



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO SOBRE LA RESISTENCIA TÉRMICA DE**  
***WEISSELLA CONFUSA* AISLADA DEL POZOL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

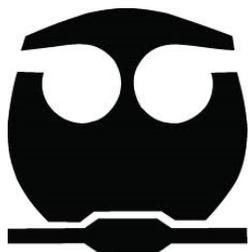
**PRESENTA**

**DIANA EVELYN GONZÁLEZ ESCÁRCEGA**

**ASESOR**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE**

**Ciudad Universitaria, CDMX. Noviembre, 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE**

**VOCAL: AURORA IRMA ORTEGON AVILA**

**SECRETARIO: ALEIDA MINA CETINA**

**1er. SUPLENTE: GENARO JIMENEZ REYES**

**2do. SUPLENTE: GLORIA DIAZ RUIZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

**Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E,  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.**

**ASESOR DEL TEMA**

---

**Dra. María del Carmen Wacher Rodarte**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**Dra. Gloria Díaz Ruíz**

**SUSTENTANTE**

---

**González Escárcega Diana Evelyn**

## RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN-223917 “Combinando la microbiología y la bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

Índice	
Abreviaturas y Símbolos .....	i
Resumen .....	ii
Introducción .....	1
Antecedentes .....	3
Alimentos fermentados tradicionales .....	4
Pozol .....	5
Elaboración del pozol .....	5
Microbiota del pozol.....	8
Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	9
<i>Weissella</i> .....	10
Ecología .....	12
Cepas de <i>Weissella</i> asociadas con infecciones clínicas humanas .....	13
Exopolisacáridos .....	15
<i>Weissella confusa</i> .....	15
Resistencia térmica de bacterias ácido lácticas .....	16
Tiempo de reducción decimal o valor D .....	17
Proteínas de choque térmico .....	18
Proteínas chaperonas.....	20
HSPs70 .....	21
Hipótesis .....	22
Objetivo General .....	23
Objetivos particulares.....	23
Metodología .....	24
Resultados .....	28
Conclusiones .....	43
Perspectivas .....	43
Bibliografía .....	44
Anexo.....	51

## **Abreviaturas y Símbolos**

%	Por ciento
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ATP	Adenosin Trifosfato
ARN <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
h	Hora
HSF1	Factor de transcripción
HSP	Heat Shock Proteins/Proteínas de Choque Térmico
HSR	Respuesta de choque térmico
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
UFC	Unidades formadoras de colonia
μL	Microlitros

## Resumen

El pozol es una bebida refrescante que se produce en el sureste de México y que se obtiene a partir de la fermentación del nixtamal. Este es un proceso que involucra el calentamiento del maíz en agua con cal para obtener los granos de nixtamal, los cuales se muelen para obtener una masa. Con ésta se forman bolas, las cuales se envuelven en hojas de plátano y se dejan fermentar. Esta masa se suspende en agua para obtener una bebida consumida por grupos indígenas y mestizos del sureste de México. Es fermentada por una microbiota compleja, dentro de la cual predominan, junto con *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius*, cepas del género *Weissella*, que es también una bacteria láctica. La bacteria se encuentra frecuentemente en la masa y se sabe que es capaz de resistir valores bajos de pH. Se conoce que la fuente de contaminación más importante de la masa ocurre durante la molienda del nixtamal. Es importante determinar la resistencia térmica del microorganismo así como su efecto en la resistencia a pH bajo. Se trabajó con la cepas *Weissella confusa* L9 y *Weissella confusa* 3A aisladas del pozol. Se determinó hasta qué valores de temperatura son capaces de resistir y posteriormente su valor D. Se usó el método de cuenta en placa para cuantificar sobrevivientes y determinar el valor D. La temperatura máxima que fue capaz de resistir la cepa *Weissella confusa* L9 fue de 55°C, con un valor D de 8 min y la temperatura máxima que presentó la cepa *Weissella confusa* 3A fue de 52°C con un valor D de 7.2 min.

## **Introducción**

Al principio de su historia, el hombre fue nómada, se dedicaba a recolectar alimentos, cazaba animales, recogía productos vegetales y viajaba a otros lugares donde sabía que podía obtener sus alimentos en ciertas épocas del año. Luego decidió establecerse en algún lugar determinado y se volvió sedentario.

Si bien esta transformación de la vida nómada de nuestros antepasados al sedentarismo debió darse como un proceso lento, la adaptación incluyó como un elemento central el desarrollo de la agricultura; el cultivo de plantas y la domesticación y cuidado de animales. Derivado de estas dos actividades, que hoy denominamos agrícolas y pecuarias, seguramente surgió la necesidad de almacenar los excedentes, es decir, de conservar los alimentos. Surgió también la posibilidad de cocinarlos o prepararlos de formas variadas. Dentro de estas formas quizás la más sencilla fue el secado al sol y la más compleja la fermentación. Ambas formas surgieron derivadas de la observación y la experimentación. Un alimento que conserva su humedad se descompone, pero si se seca exponiéndolo al sol se conserva durante un tiempo prolongado. Así se desarrollaron de manera empírica diversos métodos de conservación de alimentos. Uno de ellos es la fermentación, que es un proceso complejo, ya que consiste en la transformación del alimento (el cereal, la fruta o, eventualmente, la leche) mediante la acción de microorganismos, los cuales, al utilizar los componentes disponibles del alimento, pueden reproducirse transformando el sabor, color, olor, textura e incluso el valor nutrimental del producto en el que están creciendo y fermentando (Wacher, 2014).

La microbiología de la mayoría de estos productos a base de cereales es compleja y no se conoce con detalle. El tipo de microbiota desarrollada en cada alimento fermentado depende de la actividad de agua, del pH, de la concentración de sal, la temperatura y composición de la matriz alimenticia (Blandino *et al.*; 2003).

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la viabilidad y desarrollo de los microorganismos, al producir una gran variedad de cambios estructurales y funcionales que pueden resultar en un descenso progresivo en el número de células viables o su muerte tras una exposición prolongada a

temperaturas por encima de la óptima. La termorresistencia de un microorganismo está determinada por su capacidad para soportar un tratamiento térmico. Algunos factores que afectan la resistencia térmica de las bacterias son la fase de crecimiento de células en estudio, el pH del medio, la concentración de sales, azúcares, grasas; la disminución del  $A_w$  y la combinación con otros agentes como la presión, congelación y descongelación.

El tiempo de reducción decimal (valor D), es el tiempo necesario para destruir el 90% de la población microbiana de un determinado microorganismo a una temperatura dada, y se ha usado como modelo de inactivación bacteriana, dado que puede ser extrapolado a un proceso industrial (Lee and Kaletunc, 2002; Vasan *et al.*, 2013). Por ello, el determinar si las bacterias ácido lácticas son capaces de sobrevivir las temperaturas de pasteurización o más altas, abre la posibilidad de poder emplearlas en productos que involucren un tratamiento térmico. En el caso específico de los alimentos fermentados a base de nixtamal, que involucran la molienda de los granos a temperaturas altas, es importante estudiar su resistencia térmica, lo cual determinaría su capacidad de sobrevivir a este proceso y formar parte de su microbiota.

