



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Valoración del pozol como posible
alimento funcional.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

Kevin Leonardo Ramirez Santiago

Directora

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez
Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH

Asesora

Dra. María Silvia Sánchez Cortés
Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre del 2025



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

SECRETARÍA GENERAL

DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 25 de agosto de 2025

C. Kevin Leonardo Ramírez Santiago

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Valoración del pozol como posible alimento funcional

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores:

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña

Mtra. María Esther Molina Ruiz

Dra. Alma Gabriela Verduco Valdez

Firmas:

Ccp. Expediente



Agradecimientos

A **mi mamá y mi abuelita** por ser mis dos pilares más importantes en la vida, siempre voy a estar agradecido por todo el apoyo que me han brindado desde el primer momento que decidí que quería estudiar biología para hacer un zoológico, aunque me fui a otra área totalmente diferente siempre me he sentido respaldado por ustedes. Las amo.

A la **Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdez** primero por aceptarme como uno de sus alumnos y brindar la posibilidad de desarrollar mi proyecto de tesis. Gracias por ser mi maestra, mentora, por los consejos y llamadas de atención. Siempre voy a estar agradecido.

A la **Dra. María Silvia Sánchez Cortés** por los consejos y el apoyo durante la etapa de estudiante.

A la **Agencia Digital Tecnología del Estado** por la confianza y brindarme un apoyo para culminar mis estudios universitarios bajo Beca de Tesis Licenciatura 2025.

A la **Bióloga Alejandra Cartagena** por todo el apoyo brindado mientras fui estudiante, también por todos los consejos, risas y enseñanzas.

A todos **los maestros y doctores** que me dieron clases por darme a conocer lo bella que es la biología en sus diferentes áreas de estudio.

A **Jocelyn Sánchez** por ser la primera persona que conocí en la escuela, todos los momentos felices y de risa dentro y fuera de la escuela, por las noches de desvelo salvando semestres o perdiendo semestre jugando COD, por tu hermosa amistad y por permitirme conocer a una gran persona a la cual siempre va a tener un amigo en mí.

A **Leonardo Rodas** por ser ese amigo en quien siempre pude confiar durante la carrera y poder mover esa amistad fuera de la escuela, por esas tardes comiendo y platicando un sinfín de cosas, por mi parte siempre vas a tener un amigo en él te podrás apoyar.

A **Oscar Abosaíd** por ser una gran persona y amigo, todo el apoyo dado dentro y fuera del laboratorio. También por todos los momentos en los que hemos estado involucrados siendo buenos o malos, pero son recuerdos que siempre voy a conservar con mucho cariño.

A **María Fernanda Nuricumbo y Lucas Díaz** cuando concluí la carrera pensé que no iba a conocer a nadie más, pero no fue así. Les quiero dar las gracias por todo el

apoyo durante todo el tiempo, por las tardes y noches que nos quedábamos haciendo alguna parte de mi trabajo, por todo el cariño, admiración, respeto y compañerismo que me han brindado.

A **Joseph Chávez, Mauricio Cameras e Yvonne Enciso** por todo el cariño, vivencias, momentos que vivimos dentro y fuera de la escuela. Siempre estaré agradecido por todas las veces que me ayudaron con las diferentes materias y por todo lo me enseñaron. Siempre podrán contar conmigo para todo lo que necesiten.

A mis diferentes compañeros de desvelo, ellos siempre estuvieron en este proceso y en los momentos felices, difíciles y tristes, pero siempre junto a mí. Gracias **Kenai, Nita, Aurorita, Mia, Jerry, Suri y Pato** por ese cariño y amor incondicional.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	3
2.1 Materias primas.....	3
2.2 Descripción taxonómica y biológica.....	3
2.3 Pozol	5
2.4 Elaboración del pozol	6
2.4.1 Acción de la cal.....	7
2.5 Fermentación	7
2.5.1 Tipos de fermentación	9
2.6 Generalidades de levaduras	11
2.7 Generalidades de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas.....	13
2.8 Alimentos funcionales.....	16
2.9 Identificación microbiana.....	17
2.9.1 Métodos tradicionales de identificación.....	18
2.9.1.1 Medios de cultivo.....	18
2.9.1.2 Pruebas bioquímicas.....	20
2.9.1.4 Generalidades de agar Citrato de Simmons.....	21
2.9.1.5 Generalidades del medio MIO (Movilidad, indol, ornitina descarboxilasa).....	21
2.9.1.6 Prueba de catalasa	22
2.9.2 Métodos moleculares de identificación	22
2.9.2.1 PCR - RFLP.....	22
2.9.2.2 PCR - ARNr 16S	23
2.10 Análisis químico proximal.....	23
III. Antecedentes.....	25
IV. Objetivos	29
V. Zona de estudio	30
VI. Materiales y métodos	31
6.1 Obtención de las muestras	31
6.2 Elaboración de las muestras para siembra	31
6.3 Preparación de los medios de cultivo.....	31

6.4 Caracterización morfológica	32
6.5 Métodos moleculares de identificación	32
6.5.1 Amplificación directa	32
6.5.2 Digestión enzimática	33
6.6 Métodos tradicionales de identificación	33
6.6.1 Prueba de catalasa	33
6.6.2 Agar Hierro-Triple Azúcar (TSI)	33
6.6.3 Agar Citrato de Simmons	34
6.6.4 Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina descarboxilasa)	34
6.6.5 Tinción de Gram	34
6.7 Conservación de cepas bacterianas y levaduriformes.....	35
6.8 Análisis químico proximal.....	35
6.8.1 Determinación de humedad.....	35
6.8.2 Determinación de ceniza.....	35
6.8.3 Determinación de grasas	36
6.8.4 Determinación de proteína.....	36
6.8.5 Determinación de fibra cruda	37
6.8.6 Determinación de carbohidratos	37
6.9 Análisis estadísticos.....	38
VII. Resultados	39
7.1 Caracterización morfológica de la microbiota	39
7.2 Identificación de bacterias	42
7.2.1 Caracterización bioquímica	43
7.3 Identificación de levaduras	47
7.4 Análisis químico proximal del pozol	50
7.5 Análisis de componentes principales (PCA) y PERMANOVA	52
VIII. Discusión.....	54
IX. Conclusión	61
X. Referencias documentales	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas de los diferentes crecimientos microbianos	39
Cuadro 2. Perfil bioquímico de las diferentes cepas bacterianas aisladas	45
Cuadro 3. Levaduras identificadas y su longitud de pares de base (pb) de la región ITS 5.8S amplificaciones por PCR y una digestión con las enzimas de restricción HAE III y HINF I, los pb obtenidos fueron comparados con la base de datos de YEAST ID.	50
Cuadro 4. Composición proximal de masas de pozol blanco y cacao en base seca.	51
Cuadro 5. Composición proximal de masas de pozol blanco y de cacao en base húmeda y Kcal.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis del etanol a partir de glucosa.	9
Figura 2. Síntesis de ácido láctico a partir de glucosa.	10
Figura 3. Síntesis de ácido acético a partir de etanol.	10
Figura 4. Ubicación geográfica de los diferentes puntos de toma de muestra.	30
Figura 5. Crecimiento microbiano obtenido en placas de agar WL posterior a 24 h de hacer la siembra.	39
Figura 6A. Dendograma de levaduras aisladas del pozol.	40
Figura 6B. Dendograma de bacterias aisladas del pozol.	41
Figura 7A. Crecimiento obtenido en placas de agar MRS y eosina azul de metileno (EMB).	42
Figura 7B. Crecimiento obtenido en placas de agar manitol para BAL.	42
Figura 7C. Tinción de Gram de bacterias Gram negativas.	42
Figura 7D. Tinción de Gram de bacterias Gram positivas.	42
Figura 8A. Resultado de prueba TSI. Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa y producción de gas, sin producción de H₂S.	44
Figura 8B. Resultado de prueba TSI. Fermentación de glucosa, sin producción de gas y sin producción de H₂S.	44
Figura 8C. Resultado de prueba MIO. Con movilidad negativa, prueba de indol negativa y ornitina positiva.	44
Figura 8D. Resultado de Prueba MIO. Movilidad positiva, producción de indol positivo en cepa 37 y las demás negativa y ornitina positiva.	44

Figura 8E. Resultado de prueba de citrato de Simmons. Tubo con medio verde resultado negativo, tubo con crecimiento y medio de color azul positivo al uso de citrato como única fuente de carbono. 44

Figura 9. Dendograma de bacterias construido con los resultados obtenidos de la identificación bacteriana. Los agrupamientos observados de color azul corresponden a Enterobacterias, el color verde son BAA, el color rojo son BMA y el color amarillo BAA 46

Figura 10. Patrón de bandas número 1, 2, 3 y 7 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas 4 y 6 corresponden a *Scheffersomyces spartinae* y patrón de bandas 4 y 6 corresponde a *Candida solani*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb. 47

Figura 11. Patrón de bandas número 1, 2 y 3 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas 4, 5 y 6 corresponden a *Cyberlindnera euphorbiiphila*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb. 47

Figura 12. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida albicans*, patrón de bandas número 2 corresponden a *Saccharomyces servazzii*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida tropicalis*, patrón de bandas número 4 y 5 corresponden a *Schizosaccharomyces pombe*, y patrón de bandas número 6 corresponde a *Candida maltosa*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb. 48

Figura 13. Patrón de bandas número 1, 2 y 3 corresponden a *Candida maltosa*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb. 48

Figura 14. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas número 2 y 4 corresponden a *Candida stellata*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida heamulonis*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb. 49

Figura 15. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida apicola*, patrón de bandas número 2 corresponden a *Candida auringiensis*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida heamulonis*, patrón de bandas número 4 corresponden a *Candida apicola*, y patrón de bandas número 5 corresponde a *Candida sequanensis*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

49

Figura 16. PCA a partir de UFC bacteriano y levaduriforme y resultados de análisis químico proximal. 52

Figura 17. Análisis de coordenadas principales – PERMANOVA donde se observa la separación entre ambos tipos de pozol. 53

RESUMEN

El pozol es una bebida tradicional del sur de México, elaborada a base de maíz nixtamalizado que con frecuencia es adicionada con cacao y otros ingredientes y en ocasiones sometida a un proceso de fermentación, su consumo ancestral no solo esta vinculado a prácticas culturales, sino también a su rol como fuente energética hidratante y nutricional en climas cálidos. Para llevar a cabo la investigación se colectaron muestras de distintos productores dentro del Mercado “Dr. Rafael Pascasio Gamboa” y zonas aledañas del mismo en Tuxtla Gutiérrez. Las muestras fueron procesadas en condiciones asépticas y sometidas a diferentes técnicas microbiológicas. Iniciando con la siembra en agar WL. Como resultado, se aislaron un total de 81 morfologías diferentes, de las cuales 17 pertenecían a bacterias y 64 a levaduras. La caracterización bacteriana se completó con tinciones de Gram y pruebas bioquímicas (catalasa, agar TSI, prueba MIO y Simmons) permitiendo diferenciar y clasificar las cepas bacterianas. Además, se realizo la técnica molecular de PCR-RFLP dirigida a la región ITS-5.8S de ADNr de las levaduras, permitiendo obtener perfiles de bandas en geles de electroforesis al 3% que fueron comparados manualmente con la base de datos de Yeast ID. Logrando identificar levaduras del género *Candida*, entre ellas *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. apicola*, *C. auringiensis*, *C. haemulonis*, *C. sequanensis*, *C. stellata* y *C. maltosa*, además de la presencia otras especies de levaduras como *Saccharomyces servazzii* y *Schizosaccharomyces pombe*. Simultáneamente se evaluó la composición químico proximal de las diferentes muestras de pozol, determinando humedad, ceniza, grasa, proteínas, fibra cruda y carbohidratos de acuerdo a protocolos de AOAC. Los resultados mostraron un contenido de humedad entre 61 y 68%, se evidenciaron las diferencias entre pozol blanco y de cacao. En donde el pozol de cacao presento porcentajes más altos de grasas y proteínas, mientras que pozol blanco mostro un mayor contenido de fibra cruda y carbohidratos. Con esto nos permitió estimar el aporte calórico que varía entre 131 – 156 kcal en base húmeda. Se aplicaron técnicas de estadística multivariada, como el análisis de componentes principales (PCA) y un PERMANOVA, para analizar la relación entre los parámetros microbiológicos y la composición químico proximal, revelando que las variables con mayor influencia en la diferenciación de las muestras fueron las grasas, proteínas, UFC de levaduras vinculadas principalmente al pozol de cacao y UFC de bacterias ácido acéticas, fibra cruda y carbohidratos para pozol blanco. Con este trabajo se demuestra que el pozol posee un potencial significativo

como alimento funcional. Aunque cuenta con una carga microbiana un poco baja para ser considerado como un probiótico directo, la diversidad microbiana y el aporte nutritivo justifican la inclusión en la dieta. Sentando las bases para investigaciones futuras que exploren estrategias para potenciar de manera segura las propiedades funcionales del pozol y la promoción de alternativas de alimentación tradicional con beneficios para la salud.

Palabras clave: Pozol, Alimentos tradicionales, Fermentados, Caracterización microbiana, RFLP, Análisis químico proximal.

I. Introducción.

El pozol es una de las bebidas tradicionales más consumidas en algunos estados del sur de México, principalmente en los Estado de Chiapas y Tabasco. Esta bebida a base de maíz nixtamalizado se combina con cacao o no denominándolo pozol blanco. La adición de cacao es para otorgarle un sabor diferente y característico. Su consumo es con la masa fresca, esto quiere decir que debe ser consumida lo más próximo posible después de que el maíz nixtamalizado haya sido molido, aunque también se consume después de un tiempo de dicha molienda, lapso durante el cual se lleva a cabo un proceso simple de fermentación (Altuzar, 2006; Durán, 2009; Martínez, 2011). El proceso de fermentación del pozol es relativamente rápido; ya pasado un promedio de dos horas posterior a la molienda existe un aumento en la microbiota presente en el pozol lo que conlleva a su fermentación (Flores, 2008).

Los organismos responsables de la fermentación son las bacterias ácido lácticas (BAL), sintetizando principalmente ácido láctico, de ahí su nombre, también cuenta con la presencia de otros microorganismos en la fermentación identificando especie de bacterias ácido acéticas, enterobacterias, bacterias mesófilas aerobias y también la presencia de levaduras y hongos filamentosos (Wacher *et al*, 2000; Rizo, 2021).

La fermentación del pozol se denomina como una fermentación láctica por la abundancia de BAL al momento que se lleva la fermentación de forma espontánea, este tipo de bacterias son Gram-positivas, presentan formas diferentes que pueden ser coco o bacilo, esto dependiendo de la especie, cuentan con una tolerancia a diferentes concentraciones de pH y se considera como uno de los grupos de bacterias más importantes ya que llegan a ser implementadas como probióticos o para la elaboración de bebidas probióticas (Tortora *et al*, 2007; Velázquez-López *et al*, 2018), tienen una gran abundancia logrando aislar cepas de distintos alimentos como son la leche, vegetales, jugos, diferentes bebidas fermentadas y no fermentadas.

El consumo del pozol en el estado de Chiapas es alto, debido a su fácil elaboración y adquisición, en algunos casos llegando a sustituir un alimento, gracias a generar la sensación de saciedad debido a su materia prima principal que es el maíz (Román, 2012; González *et al*, 2018), por otro lado, el consumo del pozol después de llevar un proceso de fermentación es considerado en algunas comunidades indígenas como

un remedio casero para el tratamiento de malestares estomacales, esto debido a la presencia de BAL de las cuales varias especies son implementadas como probióticos, por otro lado, el pozol presenta características para considerarlo un alimento funcional, la presencia de las BAL en cantidades de > 106 g/UFC, genera una mayor biodisponibilidad de los nutrientes y mejoran la calidad nutricional del mismo. Con este estudio se sientan las bases para considerar como alimento funcional al pozol, el poder caracterizar dicho alimento, desde su microbiota y aporte nutricional, podría aumentar su aceptación entre los consumidores con lo que se impactaría sobre la seguridad alimentaria de la sociedad y poder clasificarlo como un alimento funcional.

II. Marco teórico

2.1 Materias primas

El pozol es elaborado a base de una masa de maíz (*Zea Mays*), este a su vez es altamente empleado en la cocina mexicana para la elaboración de diversos productos que van de tortillas, tamales, tlaxcal y bebidas fermentadas (González-Cortés *et al*, 2016).

2.2 Descripción taxonómica y biológica

Zea mays es una planta nativa de México que se empezó a domesticar hace 8000 años, esto en cuatro puntos localizados en México, de los cuales dos puntos se encuentran en la región de Chiapas-Oaxaca, otro en la región de las tierras altas y una en las tierras medias de los estados de Morelos y Guerrero (McClung, 1997; Acosta, 2009; Vela, S/A).

Es una planta altamente utilizada en diferentes industrias por su alta versatilidad y los diferentes usos en los cuales se emplean, siendo la producción de alimento una de las más importantes (Perales, 2009). Esta misma versatilidad le permite desarrollarse en diferentes estaciones del año, en diferentes climas, latitudes y altitudes, solo en México el maíz se siembra desde los 0 m.s.n.m hasta los 2500 m.s.n.m (Perales, 2009; Hossain *et al*, 2016; Vela, S/A).

Descripción taxonómica (Government of Canada, S/A)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Angiosperma

Subclase: Commelinidae

Orden: Poales

Familia: Poaceae/Gramineae

Subfamilia: Panicoideae

Género: *Zea*

Especie: *Zea mays L.*

Tallo: La planta del maíz es una herbácea que su altura oscila entre dos y tres metros de alto, pero en ocasiones llega a crecer hasta los siete metros de alto, con un espesor de dos a tres centímetros. Cuenta con parénquima laxo, presenta nudos y entrenudos siendo distintos cada uno. Sus hojas son lanceoladas, las cuales crecen de forma alterada en los lados opuestos del tallo. Tiene pelos pequeños y la cantidad de hojas varía entre plantas las cuales van de 10 a 20 hojas. Las interacciones con la luz se llevan a cabo por medio de las hojas superiores del maíz, así también son el principal contribuyente del fotosintato del grano (Australian Government, 2008; Guacho, 2014; Sánchez y Pérez-Urria, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

Raíz: El sistema de raíces de la planta del maíz tiende a ser fuerte y fibroso, logrando penetrar partes profundas del suelo. La cariopsis del maíz logra germinar por medio de una raíz embrionaria continuando plántula y raíces seminales. Estas pueden presentar coloraciones diferentes las cuales dependen de las antocianinas presentes. La administración de nutrientes y agua a la planta es llevada a cabo por las raíces seminales, también conocidas como primarias, esto por periodo no mayor a tres semanas, ya que es el tiempo para que las raíces nodales o principales se desarrollan y sustituyendo a las primarias en esta función (Australian Government, 2008; Guacho, 2014; Sánchez y Pérez-Urria, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

Existe la presencia de raíces laterales las cuales se ramifican profusamente, logrando ampliarse y penetrando la tierra de manera profunda. Gran parte las raíces con las que cuenta el maíz no sobrepasan los 30 cm de la capa del suelo, con frecuencia se logran desarrollar raíces de sostén ubicados en los nudos aéreos inferiores del tallo. Siendo partícipes en la nutrición de la planta al momento de llegar al suelo, generando a su vez unas ramificaciones (Australian Government, 2008; Guacho, 2014; Sánchez y Pérez-Urria, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

Flor: Una de las características que hace representativo a la planta del maíz es la separación de los sexos, esto en las estructuras florales, por lo consiguiente el maíz es una planta monoica, esta produce sus inflorescencias masculinas, ubicándose en el ápice del tallo, por otro lado, las inflorescencias femeninas son las mazorcas,

apareciendo en el ápice de ramas laterales, encontrándose condensadas que llegan a sobresalir de las axilas de las hojas (Australian Government, 2008; Guacho, 2014; Sánchez y Pérez-Urria, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

La inflorescencia masculina produce espiguillas libres estas en pares, he ahí donde se encuentra un flósculo fértil y otro estéril, encerrándose para su protección. En el caso de la inflorescencia femenina en la zona de la superficie del raquis de una forma muy concentrada produce pares de espiguillas, dentro de cada espiguilla se encuentran dos flores fértiles, posterior a la fecundación sexual por medio de anemogamia, los ovarios fecundados maduraran para convertirse en un grano de maíz (Guacho, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

Grano: Cada grano de maíz posee cuatro estructuras físicas fundamentales: el pericarpio, el endospermo, el embrión y la pilorizza, botánicamente el grano del maíz es una cariópside.

