sin embargo, en el pozol con pimienta se presentó una estabilización del pH en 4.7 a partir de las 48 h (Figura 5).

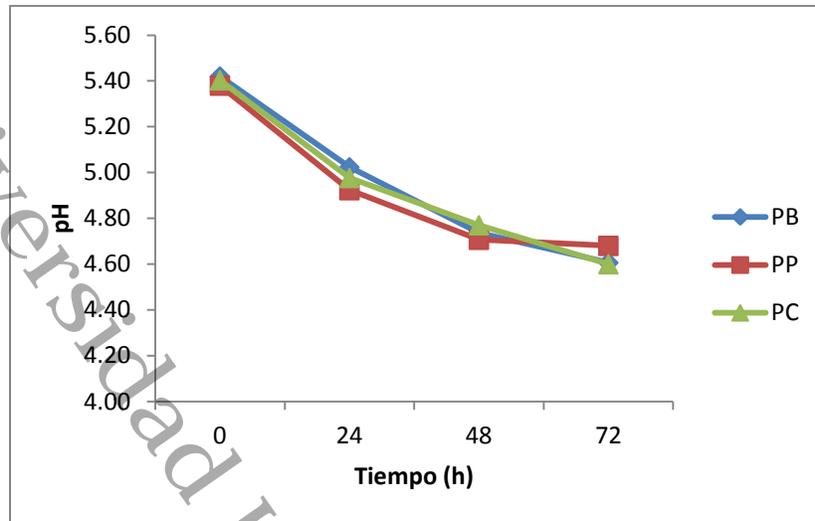


Figura 5. pH durante la fermentación de tres tipos de pozol (PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).

V. DISCUSIÓN

En un estudio en pozol blanco, Ben y Ampe (2000) reportaron que el pH alcanzado a las 24 h de fermentación fue de 3.8-4.0. Al comparar con lo encontrado en los tres tipos de pozol estudiados en este trabajo, el pH de alrededor de 4.6 se alcanzó a partir de las 48 h de fermentación, siendo aún un valor ligeramente mayor al encontrado por estos autores. Por otro lado, Pérez (2013) reportó que, en los tratamientos de pozol con pimienta y pozol blanco, se presentaron valores de pH iniciales de 7.4 y 7.17, respectivamente, hasta alcanzar un pH de 3.78 a las 48 h, siendo diferente a lo encontrado en esta investigación ya que los tres tipos de pozol iniciaron con un pH alrededor de 5.40 y finalizaron con 4.60-4.68 a las 72 horas. Por otro lado, Nuraida *et al.* (1995) estudiaron la microbiología del pozol fermentado a temperatura ambiente durante nueve días y encontraron que el pH osciló entre 4.7 y 5.7 a las 12 h alcanzando valores de pH entre 3.6–3.9 al final de la fermentación. En la investigación realizada por Díaz y Wachter (2003) sobre la fermentación de pozol blanco de maíz (*Zea mays* L.) reportaron que el pH al inicio de la fermentación fue de 7.4 alcanzado 4.4 unidades a las 72 h y, al compararlo con el valor alcanzado con los tres tipos de pozol, este valor ocurrió a las 24 h, es decir, la fermentación del pozol de camote se realizó en menor tiempo. Esta diferencia puede deberse a que el maíz utilizado y la forma de nixtamalización realizada para preparar el pozol fue diferente en ambos casos.

La menor acidez titulable inicial fue para la fermentación del pozol blanco con 1.92% y la más alta fue para el pozol con cacao con 3.36%. Al final de la fermentación, los tratamientos con pimienta y con cacao terminaron con cantidades de acidez titulable alrededor de 4.5% (Figura 6).