## **Antecedentes**

La fermentación es uno de los métodos de conservación más antiguos empleados en los alimentos alrededor del mundo. Los indígenas utilizaron la fermentación durante cientos de años en la preparación de diversos alimentos y bebidas (Battcock y Azam-Ali, 1998). Las culturas mesoamericanas desarrollaron productos fermentados con el fin de mejorar la posibilidad de almacenamiento y/o diversificar su gastronomía. Dentro de las bebidas tradicionales fermentadas mexicanas se encuentran el pozol, el tesgüino, el pulque, el colonche y el tepache (Ben Omar y Ampe, 2000). La mayoría de estas fermentaciones son naturales, es decir, los microorganismos que participan se encuentran naturalmente en el sustrato y por lo general son microbiotas mixtas complejas. Los sustratos más usados en México para estas fermentaciones son los agaves y el maíz.

El maíz fue la base de la alimentación de los pueblos mesoamericanos, para quienes además tuvo un significado religioso, ya que se creía que los seres humanos habían sido hechos de este grano. Actualmente, a partir del maíz se preparan una gran variedad de platillos y dentro de estos se encuentran los alimentos fermentados. La mayoría son bebidas lácticas aunque también se elaboran alimentos sólidos y bebidas alcohólicas. Dentro de los alimentos de maíz producidos por fermentación láctica, destacan las bebidas, como el pozol, chorote y los atoles agrios, y dentro de las bebidas alcohólicas el tesgüino. Se usan como sustrato el maíz, el maíz nixtamalizado, el maíz tierno y en ocasiones otros ingredientes, como el cacao y la “hierba dulce” (Ben Omar y Ampe, 2000).

### **Alimentos fermentados tradicionales**

Se estima que 25% de la dieta europea y 60% de la dieta de muchos países en vías de desarrollo está compuesta por alimentos fermentados (Adebayo *et al.*, 2013).

Sin embargo, es sólo durante las últimas décadas que se ha puesto en evidencia que la gran mayoría de los alimentos fermentados cuentan con una serie de propiedades fundamentales para una dieta variada y equilibrada, esta es quizá una de las razones por las cuales su preparación y consumo se ha mantenido hasta nuestros días. En casi todos los casos, estos productos están fuertemente arraigados a la cultura de las regiones en las que fueron desarrollados o adaptados; en otros casos los alimentos se han beneficiado de los avances científicos y tecnológicos, como la cerveza, el vino o la producción de yogurt; entre otros, el proceso se mantiene con muy poca innovación, tal es el caso del pozol o del pulque en México (Wacher, 2014).

Los alimentos fermentados se definen como aquellos productos que han sido sometidos al efecto de microorganismos y sus enzimas, que causan cambios bioquímicos deseables. Son producidos en todo el mundo utilizando diferentes técnicas de fabricación, materias primas y microorganismos (Blandino *et al.*, 2003). Con cada alimento fermentado se asocia una microbiota única (Kumar *et al.*, 2012). Los alimentos fermentados como el pan, el queso, la cerveza y el vino han sido preparados y consumidos durante miles de años. Estudios arqueológicos han demostrado el uso del proceso de fermentación por culturas antiguas para la elaboración de productos alimenticios (Delwen, 1996a; Delwen 1996b; McGovern *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2010). En América Latina existen regiones en las cuales los productos fermentados se siguen elaborando tradicionalmente usando equipos muy sencillos. En mercados especializados en todo mundo, estos productos fermentados son altamente apreciados y se consideran de calidad por sus características de sabor y por ser únicos.

Los alimentos fermentados indígenas cuentan con cualidades sensoriales especiales y algunos incluso poseen propiedades promotoras de la salud. Esto se debe principalmente a la diversidad biológica de la microbiota presente en las

materias primas, como la contaminación debida a los productores o a los instrumentos usados para prepararlos. Estos microorganismos son depósitos genéticos importantes para la producción de compuestos de importancia para obtener las características sensoriales esperadas, compuestos antimicrobianos, compuestos que favorecen la salud del consumidor. Constituyen además un gran potencial biotecnológico que podría ser explotado, para beneficio sobre todo de quienes han mantenido estos procesos desde épocas lejanas.

Muchos microorganismos han evolucionado en condiciones ambientales severas para sobrevivir, mientras que otros lo han hecho para producir enzimas y compuestos necesarios para su crecimiento en materias primas alimenticias. Es esencial aislar y conservar la microbiota nativa que se encuentra en estos productos, ya que constituyen especies microbianas importantes desde el punto de vista tecnológico y su fisiología es generalmente novedosa (Ray & Montet, 2015).

### **Pozol**

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México no alcohólicos de origen prehispánico el más importante es el pozol. Es un alimento tradicional de origen maya que forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México: chontales, choles, mayas, lacandones, tzotziles o chamulas, tzetzales, zoques, mames y zapotecos, junto con la población mestiza. El nombre pozol es de origen náhuatl, pozolli, que quiere decir espumoso.

### **Elaboración del pozol**

La preparación del pozol comprende varias etapas, pero es la fermentación la más importante de todas ellas, debido a que ésta es la responsable de las características sensoriales del producto final, así como el valor nutrimental del mismo y de su potencial para ser conservado por varios días.

Para la elaboración del pozol son necesarias al menos ocho operaciones importantes. En cada una de ellas, la carga microbiana se ve afectada de manera crucial debido a la manera artesanal con que este producto es preparado.

El proceso de obtención del pozol inicia con la limpieza del grano de maíz, lo que comprende quitar la cascarilla, polvo, paja o cualquier otro agente extraño. Enseguida, los granos se cuecen utilizando agua del suministro municipal (agua de la llave) con 1 a 3% de hidróxido de calcio durante 60 a 180 minutos para llevar a cabo la nixtamalización, la cual es un proceso que data desde la época prehispánica y consiste en la lixiviación del grano de maíz, produciendo así importantes cambios físicos y químicos en el mismo, resultando en una masa apta para elaborar diversos productos, como tortillas, tamales y atole, entre otros. La nixtamalización incluye también un efecto nutricional sobre el grano de maíz, mismo que se ve reflejado en el incremento de su digestibilidad, mejoramiento en el balance isoleucina/leucina (favoreciendo así un mejor aprovechamiento de las proteínas) y la liberación de niacina (Camacho *et al.*, 2007).

La cocción con hidróxido de calcio finaliza cuando se separa el hollejo del grano de maíz; entonces se procede a lavar al nixtamal con agua de pozo, de río o potable, con el fin de eliminar la cal y el hollejo. Es importante que el lavado se realice antes de las cuatro horas de haber empezado la cocción ya que, de no ser así, el grano de maíz se impregna de cal, adquiere una tonalidad verde-azulosa y el sabor del pozol se vuelve picante (Cañas *et al.*, 1993).

Según el tipo de productor, la elaboración del pozol puede llevar o no una segunda cocción. El pozol indígena no comprende esta última, mientras que el pozol mestizo sí. Esta segunda cocción consiste en cocer el nixtamal en agua durante 3-8 horas hasta que el grano de maíz “reviente”, con la finalidad de que el producto final adquiriera una textura más tersa (Cañas *et al.*, 1993).