El embrión es el encargado en la generación de una nueva planta, por su parte el endospermo proporciona nutrientes para la plántula al momento de llevar a cabo la germinación, esto es por un tiempo limitado hasta que la plántula establezca un área foliar suficiente para ya ser autótrofa.

El endospermo representa el 86% del volumen del grano de maíz, se encuentra compuesto por almidón principalmente, junto con un conjunto de proteínas denominadas “gluten”, el alto contenido de almidón es debido a que es la base de los nutrientes que emplea la plántula para desarrollarse (Australian Government, 2008; Guacho, 2014; Biswas, 2019; Government of Canada, S/A).

2.3 Pozol

El pozol es una bebida a base de maíz nixtamalizado (*Zea mays*) que puede ser consumida sola o agregando cacao (*Theobroma cacao L.*) y azúcar, esto para otorgar un sabor diferente a la bebida (Jiménez *et al*, 2010; Barros y Buenrostro, 2011). Es de origen maya formando parte de la alimentación básica de una gran diversidad de grupos étnicos del sur y sureste mexicano; donde entran grupos como chontales, choles, mayas, lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoque, mames y

zapotecos, estos juntos a las poblaciones mestizas presentes en la región (Flores, 2008).

Se considera una bebida representativa de la cultura chiapaneca, esto al considerarla como una bebida refrescante y energética. Su consumo en zonas rurales es con una mayor frecuencia, ya que familias y campesinos toman el “pozol” en un horario cercano a las 12 P.M. Esto como una forma de saciar el hambre que puedan llegar a presentar, así también para recuperar energía y mitigar la sed (Cadena-Iñiguez y De la Cruz-Morales, 2012).

Su consumo se hace cuando la masa se encuentra fresca o posterior a que lleve un proceso de fermentación, siendo una fermentación ácida no alcohólica, teniendo una presencia las bacterias, levaduras y hongos. Esta bebida fermentada se le ha logrado atribuir algunos beneficios hacia la salud humana como es el control de diarreas, disminución de fiebre y control de la gastritis (Díaz *et al*, 1999; Rodríguez *et al*, 2010).

2.4 Elaboración del pozol

La elaboración del pozol es un proceso de origen prehispánico en donde se utilizan los granos de maíz, agua y cal (CaO) como materia prima para llevar a cabo el proceso conocido como nixtamalización, posterior a ello se hace una molienda del maíz nixtamalizado para obtener la masa, a esta masa se le añade agua, azúcar y cacao (opcional) para la elaboración de la bebida del pozol (González *et al*, 2017).

La nixtamalización es un proceso térmico donde se combina la temperatura y el tiempo para lograr cambios en los granos de maíz para su uso en la elaboración de alimentos. El tiempo estimado de cocción de la nixtamalización es un valor determinado con base a la experiencia, este es un factor importante a considerar. La nixtamalización del maíz se lleva a cabo en un periodo aproximado de una hora, en el cual los granos de maíz se cuecen generando que el pericarpio reviente y se desprenda por acción de la cal, se retira del fuego y se deja enfriándose por toda la noche, se lava para lograr retirar el exceso de cal, ya limpio el producto se lleva a cabo la molienda del maíz nixtamalizado para obtener una masa blanca obteniendo así el pozol blanco. Para la elaboración del pozol de cacao, el cacao lleva un proceso

de tostado, para posteriormente descascarillar y moler, integrándose en la masa por medio de un proceso de amasado (González *et al*, 2017).

El tueste del grano de cacao se realiza a un fuego lento con movimientos circulares esto para evitar que se quemen los granos. Hay que tener cuidado que se haya obtenido el tostado correcto ya que de lo contrario este estará crudo y pozol no tendrá su sabor y color característico; si se llevó a cabo de la manera correcta el tueste del cacao al momento de llevar a cabo el amasado este empezará a tornar a una coloración oscura, presentando también su aroma y sabor característico (González *et al*, 2017).

2.4.1 Acción de la cal

La cal juega un papel muy importante al momento de alcalinizar el agua de la nixtamalización debido a que este facilita la remoción del pericarpio de los granos durante el proceso de cocción y reposo, controla la actividad microbiana, mejora las características organolépticas ya que genera modificaciones en los granos de maíz debido a que la nixtamalización es considerado selectivo para las proteínas, existe una disminución en la solubilidad de la zeína, proteína nutricionalmente pobre debido a su deficiencia en lisina y triptófano. A su vez debido a la cocción alcalina del maíz aumenta la solubilidad de glutelina la cual tiene un mayor aporte nutrimental y con ello la disponibilidad de aminoácidos esenciales (Castillo *et al*, 2009).

Estos cambios son consecuencia de la pérdida de ciertas estructuras físicas presentes en los granos de maíz y compuestos químicos, provocados por el agua, un pH alcalino por el proceso de cocción, el tiempo de cocción, temperaturas aplicadas.

La alcalinidad presente genera una disolución de la hemicelulosa presente en el pericarpio el cual tenía la función similar a un pegamento de las paredes celulares de los granos de maíz (Paredes-López, *et al*, 2008; Castillo *et al*, 2009).

2.5 Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico microbiano en donde algún tipo de compuestos orgánico es utilizado como sustrato, este también es un donador y receptor de electrones, en este proceso se hace una liberación de energía; donde no

se necesita la presencia de oxígeno ni de la cadena transportadora de electrones (Tortora *et al*, 2007; Madigan *et al*, 2015).

No fue hasta el siglo XIX donde los microorganismos se lograron identificar como contaminantes de los alimentos, la fabricación de diferentes productos alimenticios gracias a la fermentación se ha realizado desde hace aproximadamente 4000 años. La proliferación de microorganismos genera el surgimiento de otros encargados en la inhibición del crecimiento de estos mismos, esto como consecuencia a la síntesis de diferentes productos que son resultado de la acción metabólica en la materia prima. Algunas de estas sustancias que llegan a ser sintetizadas por los microorganismos son el ácido láctico y el etanol, entre otros (Vega, 2010).

Los microorganismos poseen la gran capacidad de fermentar diversos sustratos, exceptuando algunos, la fermentación de azúcares como las hexosas se consideran como sustratos fermentables excelentes (Madigan *et al*, 2015). El producto final obtenido en una fermentación va a depender de diferentes factores como el tipo de microorganismo, el tipo de sustrato que se implemente y el tipo de enzimas que se encuentran presentes y en estado de activación. Para lograr la identificación de los microorganismos encargados de la fermentación se realiza un análisis químico de los productos obtenidos (Tortora *et al*, 2007; Sharma *et al*, 2020).

La implementación de la fermentación para la obtención de alimentos es gracias a que esta logra mejorar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los nutrientes del producto en cuestión, también permite mejorar las propiedades organolépticas, lo que conlleva a la mejora de la vida útil del producto. Lograr que los alimentos sean seguros no solo con la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos que se pueda llegar a presentar esto gracias al ácido láctico que se llega a sintetiza. La fermentación es considerada como una forma eficaz de reducir el riesgo de deficiencia de minerales que puede llegar a presentar una población, desafortunadamente también existe una asociación con la proliferación de otros microorganismos, los cuales pueden llegar a provocar algún tipo de problema en seguridad del alimento obtenido por medio de la fermentación, generando la pérdida de vitaminas y minerales indispensables (Tortora *et al*, 2007; Nkhata *et al*, 2018).

2.5.1 Tipos de fermentación

Existen diferentes tipos de fermentaciones y estas se logran clasificar de acuerdo al producto obtenido al final de la fermentación las cuales pueden ser etanol, dióxido de carbono (CO_2), ácido láctico, ácido acético, entre otros. En el caso de la fermentación donde se logra obtener etanol y CO_2 se lleva a cabo por medio de una fermentación alcohólica (Vázquez y Dacosta, 2007). Este es un proceso bioquímico en donde se involucran interacciones entre levaduras, bacterias y hongos. En la fermentación alcohólica las levaduras presentes implementan a las azúcares presentes como sustrato para su crecimiento, en donde se obtiene como productos finales de la fermentación es el etanol, CO_2 y otros subproductos metabólicos los cuales aportan diversas características organolépticas a los alimentos y bebidas fermentados por medio de una fermentación alcohólica (Ciani *et al*, 2008; Buratti y Benedetti, 2016).

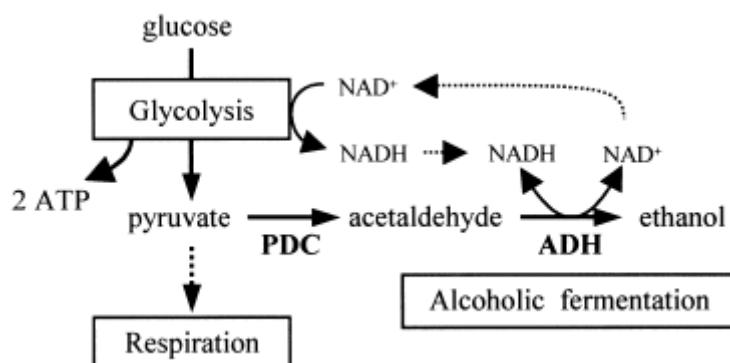
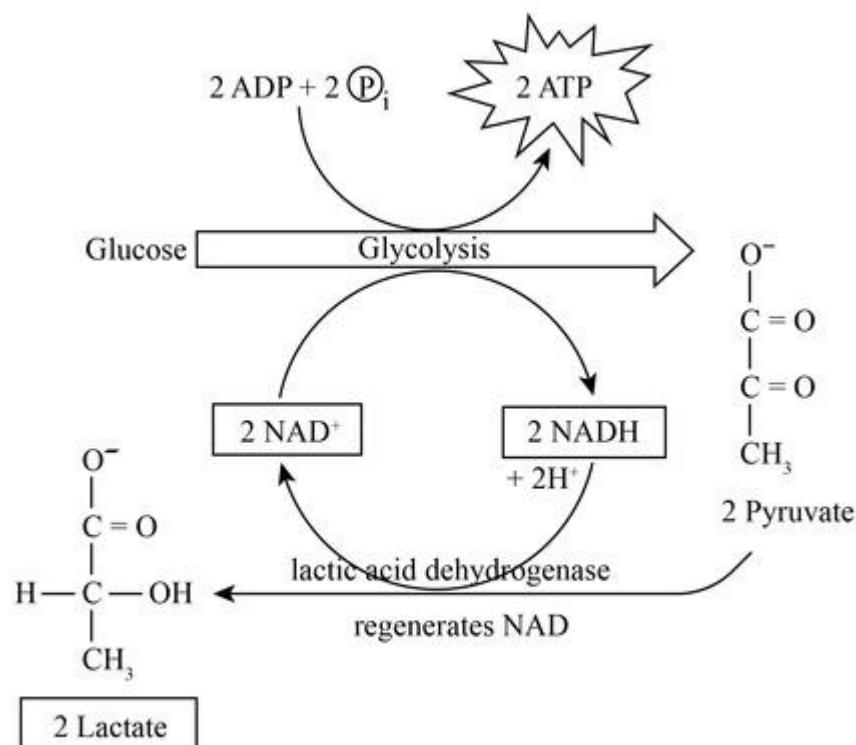


Fig. 1. Síntesis del etanol a partir de glucosa (Saika *et al*, 2006)

En la fermentación láctica principalmente se lleva a cabo por bacterias del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* entre otros; utilizando a los azúcares como sustrato para la obtención de ácido láctico. Esta fermentación juega un papel primordial en las características organolépticas presentes en los productos finales, así también en su seguridad e higiene del alimento (Muñoz *et al*, 2011; Malo y Urquhart, 2016).



(b) Lactic acid fermentation

Fig. 2. Síntesis de ácido láctico a partir de glucosa
(Afzal *et al*, 2018).

La fermentación acética utiliza el etanol como principal fuente de carbono, destacando a las bacterias del género *Acetobacter* y *Gluconobacter* como las más representativas al momento de hablar de una fermentación acética (Yassunaka *et al*, 2023).

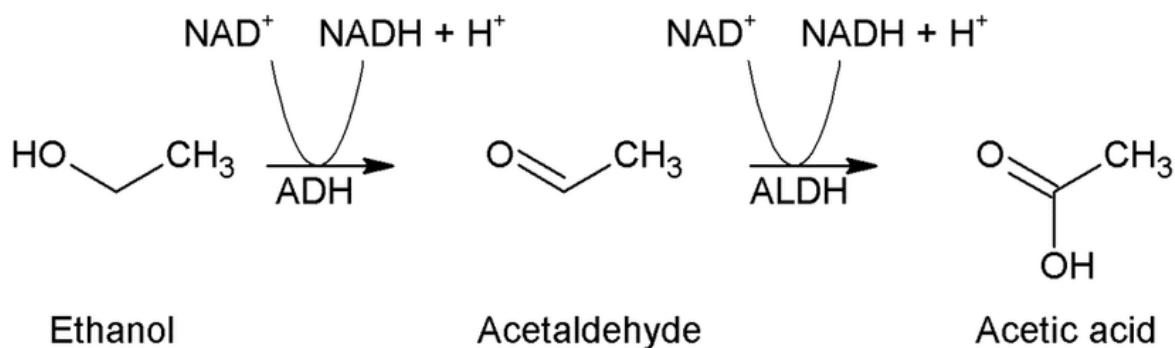


Fig. 3. Síntesis de ácido acético a partir de etanol (Kummer, 2016).

2.5.2 Microorganismos presentes en la fermentación

Las bacterias ácido lácticas son conocidas por ser las encargadas de la fermentación de los alimentos. Se caracterizan por la producción de ácido láctico de ahí su nombre de bacterias ácido lácticas.

Existe la presencia de levaduras las cuales son hongos unicelulares, esto durante una parte o por todo su ciclo vegetativo. El conocimiento acerca de la existencia de las levaduras se remonta cerca de 4,300 años esto gracias al poder fermentativo que estas presentan; debido a la gran cantidad de procesos fermentativos en los cuales se emplean (Tortora *et al*, 2007).

Las bacterias ácido acéticas se encargan principalmente en la síntesis de ácido acético utilizando como fuente de carbono el etanol, esto se lleva a cabo por medio de dos enzimas unidas a la membrana ubicadas en la parte exterior de la membrana citoplasmática. Estas enzimas son el alcohol deshidrogenasa que oxida el alcohol a acetaldehído, posterior este acetaldehído es oxidado por el acetaldehído deshidrogenasa para la obtención ácido acético (Yassunaka *et al*, 2023).

2.6 Generalidades de levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares que cuentan con una forma esférica u oval, no filamentosos, estas se encuentran ampliamente distribuidas y adaptadas a diferentes ambientes gracias a adaptaciones como cambios de temperaturas, altitudes, sustratos, manchas geográficas, es por ello que se encuentran en glaciares, lagos salinos, aguas ácidas, suelo, aire y en diferentes profundidades marinas. En ocasiones cuentan con pseudohifas, también presenta una fase sexual perfecta o teleomorfa (Mendoza, 2005; Tortora *et al*, 2007).

Las levaduras se encuentran presentes en diferentes industrias, debido a su gran uso biotecnológico, abarcando diferentes industrias como la alimentaria, biorremedación, farmacéutica, biocombustibles, con ayuda de la biotecnología diferentes cepas de levaduras son empleadas en ámbitos de la biotecnología antigua y moderna (Mendoza, 2005; Tortora *et al*, 2007; Gutiérrez, 2017). Las levaduras pueden ser ascomicetos y los basidiomicetos, para su reproducción se lleva a cabo de forma

asexual, principalmente por gemación o fisión, para estas clasificaciones se han llevado a partir de métodos moleculares (Mendoza, 2005).

Este grupo de microorganismo llegan a ser anaerobios facultativos permitiéndoles poder estar presentes en diferentes ambientes. Cuando logran metabolizar diversos hidratos de carbono y agua, es significado de que se llevo a cabo una respiración aeróbica; por otro lado, en ausencia de oxígeno se logra la obtención de etanol y CO₂, esto es debido a que las levaduras fermentan los azúcares presentes en la muestra (Tortora *et al*, 2007).

La temperatura es un factor importante para un crecimiento óptimo en las levaduras, la temperatura óptima de crecimiento es de 28°C, pero cuentan con un rango alto de resistencia a las diferentes temperaturas, las cuales pueden ir desde los 5°C hasta los 37°C. Una característica de suma importancia para un buen crecimiento es el pH, en el caso de las levaduras se proliferan mejor en concentraciones de pH de 4.5 a 6.5 (Mejía-Barajas *et al*, 2016; González, 2020).

Se estima que solo se conoce cerca de 1 – 2% de todas las especies de levaduras, ya que de acuerdo con los filos Ascomycota y Basidiomycota se conoce la existencia de 2000 especies de levaduras descritas hasta el día de hoy (Satyanarayana y Kunze, 2017).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más destacada en la industria cervecera y alimentaria, conocida por su eficiencia en la producción de etanol, su tolerancia al etanol y su capacidad para fermentar incluso en presencia de oxígeno. Esta especie se utiliza ampliamente en la elaboración de productos fermentados como vino, pan y cerveza (Karatia *et al*, 2011; Walker y Walker, 2018; Parapouli *et al*, 2020). Por otro lado, existen diversas levaduras no *Saccharomyces* (como *Hanseniaspora*, *Naumovia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Pichia* y *Candida*) que también participan en procesos fermentativos. Estas levaduras, aunque ofrecen aromas y sabores únicos, tienden a tener rendimientos de fermentación más bajos y son más sensibles al estrés por etanol. Esto les permite modificar el perfil organoléptico de los productos, aunque no alcanzan la eficiencia de *S. cerevisiae* en la fermentación (Burini *et al*, 2021).

2.7 Generalidades de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son organismos pertenecientes al grupo de bacterias Gram-positivos, los cuales no son formadores de esporas, estos presentan dos formas características que pueden ser cocos y bacilos así también formando cadenas de estos mismos, por otro lado, son catalasa negativa y exigentes, con una tolerancia alta a concentraciones de pH bajos. Considerado uno de los grupos de bacterias más importantes debido a su implementación en la fermentación de alimentos yendo de la mano de una mejora de las características organolépticas de los productos alimenticios fermentados (Bedolla *et al*, 2004; Mduduzi, 2017).

Caracterizados por la producción de ácido láctico de ahí su nombre de bacterias ácido lácticas, siendo este su principal producto utilizando a la glucosa como sustrato, logrando la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diacilos, entre otros, debido a la producción de los anteriores compuestos se logra evitar la proliferación de bacterias y patógenos que logran el deterioro de los alimentos fermentados, los ácidos presentes logran ejercer un efecto antimicrobiano esto al momento de poder interferir en el mantenimiento del potencial de la membrana celular, inhibiendo el transporte activo, reduciendo el pH intracelular y logran la inhibición de una variedad más de funciones metabólicas (Axelsson, 2004; Agurto y Ramos, 2008; Mduduzi, 2017).

Estas bacterias fermentan los carbohidratos presentes para la obtención de energía, se realiza por medio de fuentes endógenas de carbono como acceptor final de electrones en lugar de oxígeno. Son organismos aerotolerantes esto quiere decir que logran desarrollarse en la presencia de oxígeno en su medio, pero la obtención de la energía es por medio de la fermentación, también existen anaerobias estrictamente como es el caso de las que se encuentran en el intestino de los animales (Agurto y Ramos, 2008; Mduduzi, 2017).

En presencia de oxígeno no son capaces de llevar a cabo las fosforilaciones oxidativas, debido a que no sintetizan citocromos ni enzimas del grupo hemo. Sin embargo, debido a flavoproteínas, oxidases y peroxidases se logran llevar a cabo oxidaciones no fosforilantes, pero de una manera limitada (Agurto y Ramos, 2008).

Las bacterias ácido lácticas se encuentran protegidos contra subproductos del oxígeno como es el caso de H_2O_2 esto por medio de las peroxidasas (Mduduzi, 2017).

Para que exista un crecimiento óptimo de las bacterias ácido lácticas se necesita un pH el cual sea ácido ya que este oscila entre los 5,5 y 5,8, así también este grupo de bacterias presentan una alta demanda de nutrientes provenientes de aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Mduduzi, 2017).

Debido a la gran abundancia que presentan este tipo de bacterias se pueden ubicar en diferentes medios los cuales van desde material vegetal y frutas en descomposición, en productos lácteos, carne y pescados fermentados, cereales, remolacha, vegetales encurtidos, papas, masa madre, ensilajes, bebidas fermentadas como el pozol, jugos, aguas residuales y cavidades de humanos y animales (Mduduzi, 2017).