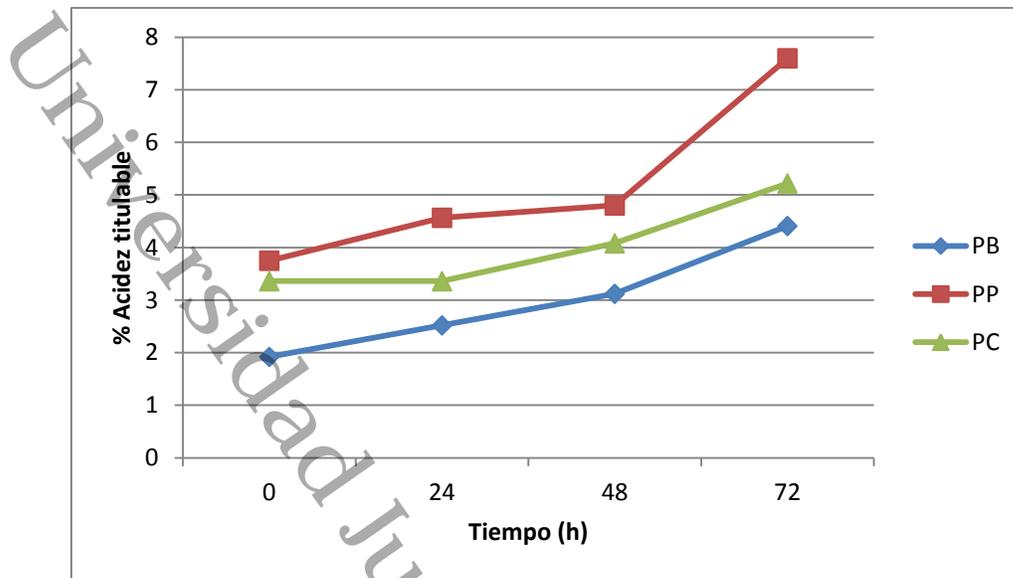


Figura 6. Acidez titulable en la fermentación de tres tipos de pozol (PC= pozol con cacao, PP= pozol con pimienta, PB= pozol blanco).

En el Cuadro 10 se indica el total de cepas aisladas de la fermentación de los tres tipos de pozol estudiados, con la clave de aislamiento y el número de código correspondiente a su ingreso en el Cepario Micológico de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. De estas 24 cepas, se encontraron cinco cepas del género *Curvularia* en la fermentación del pozol con cacao y se logró la identificación hasta especie de dos de ellas, *C. affinis* y *C. lunata*, mientras que del pozol con pimienta se aislaron cinco cepas logrando la identificación hasta género de tres de ellas y en dos sólo se obtuvo el micelio estéril por lo que no se logró la identificación de ellos. En cuanto al pozol blanco se aislaron ocho cepas y se identificaron hasta género y especie, perteneciendo cinco cepas al género *Aspergillus* y tres especies al género *Alternaria*.

Cuadro 10. Especies aisladas en los tres tipos de pozol estudiados.

Clave	Número de colección	Especie	Referencia
H1	CH222	<i>Aspergillus flavus</i>	Ulloa y Herrera, 1984
H2	CH225	<i>Aspergillus japonicus</i>	
H3	CH225	<i>Aspergillus japonicus</i>	
H4	CH223	<i>Aspergillus flavus</i>	Ulloa y Herrera,, 1984
H5	CH234	<i>Curvularia affinis</i>	
H6	CH224	Micelio estéril 1	
H7	CH227	Micelio estéril 2	
H8	CH235	<i>Curvularia</i> sp	
H9	CH230	<i>Penicillium</i> sp	Ulloa <i>et al.</i> , 1971
H10	CH221 (forma sexual de <i>Aspergillus</i>)	<i>Neosartorya fischeri</i>	
H11	CH223	<i>Aspergillus flavus</i>	Ulloa y Herrera,, 1984
H12	CH231	<i>Curvularia clavata</i>	
H13	CH229 (forma asexual de sigatoka, están en la hoja)	<i>Alternaria alternata</i>	
H14	CH228	<i>Alternaria brassicola</i>	
H15	CH232	<i>Alternaria chlamydospora</i>	
H16	CH226	<i>Bipolaris</i> sp	
H17	CH235	<i>Curvularia</i> sp	
H18	CH233	<i>Curvularia lunata</i>	
H19	CH236	<i>Fusarium</i> sp	
H20	CH237	<i>Fusarium</i> sp	
H21	CH238	<i>Fusarium</i> sp	
H22	CH239	<i>Fusarium</i> sp	
H23		<i>Geotrichum</i> sp	
H24		<i>Monilia sitophyla</i>	