A continuación, los granos se dejan remojando con el agua del último lavado del nixtamal en el caso del pozol indígena; y en el agua de la segunda cocción para el pozol mestizo. Esto se hace durante toda la noche (aproximadamente 12 horas) con el fin de facilitar la remoción del pericarpio de los granos, ya que el pH alcalino y el calor de la nixtamalización, así como las 12 horas de reposo, incrementan su humedad hasta 48-51%, debilitando las paredes celulares por la solubilización parcial de la hemicelulosa; además suavizan la estructura del grano debido al

hinchamiento, a la destrucción parcial de los gránulos de almidón y a su incipiente gelatinización (Camacho *et al.*, 2007).

Tras el remojo, los granos son sometidos a una molienda gruesa para reducir el tamaño del mismo y hacer posible su posterior procesamiento. La molienda se lleva a cabo generalmente en un pequeño molino comercial, el cual se usa también para moler lotes de granos destinados a otros productos, como tortillas o tamales. Es importante resaltar que el molino es usado y re-usado durante todo el día sin que se lave entre lote y lote. Se ha visto que esta costumbre provoca que una cantidad importante de masa se quede en los recovecos del molino. Al final, el molino sólo es desmontado para remover los restos de masa sin el uso de agua potable (Wacher *et al.*, 1993).

Posteriormente, se lleva a cabo un amasado en el que se forman bolas de masa de 5-8 cm de diámetro y de 70-170 g (Méndez-Albores *et al.*, 2004). Esta operación se hace con las manos, generalmente sobre una tabla de madera que es ocasionalmente lavada.

Las bolas de masa son enseguida envueltas en hojas de árbol de plátano y se dejan reposar a temperatura ambiente para permitir la fermentación durante 2 a 7 o más días (Ben Omar *et al.*, 2000; Méndez-Albores *et al.*, 2004). Finalmente se obtiene un producto con características sensoriales muy especiales, debido a los atributos que otorga el proceso de fermentación a los alimentos; asimismo, permite su conservación por varios días, así como un aumento en su valor nutritivo.

## **Microbiota del pozol**

El proceso de fermentación del pozol es llevado a cabo por una microbiota mixta que incluye bacterias lácticas, enterobacterias, otras bacterias, levaduras, así como varios hongos filamentosos (mohos).

Las bacterias lácticas, además de contribuir en la conservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Además, los probióticos son cultivos puros o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran la salud. En este sentido, la mayoría de los probióticos pertenecen a las bacterias ácido lácticas y son usadas por la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud.

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Penna, 1998).

Es común la presencia de enterobacterias al inicio de las fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta, así como la transmisión de estos microorganismos por contaminación fecal directa o a través del agua utilizada. El pozol es un alimento muy manipulado, sobre todo en la molienda, el amasado y el moldeado. Procedimientos que se realizan en condiciones poco higiénicas, hecho que muestra el que sea probable que se aislen enterobacterias con propiedades patógenas. (Wacher *et al.*, 1993).

Se ha logrado establecer que la molienda del grano, una vez nixtamalizado, es la operación clave para que el pozol adquiera el inóculo que lo llevará a tener una microbiota compleja al final del proceso. La cantidad de masa que se va acumulando tras cada lote en el molino es la responsable de dicho inóculo, ya que, además de que la masa permanece ahí todo un día, los microorganismos logran mantenerse en el molino los días subsecuentes por lo tanto existe una fuente de microorganismos para los nuevos granos de maíz nixtamalizados que entran para ser molidos (Wacher *et al.*, 1993).

Las principales bacterias encontradas durante todo el proceso de fermentación son las bacterias lácticas, dentro de este grupo de bacterias predominan, bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella* (Morales, 2015).

### **Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Las BAL son microorganismos diversos aislados de diferentes entornos, como vegetales (maíz, repollo, cebada), carne, leche, plantas verdes, y también se han aislado del tracto digestivo y vagina de mamíferos. Se usan como cultivos iniciadores en la manufactura de productos lácteos como leches acidificadas, yogur y quesos; también son aplicadas comercialmente en el procesamiento de bebidas alcohólicas (vino, cerveza), carnes, vegetales, encurtidos, ensilajes y embutidos. Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos que producen como principal metabolito, al ácido láctico. Son organismos nutricionalmente exigentes y son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. Estas bacterias además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales (sabor, olor, textura) y aumentan la calidad nutritiva.

Las BAL son un grupo de bacterias representadas por diversos géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, en general son cocos o bacilos Gram-positivo, no esporulados, inmóviles, microaerófilos o aerotolerantes.

Las BAL son clasificadas dentro del grupo de las mesófilas (pero pueden crecer en rangos entre 4 y 45°C) y crecen en un pH mayormente ácido (Caplice, 1999). La característica primordial de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico a partir del metabolismo de hexosas, obteniendo su energía por una fosforilación a nivel de sustrato al carecer de un ciclo de Krebs funcional, obteniendo así ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono a partir de carbohidratos. Dependiendo del tipo de metabolismo por el cual se obtiene el ácido láctico, estas pueden clasificarse en homofermentativas que solo producen lactato como producto final de la vía Embden-Meyerhoff y heterofermentativas por producir lactato y etanol como productos finales mediante la vía de las pentosas; siendo las primeras las de mayor aplicación en la industria. Como resultado de estas vías metabólicas, también se

producen sustancias que le dan características deseables a los alimentos fermentados, tal es el caso del diacetilo, acetaldehído y algunos compuestos que pueden tener implicaciones positivas en la salud de los consumidores como algunas vitaminas, antioxidantes, y péptidos bioactivos. También se les considera como débilmente proteolíticas, aunque existen algunas excepciones (Caplice, 1999).

### ***Weissella***

Collins y sus colegas fueron los primeros en designar el género *Weissella* en 1993 después de los estudios taxonómicos sobre microorganismos atípicos similares a *Leuconostoc* que se derivan de las salchichas fermentadas producidas en Grecia. Collins *et al.* (1993) notaron que estas bacterias difieren de otras especies de *Leuconostoc* en una serie de pruebas bioquímicas. Además, las investigaciones sistemáticas moleculares sugirieron que los *Leuconostoc* podrían separarse en tres linajes genéticos distintos, es decir, el género *Leuconostoc sensu stricto*, el grupo *L. paramesenteroides* (que incluía también los lactobacilos atípicos) y la especie conocida entonces como *L. oenos* (que es actualmente clasificado como *Oenococcus oeni*). Un estudio a profundidad basado en análisis fenotípicos, bioquímicos y del gen 16S rRNA permitió la diferenciación del nuevo género *Weissella*.

Las bacterias que pertenecen al género *Weissella* son difíciles de separar de los miembros del género *Leuconostoc* o de los lactobacilos heterofermentativos únicamente sobre la base de características fenotípicas. Como se mencionó anteriormente, la taxonomía de las bacterias estrechamente relacionadas en estos grupos, y la nueva descripción del género *Weissella*, fue posible solo sobre la base de técnicas taxonómicas moleculares. El género *Weissella* recibió su nombre del microbiólogo alemán Norbert Weiss, conocido por sus numerosas contribuciones en el campo de la investigación de bacterias ácido lácticas (Collins *et al.*, 1993). Desde la descripción original del género por Collins *et al.* (1993), varias nuevas especies de *Weissella* se han descrito, por lo que actualmente el género comprende 19 especies validados. La clave para estas nuevas descripciones de especies en los

estudios relevantes fue la secuencia del gen 16S rRNA y los análisis de hibridación ADN: ADN, junto con los datos fenotípicos en un enfoque taxonómico polifásico. Así pues, hoy en día existen varias especies del género *Weissella*: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella viridiscens*, *Weissella thailandesis*, *Weissella cibaria*, *Weissella fabaria* y *Weissella koreensis* entre otras (Bjorkroth *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; De Bruyne *et al.*, 2010).