Las bacterias ácido lácticas se logran clasificar de acuerdo a la morfología celular que presentan, al tipo de fermentación que llevan a cabo con la glucosa, también de acuerdo al rango de temperatura en la que logra su crecimiento adecuado y con base a los patrones de la utilización del carbohidrato presente. Existe una gran abundancia de géneros pertenecientes a las bacterias ácido lácticas las cuales son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, en donde el género que presenta una mayor cantidad de especies es *Lactobacillus* en donde actualmente se conocen más de 100 especies, las cuales se encuentran presente con mayor abundancia en sustancias ricas en carbohidratos (Axelsson, 2004; Mduduzi, 2017).

Las bacterias ácido acéticas (BAA) son un grupo de microorganismos aerobios de manera estricta siendo el oxígeno el aceptor final de los electrones, estos son Gram-negativos, catalasa positiva y oxidasa negativa, cuentan una morfología en forma de bacilos, estos se encuentran se forma individual, en pares o en cadenas, pueden ser móviles gracias a la presencia de flagelos perítricos o polares. Al ser productoras de ácido acético logran desarrollarse en pH de 5,0 – 6,5, pero logran crecer a

concentraciones más bajas, también son microorganismos mesófilos, siendo 25 – 30 °C la temperatura adecuada para su crecimiento (Mamlouk y Gullo, 2013; Gomes *et al*, 2018).

Las BAA cuentan con la capacidad de oxidar alcoholes, aldehídos, azúcares o alcoholes de azúcar en presencia de oxígeno, donde los productos obtenidos en la oxidación se acumulan en el medio. Todas estas reacciones oxidativas son catalizadas por enzimas deshidrogenasas primarias, que se ubican en la superficie externa de la membrana citoplasmática.

En el proceso de fermentación de las BAA dependiendo de las concentraciones de ácido acético es el género de bacterias que se encontrarán en el sustrato o medio de cultivo. En concentraciones bajas del ácido, predomina las bacterias pertenecientes al género *Acetobacter*, hasta que se presente una concentración mayor al 5% con relación masa por volumen, en ese momento predominan las bacterias del género *Komagataeibacter*, siendo este el género utilizado para la producción de vinagre por medio de la fermentación acética sumergida. Por otro lado, las BAA pueden presentar afectaciones significativas debido a la materia prima utilizada en la producción de vinagre (Gomes *et al*, 2018).

Las BAA son microorganismos nutricionalmente exigentes, combinado a eso son cepas difíciles de aislar y cultivar en los diferentes medios, principalmente cepas provenientes de bebidas fermentadas, esto se debe al fenómeno del estado viable, pero no cultivable, generando la condición de no poder cultivar y enumerar las poblaciones de BAA, en los diferentes medios de cultivo, principalmente a que no todos los medios favorecen su crecimiento y pueden llegar a ser selectivos entre las diferentes cepas bacterianas. Para las cepas utilizadas en la producción de vinagre industrial el aislamiento y purificación se lleva a cabo por medio de un medio líquido o sólido que logre proporcionar los nutrientes necesarios a las cepas. Las fuentes de carbonos que son utilizadas principalmente D-Glucosa y D-Manitol, agregando etanol y ácido acético en diferentes concentraciones, combinado con diferentes fuentes de nitrógeno, como peptonas o extractos de levaduras y algunos minerales como fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato de disódico anhídrico (Na_2HPO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4) (Gomes *et al*, 2018).

Diversas BAA son empleadas como biocatalizadores en producciones industriales de diferentes compuestos, siendo importantes para el desarrollo de procesos fermentativos ecológicos como una alternativa a una síntesis química. *Gluconobacter oxydans* sintetizan enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos, donde el ácido glutámico y aspártico son un ejemplo de ellos (Mamlouk y Gullo, 2013). Especies del género *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, además de estar vinculados a la producción industrial de vinagre, se encuentran presente en el campo agrícola, destacando cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* son útiles en la fijación de N₂ y *Gluconacetobacter xylinus* es ampliamente conocida por su producción de celulosa pura en grandes cantidades (Mamlouk y Gullo, 2013).

2.8 Alimentos funcionales

Actualmente, la creciente demanda de alimentos por parte de los consumidores ha provocado cambios en los procesos de producción. Esta búsqueda de nuevas opciones alimenticias no se limita solo a cubrir el hambre o las necesidades nutricionales básicas, sino también busca contribuir al bienestar físico y ofrecer beneficios positivos para la salud del consumidor.

El término de alimento funcional fue propuesto por primera vez en 1980 en Japón esto para diversos alimentos fortificados con diferentes ingredientes que contenían efectos positivos a nivel fisiológico (Mondragón, 2012; Granato *et al*, 2020).

Los alimentos funcionales son aquellos procesados de forma industrial o naturales, son consumidos con regularidad en una dieta variada, brindando efectos potencialmente positivos en la salud además de la nutrición básica ya brindada. Para poder afirmar esto se deben realizar diversos ensayos clínicos aleatorios, doble ciego y controlados con placebo para establecer toda la eficiencia funcional con la que cuenta el alimento.

Los alimentos funcionales además del valor nutrimental que aportan promueven diferentes condiciones óptimas de salud y logran reducir riesgos de enfermedades no transmisibles, como el cáncer, diabetes tipo 2, dislipidemia, accidente cerebrovascular y enfermedades cardiovascular, es por ello que se deben realizar diferentes ensayos clínicos de acuerdo a las regulaciones de cada país. Aunado a lo anterior deben de

ser de acceso gratuito sin contar con una prescripción médica y una evidencia sólida de los diferentes beneficios para la salud al momento de consumirlo con regularidad en una dieta equilibrada, destacar que los alimentos funcionales no son medicamentos, ya que no curan ni previenen enfermedades (Granato *et al*, 2020).

2.9 Identificación microbiana

El proceso de la identificación microbiana se implementa para poder determinar y clasificar los diferentes grupos de microorganismos presentes en una muestra, ya sea ambiental, alimentos, agua u otros sustratos. Implementando diferentes técnicas y procedimientos donde cada uno cuenta con sus ventajas y limitaciones (Tortora *et al*, 2007).

Están los métodos fenotípicos, basándose en características observables del microorganismo, como es la morfología, coloración, crecimiento en medios específicos, propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo es indispensable para el aislamiento del microorganismo, permitiendo así poder llevar a cabo su identificación, conocer su sensibilidad ante algún antimicrobiano, entre otras cosas. Se necesita una correcta elección de medio de cultivo y condiciones de incubación para un crecimiento óptimo del microorganismo (Bou *et al*, 2011).

El uso de pruebas bioquímicas para una identificación preliminar son complementarias a una identificación de la cepa en cuestión donde se utiliza una batería de pruebas con diferentes tiempos de respuesta, existiendo pruebas de lectura inmediata como catalasa y oxidasa, también se combinan pruebas las cuales nos dan un resultado pasado cierto tiempo de incubación, destacando la pruebas de β -galactosidasa e indol, entre otras donde el tiempo de respuesta es menor a seis horas, aunado a estas pruebas están las que se demoran un tiempo de 18 – 48 horas donde se incluyen pruebas de óxido-fermentación, reducción de nitratos, fermentación de azúcares, utilización de citratos, entre otras, por último, pruebas basadas en la resistencia de la cepa microbiana a ciertas sustancias. La implementación de pruebas moleculares es considerada como una herramienta clave para una identificación precisa, rápida y con una calidad mayor al momento de identificar microorganismos difíciles utilizando métodos tradicionales. La PCR es uno de los métodos más empleados permitiendo la amplificación del ADN del

microorganismo, contando con una ventaja al momento de identificar muestras complejas por su alta sensibilidad y especificidad (Bou *et al*, 2011)

2.9.1 Métodos tradicionales de identificación

Son técnicas utilizadas para la identificación y clasificación de los diferentes microorganismos basándose en las características fenotípicas.

2.9.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son empleados para el cultivo y aislamiento de los diferentes microorganismos, siendo de forma líquida, cuando el crecimiento microbiano es de forma exponencial presentando una limitación para su crecimiento hasta que la disponibilidad de nutrientes es menor o insuficiente, y una forma sólida utilizando el agar para solidificar (Tortora *et al*, 2007; Bonnet *et al*, 2019). Un medio de cultivo es una composición de diferentes elementos básicos acompañado de productos orgánicos e inorgánicos, variando de acuerdo al requerimiento del microorganismo para un crecimiento óptimo. Combinado con otros caracteres como es una humedad idónea de acuerdo al organismo, un pH ajustado de acuerdo al tipo de medio de cultivo y una concentración de oxígeno determinada por el microorganismo en cuestión o ausencia del mismo, todos estos parámetros deben de llevar un proceso de esterilización en conjunto previo al uso del medio de cultivo (Tortora *et al*, 2007; Mandigan *et al*, 2015).

Para un crecimiento idóneo se requiere un mínimo de diferentes nutrientes, presentando variaciones de acuerdo a cada microorganismo, pero la base principal de todo medio de cultivo es el agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales; donde cada compuesto representa un requerimiento del microorganismo. El agua es indispensable para la solubilización de los diferentes nutrientes, a su vez el transporte de los mismos y llevar a cabo reacciones de hidrólisis. En algunos casos existen bacterias que dependen del agua para un mejor crecimiento en el medio y si la cantidad de agua no es la suficiente estos pueden reducir su tamaño o no crecer (Tortora *et al*, 2007; Bonnet *et al*, 2019).

La fuente de carbono es uno de los componentes indispensables al ser utilizado para la síntesis de moléculas con carbonos en su cadena, los cuales van de grasas,

carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta fuente de carbono puede provenir de una forma inorgánica como CO_2 o de una forma orgánica siendo azúcares y alcoholes los más utilizados.

La fuente de nitrógeno es de suma importancia al ser utilizada para la síntesis de las proteínas necesarias de los microorganismos en cuestión, las fuentes de nitrógeno pueden ser de forma inorgánica como el caso de los nitratos o de forma orgánica siendo hidrolizados de proteínas como es la proteosa-peptona o triptona. Por último, el fosfato, el sulfato, el magnesio o el calcio son de las principales sales minerales utilizadas por los microorganismos (Tortora *et al*, 2007; Bonnet *et al*, 2019).

De acuerdo al tipo de medio de cultivo se pueden clasificar principalmente en cuatro rubros, siendo medios de cultivo generales, medios de cultivo selectivos, medios de cultivo diferenciales y medios de cultivo enriquecidos, esto va a depender de los compuestos con los que se haya elaborado el medio de cultivo (Mandigan *et al*, 2015).

Los medios generales únicamente cuentan con su fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales, utilizados para el crecimiento en general de los diferentes microorganismos, siendo el agar o caldo nutritivo el más empleado. Para el caso de los medios selectivos únicamente permiten el crecimiento de un grupo determinado de microorganismos para esto se retiran o se colocan diferentes elementos los cuales son utilizados como inhibidores de crecimiento de organismos no deseados, este tipo de medios facilita el aislamiento e identificación del organismo a trabajar, en el caso de agregar algún elemento o sustancia inhibidora de crecimiento se utiliza principalmente sales, ácidos, colorantes o antibióticos. Uno de los medios más utilizados es el agar *Salmonella-Shigella* donde prioriza el crecimiento de bacterias pertenecientes a los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Por otro lado, los medios de cultivo diferenciales contienen algunas sustancias que provocan cambios en las colonias entre las diferentes especies, esto es para facilitar la identificación entre los diferentes organismos microbianos que se encuentren en la placa de cultivo, un ejemplo es el agar TSI (agar hierro-triple azúcar), en el cual de acuerdo al estado que se encuentre el medio de cultivo posterior a la inoculación nos mostrara se estamos trabajando con un microorganismo deseado. Por último, medios de cultivo enriquecidos, se conocen de esta manera debido a que cuentan con diferentes

elementos y sustancias que son un apoyo a una mejor proliferación de los microorganismos, este tipo de medios de cultivo logra mantener a diferentes agentes microbianos no deseados en un fase de latencia, prevaleciendo el crecimiento logarítmico de un cierto microorganismo, se cuenta con la posibilidad de aislar el microorganismo necesario posterior al enriquecimiento recibido por el medio de cultivo. Existe la posibilidad de la unión de dos tipos de medios siendo medios selectivos y diferenciales al mismo tiempo de acuerdo al agente selectivo y la apariencia que tenga el medio posterior a la inoculación, el agar sal-manitol es uno de este tipo de medio de cultivo (Tortora *et al*, 2007; Mandigan *et al*, 2015; Prinzi y Rohde, 2020).

2.9.1.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de técnicas utilizadas en los laboratorios para una identificación o diferenciación entre microorganismos, utilizándose principalmente en bacterias, con una base de reacciones químicas de los diferentes compuestos que logra utilizar o sintetizar los diferentes microorganismos. Estas pruebas logran detectar la presencia de enzimas específicas o la capacidad del microorganismo para poder metabolizar el sustrato donde se encuentra. Existen diferentes pruebas bioquímicas como las pruebas de acuerdo a la fermentación de un azúcar, está detecta la capacidad del microorganismo para poder fermentar diferentes carbohidratos o algunos en específico produciendo gases o ácidos como producto de la fermentación. Otro tipo de prueba es de acuerdo a su producción de enzimas con el fin de poder identificar si el microorganismo sintetiza enzimas específicas, también las pruebas que evalúan la descomposición del sustrato, con el objetivo de poder determinar la capacidad del microorganismo de poder catabolizar diferentes compuestos químicos, también están las pruebas relacionadas a la utilización de un sustrato específico, esta prueba se realiza para conocer la capacidad del microorganismo de poder utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono o de nitrógeno. Por último, existen pruebas bioquímicas vinculadas a la producción de metabolitos logrando percibir la síntesis de diferentes metabolitos esto durante el crecimiento del microorganismo (Macfaddin, 2003; MacWilliams, 2009).

2.9.1.3 Generalidades de la prueba de agar TSI (Hierro - Triple azúcar).

Es un medio de cultivo diferencial que cumple un doble propósito, la determinación de la fermentación de los diferentes carbohidratos presentes y la determinación de la producción ácido sulfídrico (H_2S), diferentes microorganismo pueden usar cualquier azúcar como sustrato dando un patrón de sustratos metabolizados como resultado, este patrón es utilizado para la identificación de diferentes grupos, géneros o especies, principalmente los pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (MacFaddin, 2003).

2.9.1.4 Generalidades de agar Citrato de Simmons

La prueba de citrato utiliza el citrato como única fuente de carbono permitiendo crecimiento de bacterias que tengan la capacidad de usar el citrato como fuente de carbono siendo especies de Enterobacteriaceae, a su vez la prueba de citrato utiliza sales de amonio como única fuente nitrógeno. Cuando los microorganismos logran utilizar el citrato, el medio cambia su pH a un medio alcalino combinado con un cambio de color del medio de verde a azul (MacWilliams, 2009).

2.9.1.5 Generalidades del medio MIO (Movilidad, indol, ornitina descarboxilasa)

El medio MIO es una prueba bioquímica encargada en identificar la movilidad, indol y ornitina descarboxilasa. La prueba de movilidad se enfoca en la detección de flagelos en bacterias, dicho flagelos son empleados por el microorganismo para moverse dentro del medio.

La prueba de indol comprueba la capacidad de un microorganismo en poder degradar el triptófano y producir indol. El triptófano cuenta con la característica que puede presentar una desaminación e hidrólisis por bacterias que sinteticen una enzima capaz de degradar el triptófano, el indol es un subproducto obtenido al momento de degradar el triptófano y detectarlo dependerá de una reacción química entre el indol y el P-dimetilaminobenzaldehído en condiciones de un pH ácido generando a su vez la producción del colorante rojo rosindol, por último, se evalúa la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa, iniciando con la fermentación de la glucosa presente en el medio provocando una acidez en el mismo y un viraje de púrpura al amarillo, esta acidez es la indica para que la enzima ornitina descarboxilasa actúe sobre la

ornitina y la putrescina a su vez lleva a una alcalinización del medio y genere otro viraje a púrpura (MacFaddin, 2003; MacWilliams, 2009).

2.9.1.6 Prueba de catalasa

La prueba de catalasa es una prueba bioquímica utilizada en la microbiología con el objetivo de poder identificar la presencia de la enzima catalasa en los diferentes microorganismos, esta descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno, logrando diferenciar entre las bacterias que logran sintetizar o no la catalasa.

Esta enzima se encuentra presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que presentan citocromos, existen excepciones como son las cepas pertenecientes a *Streptococcus* que no cuentan con catalasa (Macfaddin, 2003; Tortora *et al*, 2007)

2.9.2 Métodos moleculares de identificación

Son métodos basados en el análisis del material genético de los microorganismos, cuentan con ventaja ante los tradicionales, ya que estos son más rápidos, sensibles, específicos; logrando la identificación de microorganismos no cultivables (Tortora *et al*, 2007).

2.9.2.1 PCR - RFLP

Es una técnica empleada para la identificación de levaduras, se basa en un análisis de los patrones de restricción de la región espaciadora transrito interno (ITS) del ADNr presente en el gen de ARNr 5.8S.

En la identificación de las levaduras se analizan los patrones de restricción que fueron generados por medio de una amplificación de la región los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), flanqueando el gen 5.8S ARNr. El poder amplificar la región ITS por medio de una digestión con enzimas de restricción (HaeIII, Hinfl y Cfol) da como resultado un patrón de restricción específico en cada especie que se estudie (Segura *et al*, 2010; Verdugo-Valdez, 2013; NIH, 2024).

2.9.2.2 PCR - ARNr 16S

El ARNr 16s es una macromolécula empleada para estudios de filogenia y taxonomía en bacterias al ser considerada como un cronómetro molecular. El gen 16s ARNr pertenece a la región del ADN que codifica el ARNr 16S, ubicándose en la subunidad pequeña 30S del ribosoma. El uso de esta región se da principalmente a la presencia de regiones altamente conservadas y regiones con variaciones entre las diferentes especies de bacterias.

La técnica se realiza en tres etapas: iniciando con la secuenciación parcial o total del gen 16S ARNr a partir de una muestra adecuada, continuamos con la determinación de las secuencias de nucleótidos del amplicón y terminamos con el análisis de la secuencia.

La amplificación se lleva a cabo en un termociclador por medio de una PCR, utilizando de sustrato ADN purificado que puede provenir de diferentes orígenes. El gen 16S ARNr al contener regiones conservadas permite el uso de cebadores universales que flanquean las regiones conservadas del gen, logrando la amplificación de regiones variables. La amplificación se realiza de las regiones de la V1 a V9, destacando las regiones V3 y V4 como las más comunes; para la secuenciación se realiza una purificación del producto de la PCR por medio de un gel de agarosa en electroforesis, para la secuenciación existen diferentes técnicas que se pueden realizar como una secuenciación de Sanger o una secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés), por último, un análisis bioinformático realizando la alineación, el agrupamiento y la comparación con diferentes bases de datos dando como resultado una identificación de las bacterias presentes en la muestra y una abundancia relativa (Rodicio y Mendoza, 2004; Case *et al*, 2007; Valenzuela-González *et al*, 2015).

2.10 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal consiste en un método para determinar los contenidos de macronutrientes en muestras provenientes de alimentos, estimando porcentajes de humedad, ceniza, grasas, proteínas, fibra cruda y carbohidratos (Fon-Fay y Zumbado, 2019; Ruiz-Albores, 2019; Ganopichayagrai y Suksaard, 2020).

Cuenta con múltiples aplicaciones prácticas en diferentes ciencias e industrias. Con este tipo de análisis se determina los contenidos de macronutrientes en los alimentos con el objetivo de generar el etiquetado nutricional obligatorio en diferentes países, esto con el fin de guiar al consumidor de lo que está consumiendo (FAO, 1986).

Conocer la composición proximal de los alimentos permite formular dietas equilibradas en función de los diferentes requerimientos nutricionales de la persona o animal (NRC, 2001). También es utilizado para la caracterización de materias primas, comparar variedades, evaluar la calidad nutricional de nuevos productos (AOAC, 2019).

III. Antecedentes

El pozol es una de las bebidas que tiene una alta presencia en la dieta de personas de sur y surestes de México, su consumo presenta dos propósitos los cuales van de saciar la sed de una persona, así también mitigar el hambre, el pozol es consumido en las horas previas a comer que van desde las 11 A.M. hasta las 2 P.M (Cadena-Iñíguez y De la Cruz-Morales, 2012).

Se han hecho diferentes estudios relacionados a la microbiota del pozol utilizando diferentes enfoques de acuerdo a cada autor.