A este respecto, los únicos reportes encontrados sobre el estudio de hongos y levaduras en pozol, son los realizados por el grupo de Ulloa *et al.*, (1971, 1987) quienes reportaron a las especies *Aspergillus flavus* y *Penicillium* mismas que también fueron encontradas en el presente trabajo.

Los hongos lipolíticos más importantes son especies de *Aspergillus* y *Rhizopus*. Hoy en día se sabe que las aflatoxinas son producidas por dos especies de hongos estrechamente emparentadas con *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* que son especialmente comunes en los trópicos y en los subtrópicos. Al principio, se consideró que la contaminación por aflatoxinas era esencialmente un problema de almacenamiento inadecuado de los productos agrícolas después de su recolección que permitía el crecimiento de hongos de almacenamiento tales como los aspergilos y los penicilios con la consiguiente formación de micotoxinas. En realidad, las condiciones de humedad elevada y temperaturas calurosas pueden originar las concentraciones más elevadas de aflatoxinas en los alimentos, sobrepasando con frecuencia el límite máximo fijado en un principio por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 30mg kg^{-1} en los alimentos destinados al consumo humano (Adams y Moss, 1997)

Penicillium: El descubrimiento de la penicilina en 1929 dio un impulso a la búsqueda de otros metabolitos de *Penicillium* con propiedades antibióticas y, finalmente, a la identificación de la citrinina, la patulina y la griseofulvina como “antibióticos tóxicos” o, posteriormente, como micotoxinas. *Penicillium* es un género numeroso que comprende 150 especies admitidas de las que 50 o más se encuentran corrientemente en el suelo. En general, las toxinas de *Penicillium*, que afectan al hígado o a la función renal, son asintomáticas o causan una debilidad generalizada en el hombre o en los animales, mientras que las neurotoxinas producen con frecuencia un temblor sostenido en los animales. Sin embargo, todas y cada una de las toxinas muestran amplias variaciones en los síntomas que producen (ICMSF, 1998).

Bipolaris sp: es un hongo productor de la toxina estierigmatocistina y los han aislados en harina de cereales (Muller, 1981).

Como hongos parásitos deben citarse diferentes Demaciáceos como *Alternaria brassicola*. En las hojas aparecen a veces manchas negras que posteriormente se amarillean; las produce *Peronospora brassicae*, parásito que causa el mildiu de las Crucíferas y que propagándose también durante el almacenamiento da lugar a la podredumbre. Entre las enfermedades por hongos que afectan a diferentes especies de coles, deben citarse las podredumbres producidas por el moho gris, por *Rhizopus* y por *Rhizoctonia* (Muller, 1981).

Alternaria alternata: Las especies de *Alternaria* son especialmente importantes como contaminantes potencialmente tóxicos de los alimentos. *Alternaria* infecta los cultivos del campo y puede contaminar el trigo, sorgo y cebada. Se han descrito diversas toxinas de *Alternaria*, como alternariol, alternariol monometil éter, alternueno, ácido tenuazónico y altertoxinas. Se conoce relativamente poco de la toxicidad de estas toxinas; sin embargo, los cultivos de *Alternaria* desarrollados en maíz o arroz, al suministrarlos a ratas, pollos, pavipollos y patipollos fueron muy tóxicos (Doyle *et al.*, 1997).