Las bacterias que pertenecen al género *Weissella* son células Gram-positivo, catalasa-negativo, que no forman endosporas con morfología cocoide o en forma de bacilos (Collins *et al.*, 1993 ; Björkroth *et al.*, 2014). Las especies de *Weissella* pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Leuconostocaceae* (Collins *et al.*, 1993). Solo se informó que *W. beninensis* es móvil (Padonou *et al.*, 2010), y que todas las demás especies no son móviles. Como en la descripción original del género *Weissella* (Collins *et al.*, 1993), las bacterias de este género se describieron como no móviles, esta característica móvil de *W. beninensis* no está de acuerdo con la descripción de las características generales de las bacterias en este género, y en consecuencia la descripción del género fue enmendado por Padonou *et al.* (2010) para explicar la motilidad atípica de esta especie en particular. Las bacterias *Weissella* son quimioorganótrofos anaeróbicos facultativos con un metabolismo obligatoriamente fermentativo. No poseen citocromos y fermentan la glucosa de forma heterofermentativa a través de las rutas hexosa-monofosfato y fosfocetolasa. Los productos finales de la heterofermentación de glucosa incluyen el ácido láctico (con algunas especies que producen solo D(-) y otros dos D (-) y L (+) enantiómeros de ácido láctico), gas (CO<sub>2</sub>) y etanol y / o acetato (Collins *et al.*, 1993 ;Björkroth *et al.*, 2014). Las bacterias tienen requisitos nutricionales complejos y necesitan péptidos, aminoácidos, carbohidratos fermentables, ácidos nucleicos, ácidos grasos y vitaminas para el crecimiento. Todas las especies crecen a 15 °C y algunas pueden crecer hasta 42-45°C. Producción de dextrano, la hidrólisis de esculina y la producción de amoníaco a partir de arginina son características variables para las diferentes especies, y se pueden utilizar como pruebas fenotípicas para ayudar en

la identificación de especies. Lo mismo se aplica para la fermentación de azúcares tales como celobiosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, sacarosa, trehalosa y xilosa. El peptidoglicano de la pared celular se basa en la lisina como el diaminoácido y, además de *W. kandleri*, todos contienen alanina o alanina y serina en el puente interpéptido (Björkroth *et al.*, 2009). El puente interpéptido de *W. kandleri* contiene glicina (Holzapfel y van Wyk, 1982 ; Björkroth *et al.*, 2009). El contenido en moles %G + C de las diferentes especies de *Weissella* oscila entre el 37 y el 47% que es lo estimado para poder diferenciar a este género con otras especies (Stackebrandt y Liesack, 1993).

### **Ecología**

Las bacterias del género *Weissella* habitan en una variedad de nichos ecológicos, incluido el suelo (principalmente *W. soli*) (Magnusson *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2005), lodo de máquinas de ordeño (*W. minor*) (Kandler *et al.* , 1983), sedimentos de un pantano costero (*W. cibaria* y *W. confusa*) (Zamudio-Maya *et al.*, 2008), sedimentos y peces del estuario de Bahía Blanca, (*W. viridescens*) (Sica *et al.*, 2010) agua del lago (*W. cibaria*) (Yanagida *et al.*, 2007) y plantas. Además en una gran variedad de alimentos fermentados, la cavidad oral, la leche materna, los tractos uro-genital y gastro-intestinal de los seres humanos, así como la piel, leche y el tracto gastro-intestinal de muchos animales.

Las especies de *Weissella* también se encuentran comúnmente en hábitats asociados con el cuerpo humano o animal, por ejemplo, el tracto gastrointestinal o en la leche materna humana. Se encontró que *W. cibaria* estaba presente en todas las muestras fecales de adultos sanos, pero con menor frecuencia en las muestras fecales de pacientes con enfermedad celíaca (Nistal *et al.*, 2012). Se demostró que *W. confusa* estaba más ampliamente distribuido en las heces de los pacientes con síndrome de intestino irritable que en las heces de los pacientes no afectados por esta enfermedad (Ponnusamy *et al.*, 2011). También se encontraron cuentas altas de *Weissella* spp. en la microbiota ileal de lechones alimentados con diferentes cantidades de óxido de zinc (ZnO), una molécula anfótera que se usa

ampliamente como aditivo en la alimentación para la profilaxis de la diarrea en lechones (Vahjen *et al.*, 2010). *W. confusa* se encontró en la leche materna, así como en las heces de madres y lactantes (Martín *et al.*, 2007a, Albesharat *et al.*, 2011), confirmando el mecanismo hipotético de transferencia vertical del intestino de la madre a la leche correspondiente y luego de la leche al intestino del bebé. En cuanto a la presencia de *Weissella* y otros microorganismos en la leche humana, los posibles mecanismos por los cuales estas bacterias pueden llegar a la glándula mamaria (es decir, ya sea por contaminación o por migración activa) han sido revisados recientemente (Jeurink *et al.*, 2013). Se ha sugerido (Lahtinen *et al.*, 2012) que las cepas *Weissella* de la leche humana proceden de una fuente ambiental (suelo, vegetación). De hecho, el modo de parto al nacer, el tipo de dieta, así como el estado de salud de humanos y animales pueden afectar la composición de la microbiota de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital.

#### **Cepas de *Weissella* asociadas con infecciones clínicas humanas**

Algunas cepas de *Weissella* se han aislado de muestras clínicas, tales como sangre, piel, heridas y heces de seres humanos y animales. Además de Kulwichit *et al.*, (2007), que identificaron una cepa de *Weissella* de la sangre de un paciente como *W. viridescens*, y otras de orina, torundas de pulmón y sangre de pacientes con bacteriemia como *W. cibaria*, las únicas especies de *Weissella*, que se han descrito como oportunistas de los humanos o como patógeno emergente para las truchas arco iris cultivadas son: *W. confusa* y *W. ceti*, respectivamente. En particular, *W. confusa* se aisló de varias muestras humanas y clínicas en casos de infecciones polimicrobianas (Green *et al.*, 1990, 1991; Riebel y Washington, 1990; Bantar *et al.*, 1991; Olano *et al.*, 2001; Björkroth *et al.*, 2002). Posteriormente, esta especie también se describió como el único agente microbiano en diversas infecciones que permitió la descripción de *W. confusa* como un patógeno oportunista.

Según lo sugerido por varios autores (Lahtinen *et al.*, 2012; Fairfax *et al.*, 2014; Medford *et al.*, 2014), las infecciones causadas por *Weissella*, como las causadas por *Leuconostoc*, se deben principalmente a su resistencia natural a la vancomicina, y generalmente ocurre en casos de inmunosupresión o enfermedad subyacente del

huésped. Sin embargo, las infecciones causadas por *Weissella* spp. son generalmente raras, aunque puede haber una subestimación como resultado de la incapacidad de los sistemas comerciales de identificación bacteriana.

### **Determinación de virulencia en *Weissella***

La seguridad de muchas especies de BAL ha sido reconocida como GRAS (Generalmente reconocido como seguro, para E.U.; Food and Drug Administration(FDA)) o han logrado el QPS (Calificación presuntiva de seguridad) por la European Commission; European Food Safety Authority (EFSA).