De acuerdo al estudio que llevó a cabo Flores-Espinosa (1995), en donde caracterizó bacterias lácticas aisladas del pozol, logró determinar la gran capacidad que presentan estas bacterias para llevar a cabo la fermentación de los diferentes azúcares presentes en el nixtamal, en donde se puede encontrar la presencia de disacáridos (sacarosa y maltosa) y monosacáridos (glucosa y fructosa), así también estas bacterias logran degradar el almidón perteneciente al maíz, por otra parte, la actividad amilolítica se ve favorecida debido a la presencia de calcio. Por último se llevó a cabo una identificación de las bacterias lácticas esto de acuerdo a los resultados obtenidos de la fermentación de azúcares presentes; esta identificación se realizó por medio de APILAB (Biomérieux), en donde un porcentaje mayor al 50% de la cepas se identificaron dudosamente, debido a que el patrón de fermentación de carbohidratos no encontró coincidencia alguna con su base de datos, se consideró como algo normal, esto se debe a que se analiza un sustrato que no presentaba estudios previos, considerando lo anterior se logró la identificación de la presencia de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, con una mayor abundancia las especies de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* .

Por otro lado, Nuraida y colaboradores (1995), identificaron la microbiota presente en diferentes muestras que presentaban procesos de almacenado para su fermentación, un grupo de muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico posterior a su compra, en donde se encontraron diferentes especies de bacterias como son: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis*, pero con la observación de que no se encontró crecimiento fúngico de ningún tipo, por otra parte, las muestras fermentadas

de la forma tradicional, envueltas en hojas de plátano, presentaron una microbiota importante a nivel superficial, debido a que hubo crecimiento de bacterias ácido lácticas, levaduras y mohos esto en un periodo de dos días.

Díaz y colaboradores (1999), mencionan que en algunas muestras de pozol se han llegado a detectar grandes cantidades de bacterias ácido lácticas amilolíticas, esto al inicio del proceso de la fermentación de las muestras, presentando una abundancia constante cerca de 72 horas la cual fue interrumpida debido a que el pH alcanzó niveles más ácidos que los que presentaba al inicio, gracias a ellos lograron a formar parte de 10% total de las bacterias ácido lácticas totales en la muestra.

Ampe y colaboradores (1999), demostraron que la ecología de la microbiota presente en los alimentos fermentados no se puede estudiar de una manera tradicional con únicamente métodos los cuales sean dependientes de cultivos microbianos, esto debido a que algunos taxones dominantes no se logran recuperar con este enfoque. Debido a ello la investigación se realizó mediante un enfoque polifásico implementado diferentes métodos microbiológicos y moleculares, dando como resultado a la toma de huellas dactilares DGGE y la cuantificación de ARNr permite una caracterización con mayor precisión.

Wacher *et al.* (2000), evaluaron la microbiota presente en diferentes muestras de pozol mestizo e indio, comparando la microbiota inicial presente, sometiéndolos a un proceso de fermentación de nueve días, donde se observó el aumento constante de las concentraciones de bacterias y levaduras, teniendo una mayor visibilidad de levaduras en la superficie de la masa que en el interior de la misma; a diferencia de las bacterias que presentaban concentraciones similares en el interior de la masa y en la superficie de la misma.

Flores (2008), menciona acerca de que diversos estudios microbiológicos se han llevado a cabo a esta bebida dan como resultado una microbiota abundante en la cual diferentes microorganismos desempeñan el papel de fermentar los azúcares presentes en la masa o en la bebida, siendo así las bacterias ácido lácticas las primeras en poder proliferar y estando presentes durante largos periodos de tiempo, este tipo de bacterias son las encargadas de acidificar la masa esto debido a la

producción de ácido láctico que a su vez lograr modificar algunas características vinculadas al sabor y olor de la bebida.

Velázquez-López y colaboradores en el (2018), llevaron a cabo trabajos con cepas que fueron aisladas de muestras de pozol empleándolas para la elaboración de una bebida probiótica utilizando diferentes muestras de pozol como es el caso del pozol blanco y pozol de cacao. De acuerdo al escrito nos menciona la posibilidad de poder llevar a cabo una bebida probiótica, pero esto únicamente con dos cepas las cuales logran presentar las características necesarias (pH y ácido láctico) para que estas pueden desempeñarse como probióticos, también pueden lograr a desempeñar un papel importante a nivel industrial gracias a que presentan características las cuales hacen a que resistan a condiciones casi extremas.

Rizo (2021), realizo un análisis microbiológico, bioquímico y metaproteómico del pozol con el objetivo de conocer los cambios presentes durante la fermentación del pozol y analizar el metaproteoma en diferentes etapas de la fermentación, abordo esto con un enfoque multidisciplinario permitiendo generar una imagen compleja del sistema de fermentación. Identifico la presencia de bacterias, hongos, levaduras y arqueas al momento que se lleva a cabo la fermentación. Siendo las bacterias los que cuentan con una mayor presencia a diferencia de los demás microorganismos. Destacando que los cambios principales como es la caída de pH, disminución de los nutrientes y aumento logarítmico de los microorganismos se da en las primeras 9 horas. Donde se identifican microorganismos ambientales relacionados con el maíz y el agua, pero la presencia de estos no determina las características del alimento. Las bacterias ácido lácticas tienen una mayor representación en el fermento, destacando la presencia del género *Streptococcus* con una mayor abundancia.

Con respecto al análisis químico proximal se han hecho pocos trabajos donde se hayan llevado a cabo estas técnicas a masas de pozol.

Mex-Álvarez y colaboradores (2016) llevaron a cabo un análisis químico proximal de cinco variedades de maíz las cuales fueron cultivadas en el Estado de Campeche, México, en donde las diferentes variedades de maíz fueron: Morado, rojo, amarillo, blanco criollo y blanco híbrido, en donde se obtuvo que la variedad morada de maíz presenta un mayor porcentaje de humedad (10.43%), a su vez el contenido de grasas

totales más bajo (4.07%), por otro lado, las dos variedades de maíz blanco que se usaron para el estudio presenta el porcentaje de proteínas más alto (9.54% para criolla y 9.93% para maíz híbrido) y también el porcentaje de fibra total más bajo (2.97 para criolla y 2.58 para híbrida). En comparación las muestras de maíz blanco y amarillo presentan similitudes en su análisis químico proximal, a diferencia de la variedad morada de maíz la cual logra diferenciarse mayormente de las demás variedades, por último, la variedad de maíz rojo presenta características a nivel intermedio entre las variedades del maíz morado y el maíz blanco

Ayala (2022), realizó una caracterización de diferentes bebidas tradicionales consumidos en México con el objetivo de desarrollar nuevos sabores para incorporarlos a fórmulas lácteas, para ello realizó diferentes pruebas y una de ellas fue un análisis químico proximal a cinco muestras de pozol encontrando rangos de humedad entre los 64.28 a 69.58 g/100g. Los resultados son en base seca donde reportó a los carbohidratos como el componente mayoritario con rangos de 60.85 a 75.81 g/100 g y los rangos obtenidos de las grasas y proteínas son de 7.93 a 19.69 g/100 g y 9.75 a 11.95 g/100 g respectivamente, los resultados reportados son únicamente de pozol de cacao.

IV. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el pozol como posible alimento funcional respecto a su microbiota y sus componentes nutricionales.

Objetos específicos

- Aislar e identificar los microorganismos asociados a la fermentación del pozol.
- Determinar la composición química proximal de muestras de pozol de diferentes puntos de venta en los mercados de Tuxtla Gutiérrez.
- Destacar las características del pozol como alimento funcional entre los consumidores del producto.

V. Zona de estudio

Tuxtla Gutiérrez es la ciudad capital del estado de Chiapas, ubicado en el sureste mexicano. Está se encuentra en la región del valle central del estado (Domínguez, 2008). presenta un clima tropical húmedo y seco, teniendo un número mayor de precipitaciones al año en la estación de verano, cuenta con poca variación de clima durante todo el año. Siendo 25.4°C la temperatura media anual y ubicándose a 522 m.s.n.m. (SMN, 2021).

La recolección de las diferentes muestras se llevó a cabo en el Mercado Público Municipal “Dr. Rafael Pascasio Gamboa” (No. 1 en el mapa) y en la calle 2da poniente norte (No. 2 en el mapa)



Figura 4. Ubicación geográfica de los diferentes puntos de toma de muestra

VI. Materiales y métodos

6.1 Obtención de las muestras

Se colectaron seis muestras de masa de pozol, tres de pozol blanco y tres de pozol de cacao en seis diferentes puntos de venta dentro del mercado y zonas aledañas, las muestras se colocaron en frascos de cristal previamente esterilizados, la colecta fue realizada a las 12:00 horas del día.

6.2 Elaboración de las muestras para siembra

Se tomaron muestras de alrededor de 60 – 70 g los cuales se colocaron en frascos de cristal estériles y se agregaron 150 ml de agua destilada estéril, siendo colocados en el agitador orbital por un tiempo de 24 horas para homogenizar la muestra y promover el aumento de biomasa de los microorganismos de la muestra, el resto de la muestra se puso a congelar para las demás pruebas que se realizaron.

6.3 Preparación de los medios de cultivo

Se utilizaron diferentes de medios de cultivo en diferentes etapas del trabajo, se preparó agar WL (Wallerstein Laboratory) un medio de cultivo selectivo-diferencial, utilizado para la caracterización morfológica. Para su preparación se pesó 80.26 g, para un litro de medio de cultivo. Se elaboró agar YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa por sus siglas en inglés), suspendiendo 10 g de extracto de levadura, 20 g de dextrosa, 20 g de peptona de caseína y 20 g de agar bacteriológico para obtener un litro de medio de cultivo, este fue utilizado para el aislamiento de las diferentes colonias de levaduras y bacterias.

Se elaboró placas de agar EMB (Eosina y Azul de Metileno), suspendiendo 36 g, para un litro de agua destilada, agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), suspendiendo 68.25 g en un litro de agua destilada y Manitol, suspendiendo en un litro de agua destilada 25 g de manitol, 5 g de extracto de levadura, 3 g de peptona y 15 g de agar, para una mejor clasificación bacteriana. Los medios fueron diluidos en agua destilada, esterilizándolos en el autoclave (EcoShel) a 121°C durante 15 min; se dejó enfriar un momento para su posterior vaciarlo en cajas Petri de 90x15 mm para el agar WL y

60x15 mm para los otros medios de cultivo. (Tortora *et al*, 2007; Verdugo, 2013; Fernández, 2015; Satora *et al*, 2020; Sigma Aldrich, 2021).

6.4 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó describiendo forma, textura, elevación, color, transparencia, brillo, características del borde, diferencia al reverso, superficie y tamaño de cada morfología diferente que haya crecido en las placas de agar WL (Yarrow, 1998).

6.5 Métodos moleculares de identificación

Se realizaron PCR-RFLP a los aislados obtenidos de levaduras de las diferentes muestras de pozol

6.5.1 Amplificación directa

Se llevaron a cabo PCR-RFLP en donde se emplearon tubos de 125 μ L, donde en cada tubo se manejó un volumen de 25 μ L. Cada uno contenía 12.5 μ L GoTaq y 10.5 μ L de agua destilada estéril, se amplificaron las regiones ITS-5.8S con los cebadores universales, siendo ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') con 1 μ L a una concentración de 10 μ M. La obtención del inóculo se hizo por picadura a una colonia fresca de cada cepa, la picadura se hizo con un asa bacteriológica previamente esterilizada y se suspendió en cada tubo de donde se realizó la reacción. Se incubaron en el termociclador de acuerdo a Esteve-Zarzoso *et al* (2001), una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, continuando con 35 ciclos con las siguientes condiciones; una desnaturalización a 94°C durante un minuto, se alinearán a 55°C por dos minutos y una extensión a 72°C por un minuto, para terminar con otra extensión final a 72°C durante 10 minutos y si es necesario se almacenó a 4°C (Verdugo-Valdez, 2013).

Posterior a ello, las muestras que se lograron amplificar fueron visualizadas por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 60 volts por un tiempo de 45 minutos, finalizando ese tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) al 1% durante 30 minutos y se visualizó en un transiluminador (Enduro GDS) (López-Gurua, 2019).

6.5.2 Digestión enzimática

Con las muestras obtenidas de la amplificación se sometieron a una digestión por medio de las enzimas de restricción HaeIII e Hinfl, para esto se hizo una solución madre en donde contenga 1 μ L de enzima de restricción, 2.5 μ L de buffer de enzima 10X y 15.5 μ L de agua libre de proteasas; de la mezcla madre se tomó 19 μ L añadiendo posteriormente 6 μ L de la muestra amplificada. La digestión se llevó a cabo en el termociclador a 37°C por 2 horas.

Los fragmentos fueron analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Para la tinción y visualización se llevó a cabo de la misma forma a la mencionada anteriormente (López-Gurgua, 2019).

6.6 Métodos tradicionales de identificación

Se llevaron a cabo diferentes pruebas bioquímicas, eligiendo la prueba de TSI, citrato de Simmons, MIO, así también la prueba de catalasa para poder clasificar a los diferentes crecimientos bacterianos obtenidos.

6.6.1 Prueba de catalasa

Se llevó a cabo la prueba la catalasa, para esto se colocó una pequeña muestra del crecimiento bacteriano en un portaobjetos y con ayuda de un gotero se tomó un poco de peróxido de hidrógeno al 3% (H_2O_2), al momento de la formación de burbujas se considera como un resultado positivo, ya que de lo contrario al no haber formación de burbujas la prueba de considera negativa (Reiner, 2010; Torrens y Martín, 2012; Aryal, 2022).

6.6.2 Prueba de fermentación de azúcares y producción de H_2S

Se prepararon tubos 16x100 mm con agar TSI, elaborando los medios con agua destilada, pesando 62.5 g por litro de agua esterilizándolos a 121°C por 15 minutos en el autoclave (Ecoshel), se obtuvo muestra bacteriana de colonias frescas, tomando la muestra con un asa bacteriológica estéril y se realizó la siembra por picadura en los diferentes tubos, estos se colocaron en la incubadora por 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se observaron los resultados (MacFaddin, 2003; Fernández *et al*, 2010).

6.6.3 Prueba de citrato

Se prepararon tubos de 16x100 mm con agar Citrato de Simmons, utilizando agua destilada para realizarlos, pesando 24.2 g por litro de agua, fueron sometidos a un proceso de esterilizado a 121°C por 15 minutos en el autoclave (Ecoshel), culminando el proceso de esterilizado los tubos fueron acostados de forma que el medio tomará pico de flauta. La inoculación fue por estriado con cepas frescas utilizando un asa bacteriológica estéril, incubando por 36 horas a 37°C (MacFaddin, 2003; Fernández *et al*, 2010).

6.6.4 Prueba de Movilidad, indol, ornitina descarboxilasa

Se elaboraron tubos de 16x100 mm con medio MIO, para su preparación se utilizó agua destilada, pesando 31 g por un litro de agua, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos en el autoclave (Ecoshel), terminado el proceso de esterilización de dejaron gelificar de forma vertical, para la siembra se utilizaron colonias frescas, inoculando por picadura con un asa bacteriológica estéril, incubando por 36 horas a 37°C (MacFaddin, 2003; Fernández *et al*, 2010).

6.6.5 Tinción de Gram

Se llevaron a cabo tinciones de Gram para clasificar las bacterias en Gram-positivas o Gram-negativas. Para esto se hizo un frotis en el que se fijarán la muestra en un portaobjetos con la ayuda del calor de la llama de un mechero bunsen, posterior a ello se llevó a cabo la tinción con los siguientes colorantes, primero se le colocó cristal violeta y se dejó por un minuto, posterior a ello se lavó con agua hasta retirar el exceso de colorante, luego se agregó una solución de yodo-lugol para poder fijar el colorante y nuevamente se dejó por un minuto, pasado el minuto se lavó con abundante agua, a continuación se le agregó alcohol-acetona esto para generar una decoloración a las bacterias Gram-negativas esto por 15 segundos y por último, se le agregó safranina por un tiempo de dos minutos esto para lograr teñir las bacterias Gram-negativas. Para la visualización en el microscopio se hizo con el objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión y se observó la tinción (Tortora *et al*, 2007; Madigan *et al*, 2015).

6.7 Conservación de cepas bacterianas y levaduriformes

Se realizaron siembras en agar YPD de las cepas que se querían conservar, estas fueron colocadas a incubación por 48 hrs máximo a 28 °C para levaduras y 37 °C para bacterias. Posterior a tener un crecimiento en las placas de agar, se agregó 2 ml de agua destilada estéril en cada placa dentro de una zona estéril proporcionado por mecheros bunsen, se homogeneizó el agua presente en la placa con el crecimiento del microorganismo, recuperando 500 µl los cuales fueron depositados en tubos eppendorf estériles de 1 ml que contienen 500 µl glicerol esterilizado días antes. Recuperando 3 tubos eppendorf con 500 µl de glicerol y 500 µl de muestra por cada placa sembrada, estos tubos fueron colocados a congelación a -4 °C.

6.8 Análisis químico proximal

Se hizo un análisis químico proximal de las muestras en el cual se determinará humedad, ceniza, grasas, proteína, fibra cruda y carbohidratos de las muestras.

6.8.1 Determinación de humedad

Se colocaron a deshidratar las muestras, esto se hizo en un horno de secado en tapas de cajas de Petri que previamente se colocaron a peso constante, para eso se colocaron por un periodo de 12 horas a una temperatura entre los 50 y 60 °C dentro del horno de secado, posteriormente las tapas fueron colocadas en un desecador para enfriar y pesarlas, se colocó 5 g de muestra en las tapas de caja Petri extendiéndose por la superficie para ser nuevamente introducidos en el horno de secado a una temperatura de entre 50 - 60 °C por un periodo de 12 a 24 horas, concluyendo el tiempo se colocaron en el desecador para enfriar las placas, por último, se pesaron para calcular el contenido de humedad de acuerdo a la pérdida de peso de las muestras. Esto se realizó de acuerdo a la técnica de AOAC 2015, 934.01 (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruiz-Albores, 2019).

6.8.2 Determinación de ceniza

Se pusieron crisoles a peso constante por medio de una estufa de secado, esto a una temperatura de entre 50 - 60 °C, después de haber llegado al peso constante. Se colocaron 5 g de la muestra seca previamente pulverizada en los crisoles. Estos se

colocaron en una parrilla de calentamiento hasta que se empiece a liberar humo, indicando que se están calcinando las muestras. Pasado 30 – 45 min los crisoles fueron introducidos en la mufla a una temperatura entre 500 - 600 °C, esto hasta la obtención de las cenizas presentando una tonalidad entre blanca y gris, después de haber obtenido esas tonalidades fueron retirados de la mufla con ayuda de unas pinzas para crisol, colocándolas en la estufa de secado por un periodo de 10 minutos, concluyendo el tiempo se pesaron los crisoles previamente enfriados. Esto se realizó de acuerdo a la técnica de AOAC 2015, 942.05 (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruíz-Albores, 2019).

6.8.3 Determinación de grasas

Para la determinación de grasas se realizó por medio del método de Soxhlet, se llevaron a peso constante matraces bola fondo plano por medio de la estufa de secado, teniéndolos a peso constante la colocó 5 g de muestra seca en bolsas pequeñas de papel filtro para posterior fueran introducidos en la trampa de extracción Soxhlet, en el matraz se colocó 170 ml de hexano y se revisó que los condensadores se encuentre conectado a la corriente de agua para que se lograra iniciar la extracción la cual tiene un promedio de duración de 16 horas. Transcurrido el tiempo se extrajo los envueltos de papel filtro de las trampas y fueron llevadas a una estufa de secado en donde se evaporó el solvente restante, por otra parte, los matraces que es donde se encontraba la muestra de grasa se le evaporó el solvente presente con ayuda del rotaevaporador y el residuo resultante se evaporó en la estufa de secado, se llevó nuevamente a peso constante y se pesó. Esto se realizó de acuerdo a la técnica de AOAC 2015, 954.02 (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruíz-Albores, 2019).

6.8.4 Determinación de proteína

Se llevó a cabo el método de micro-kjeldahl, este método se divide en tres partes. La primera parte es la digestión de la muestra en donde se pesó 0.05 g de muestra seca y libre de grasas, colocando en el matraz micro-kjeldahl en donde también se agregó 2 g de catalizador del micro-kjeldahl (1.9 g de K₂SO₄ y 40 mg de HgO), 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄), perlas de ebullición y se colocó en el digestor por un periodo no mayor a una hora y media.

La segunda parte de este método es la destilación en donde la muestra se lavó con agua destilada 6 veces agregándolo todo en el matraz de destilación, también agregando 10 ml de solución sosa-tiosulfato, 5 ml de ácido bórico (H_3BO_3) al 5% y tres gotas del indicador micro-kjeldahl (solución de rojo de metilo – verde de bromocresol) en un matraz Erlenmeyer donde se colectó 50 ml de la destilación.