Curvularia: agrupa un gran número de especies capaces de ser patógenos facultativos de las plantas y del suelo. Numerosas especies de este género, como es el caso de *C. lunata*, pueden producir síntomas en hojas y tallos que varían en dependencia del hospedante y el ambiente (Estrada y Sandoval, 2004).

VI. CONCLUSIONES

- Se encontró mayor cantidad de hongos y levaduras en el pozol con cacao.
- El pH del pozol con pimienta se estabiliza a las 48 h.
- La acidez titulable de la fermentación del pozol con cacao presentó valores mayores a la de los otros dos pozoles.
- En el pozol blanco se encontraron tres especies de *Aspegillus* y tres de *Alternaria*.
- En el pozol con pimienta se encontraron tres géneros diferentes de hongos y dos más que no lograron identificarse.
- En el pozol con cacao se encontraron cinco cepas de *Curvularia* de las cuales sólo tres de ellas se identificaron a nivel de especie.
- El pH y la acidez titulable alcanzados durante la fermentación de los tres tipos de pozol, favoreció el crecimiento de diferentes especies de hongos.

VII. LITERATURA CITADA

- Abu, O.A., Tewe, O.O., Losel, D.M., Onifade, A.A. (2000). Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology* 72: 189-193.
- Adams, M.R., Moss, M.O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, España. pp. 291-292.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist. 20th Ed. Edited by Kenneth Helrich. Washington, D.C. 1298 pp.
- Astiasarán, I., Martínez, J.A. (2000). *Alimentos: composición y propiedades*. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, España. 152pp.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1987). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth Edition. McMillan Publishing Company, New York. 218pp.
- Barros, C. y Buenrostro, M. (2011). Pozol, Popo, Champurrado. *Revista Digital Universitaria* 12(4): 2-8.
- Ben, N. O. and Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9): 3664-3673.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. (2012). Food Fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-94.
- Carrillo, L. (2003). Técnicas. En: *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta, Argentina. Consultado en la Web en: [http://userbooks.bookfi.org/1/4c87f36e392db4d3402f1d4e4505e6f1/_as/\[LEONOR_CARRILLO\]_Los_Hongos_de_los_Alimentos_y_Fo\(BookFi.org\).pdf](http://userbooks.bookfi.org/1/4c87f36e392db4d3402f1d4e4505e6f1/_as/[LEONOR_CARRILLO]_Los_Hongos_de_los_Alimentos_y_Fo(BookFi.org).pdf) el 1 de octubre de 2012.
- Díaz, R. G. y Wachter, R. C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45(1-2): 30-40.
- Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. (1997). *Microbiología de los Alimentos (Fundamentos y fronteras)*. Editorial Acribia, España. p 453.

- Estrada, G. y Sandoval, I. (2004). Patogenicidad de especies de *Curvularia* en arroz. *Fitosanidad* 8(4): 23-26. Disponible en la Web en la dirección: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209117865004>
- Farrés, A., Ampé, F., Escalante, A., Flores, M.T., Guyot, J.P., Marlon-Guyot, J., Romero, M.T., Wachter, C. (1999). Determinación de la diversidad bacteriana del pozol: un enfoque polifásico. Memorias VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oaxaca, México, del 12 al 17 de septiembre de 1999.
- García, G.,M., Quintero, R.R., López-Munguía, A. (2002). Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa, México. pp. 153-346.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28:251-260.
- Henzler, H. J., Schedel, M. (1991) Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering* 7: 123-1 31.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1975). Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Revista Latino-Americana de Microbiología* 17: 143-147.
- Herrera, T., Ulloa, M. (2004). El reino de los hongos. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica. México. pp: 461-481.
- ICMSF. (1998). Microorganismos de los alimentos. Editorial Acribia, España. pp. 463-465.
- Klich, M. A. and Pitt, J. I. (1988). A Laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. 116 pp.
- Lappe, P., Moreno, R., Arias, A., Gschaedler, A., Quirasco-Baruch, M., Wachter, M. (2011). Bebidas fermentadas tradicionales de México y Perú. En: Moreno, A., Pulido, M., Mariaca, R., Valadez, R., Mejía, P., Gutiérrez, T (Editores). *Sistemas Biocognositivos Tradicionales*. Asociación Etnobiológica Mexicana. México. pp: 369-381.