De hecho, muchas personas se refieren a estas bacterias como inocuas, e incluso asociadas con propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, se sabe que ciertas especies dentro de un género, o incluso ciertas cepas dentro de una especie específica, puede tener diferentes impactos en la salud, como ha sido señalado para los Enterococos (Franz *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008). Hasta el momento, ninguna especie *Weissella* tiene QPS.

Datos sobre los factores de virulencia presentes en las especies de *Weissella* son muy escasos y el análisis genómico puede ayudar a detectar y describir la aparición de determinantes de virulencia que pueden estar presentes en alguna cepa de este género. En este sentido, Ladneret (2013) ha encontrado en la secuencia del genoma de *W. cети* NC36, un patógeno emergente de la trucha arco iris cultivada en los Estados Unidos, la presencia de varios genes putativos del factor de virulencia, que no tenía homólogos codificados en cualquiera de otros genes secuenciados del género *Weissella*. En particular, éstos incluyen cinco genes de adhesina de colágeno (WCNC\_00912, WCNC\_00917, WCNC\_00922, WCNC\_05547 y WCNC\_06207). Los cinco genes de adhesina de colágeno incluyen los de *W. cети* WS105 (tres adhesinas de colágeno) y *W. confusa* LBAE C39-2 (una adhesina de colágeno).

El papel en la virulencia de *Weissella*, de los genes anteriores mencionados aún se desconoce. Se necesitan más estudios para confirmar si estos genes de la virulencia se expresan por sí solos y si se ubican en elementos genéticos móviles (por ejemplo, transposones).

### **Exopolisacárido**

La capacidad de producir dextrano es una de las características fenotípicas distintivas del género *Weissella* (Collins *et al.*, 1993; Björkroth y Holzapfel, 2006). En particular, las cepas de *W. confusa* y *W. cibaria* han recibido una gran atención en la última década debido a su capacidad para producir cantidades significativas de dextrano, fructanos, heteropolisacáridos y oligosacáridos no digeribles. Estos últimos están aumentando el interés debido a su potencial prebiótico, ya que pueden disminuir el riesgo de infecciones y diarrea, aumentar la función intestinal y el metabolismo, y pasar a través del tracto gastrointestinal y estimular el crecimiento de bacterias benéficas, principalmente las bifidobacterias (Rastall y Gibson, 2014). Además de su beneficio para la salud postulado, los oligosacáridos prebióticos pueden usarse en una amplia gama de aplicaciones en la industria clínica, cosmética, alimentaria como edulcorantes, humectantes, posibles agentes de control del peso y fibras dietéticas (Patel y Goyal, 2011).

Los dextranos producidos por *Weissella* spp. tienen estructuras similares con enlaces principalmente (aproximadamente 97%)  $\alpha$ - (1-6) y solo el 3% de enlaces  $\alpha$ - (1-3). Esto hace que las cepas de *W. cibaria* y *W. confusa* que producen dextrano sean muy atractivas para una amplia gama de aplicaciones industriales, especialmente para aplicaciones en panadería y para la producción de bebidas funcionales fermentadas basadas en cereales.

### ***Weissella confusa***

*Weissella confusa* se ha detectado en caña de azúcar, jugo de zanahoria, cereales y ocasionalmente en leche cruda (Bjorkroth *et al.*, 2002; Katina *et al.*, 2009). Asimismo, se ha visto que está presente en el intestino humano, como parte de la microbiota normal (Nam *et al.*, 2002). Es un bacilo Gram positivo, catalasa negativo, no esporulado, no móvil, heterofermentador y produce los enantiómeros D y L de ácido láctico cuando fermenta la glucosa por la vía de las pentosas-fosfato (heterofermentador). Es capaz de utilizar la glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y

algunas pentosas de los cereales en los que se encuentra (Katina *et al.*, 2009). El amoníaco y el ácido que resulta de la descomposición de la arginina se produce a partir de celobiosa, galactosa, ribosa, salicina, sacarosa y xilosa, pero no a partir de la fermentación de arabinosa, lactosa, melibiosa, rafinosa y trehalosa. El dextrano que produce se forma a partir de sacarosa. El contenido de % en moles de G + C del ADN es 45-47% (Collins *et al.*, 1993).

Por otro lado, dicha bacteria se ha aislado de diferentes alimentos, como salami griego, carne con chilli y leche cruda, así como también del pozol y otros alimentos fermentados (Ampe *et al.*, 1999; Bjorkroth *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2002). De acuerdo a Nam (2002) fue propuesto como un cultivo iniciador, y también como probiótico que proporciona diversos efectos beneficiosos para la salud, tal como la inhibición de *Helicobacter pylori*, una bacteria que causa inflamación crónica y úlceras en el estómago (Nam *et al.*, 2002).

Se ha visto, sin embargo, que *W. confusa* no se encuentra presente durante todas las etapas de fermentación de los alimentos y además no es una especie dominante. Se ha reportado que, en general, las cepas de *Weissella* se encuentran presentes sólo en las etapas intermedias de la fermentación (Bjorkroth *et al.*, 2002), por lo que se ha sugerido que existen factores u otras especies bacterianas que pudieran inhibir su crecimiento.

### **Resistencia térmica de Bacterias Ácido Lácticas**

La temperatura es uno de los principales factores que influye en la viabilidad y desarrollo de los microorganismos, al producir una gran variedad de cambios estructurales y funcionales que pueden conllevar a un descenso progresivo en el número de células viables o su muerte tras una exposición prolongada a temperaturas por encima de la óptima. La termorresistencia de un microorganismo está determinada por su capacidad para soportar un tratamiento térmico máximo.

Algunos factores que afectan la resistencia térmica de las bacterias son; la fase de crecimiento de células en estudio, el pH del medio, la concentración de sales,

azúcares, grasas; la disminución del  $A_w$  y la combinación con otros agentes tales como presión, congelación, descongelación; entre otros (Stumbo, 1973). Los métodos tradicionales para estudiar los mecanismos de inactivación y muerte térmica, se han enfocado en establecer las alteraciones que el calor produce en componentes celulares como las proteínas, ARN y la irreversible desnaturalización de las membranas y/o ácidos nucleicos, además de ciertas enzimas (Hurst, 1977). Las transiciones en los componentes celulares pueden detectarse mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC), a través de un patrón de picos que muestran el proceso de desnaturalización como una función del tiempo y de la temperatura (Lepock *et al.*, 1990; Mackey *et al.*, 1991).

### **Tiempo de reducción decimal o valor D**

Se conoce que la muerte de un microorganismo a una temperatura elevada sigue una cinética de primer orden, mediante la cual, a temperatura constante, la cuenta de microorganismos viables disminuye, de manera que es directamente proporcional a la concentración presente en un tiempo en particular. El valor D se define como el tiempo durante el cual se elimina 10 veces la cuenta inicial en un intervalo de tiempo, independientemente del número actual (Rees y Bettison, 1991).

En términos generales, el tiempo de reducción decimal (valor D), es el tiempo necesario para destruir el 90% de la población microbiana de un determinado microorganismo a una temperatura dada, y se ha usado como modelo de inactivación bacteriana dado que puede ser extrapolado a un proceso industrial (Lee and Kaletunc, 2002; Vasan *et al.*, 2013) (Fig. 1).