Por último, se llevó a cabo una titulación del destilado con ácido clorhídrico (HCl) al 0.05 N colocando el ácido en una bureta de 25 ml, mezclando lo previamente destilado con el ácido por goteo, hasta generar el viraje de la solución. Esto se realizó de acuerdo a la técnica de AOAC 2015, 2001.11 (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruíz-Albores, 2019).

6.8.5 Determinación de fibra cruda

Se puso en peso constante trozos de papel filtro, pesando un gramo de cada muestra seca sobre el papel filtro a peso constante, transfiriéndola a un vaso Berzelius en donde a su vez se le agregó 30 ml del reactivo Scharrer-Kürschner (S-K, 50 g de ácido tricloroacético en 1 – 1.5 L de ácido acético al 70%, adicionar con 124 ml de ácido nítrico al 65% y densidad de 1.4, completar con 2 L de ácido acético al 70%). Se colocó en el condensador de fibra cruda hasta alcanzar el punto de ebullición, donde se mantuvo por 30 minutos. Terminando los 30 minutos se realizó un filtrado al vacío, el residuo que quedaba en el vaso Berzelius fue lavado con agua caliente y se agregó 15 ml acetona sobre el papel filtro, por último, se dejó secar el papel filtro con la fibra pegada a él, se pesó el papel filtro pasadas 24 hrs en la balanza analítica. Esto se realizó de acuerdo a la técnica de AOAC 2015, 962.09 (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruíz-Albores, 2019).

6.8.6 Determinación de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos totales se hizo una resta del 100% del resultado del porcentaje de humedad, ceniza, grasas, proteínas y fibra cruda (Gómez-Flores *et al*, 2019; Ruíz-Albores, 2019).

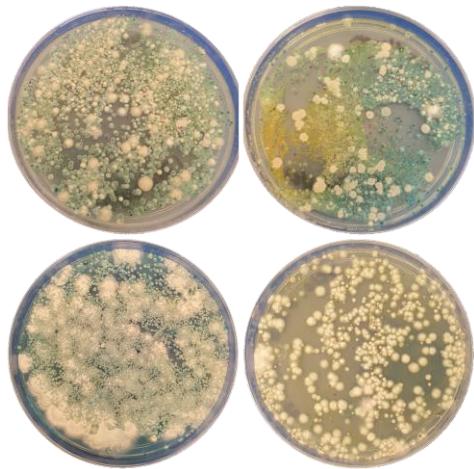
6.9 Análisis estadísticos

Se hizo una base de datos en Microsoft Excel con los caracteres fisiológicos obtenidos de la caracterización, las UFC de cada grupo de microorganismos y el resultado obtenido en el análisis químico proximal. Se aplicó un análisis de conglomerados en el software PAST (4.12b) con los caracteres fisiológicos para agrupar a los diferentes crecimientos microbianos de acuerdo a sus características morfológicas vistas en caja, obteniendo un dendograma que permitió identificar grupos morfológicamente similares. Para reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) por medio del software R y RStudio (versión 4.4.2) utilizando los datos de las UFC y lo obtenido en el análisis químico proximal. Por último, para evaluar la significancia entre los grupos identificados en la PCA se realizó un análisis de varianza multivariado por permutaciones (PERMANOVA, por sus siglas en inglés), basado en la matriz de disimilitud que se calculó con él por medio del índice de Bray-Curtis con un total de 999 permutaciones con el fin de estimar la significancia estadística entre las diferentes muestras, por medio del software R y RStudio (versión 4.4.2).

VII. Resultados

7.1 Caracterización morfológica de la microbiota

En la primera etapa del trabajo se realizó la siembra en placas de agar WL de seis



muestras de pozol, donde tres muestras pertenecían a pozol blanco y las otras tres a pozol de cacao (Fig. 5), se obtuvo un total de 81 tipos de morfologías de un total de 5977 UFC, estas repartidas en 28 grupos levaduriformes distribuidos en 13 especies y 15 grupos bacterianos, comprendido a bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, bacterias mesófilas aerobias y enterobacterias, todo esto repartido en 18 cajas de agar WL (Cuadro 1). Se hicieron dos dendogramas utilizando los caracteres morfológicos obtenidos con el fin de agrupas los diferentes crecimientos microbianos, obteniendo 15 morfologías diferentes y

Figura 5. Crecimiento microbiano obtenido en placas de agar WL posterior a 24 h de hacer la siembra.

38 morfologías diferentes para las levaduras (Fig. 6A – 6B).

Cuadro. 1. Unidades formadores de colonias (UFC) obtenidas de los diferentes crecimientos microbianos de cada muestra de pozol.

Muestras	UFC Levaduras	UFC BAL	UFC BAA	UFC Enterobacterias	UFC BMA
Muestra 1 – Pozol blanco	1×10^3	0	0	0	0
Muestra 2 – Pozol de cacao	1.012×10^3	35	0	4.05×10^2	1.56×10^2
Muestra 3 – Pozol de cacao	1.353×10^3	0	0	0	0
Muestra 4 – Pozol blanco	1.069×10^3	12	0	1×10^2	4.48×10^2
Muestra 5 – Pozol de cacao	8.28×10^2	0	0	0	1.76×10^2
Muestra 6 – Pozol blanco	2.97×10^2	20	41	0	18

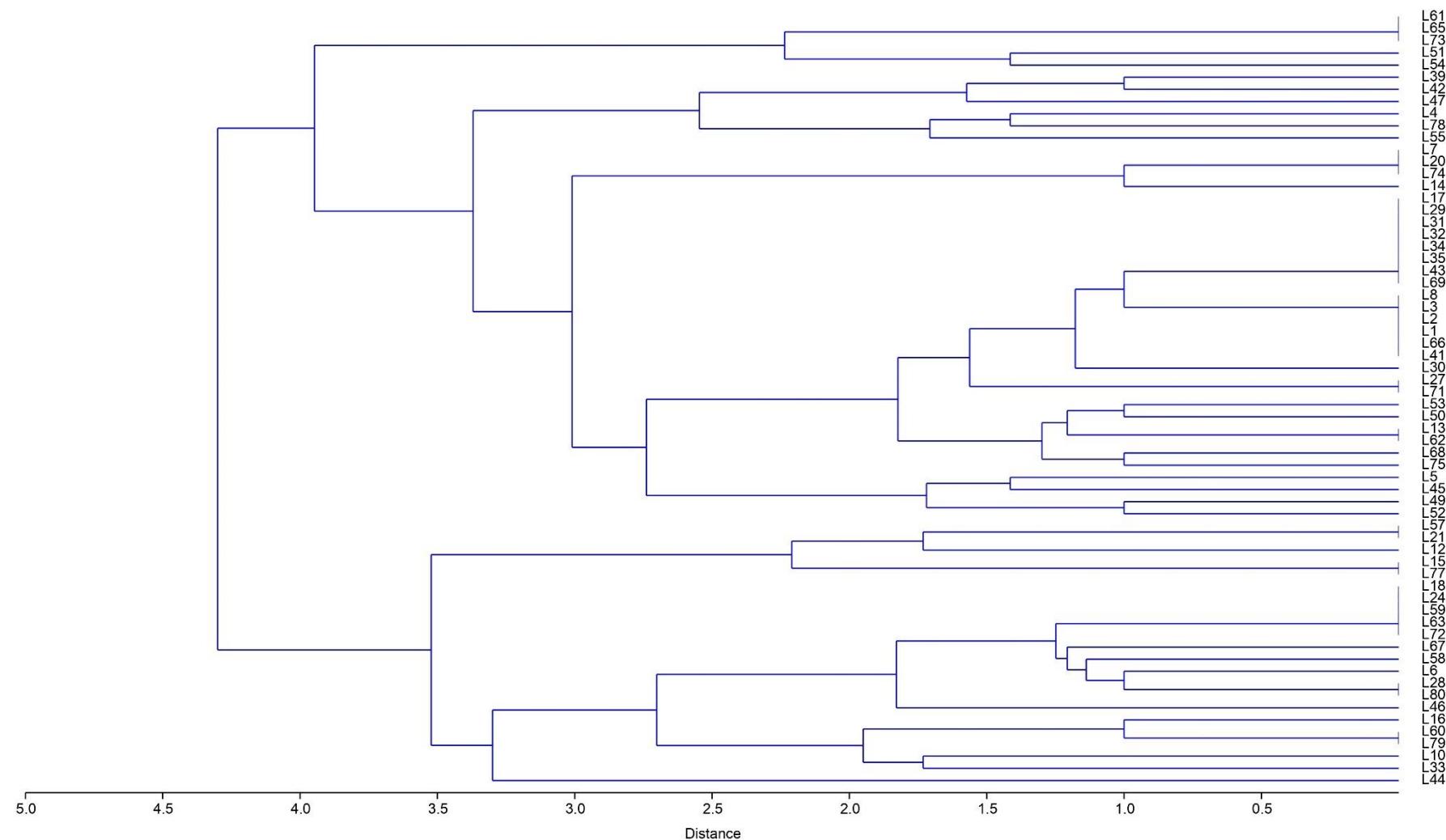


Figura 6A. Dendrograma de levaduras aisladas del pozol. Se observa el agrupamiento de los 64 aislamientos obtenidos, con base a los caracteres morfológicos observados en agar WL, obteniendo un total de 38 morfologías diferentes divididos en dos ramificaciones principales, siendo la forma y el color de las colonias las que dan esta ramificación y las unidades cercanas nos indican similitudes fenotípicas.

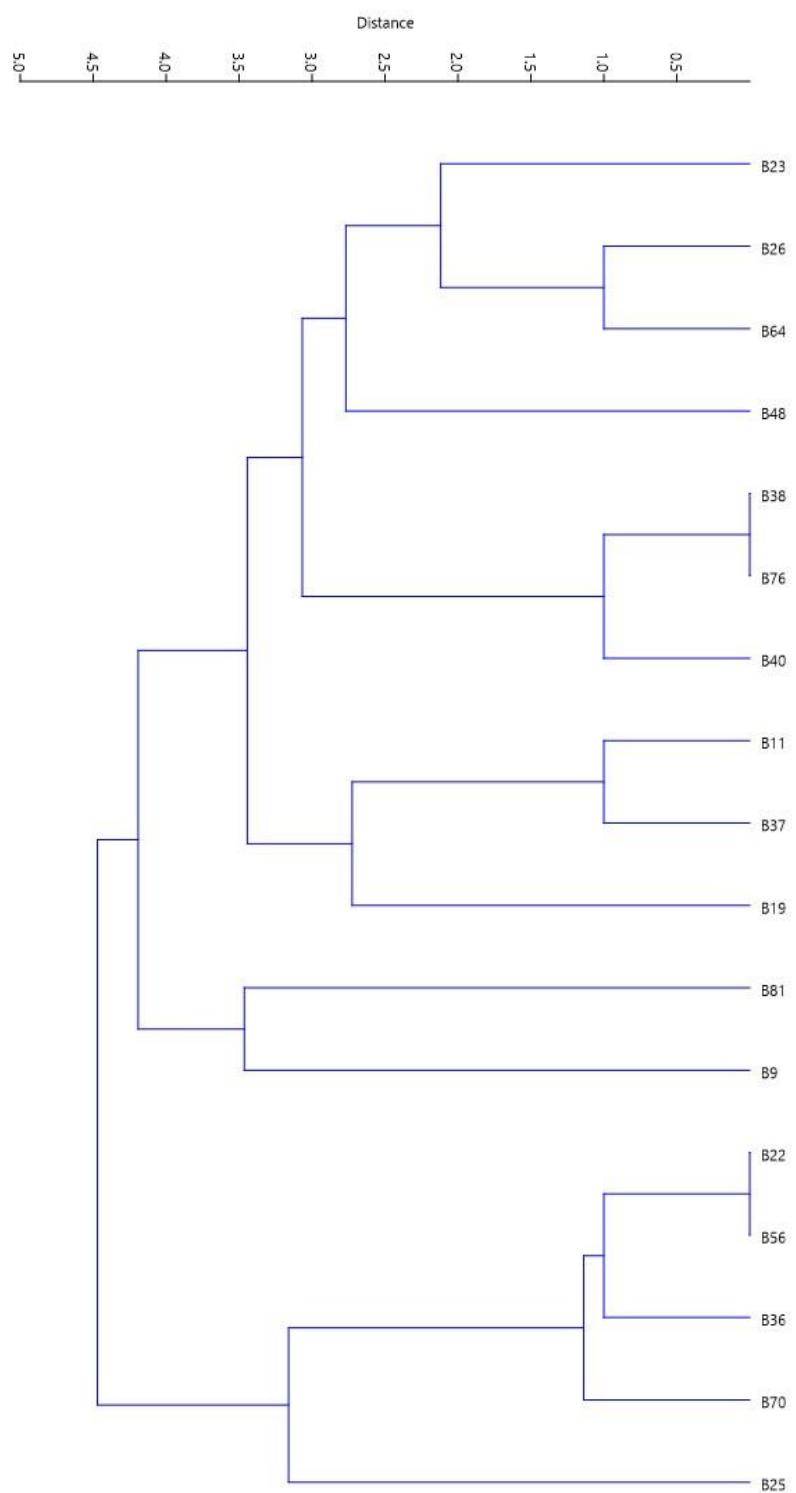


Figura 6B. Dendograma de bacterias aisladas del pozol. Se observa el agrupamiento de los 17 aislamientos obtenidos, este se hizo con base a los caracteres morfológicos observados en agar WL, obteniendo un total de 15 morfologías diferentes divididos en dos ramificaciones principales, siendo el color del borde de las colonias la que da esta ramificación y las unidades cercanas nos indican similitudes fenotípicas.

7.2 Identificación de bacterias

Las diferentes cepas bacterianas posterior a ser aisladas en agar YPD, se resembraron en medios selectivos-diferenciales, utilizando agar EMB para conocer la presencia de coliformes (Fig. 7A), agar MRS para conocer la presencia de bacterias ácido lácticas, y agar manitol para conocer la presencia de bacterias de ácido acético (Fig. 4A - 4B). obteniendo crecimiento en los tres medios, cuatro cepas crecieron en agar EMB únicamente, para agar MRS crecimiento 11 cepas y para el agar manitol 9 cepas crecieron en el medio, donde algunas cepas bacterias crecieron en ambos medios. Se practicaron tinciones de Gram a las 17 cepas, dando como resultado 4 cepas fueron Gram positivas (Fig. 7D), y los 13 restantes fueron Gram negativas (Fig. 7C) (Cuadro 2).

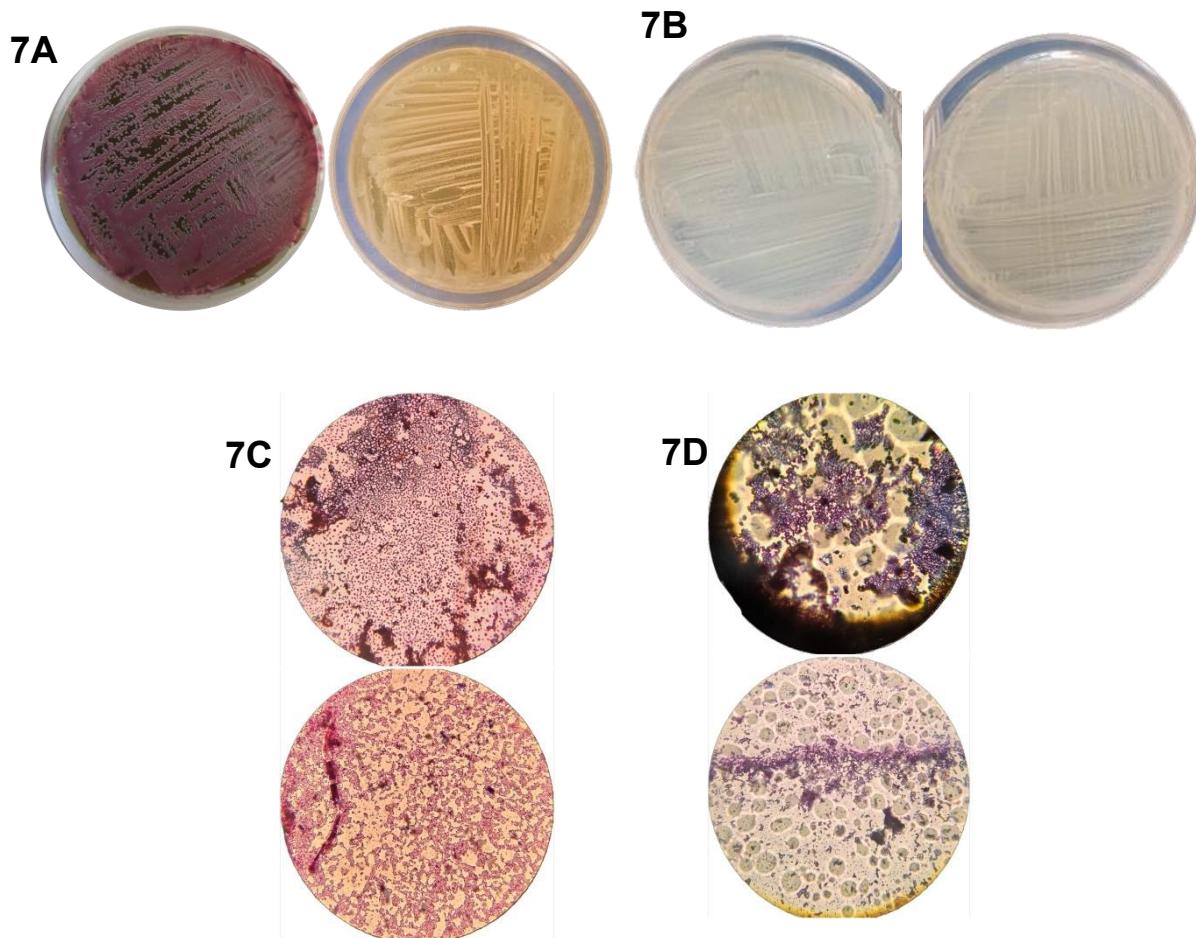


Figura 7A. Crecimiento obtenido en placas de agar MRS y eosina azul de metíleno (EMB).
Figura 7B. Crecimiento obtenido en placas de agar manitol para BAL. Figura 7C. Tinción de Gram de bacterias Gram negativas. 7D. Tinción de Gram de bacterias Gram positivas.

7.2.1 Caracterización bioquímica

Las 17 cepas bacterianas fueron sometidas a pruebas bioquímicas, iniciando con la prueba de catalasa (Cuadro 2), dando un resultado positivo 5 cepas y las otras 12 un resultado negativo.

Para poder identificar mejor las bacterias aisladas del agar WL se practicaron diferentes pruebas bioquímicas utilizando el agar hierro-triple azúcar (TSI), para conocer si las cepas pueden utilizar diferentes azúcares como fuentes de carbono y si al momento de fermentar esos azúcares presentaban una producción de gas y de ácido sulfídrico destacando únicamente a las cepas 9, 11, 19 y 37 (Fig. 8A), con una producción de gas y la fermentación de los tres azúcares presente en el medio, para el resto de las cepas se observó únicamente la fermentación de la glucosa presente, no hubo una producción de gas o de ácido sulfídrico (Fig. 8B).

También se utilizó medio MIO para una caracterización de la movilidad, producción de indol y actividad de la ornitina descarboxilasa, las cepas 23, 26, 40 y 56 dieron un resultado negativo en la prueba de movilidad, el resto de las bacterias el resultado visto fue positivo (Fig. 8C), la cepa 37 fue la única en producir de indol, el resto dio un resultado negativo (Fig. 8D), únicamente las 70 y 81 presentaron un resultado negativo en la presencia de ornitina descarboxilasa, el resto de las cepas bacterianas dieron un resultado positivo.

Por último, el uso de agar Citrato de Simmons (Fig. 8E) para conocer las cepas capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono siendo nuevamente las cepas 9, 11, 19 y 37 las únicas en dar un resultado positivo a la prueba, el resto de las cepas bacterianas dieron un resultado negativo, con estos resultados se hizo un dendograma para ver cómo se agrupaban las bacterias y poderlas clasificar como bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas, bacterias mesófilas aerobias y enterobacterias (Fig. 9) (Cuadro 2).