- Méndez, R.C., Vergaray, G., Béjar R.V. y Cárdenas, J.K. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Rev. Peru. Biol.* 13(3): 203-205.
- Moreau, C.(1997). Los hongos. En: Bourgeois, C. M., Larpent, J. P. Microbiología Alimentaria. Editorial Acribia, España. pp: 35-40.
- Mudgett, E. R. (1986). Solid-state fermentations. In: Arnold, L. D., Nadine, A. S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, New York. pp:66-81.
- Muller, G.(1981). Microbiología de los alimentos vegetales. Editorial Acribia, España. pp. 8,12.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in Foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas, México.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de hongos y levaduras en alimentos.
- Nuraida, L., Wachter, C. M. and Owens D. J. (1995).Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 567- 571.
- Pérez, R. L. C. (2013). Actividad microbiana en la fermentación natural del pozol blanco con pimienta (*Pimenta dioica* (L.) Merrill). Tesis Maestría en Ciencias Alimentarias.Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco: México.
- Ray, B. y Bhunia, A. (2010). Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. Editorial McGraw-Hill, México. pp.21-70.
- Ray, C. R. and Sivakumar, S. P. (2009). Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1073-1087.
- Raybaudi-Massilia, M. R., Fortuny, S. R., Belloso, M. O. (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. I Simposio Ibero-Americano de vegetales frescos cortados, España. pp: 15-21.

- Saucedo, C. G. (2008). Aplicaciones de la fermentación en medio sólida en el área de alimentos. IV Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 26 al 26 Septiembre 2008. Villahermosa, Tabasco.
- Scott, R., and Sullivan, C. W. (2008). Ecology of fermented foods. *Human Ecology Review* 15 (1): 25-31.
- Ulloa, M., Herrera, T. (1984). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* (47-53): 145-163.
- Ulloa, M., Herrera, T y Lanza, G. (1971). Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol. Instituto de Biología, UNAM, México, D. F.
- Wacher-Rodarte, C. (2002). Alimentos y bebidas fermentadas tradicionales. En: García, Quintero, López-Munguía, A. (Compiladores). *Biología Alimentaria*. Limusa Noriega Editores, México. pp:313-349.
- Wacher, C., Cañas, A., Cook, E. P., Barzana, E., Owens, D.J. (1993). Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 269-274.
- Watanabe, T. (1994). Pictorial atlas of soil and seed fungi. Lewis Publishers, CPC Press, USA.

Micoflora de tres tipos de pozol fermentado blanco, con cacao (*Theobroma cacao* L.) y con pimienta (*Pimenta dioica* L.)

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revistaladecin.com Internet	236 palabras — 3%
2	vsip.info Internet	92 palabras — 1%
3	tesis.ipn.mx Internet	81 palabras — 1%
4	idoc.pub Internet	53 palabras — 1%
5	ninos.kiddle.co Internet	47 palabras — 1%
6	dokumen.pub Internet	44 palabras — 1%
7	www.buenastareas.com Internet	41 palabras — 1%
8	es.scribd.com Internet	35 palabras — < 1%
9	vdocuments.mx Internet	34 palabras — < 1%

10	link.springer.com Internet	33 palabras — < 1%
11	dspace.uclv.edu.cu Internet	30 palabras — < 1%
12	repositorio.unicach.mx Internet	28 palabras — < 1%
13	sired.udenar.edu.co Internet	28 palabras — < 1%
14	vdocuments.com.br Internet	22 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.