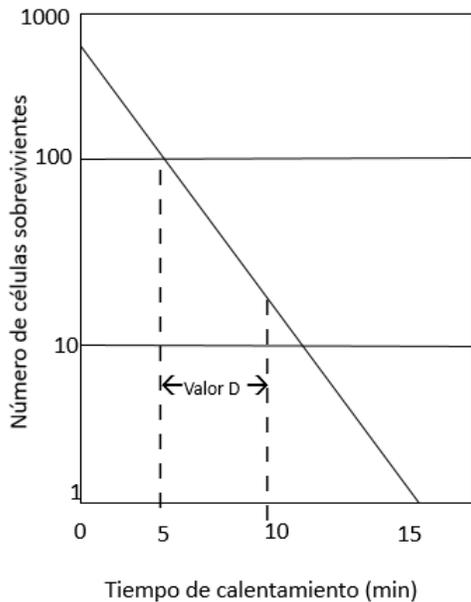


Figura 1. Representa la reducción de un ciclo logarítmico en un factor de 100 a 10 a una temperatura de calentamiento constante que ejemplifica el tiempo de reducción decimal (Valor D) (Lee and Kaletunc, 2002; Vasan et al., 2013).

### **Proteínas de choque térmico**

Las proteínas de choque térmico (Hsp) pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células pro y eucariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas y la inducción de otras, de la misma familia, que no son constitutivas. Su función es minimizar los daños producidos por el estrés. Las células en cultivo responden de manera similar a cambios en su medio ambiente habitual o situaciones de estrés, iniciándose una respuesta que implica la síntesis de un conjunto de proteínas, conocidas bajo la común denominación de Hsp (Heat shock proteins) o proteínas antiestrés. La denominación proviene del hecho en el que se detectaron inicialmente producidas por un estrés térmico en *Drosophila* (Ritossa, 1962). En cambio, si el estrés aumenta, la función protectora de las Hsp se ve sobrepasada deteniéndose su producción y activándose el programa de apoptosis (Samali, 1996).

Las células normales son capaces de expresar constitutivamente muchas proteínas antiestrés, que intervienen en procesos metabólicos esenciales como la síntesis, plegamiento y ensamblaje de otras proteínas. Dentro de los factores que aumentan la producción de las Hsp constitutivas se encuentran, el proceso de mitosis, la acción de factores de crecimiento y procesos de diferenciación celular (Kindas-Muggel, 1994; Welch, 1993; Trautinger *et al*, 1990). El plegamiento de una proteína es el proceso por el cual la información lineal contenida en la secuencia de aminoácidos obtiene la conformación tridimensional típica de cada proteína funcional, siendo un proceso dependiente de ATP. En años recientes se ha comprobado que para determinadas proteínas, este proceso requiere de la preexistencia de otras, denominadas chaperonas, que no formarán parte de la estructura final de la proteína funcional (Fig. 2).

El grupo de Hsp que no son constitutivas de la célula sino que son inducibles por estrés, cumple funciones de protección que abarcan, desde la eliminación de proteínas desnaturalizadas, hasta el aumento de la producción de otras proteínas requeridas por la célula. La acumulación intracelular de proteínas desnaturalizadas o plegadas defectuosamente por efecto de una situación de estrés, desencadena una respuesta que consiste en la producción de altos niveles de Hsp, que facilitan el reordenamiento de las proteínas defectuosas.

La rápida inducción de Hsp es debida a la activación del factor de transcripción (HSF1), que incrementa la actividad de los genes que codifican estas proteínas (Morimoto *et al*, 1990). La mayor estabilidad del ARNm de las Hsp sería una respuesta adaptativa primaria temprana, que pudo haber contribuido a establecer mecanismos de defensa hacia distintos tipos de estrés (Huot *et al.*, 1996).

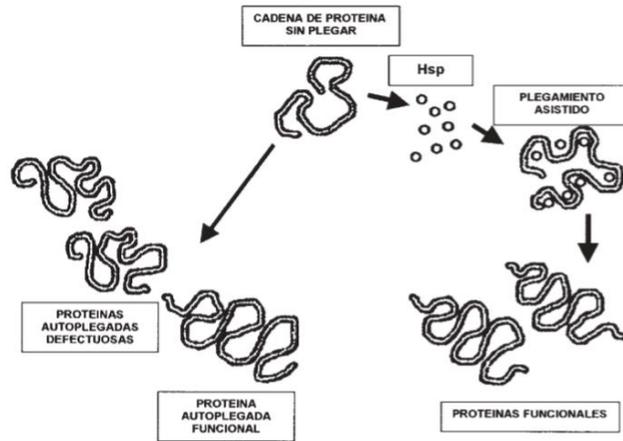


Figura 2. Plegamiento protéico asistido por Hsp (Kindas- Muggel, 1994; Welch, 1993; Trautinger *et al*, 1990).

### Proteínas chaperonas

Se conoce con este nombre a aquellas proteínas que acompañan a otras proteínas estabilizando las formas inestables, actuando por medio de uniones y desuniones controladas, facilitando el ensamblado, la correcta unión de oligómeros, su transporte a otro compartimento celular o la disposición para la degradación. Previenen interacciones incorrectas entre polipéptidos, aumentando el rendimiento de las reacciones de ensamblado aunque no su velocidad (Ulrich, 1996). Una característica genérica de las proteínas chaperonas, es que involucran reacciones dependientes de ATP en los procesos en que actúan. La cooperación entre diferentes chaperonas crea una red sinérgica, para el plegamiento de las proteínas celulares que mantiene la homeostasis bajo condiciones no permisivas para los plegamientos espontáneos (Beissinger *et al.*, 1998).

Dentro de las funciones de las proteínas chaperonas se encuentran:

- Unión de las cadenas nascentes de polipéptidos a fin de lograr el retardo transitorio en su plegamiento hasta que la síntesis se complete.
- Establecimiento de la conformación adecuada de dichas cadenas, para su translocación a través de las membranas de los organelos.

- Impedimento de la agregación intermolecular o intramolecular y transporte de metabolitos tóxicos para su degradación por proteosomas (Benjamin *et al.*, 1998).

La superfamilia de las HSPs agrupa una serie de familias que se clasifican de acuerdo con sus pesos moleculares: proteínas de alto, medio y bajo peso molecular. La familia HSPs70, de peso molecular medio, no sólo es la más común sino también la más abundante de las chaperonas moleculares (Cascales, 2002). Los genes que codifican la familia HSP70, están muy conservados evolutivamente (Silver y Way, 1993). Las distintas isoformas de la HSPs70 difieren en sus niveles basales de expresión e inducción, y así, algunos de sus miembros se sintetizan de manera constitutiva como la HSP73 refiriéndose como HSP70c y otras son inducidas por estrés como la HSP72 (HSP70i).

### **HSPs70**

La familia de las HSPs70 (en eucariotas: HSP68, HSP72, HSP73 y GRP78), son un grupo de ATPasas muy conservadas en la escala filogenética, especialmente en su dominio N-terminal (ATPasa) y en el sitio de unión al sustrato (Cascales, 2002). La característica más importante del funcionamiento de las HSPs70 son los ciclos de unión y liberación de moléculas sustrato (proteínas sin configuración espacial adecuada), dependiente de ciclos de hidrólisis del ATP y de cambios conformacionales (Keller, 1999). Las HSPs70 son esenciales en el plegamiento de proteínas, unión y desunión de oligómeros, traslocación de proteínas o degradación de las mismas (Ruddon y Bedows, 1997).