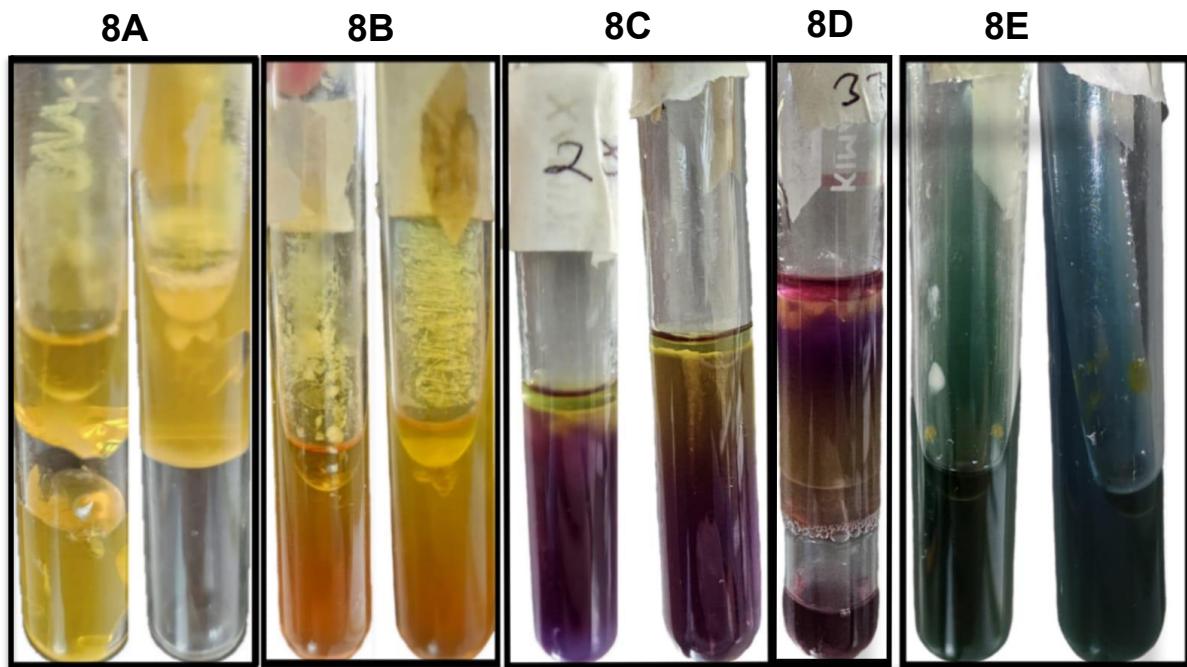


Figura 8A. Resultado de prueba TSI. Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa y producción de gas, sin producción de H_2S . Figura 8B. Resultado de prueba TSI. Fermentación de glucosa, sin producción de gas y sin producción de H_2S . Figura 8C. Resultado de prueba MIO. Con movilidad negativa, prueba de indol negativa y ornitina positiva. Figura 8D. Resultado de Prueba MIO. Movilidad positiva, producción de indol positivo en cepa 37 y las demás negativa y ornitina positiva, Figura 8E. Resultado de prueba de citrato de Simmons. Tubo con medio verde resultado negativo, tubo con crecimiento y medio de color azul positivo al uso de citrato como única fuente de carbono.

Cuadro 2. Perfil bioquímico de las diferentes cepas bacterianas aisladas

No. de cepa	9	11	19	22	23	25	26	36	37	38	40	48	56	64	70	76	81
	Azúcar	X	X	X	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	*	*
Agar TSI	Gas	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido sulfídrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio MIO	Movilidad	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Ornитина descarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	C. de Simmons	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Tinción de Gram	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	Prueba de catalasa	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Tipos de bacterias	Ent	Ent	Ent	BMA	BAL	BMA	BAL	BMA	ENT	BMA	BAL	BMA	BAL	BMA	BAA	BMA

X indica cepas fermentadoras de glucosa, lactosa y/o sacarosa; * Indica fermentación únicamente de glucosa;

+ Resultado positivo; - Resultado negativo; Ent: Enterobacterias; BAL: Bacterias ácido lácticas; BAA: Bacterias ácido acéticas; BMA: Bacterias mesófilas aerobias

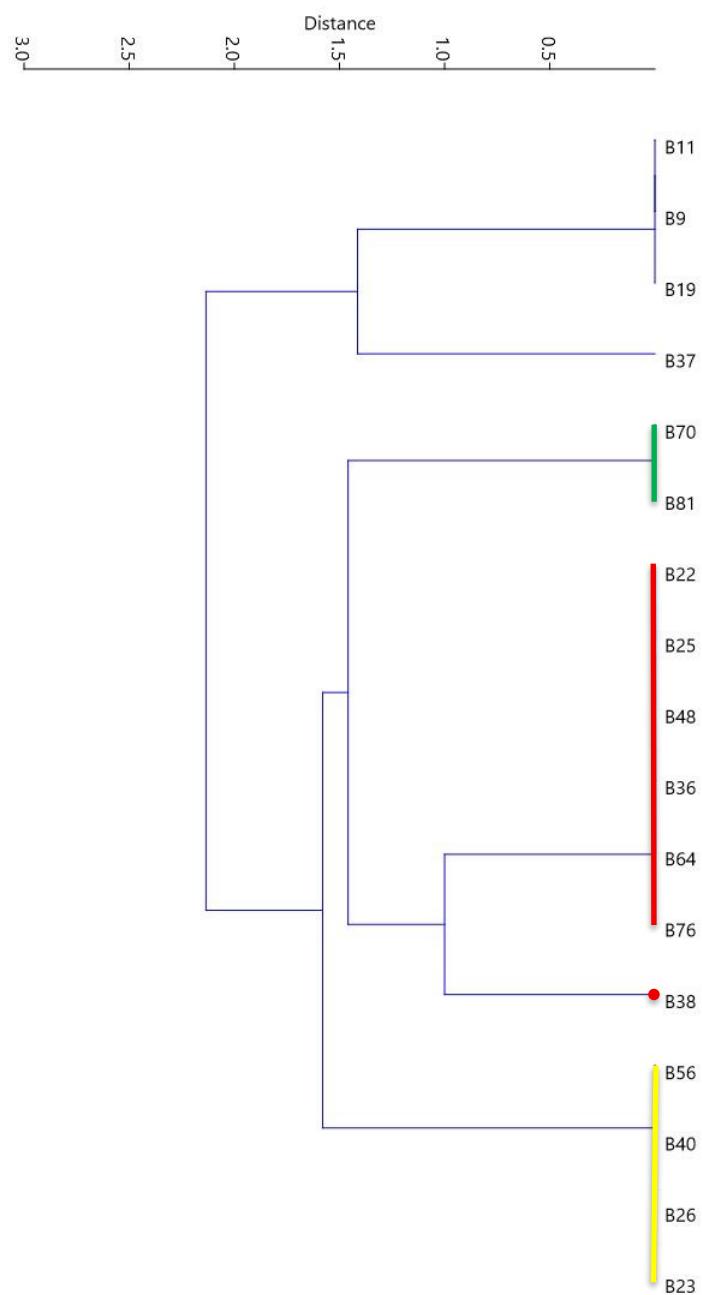


Figura 9. Dendograma de bacterias construido con los resultados obtenidos de la identificación bacteriana. Los agrupamientos observados de color azul corresponden a Enterobacterias, el color verde son BAA, el color rojo son BMA y el color amarillo BAA

7.3 Identificación de levaduras

Se realizaron amplificaciones a las diferentes cepas de levaduras previamente aisladas, obteniendo así el ADNr a partir del cual se llevó a cabo la técnica de RFLP obteniendo un total de 13 perfiles de bandas diferentes en geles de agarosa al 3% (Fig. 10 – 15) están repartidas en 29 pruebas. La identificación se obtuvo de forma manual estimando los pares de bases de cada perfil de bandas y estas fueron comparadas con la base de datos de Yeast ID (Cuadro 3).

Las cepas de levaduras identificadas están en el cuadro 3 destacando que la especie más abundante fue *Candida tropicalis* entre las diferentes muestras de pozol.



Figura 10. Patrón de bandas número 1, 2, 3 y 7 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas 4 y 6 corresponden a *Scheffersomyces spartinae* y patrón de bandas 5 corresponde a *Candida solani*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb



Figura 11. Patrón de bandas número 1, 2 y 3 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas 4, 5 y 6 corresponden a *Cyberlindnera euphorbiiphila*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

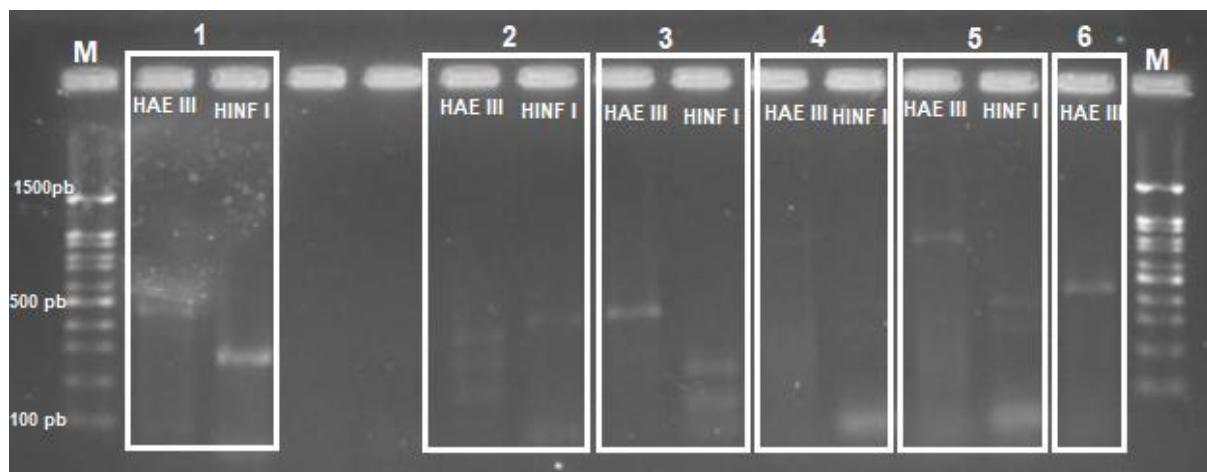


Figura 12. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida albicans*, patrón de bandas número 2 corresponden a *Saccharomyces servazzii*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida tropicalis*, patrón de bandas número 4 y 5 corresponden a *Schizosaccharomyces pombe*, y patrón de bandas número 6 corresponde a *Candida maltosa*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

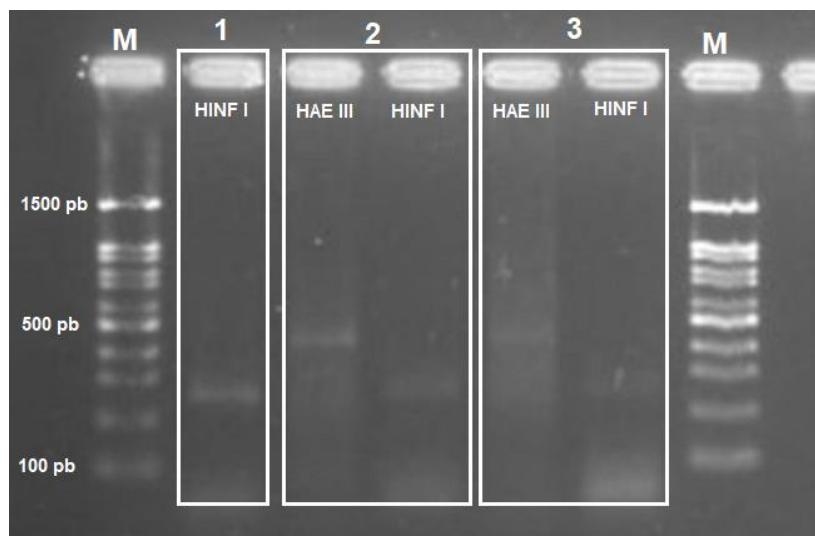


Figura 13. Patrón de bandas número 1, 2 y 3 corresponden a *Candida maltosa*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

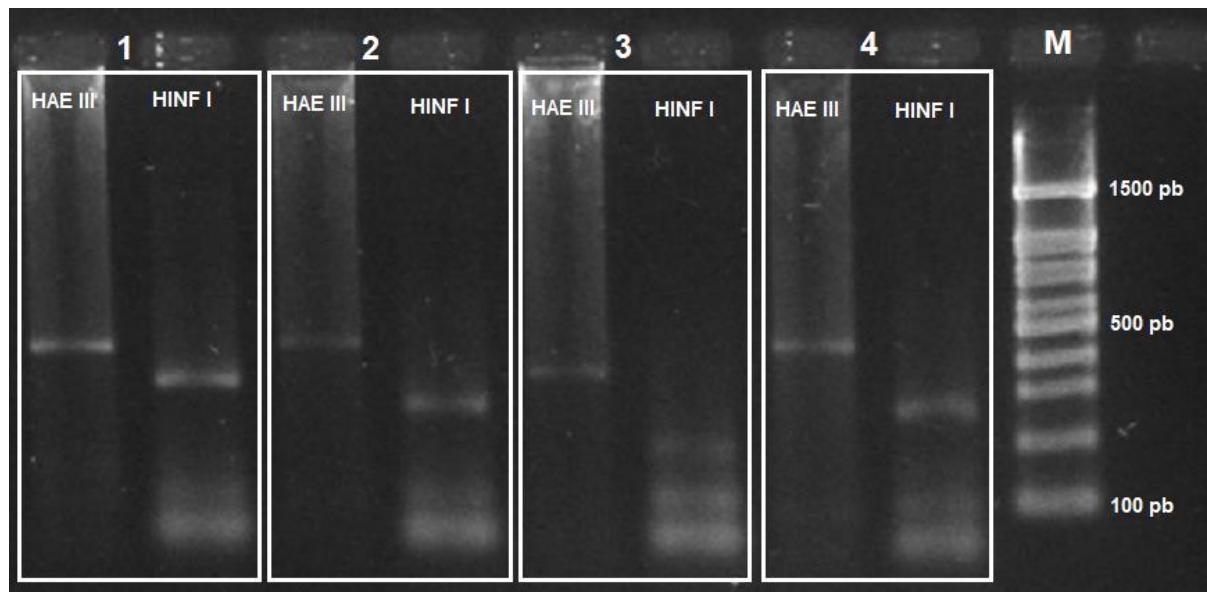


Figura 14. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida tropicalis*, patrón de bandas número 2 y 4 corresponden a *Candida stellata*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida heamulonis*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

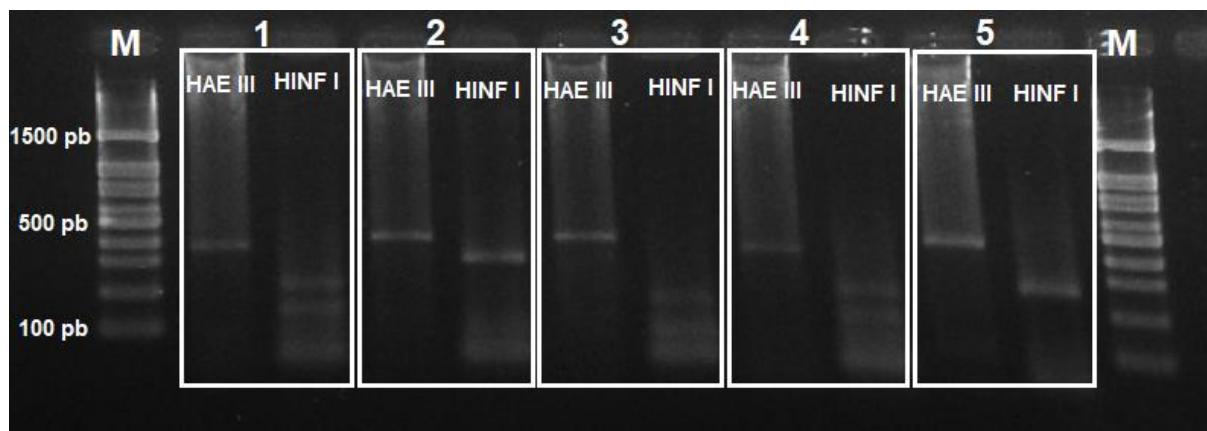


Figura 15. Patrón de bandas número 1 corresponden a *Candida apicola*, patrón de bandas número 2 corresponden a *Candida auringiensis*, patrón de bandas número 3 corresponde a *Candida heamulonis*, patrón de bandas número 4 corresponden a *Candida apicola*, y patrón de bandas número 5 corresponde a *Candida sequanensis*, posterior a una digestión de la región ITS 5.8S previamente amplificada, usando las enzimas de restricción HAE III y HINF I corriendo en un gel de agarosa al 3%; M: marcador de peso molecular 1500 pb.

Cuadro 3. Levaduras identificadas y su longitud de pares de base (pb) de la región ITS 5.8S amplificados por PCR y una digestión con las enzimas de restricción HAE III y HINF I, los pb obtenidos fueron comparados con la base de datos de Yeast ID.

Especies	No de cepas	Pb obtenidos		Autor de referencia
		HAE III	HINF I	
<i>Candida tropicalis</i>	1,2,3,4,5,8,16,17, 21,28,29,31,32, 34,35,43,57,69,80	450	280	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida albicans</i>	45	465	280	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida apicola</i>	46,55	400	150, 250	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida auringiensis</i>	52	450	100, 330	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida haemulonis</i>	33,54	400	90, 180	Meyer y Yarrow, 1978
<i>Candida sequanensis</i>	75	430	180	De Los Llanos <i>et al,</i> 2004
<i>Candida stellata</i>	30,44	470	100, 250	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida maltosa</i>	41,59,63,65,66,72 73	550	270	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Candida solani</i>	14	600	285	De Los Llanos <i>et al,</i> 2004
<i>Saccharomyces servazzii</i>	50	180, 250, 350	100, 420	Fernández-Espinar <i>et al,</i> 2000
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	60,61,79	970	410, 500	Esteve-Zarzoso <i>et al,</i> 1999
<i>Cyberlindnera euphorbiiphila</i>	18,24,27,71	420	320	Villa-Carbajal <i>et al,</i> 2006
<i>Scheffersomyces spartinae</i>	12,15,77	150, 400	290	Villa-Carbajal <i>et al,</i> 2006

7.4 Análisis químico proximal del pozol

Los resultados del análisis químico proximal se muestran en el cuadro 4; reportando el valor de cada parámetro evaluado a 6 muestras de masa de pozol en base seca, donde 3 muestras fueron de pozol de cacao y 3 de pozol blanco. Los rangos de humedad oscilan entre el 61.12 - 67.83 %, el pozol de cacao presentó porcentajes más altos en grasas y proteínas dando como resultado 9.75, 16.70, 7.25% y 10.15, 8.88, 7.56% respectivamente, por otro lado, el pozol blanco presentó los porcentajes más altos en fibra cruda dando como resultado 13.27, 7.87, 7.55%.

Cuadro 4. Composición proximal de masas de pozol blanco y de cacao en base seca

Parámetros evaluados de acuerdo a su composición química proximal											
	Humedad (%)		Ceniza (%)		Grasas (%)		Proteínas (%)		Fibra cruda (%)		Carbohidratos (%)
Muestra 1 – Pozol blanco	61.12	±0.38	1.12	±0.10	2.96	±0.10	6.95	±0.28	13.27	±0.40	75.72
Muestra 2 – Pozol de cacao	67.83	±0.34	1.28	±0.10	9.74	±0.31	10.15	±0.26	5.76	±0.33	73.08
Muestra 3 - Pozol de cacao	65.31	±0.42	1.5	±0.20	16.7	±0.20	8.88	±0.23	6.94	±0.29	65.99
Muestra 4 – Pozol blanco	65.49	±0.16	1.22	±0.17	3.51	±0.14	7.98	±0.32	7.87	±0.34	79.44
Muestra 5 – Pozol blanco	63.42	±0.11	1.31	±0.24	7.25	±0.06	7.57	±0.42	6.3	±0.38	77.59
Muestra 6 – Pozol de cacao	62.35	±0.22	2.12	±0.08	4.56	±0.07	5.48	±0.46	7.55	±0.16	80.33

A su vez se calcularon los porcentajes en base húmeda, donde los porcentajes de humedad son los mismos, nuevamente los porcentajes más altos para el pozol de cacao fueron grasas y proteínas 3.13, 5.79 y 2.64% y 3.26, 3.07, 2.76 respectivamente y la fibra cruda presentó porcentajes más altos en el pozol blanco 5.15, 2.71 y 2.83%, con estos resultados se calcularon las kilocalorías de las diferentes masas de pozol utilizadas, estas oscilan entre 131 a 156 kcal (Cuadro 5).