## **Justificación**

*Weissella confusa* es un microorganismo que ha sido identificado en la mayoría de los estudios sobre la fermentación del pozol y es uno de los que predominan durante la misma. Además, se ha determinado que es capaz de hidrolizar y consumir xilooligosacáridos presentes en el nixtamal. Debido a esto es importante estudiar el efecto de las temperaturas altas en la sobrevivencia de esta bacteria.

## **Hipótesis**

Ya que se ha aislado a *Weissella confusa* del pozol, cuyo sustrato, el maíz, recibe tratamiento térmico y alcalino de la nixtamalización, será capaz de sobrevivir a temperaturas altas.

**Objetivo General**

Determinar la resistencia térmica de *Weissella confusa* cepas L9 y 3A.

**Objetivos particulares**

Determinar hasta qué valores de temperatura las cepas evaluadas son capaces de resistir.

Determinar su valor D, usando el método de cuenta en placa para cuantificar sobrevivientes.

## Metodología

Se trabajó inicialmente con la cepa *Weissella confusa* L9 y cuando se obtuvieron datos experimentales de la misma, se realizó el mismo experimento con la cepa *Weissella confusa* 3A (López-Hernández *et al.*, 2018; ambas cepas forman parte de la colección de cultivos del laboratorio 324, del conjunto E de la Facultad de Química) para observar si existían diferencias entre cepas y al final compararlas. Para realizar el experimento se llevó a cabo lo siguiente:

- Reactivación de las cepas de *W. confusa*.

Se utilizaron las cepas *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A, previamente aisladas y crioconservadas en glicerol (-70°C) en ultracongelador (marca Puffer Hubbard, modelo IUF7513ABA). Para su reactivación se inocularon 50µL de *W. confusa* L9 en 5 mL de caldo APT y 5 mL de caldo MRS, respectivamente y se incubaron a 30°C en incubadora (marca Binder). Después de 24 horas se tomaron 50µL del mismo vial y se inocularon en 5mL de caldo APT y 5 mL de caldo MRS y se incubó a 30°C por 20 horas.

- Evaluación de la pureza e identificación de las características macroscópicas y microscópicas de la cepa.

Para evaluar las características microscópicas, se llevaron a cabo un frotis y una tinción de Gram de *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A con crecimiento de 24 horas en caldo APT y se observó al microscopio con el objetivo de 1000x.

Para evaluar las características macroscópicas, se inoculó con *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en cajas Petri con agar APT, que se incubaron a 30°C durante 24 horas y se observó la morfología del crecimiento.

- Curva de crecimiento de *Weissella confusa* L9 y 3A en caldo APT y MRS a 30°C

Se inocularon 5 mL de *W. confusa* L9 y 3A (cepas reactivadas tal como se describió previamente) en 150 mL de caldo APT y de caldo MRS, se incubaron a 30°C, se midió la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (marca Thermo scientific, modelo Genesys IOS UV-Vis) y al mismo tiempo se midió el pH en el potenciómetro

(marca Oakton, modelo pH 700), cada hora durante 10 horas continuas y se midió un último punto a las 24 horas para cada caldo por duplicado.

- Evaluación de la resistencia térmica de *W. confusa* L9 y 3A a diferentes temperaturas

Para hacer la curva se inocularon 5 mL de *W. confusa* L9 previamente reactivada en 150 mL de caldo APT, tomando esta parte como tiempo cero, se incubaron a 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C; se midió la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro y al mismo tiempo se midió el pH en el potenciómetro cada hora durante 10 horas continuas y se midió un último punto a las 24 horas se realizó por triplicado.

Además, en las temperaturas 50, 55 y 60°C se llevó a cabo el método de cuenta en placa para determinar sobrevivientes, se tomaron muestras de 0.5 mL en los tiempos 0, 3, 6, 9 y 12 horas después de iniciada la fermentación y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  de cada tiempo. Se inocularon por duplicado las últimas tres diluciones de cada tiempo con 100 $\mu$  de cultivo en cajas con agar APT y se incubaron a 30°C por 24 horas, pasado este tiempo se realizó el conteo de sobrevivientes.

Para llevar a cabo la curva de *W. confusa* 3A, se inocularon 5 mL de la cepa previamente reactivada en 150 mL de caldo APT, tomando ésta como tiempo cero. Se incubaron a 30, 37, 45, 48, 49, 50, y 52°C; se midió la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro y al mismo tiempo se midió el pH en el potenciómetro cada hora durante 10 horas continuas y se midió un último punto a las 24 horas se realizó por triplicado.

Además, en las temperaturas 49, 50 y 52°C se llevó a cabo el método de cuenta en placa para determinar sobrevivientes, se tomaron muestras de 0.5 mL en los tiempos 0, 3, 6 y 9 horas después de iniciada la fermentación y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  de cada tiempo. Se inocularon por duplicado las últimas tres diluciones de cada tiempo con 100 $\mu$  de cultivo en cajas con agar APT y se incubaron a 30°C por 24 horas, pasado este tiempo se realizó el conteo de sobrevivientes.

- Determinación del valor D

- a) Preparación del inóculo

Se inoculó la bacteria en 10 mL de caldo APT con 330  $\mu$ L de cultivo de *W. confusa* (preparada como se explicó en la reactivación de la cepa). Se incubó a 30°C durante 6 horas y después de este tiempo se concentraron las células, se lavaron con solución salina al 0.8% y se centrifugaron a 10,000 rpm, 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 mL de solución salina al 0.8%. Esta solución se utilizó como inóculo para la determinación del valor D, del cual se tomó 1 mL y se inoculó un tubo con 9 mL de caldo APT que se incubó en un baño de agua a las temperaturas de 52°C y 55°C respectivamente.

- b) Experimento valor D

Se tomaron muestras de 0.5 mL en los tiempos 0, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 30, 60 y 80 minutos después de iniciada la fermentación y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  de cada tiempo. Se inocularon por duplicado las últimas tres diluciones de cada tiempo con 100  $\mu$ L de caldo en cajas con agar APT y se incubaron a 30°C por 24 horas.

- c) Determinación del valor D

Después de las 24 horas de incubación se realizó un conteo de los sobrevivientes y se realizó una tabla en donde se vaciaron todos los datos obtenidos de los conteos para cada tiempo, después se calculó el logaritmo base 10 de las UFC contabilizadas y se graficó contra el tiempo. Se obtuvo una regresión lineal en donde se extrapolo el tiempo de reducción decimal (valor D).

El experimento se realizó por duplicado.

Se realizó un análisis de varianza de un factor con  $\alpha=0.05$  en tres partes, la primera y la segunda consistieron en evaluar diferencias significativas entre temperaturas para *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en tres puntos diferentes de cada una de las cinéticas de crecimiento (2, 6 y 9 horas y 4, 6 y 9 horas, respectivamente) y en la tercera se evaluaron diferencias significativas entre cepas.