Cuadro 5. Composición proximal de masas de pozol blanco y de cacao en base húmeda y Kcal

Parámetros evaluados de acuerdo a su composición química proximal												
	Humedad (%)		Ceniza (%)		Grasas (%)		Proteínas (%)		Fibra cruda (%)		Carbohidratos (%)	Kcal / 100 g
Muestra 1 – Pozol blanco	61.12	±0.38	0.44	±0.10	1.15	±0.10	2.71	±0.28	5.16	±0.40	29.45	139
Muestra 2 – Pozol de cacao	67.83	±0.34	0.41	±0.10	3.14	±0.31	3.27	±0.26	1.86	±0.33	23.52	135
Muestra 3 - Pozol de cacao	65.31	±0.42	0.52	±0.20	5.8	±0.20	3.08	±0.23	2.41	±0.29	22.9	156
Muestra 4 – Pozol blanco	65.49	±0.16	0.43	±0.17	1.13	±0.14	2.76	±0.32	2.72	±0.34	27.42	131
Muestra 5 – Pozol blanco	63.42	±0.11	0.49	±0.24	2.65	±0.06	2.77	±0.42	2.31	±0.38	28.39	148
Muestra 6 – Pozol de cacao	62.35	±0.22	0.8	±0.08	1.72	±0.07	2.07	±0.46	2.84	±0.16	30.24	153

7.5 Análisis de componentes principales (PCA) y PERMANOVA

Se hizo una PCA a partir de variables microbiológicas (UFC de levaduras y bacterias) y análisis químico proximal. Entre los dos primeros componentes se logra explicar el 72% de la varianza total (Fig. 16). El contenido de grasas, proteínas y las UFC de levaduras son las variables que contribuyen a la separación entre muestras, siendo estas las que se encuentran asociadas al pozol de cacao, mientras que el contenido de carbohidratos, cenizas y UFC de BAL y BMA están más relacionadas a las muestras de pozol blanco.

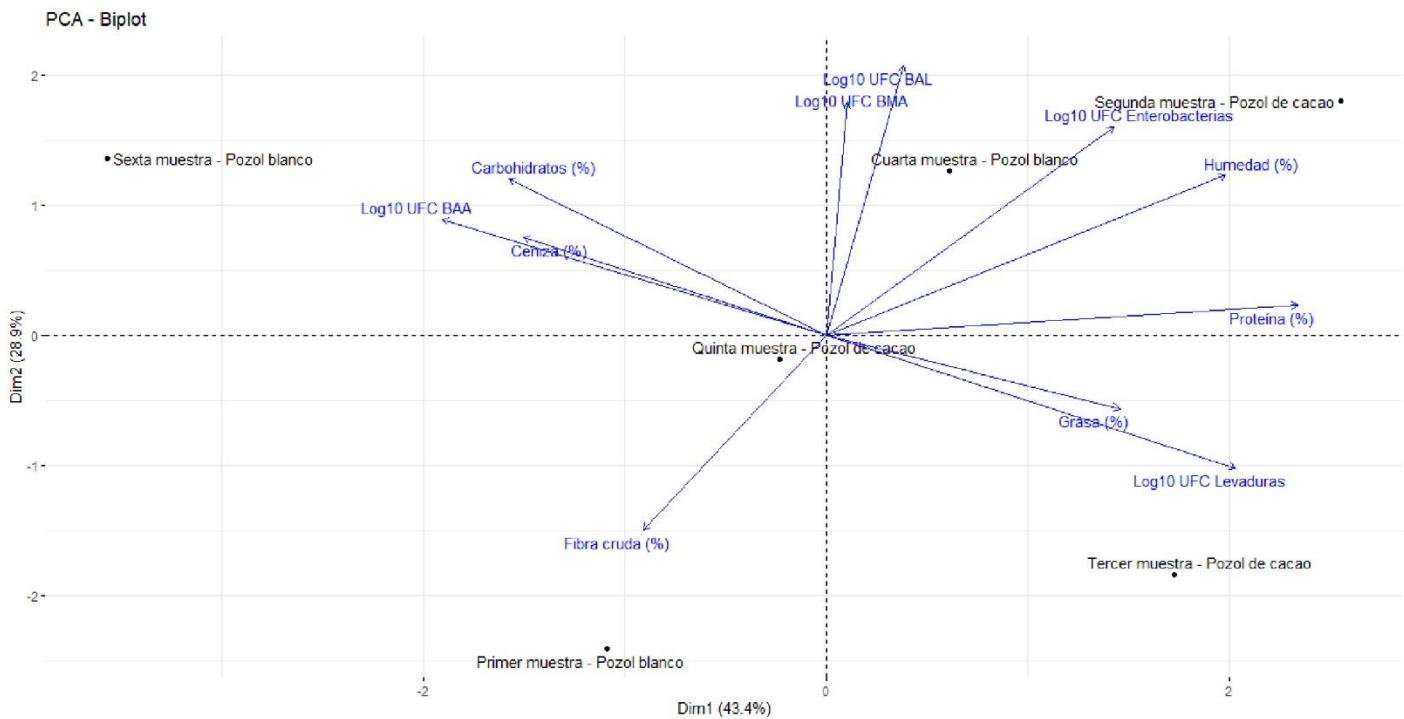


Figura 16. PCA a partir de UFC bacteriano y levaduriforme y resultados de análisis químico proximal

Se hizo una prueba de PERMANOVA a partir de variables microbiológicas (UFC de levaduras y bacterias) y análisis químico proximal, donde nos muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tipos de muestras ($R^2 = 0.4371$, $p = 0.1$), pero se observa una tendencia hacia la diferenciación. De forma visual se observa una separación parcial entre las muestras de pozol blanco y pozol de cacao (Fig. 17), principalmente en la primera dimensión.

PCoA - PERMANOVA

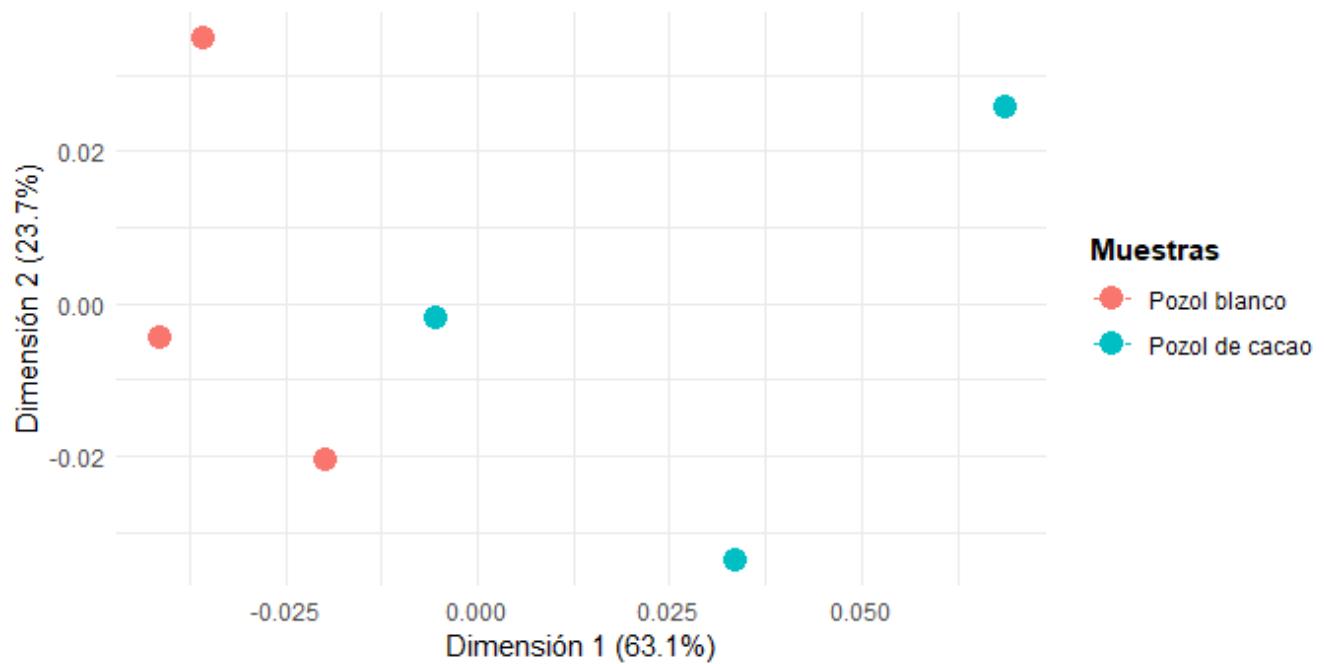


Figura 17. Análisis de coordenadas principales – PERMANOVA donde se observa la separación entre ambos tipos de pozol

VIII. Discusión

El pozol es una bebida tradicional de fermentación espontánea consumida en el sur y sureste de México esta cuenta con una alta carga microbiana destacando la presencia de bacterias y levaduras. La fermentación del mismo se debe principalmente a bacterias ácido lácticas, siendo estos los principales organismos fermentadores del pozol no obstante, las bacterias ácido acéticas y levaduras se encuentran vinculadas en la fermentación del mismo, el poder caracterizar las diferentes cepas microbianas permite conocer gran parte de los microorganismos que convergen dentro del mismo sustrato, ya que algunos pueden presentar algún beneficio para la salud y otros ser potencialmente peligroso. En el pozol destacan principalmente las bacterias ácido lácticas, Nuraida *et al*, 1999 mencionan la presencia de los géneros (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*), donde algunos llegan a ser empleados como probióticos (Velázquez-López *et al*, 2018), generando una mejora en la salud digestiva y el sistema inmunológico (NIH, 2022).

Al momento de llevar a cabo la caracterización se encontraron un total de 81 cepas microbianas, 17 pertenecen a morfologías bacterianas y 64 pertenecen a morfologías de levaduriformes, Nuraida *et al*, 1995 y Wacher *et al*, 2000 mencionan haber encontrado principalmente bacterias ácido lácticas en el pozol con un porcentaje menor de levaduras, uno de los factores a tener un resultado diferente se debe al uso de un medio de cultivo diferente, nos mencionan el uso de agar MRS para bacterias ácido lácticas y agar papa-dextrosa (PDA) para levaduras y mohos, estos son medios diseñados para conocer la presencia de estos tipos de microorganismos (Tortora *et al*, 2007), por otro lado, el medio de cultivo agar WL es un medio empleado para poder caracterizar los diferentes microorganismos presentes en la muestra ya que permite el crecimiento de levaduras, mohos, BAL, BAA y enterobacterias presentes en las muestras. También es de considerar que ambos trabajos someten a la masa a procesos de fermentación, en el caso de Nureida *et al*, 1995 las diferentes muestras fueron sometidas a un proceso fermentativo de 1 a 9 días observando la forma en que los microorganismos fueron colonizando la masa, siendo las bacterias ácido lácticas las que se encuentran repartidas por toda la masa, desde el centro y las periferias de la misma; a diferencia de las levaduras que se encuentran únicamente proliferando en las periferias de la masa del pozol.

Las bacterias ácido acéticas se encuentran presentes en diferentes bebidas y alimentos fermentados desempeñando un papel fundamental en la producción de diferentes metabolitos, en el pozol las BAA se encuentran distribuidas formando parte de las bacterias iniciadoras de la fermentación del mismo, *Acetobacter aceti* fue identificado como parte de la comunidad bacteriana fermentadora del pozol, gran parte de las BAA son bacterias viables, no pero cultivables utilizando métodos tradicionales de microbiología (Gomes *et al*, 2018; Rizo, 2021), de acuerdo a las diferentes pruebas bioquímicas logramos identificar de forma preliminar dos cepas pertenecientes al grupo de bacterias ácido acéticas.

Las enterobacterias en ocasiones son participantes activos de la fermentación del alimento, transformando la materia prima presente en el sustrato mediante la actividad enzimática y microbiana, logrando mejorar la seguridad, vida útil y valor nutrimental del alimento (Gopikrishna *et al*, 2021), pero la presencia de estas se encuentra relacionada a la posibilidad de generar algún tipo de enfermedad debido a la existencia de cepas patógenas oportunistas planeando riesgos para el consumidor, presentando una doble función beneficiosa y otra dañina. La producción del pozol cuenta con una higiene adecuada, pero en ocasiones se encuentra en zonas con una probabilidad de ser inoculada por enterobacterias ajenas a la fermentación, debido a diferentes factores como las corrientes de aires, el uso de materia prima con estas cepas, donde esta llega a ser parte de la fermentación del mismo ayudando a una mejora en la absorción de los diferentes nutrientes al momento de consumir el pozol. Rizo, 2021 documenta la presencia de cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella* sp, *Serratia marcescens*, en diferentes muestras de pozol y con base a las pruebas bioquímicas realizadas se identificaron de forma preliminar cuatro cepas pertenecientes al grupo de las Enterobacterias.

Existen diferentes métodos para una buena identificación de los microorganismos presentes en la muestra, esta es una etapa importante ya que con ello conoceremos la diversidad microbiana que juega un papel importante vinculados a la calidad del pozol.

El uso de métodos tradicionales como el cultivo en medio selectivos, diferenciales y el uso de pruebas bioquímicas convencionales en ocasiones son poco eficientes para

una identificación correcta, ya que existen microorganismos los cuales están presentes en la muestra, que son viables, pero no cultivables limitando el poder conocer la diversidad completa, aunado a esto este tipo de métodos necesita un tiempo prolongado de entre días o semanas para poder obtener el resultado, por otra parte, las características fenotípicas generan variaciones de acuerdo a las condiciones de cultivo, provocando qué se realice una identificación errónea en algunos casos (Fernández *et al*, 2010).

Para obtener una mayor precisión se utilizan diferentes métodos moleculares implementando técnicas como PCR, secuenciación y técnicas de hibridación, teniendo una mayor precisión al momento de la identificación, logrando conocer hasta nivel de especies, lo que permite un estudio mayor del microbioma completo sin dejar fuera a cepas microbianas no cultivables (Alba *et al*, 2017). La integración de ambas metodologías garantiza una identificación más completa y útil, aprovechando las fortalezas de ambas metodologías.

La diversidad de levaduras halladas e identificadas dentro del pozol muestra la complejidad microbiana presente en el mismo. Detectando diferentes especies de los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Cyberlindnera* y *Scheffersomyces*, géneros los cuales se han identificado y asociado a fermentaciones espontaneas de alimentos y bebidas tradicionales como vino, cerveza de sorgo africana, tuak (Fleet, 2003; Deák, 2008).

El género *Candida* es el que presenta una mayor representación, con especies como *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. apicola*, *C. auringiensis*, *C. haemulonis*, *C. sequanensis*, *C. stellata*, *C. maltosa* y *C. solani*. Esta gran diversidad se puede deber a las condiciones ideales que proporciona la masa de pozol, como es el pH ligeramente ácido por la BAL, una carga de alta de carbohidratos derivados de maíz o el cacao, favoreciendo el crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces* (Panda *et al*, 2016). Destacando la presencia de *C. tropicalis* y *C. albicans*, siendo reportadas con anterioridad por (Rizo, 2021), aunado a eso estas son levaduras oportunistas las cuales forman parte de microbiota humana y en algunos casos llegan a contaminar los alimentos durante la manipulación (Mayer *et al*, 2013), siendo el caso del pozol al momento de amasarlo o batirlo.

Algunas otras especies como *C. apicola*, *C. stellata* y *C. maltosa* se han reportado en fermentaciones espontaneas de vinos, frutas fermentadas y algunas otras bebidas tradicionales. Estas levaduras cuentan con diferentes capacidades metabólicas, como la síntesis de amilasas e invertasas, las cuales intervienen en la liberación de azúcares fermentables facilitando su uso por las levaduras y bacterias (Ciana y Ferraro, 1998).

La identificación de *Saccharomyces servazzi* y *Schizosaccharomyces pombe* es relevante debida a la alta capacidad fermentativa de las cepas, *S. pombe* ha sido estudiada por su capacidad de fermentar hexosas y pentosas, también por su tolerancia a condiciones de estrés osmótico y acidez (Benito *et al*, 2016), permitiendo la producción de etanol, ácidos grasos que modifican las características organolépticas y generan una mejor asimilación de los nutrientes al consumirlo.

La presencia de *Cyberlindnera euphorbiiphila* y *Scheffersomyces spartinae* añade un componente interesante, ya que estos géneros se han reportado en ambientes vegetales y fermentaciones de residuos lignocelulósicos, y tienen la capacidad de fermentar azúcares poco comunes como xilosa y arabinosa (Kurtzman *et al*, 2011). Esto podría indicar una participación especializada en la fermentación de compuestos derivados de la hemicelulosa del maíz o en fases específicas del proceso.

El análisis químico proximal constituye como una herramienta básica para caracterizar alimentos tradicionales como el pozol, al ofrecer una estimación de sus principales macronutrientes (grasas, proteínas, fibra cruda y carbohidratos) y otros componentes como cenizas y humedad. No obstante, el valor de estos resultados no se centra únicamente en describir porcentajes, sino en contextualizarlos frente a estudios previos, estándares nutricionales y prácticas culturales de consumo.

Los valores de humedad obtenidos (61.12 – 67.83 %) son similares a los reportados por Ayala (2022), que encontró un rango de 64 – 69.6 %. Este contenido elevado de humedad se puede interpretar de dos formas: por un lado, permite considerar al pozol como bebida hidratante de consumo diario; a su vez, lo hace susceptible a una mayor presencia de microorganismos acelerando el tiempo de fermentación.

Con respecto al contenido de cenizas, los valores encontrados (1.11 – 2.11 % en pozol blanco y 1.31 – 1.49 % en pozol de cacao). Sugieren la presencia de minerales,

pero en cantidades menores a la reportada por Ayala (2022). Esta diferencia puede deberse a diferentes factores como variaciones en la materia prima, las condiciones que se tuvieron al momento de llevar a cabo la nixtamalización y la posible perdida de compuestos minerales durante el lavado del grano.

El contenido de grasas mostró diferencias notables entre ambos tipos de pozol, donde el pozol blanco (2.95 – 4.55 %) y el pozol de cacao (4.56 – 16.69 %). Cuentan con una concordancia a lo reportado por Ayala (2022). La variabilidad responde principalmente a la cantidad de cacao añadido, dando a en conocer un aspecto relevante, el pozol no es alimento estandarizado, sino una preparación artesanal cuya composición depende de las decisiones culturales y familiares.

Por su parte, las proteínas cuentan con un porcentaje que va de (5.47 – 10.14 %) están dentro de un rango para productos a base de maíz, siendo superiores en el pozol de cacao por la adición de los granos del cacao. Ayala (2022) reporto porcentajes más ligeramente más altos (9.75 – 13.49 %), puede deberse a la variabilidad en la calidad de la materia prima. Un mayor contenido proteico no necesariamente implica mayor valor biológico, dado que la calidad de las proteínas del maíz es limitada por la deficiencia de lisina y triptófano, a menos que la combinación con el cacao y la fermentación mejoren parcialmente su biodisponibilidad.

La fibra cruda presento una mayor diferencia con lo reportado con anterioridad (5.75 – 13.26 %), estos son valores superiores a los reportados por Ayala (2022), que reporta 1.66 – 4.05 %. Esta diferencia se explica por el método empleado: mientras que Ayala, utilizó el protocolo de AOAC 973.19, que elimina hemicelulosa y lignina durante la digestión ácido-alcalina, por otra parte, se empleó el reactivo S-K, que tiende a sobreestimar la fracción fibrosa al oxidar parcialmente lignina. Estas diferencias de metodología es que logra los diferentes resultados, lo que también revela la necesidad de estandarizar técnica de análisis de alimentos y bebidas tradicionales para garantizar comparabilidad.

Por último, los carbohidratos forman parte del componente mayoritario del pozol (65.99 – 80.32 %), siendo más abundantes en el pozol por su base amilácea de maíz nixtamalizado, mientras que el pozol de cacao el porcentaje disminuye debido al

reemplazo parcial por las grasa y proteínas. Este patrón confirma que más que perder valor nutrimental, el pozol de cacao redistribuye sus macronutrientes, ofreciendo un perfil más equilibrado.

Los resultados muestran que el pozol puede considerarse un alimento con un aporte energético significativo (calculado mediante los factores de conversión calórica FAO/OMS/UNU, 2004), aunque con gran variabilidad según la elaboración.

En conjunto, la diversidad de levaduras observada puede responder a una sucesión microbiana natural, en la cual diferentes especies predominan en distintas fases del proceso fermentativo, dependiendo de factores como el pH, la concentración de azúcares, el contenido de oxígeno y la interacción con bacterias ácido lácticas (De Vuyst & Leroy, 2006). Estas interacciones microbianas no solo contribuyen a la estabilidad ecológica del sistema, sino también a la generación de compuestos funcionales como vitaminas del complejo B, ácidos grasos de cadena corta y compuestos antimicrobianos (Basket *et al*, 2024).

El análisis químico proximal del pozol nos revela que es una fuente de carbohidratos, proteínas, grasas y fibra cruda contribuyendo así al valor nutricional presente en el alimento. Los diferentes alimentos que llevan a cabo un proceso fermentativo cuentan con cepas de microorganismos beneficiosos para la salud y compuestos bioactivos los cuales ayudan a que se puede considerar como un alimento funcional, principalmente cuando estos son incluidos en la dieta diaria y equilibrada (Granato *et al*, 2010). Con esta base, el pozol, como una bebida tradicional fermentada, muestra un potencial significativo para ser considerado un alimento funcional, gracias al aporte de los diferentes microorganismos presentes, nutrientes esenciales y algunos compuestos bioactivos resultado de la fermentación del mismo (Omar y Ampe, 2000).

Tanto el pozol blanco como el pozol de cacao cuentan con características que le dan un potencial como alimento funcional, pero el pozol de cacao nos muestra un mejor perfil funcional, esto porque cuenta con un mayor porcentaje de proteínas y grasas que derivan del cacao. Las grasas consumidas en el pozol de cacao llegan a aportar antioxidantes naturales, como algunos polifenoles, estos cuentan con efectos benéficos para la salud cardiovascular y metabólica (Granato *et al*, 2010). El promedio el pozol de cacao presento un mayor UFC de levaduras y bacterias ácido lácticas, en

comparación del pozol blanco. Se conoce que diferentes especies de BAL cuentan con la capacidad de modular la microbiota intestinal y favorecer la salud digestiva e inmunológica (Hill *et al*, 2014).

IX. Conclusión

El poder evaluar el pozol nos permite conocer los microorganismos presentes en este microambiente, contando con bacterias ácido lácticas, ácido acéticas, enterobacterias, bacterias mesófilas aerobias y levaduras.

El caracterizar las bacterias y levaduras presentes nos revela una amplia variedad de estas. En este caso de las levaduras predominan especies del género *Candida*, también teniendo la presencia de especies de levaduras con un mayor poder de fermentación como es *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces servazzi*.

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas son las que destacan en el proceso fermentativo del mismo al ser una fermentación láctica, pero los demás tipos de bacterias están vinculadas con diferentes características organolépticas dadas por ellas hacia el pozol, realzando su olor, sabor y textura principalmente y son indispensables para una estabilidad ecológica. Así demostrando un ecosistema complejo en donde cada especie desempeñan funciones específicas en la síntesis de metabolitos y estabilización del pozol para una mejor asimilación al momento de consumirlo.

El análisis químico proximal nos da una perspectiva del aporte nutrimental del pozol, destacando el pozol de cacao con una mayor concentración de proteínas y grasas a diferencia del pozol blanco que cuenta con un mayor porcentaje de fibra cruda y carbohidratos totales. También presentando variaciones entre diferentes muestras del mismo tipo de pozol las cuales van de la mano con la elaboración del mismo y el origen de los productos. Con estos resultados podemos reforzar la importancia del pozol en la dieta diaria.

La caracterización de las diferentes cepas bacterianas y levaduriformes, la estimación de las unidades formadoras de colonias, en combinación con el análisis químico proximal de las diferentes muestras, nos permite decir que el pozol cuenta con el potencial para ser considerado como un alimento funcional. Sin embargo, este no puede considerarse de manera estricta un probiótico por el contenido menor de UFC de BAL al establecido.

El pozol de cacao cuenta con mayor potencial como un alimento funcional integral debido a una mayor carga microbiana de organismos fermentadores, a su vez, presenta un mayor porcentaje de nutrientes dados por el maíz y el cacao.

Con estos hallazgos se sientan las bases para futuras investigaciones orientadas a la conservación de la riqueza microbiana y un mejor conocimiento del aporte nutricional que nos otorga el pozol y poder clasificarlo como alimento funcional.

X. Referencias documentales

- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. *El maíz de Cuba. Cultivos tropicales*. 30 (2). Pp. 113 – 120.
- Afzal, B., Siddiqui, E., Kazi, S. G., Khan, I. Q., Daniyal, M., Khan, M. A. R. 2018. Unusually high serum lactate in patient presenting with septic shock. *International Journal of Community Medicine and Public Health*. 5 (10). Pp. 1 - 4.
- Agurto, S. T., Ramos, G. J. C. 2008. Bacterias ácido lácticas: Biopreservante de los alimentos. *Biotempo*. 8. Pp. 54 - 64.
- Alba, A. L. M., García, G. J. M., Pérez, H. M. D., Martínez, G. S., Palacios, G. J. J. 2017. Utilidad de los métodos fenotípicos y genotípicos en el estudio de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a fármacos antituberculosos de primera línea. 53 (4). Pp. 192 - 198.
- Altuzar, A. 2006. El pozol. <http://www.conecultachiapas.gob.mx/Noticias/view/el-pozol>. Consultado el 05 de mayo de 2022.
- Ampe, F., Omar, N., Moizan, C., Wacher, C., Guyot, J. P., 1999. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independet Methods to Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12). Pp. 5464 – 5473.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18 ed.
- Aryal, S. 2022. Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions. <https://microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/>. Consultado el 23 de mayo de 2022.
- Association of Official Analytical Chemists. 2019. Official Methods of Analysis. 21 ed. AOAC International
- Australian Government. 2008. The Biology of *Zea mays* L. ssp *mays* (maize or corn). <https://www.ogtr.gov.au/resources/publications/biology-zea-mays-l-ssp-mays-maize-or-corn>. Consultado el 30 de abril de 2023.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Wright, A. Ouwehand, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3ra ed. Marcel Dekker. Pp. 1 - 5.

- Ayala, P. E. 2022. Caracterización de bebidas tradicionales mexicanas para el desarrollo de saborizantes que puedan ser incorporados a fórmulas lácteas. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro de Santiago.
- Ballinas, D. E. J., Meza, G. P. I., Aguilar, N. O. A. Vela-Gutiérrez, G., Flores-Guillen, L. E., Pérez, J. A., Morales. M. L. A. 2023. El análisis proximal, práctica e interpretación de resultados. Colección Montebello UNICACH.
- Barros, C., Buenrostros, B. 2011. Pozol, Popo y Champurrado. Revista Digitas Universitaria. 12 (4).
- Basket, J., Eissa, M. A., Cardozo, L. L. Y., Romero, D. G., Rezq, S. 2024. Impact of Probiotics and Prebiotics on Gut Microbiome and Hormonal Regulation. *Gastrointest Disord.* 6 (4). Pp. 801 - 815.
- Bedolla-Bernal. 2004. Introducción a la Tecnología de Alimentos. México Linusa. Noriega. 2: 148-158.
- Benito, A., Jeffares, D., Palomero, F., Calderon, F., Bai, F. Y., Bähler, J., Benito, S. 2016. Selected *Schizosaccharomyces pombe* Strains have Characteristics That Are Beneficial for Winemaking. *PLOS ONE.* 11 (3)
- Biswas, S. 2019. Maize: Origin, Botany and Growth Stages and Uses. <https://www.agricultureinindia.net/cultivation/maize-cultivation/maize-origin-botany-and-growth-stages-and-uses-agriculture/19680>. Consultado el 30 de abril de 2023.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., Khelaifia, S. 2019. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections.*
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Saéz-Nieto, J. A., Valdazate, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 29 (8). Pp. 601 – 608.
- Buratti, S., Benedetti, S. 2016. Alcoholic Fermentation Using Electronic Nose and Electronic Tongue. En: *Electronic noses and tongues in food science.* 1er ed. Academic press. Pp. 291-299.
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C. Libkind, D. 2021. Non-conventional yeast as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología.* 53 (4). Pp. 359 – 377.

- Cadena-Iñíguez, P., De la Cruz-Morales, F. R. 2012. Comidas y bebidas: Mezcla de saberes y sabores zoques en Chiapas. *Agro Productividad*. 5 (4). Pp. 18-25.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmströn, C., Ford-Doolittle, W., Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Pp 278 – 288.
- Castillo, V. K. C., Ochoa, M. L. A., Figueroa, C. J. D., Delgado, L. E., Gallegos, I. J. A., Morales, C. J. 2009. Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*ea mays* L.) nixtamalizado, sobre características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal. *Archivos Latinoamericanos de la Nutrición*. 59 (4).
- Ciani, M., & Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*. 85 (2). Pp. 247-254.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. 2008. Fermentation. En: Jørgensen, S. E., Fath, B. D. 1er ed. *Encyclopedia of Ecology*. Pp. 1548-1557.
- CIBIOGEM. S/A. Maíz. <https://conacyt.mx/cibiogem/index.php/maiz>. Consultado el 08 de mayo de 2023.
- Deák, T., 2008. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, Second Edition - CRC Press Book, 2nd ed. CRC Press: Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13 (4). 194 - 199.
- Díaz, G., Ruíz, F., Morlon-Guyot, J., Wacher, C. 1999. Diversidad de bacterias ácido lácticas amilolíticas del pozol. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México, Distrito Federal. Pp. 40.
- Domínguez, Y. 2008. Tuxtla Gutiérrez. <https://eschiapas.org/2008/12/15/tuxtla-gutierrez/#:~:text=La%20vegetaci%C3%B3n%20del%20municipio%20es,y%20otras%20ya%20son%20escasas>. Consultado el 18 de septiembre de 2022.
- Durán, A. A. 2009. Pozol: una bebida para refrescarse. <https://archivo.eluniversal.com.mx/articulos/53002.html>. Consultado el 05 de mayo de 2022.

- Esteve-Zarzoso, B., Perris-Torran, M. J., Ramón, D., Querol, A. 2001. Molecular characterization of *Hanseniaspora* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 80. Pp.85 – 92.
- FAO, 1986. Manual de análisis de alimentos. <https://www.fao.org/4/AB489S/AB489S03.htm>
- Fernández, O. A., García, F. C., Saéz, N. J. A., Veldazate, R. S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica.
- Fernández, P. R. 2015. Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisin frente a biofilms de bacterias enológicas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Universidad de la Rioja. Loroño, España.
- Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86(1-2). Pp. 11-22.
- Flores, R. E. 2008. Pozol: una bebida fermentada tradicional de México. *Cienciorama*.
- Flores-Espinosa, M. T. 1995. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Fon-Fay, V. F. M., Zumbado, F. H. 2019. Análisis proximal en alimentos: Fundamentos teóricos y técnicas experimentales. Centro de Formación Colloquium.
- García, G. 2020. Cacao, un alimento de alto valor nutrimental. https://thefoodtech.com/nutricion-y-salud/cacao-un-alimento-de-alto-valor-nutricional/#utm_source=chatgpt.com. Consultado el 28 de noviembre de 2024.
- Ganogpichayagrai, A., Suksaard C. 2020. Proximate composition, vitamin and mineral composition, antioxidant capacity, and anticancer activity of *Acanthopanax trifoliatus*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 11 (4). Pp. 179-183.
- Gomes, R. J., Borges, M. F., Rosa, M. F., Castro-Gómez, B. J. H., Spínola, W. A. 2018. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technol Biotechnol*. 56 (2): 139 - 151.
- Gómez-Flores, L. J., Martínez-Ruiz, N. R., Enríquez-Auchondo, I. D., Garza-Ocaña, F. Nájera-Medellin, J. A., Quiñonez-Martínez, M. 2019. Análisis proximal y

- composición mineral de cuatro especies de hongos ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*. 22. Pp. 1 – 10.
- González, L. O. Y., Jacinto, C. L., Pérez, C. M. 2018. El pozol, una bebida ancestral mexicana como legado cultural inmaterial. 24 (68). Pp. 29-37.
- González-Cortés, N., Silos-Espino, H., Estrada, C. J. C., Chávez-Muñoz, J. A., Tejero, J. L. 2016. Características y propiedades de maíz (*Zea mays* L.) criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 7 (3). Pp. 669 – 680.
- Gopikrishna, T., Suresh, K. H. K., Perumal, K., Elangovan, E. 2021. Impact of *Bacillus* in fermented soybean food on human health. *Annals of Microbiology*. 71 (30).
- Government of Canada. S/A. The biology of *Zea mays* L. (maize). <https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-maize-eng/1330985739405/1330985818367>. Consultado el 30 de abril de 2023.
- Granato, D., Barba, J. F., Kovačević, D. B., Lorenza, J. M., Cruz, A. G., Putnik, P. 2020. Functional Food: Product Development. Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*. 11. Pp. 93 – 118.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9 (3). Pp. 292 - 302.
- Guacho, A. E. F. 2014. Caracterización agro-morfológica del maíz (*Zea mays* L.) de la localidad San José de Chazo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Recursos Naturales. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Gutiérrez, L. C. g. 2017. Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11 (8). Pp. 506-514

- Hossain, F., Muthusamy, V., Bhat, J. S., Jha, S. K., Zunjare, R., Das, A., Sarika, K., Kumar R. 2016. Maize. *Springer India*. Pp. 67 – 88.
- Jiménez, V. R., González, C. N., Magaña, C. A., Corona, C. A. 2010. Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (1). Pp. 70-80.
- Karatia, H., Vilapriño, E., Sorribas, A. Albes, R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *Plos One*.
- Kurmmer, N. 2016. Alternative sampling strategies to monitor alcohol consumption in case of driver's licence regranting. Tesis de Doctorado. Faculty of Pharmaceutical Sciences. Ghent University. Ghent, Belgica.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. 2011. The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th ed. Elsevier
- López-Gurgua, A. L. 2019. Caracterización fisiológica de *Kluyveromyces marxianus* (Van der Walt, 1971) asociadas a la bebida tradicional comiteco. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencia Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez.
- MacFaddin, J. F. 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3 ed. Editorial Medica Panamericana.
- MacWillians, M. P. 2009. Indole Test Protocol. American Society for Microbiology.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. 14 ed. PEARSON.
- Malo, P. M., Urquhart, E. A. 2016. Fermented foods: Use of Starter Cultures. En: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldra, F. 1er ed. Encyclopedia of Food and Health. Pp. 681-685.
- Mamlouk, D., Gullo, M. 2013. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*. 53(4): 377-384.
- Martínez, F. 2011. El pozol: bebida ancestral del sureste. <https://www.mexicodesconocido.com.mx/el-pozol-bebida-ancestral-del-sureste-mexicano-tabasco.html>. Consultado el 05 de mayo de 2022.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2). Pp. 119-128.

- Mduduzi, M. P. 2017. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens. *Molecules*. 22. 1255. doi:10.3390/molecules22081255
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C., Saavedra-Molina, A. 2016. Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información tecnológica*. 27 (4).
- Mendoza, M. 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25 (1).
- Mex-Álvarez, R. M. J., Garma-Quen, P. M., Bolívar-Fernández, N. J., Guillén-Morales, M. M. 2016. Análisis Proximal y Fitoquímico de Cinco Variedades de Maíz del Estado de Campeche (México). *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 12 (2). Pp. 74-80.
- Möller, J. 2014. Comparación de los métodos para la determinación de fibra en pienso y en los alimentos. Foss.
- Mondragón, C, D. 2012. Importancia de los alimentos funcionales en la industria de alimentos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Autónoma de México. México, D. F.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., De La Rivas, B. 2011. Lactic Acid Bacteria. En: Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R. 1er ed. Molecular Wine Microbiology. Pp. 191-226.
- National Human Genome Research Institute. 2024. Fragmentos de Restricción de Logitud Polimórfica (RFLP). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrlfp/>. Consultado el 24 de noviembre de 2024.
- Nacional Institute of Health, 2022. Probióticos. [69](https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspanol/#:~:text=Cuando%20una%20persona%20come%20o,otros%20beneficios%20para%20la%20salud. Consultado el 23 de noviembre de 2024</p><p>National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7 ed. National Academies Press</p><p>Nkhata, S. G., Ayau, E., Kamau, E. H., Shingiro, J. B., 2018. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. <i>Food Science and Nutrition</i>. 6. Pp. 2446 – 2458.</p></div><div data-bbox=)

- Nuraida, L., Wacher, M. C., Owens, J. D. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11. Pp. 567 – 571.
- Omar, N. B., Ampe, F. 2000. Microbial Community Dinamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Pp. 3664 - 3673.
- Panda, A. K., Mishra, S. S., Kayitesi, E., & Ray, R. C. 2016. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental Sustainability*. 1. Pp. 91 – 100.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AMS Microbiol*. 6 (1). 1 – 31.
- Paredes, L. O., Guevara, L. F., Bello, P. L. A. 2008. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencia*.
- Perales, R. H. R. 2009. Maíz, riqueza de México. *Ciencias*. Pp. 46 – 55.
- Prinzi, A., Rohde, R. 2020. Why Differential & Selective Media Remain Invaluable Tools. <https://asm.org/articles/2020/september/why-differential-selective-media-are-invaluable-to>. Consultado el 28 de noviembre de 2024.
- Reiner, K. 2010. Catalase Test Protocol. *American Society for Microbiology*.
- Rizo-Villagrana, J. M. 2022. Caracterización microbiológica, bioquímica y proteómica del pozol. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Rodicio, M. R., Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en la microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 22 (4).
- Rodríguez, A., Villalva, B., Flores, M. T., Sainz, T., Eslava, C., Díaz, R. G., Wacher, R. M. C. 2010. Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México, Distrito Federal.
- Roman, V. 2012. El pozol: bebida ancestral. <http://lossaboresdemexico.com/el-pozol-bebida-ancestral/>. Consultado el 11 de agosto de 2022.
- Ruiz-Albores, A. I. 2019. Bebida en polvo a base de semilla de mamey (*Pouteria sapota*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez.

- Saika, H., Matsumura, H., Takano, T., Tsutsumi, N., Nakazono, M. 2006. A Point Mutation of *Adh1* Gene is Involved in the Repression of Coleoptile Elongation under Submergence in Rice. *Breeding Science*. 56. Pp 69 – 74.
- Sánchez, O. I., Pérez-Urria, C. E. 2014. Maíz I (*Zea mays*). *Reduca*. 7 (2). Pp. 151 – 171.
- Satora, P., Skotniczny, M., Strnad, S., Ženíšková, K. 2020. Yeast Microbiota during Sauerkraut Fermentation and Its Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (24).
- Satyanarayana, T. y Kunze, G. 2017. Yeast diversity in human welfare. *Springer*.
- Segura, G. L. E., Kirchmayr, M. R., Flores, B. E. P., Gschaedler, M. A. C. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Gnosis*. 8(2): 1-12.
- Sharma, R., Garga, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., Kulshrestha, S. 2020. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Food. *Fermentation*. 6. 106. doi:10.3390/fermentation6040106
- Sigma-Aldrich, 2021. WL Differential Agar. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sial/17215>. Consultado el 15 de septiembre de 2022.
- Sistema Meteorológico Nacional. 2021. Normales climatológicas. <https://web.archive.org/web/20150427111454/http://smn.cna.gob.mx/climatologia/Normales5110/NORMAL07165.TXT>. Consultado el 18 de septiembre de 2022.
- Torrens, G. D., Martín, G. M. 2012. Prueba de la catalasa. <https://www.semicrobiologia.org/imagen-banco/prueba-de-la-catalasa>. Consultado el 23 de mayo de 2022.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 2007. Introducción a la Microbiología. 9 ed. Editorial Médica Panamericana.
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*. 41 (4). Pp. 297 - 313.
- Vázquez, H. J., Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *INGENIERÍA Investigación y Tecnología*. 8 (4). Pp. 249-259.

Vega, E. Z. 2010. Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana – Fermentación. Visto 07 de marzo de 2022. Consultado en: https://laboratoriomicroaplicada.files.wordpress.com/2008/11/alimentos_fermntados.pdf

Vela, E. S/A. Taxonomía y botánica del maíz. <https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/taxonomia-y-botanica-del-maiz>. Consultada el 08 de mayo de 2023.

Velázquez-López, A., Covatxin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., Vela-Gutierrez, G. 2018. Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *Ciencia UAT*. 13 (1). Pp. 165 - 178.

Verdugo-Valdez, A. G. 2013. Caracterización de las levaduras asociadas al proceso fermentativo del mezcal. Tesis de Doctorado. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens, D. 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*. 17. Pp. 251 – 256.

Walker, G. M., Walker, R. S. K. 2018. Enhacing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En: Kurtzman, C. P., Fell, J. W. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. ELSEVIER. Netherlands. Pp. 77.

Yassunaka, H. N. N., Surek, M., Sartori, D., Serrato, R. V., Spínosa, W. A. 2023. Role of Acetic Acid Bacteria in food and Beverages. *Food Technol Biotechnol*. 61 (1): 85 – 103.