Con los valores de absorbancia y pH obtenidos en las curvas de crecimiento a diferentes temperaturas para cada cepa en cada uno de los tiempos de incubación de cada experimento se realizó un análisis de varianza y por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan se identificó la o las temperaturas que presentaron mayor diferencia significativa es decir en donde las cepas ya no presentaron un incremento estadísticamente significativo en su crecimiento al ser sometidas a altas temperaturas. Con estos valores de las dos cepas en los diferentes tratamientos de incubación evaluados en cada experimento se realizó un análisis de varianza de tipo factorial aleatorio para las variables: cepas, temperatura y la interacción entre cepas x temperatura de incubación y con la prueba de Student, Tukey y Duncan se identificó la temperatura máxima de crecimiento para cada cepa (Anexo).

## Resultados

### Verificación de la pureza

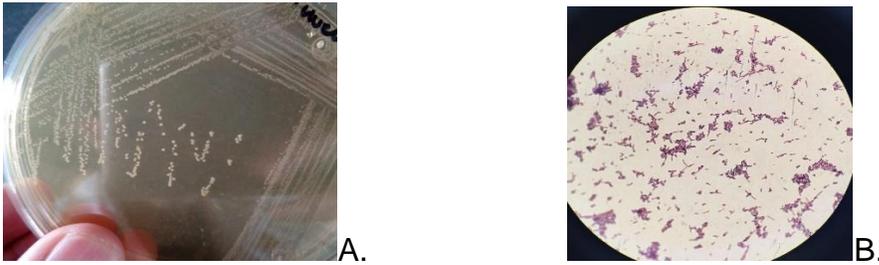


Figura 3. A. Se observaron colonias homogéneas, color beige, redondas y convexas para la cepa *W. confusa* L9. B. Se observó al microscopio con un objetivo de 100x bacterias Gram-positivo, uniformes y homogéneas para la cepa *W. confusa* L9.

### Experimentos con *Weissella confusa* L9.

En la figura 4, se observa en las primeras tres horas el crecimiento de *W. confusa* L9 en caldo MRS y en caldo APT la misma fase Lag, en la que las células se están adaptando a las condiciones del medio que son diferentes para cada caso. El medio MRS es usado para evidenciar el crecimiento de lactobacilos y bacterias ácido lácticas y contiene citrato de amonio para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (-) y el medio APT es usado para cultivar lactobacilos heterofermentativos (Difco™, 2018). A partir de la cuarta hora se observa que en el caldo ATP llega a una fase de crecimiento logarítmico más rápido que en el caldo MRS. Esto se puede deber a que el medio APT en su formulación tiene un mayor contenido de sustancias que proveen los iones usados para la replicación del microorganismo, tales como el cloruro de manganeso y el sulfato de magnesio, además de contener sulfato de hierro que el caldo MRS no lo contiene (Difco™, 2018). A partir de la séptima hora el cultivo en el medio APT presentó un máximo para luego decrecer en las siguientes horas, entrando en la fase estacionaria, en la cual ya no hay replicación de la bacteria y comienza a morir. En cambio, en el medio MRS se observó un comportamiento diferente, ya que la bacteria siguió creciendo, pero a menor velocidad. Alcanza la fase log tardía hasta la décima hora, iniciando la fase estacionaria; sin embargo, el máximo se observó hasta las 24 horas cuando presentó una mayor absorbancia.

El pH de los caldos APT y MRS incubados a 30°C siguió el mismo patrón que en la figura 4, ya que a mayor crecimiento del microorganismo se espera que produzca más ácido láctico. En el caldo MRS a partir de la hora siete se observa una reducción de pH mayor a la que se presenta en el caldo APT. A la hora 5 el caldo APT tiene el mismo pH que el caldo MRS. Estos resultados son congruentes, ya que 5 horas después de comenzada la fermentación se obtuvo aproximadamente la misma absorbancia en el caldo APT que en el MRS, lo que significa que el número de microorganismos presentes en esta hora es similar.

Comparando los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el medio APT para tener un mayor control sobre el crecimiento de las cepas además que ya se había observado en experimentos anteriores el excesivo crecimiento de las cepas en el medio MRS y no se obtienen datos reproducibles.

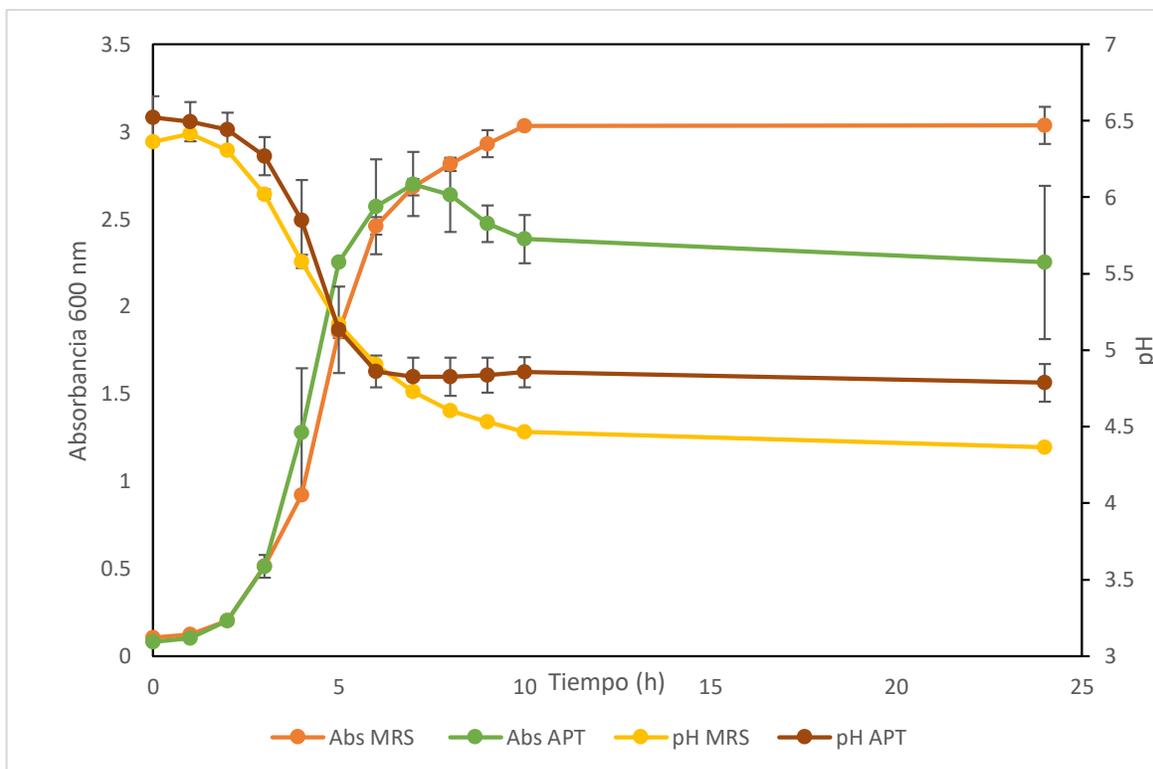


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Weissella confusa* L9 en caldo APT y en caldo MRS a 30°C durante 24 horas. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Se evaluó la resistencia térmica de *Weissella confusa* L9 midiendo su sobrevivencia en el caldo APT a diferentes temperaturas: 30, 37, 45 y 50°C en un lapso de 24 horas en las cuales se midió la densidad óptica a 600 nm cada hora durante 10 horas y se midió un último punto a las 24 horas.

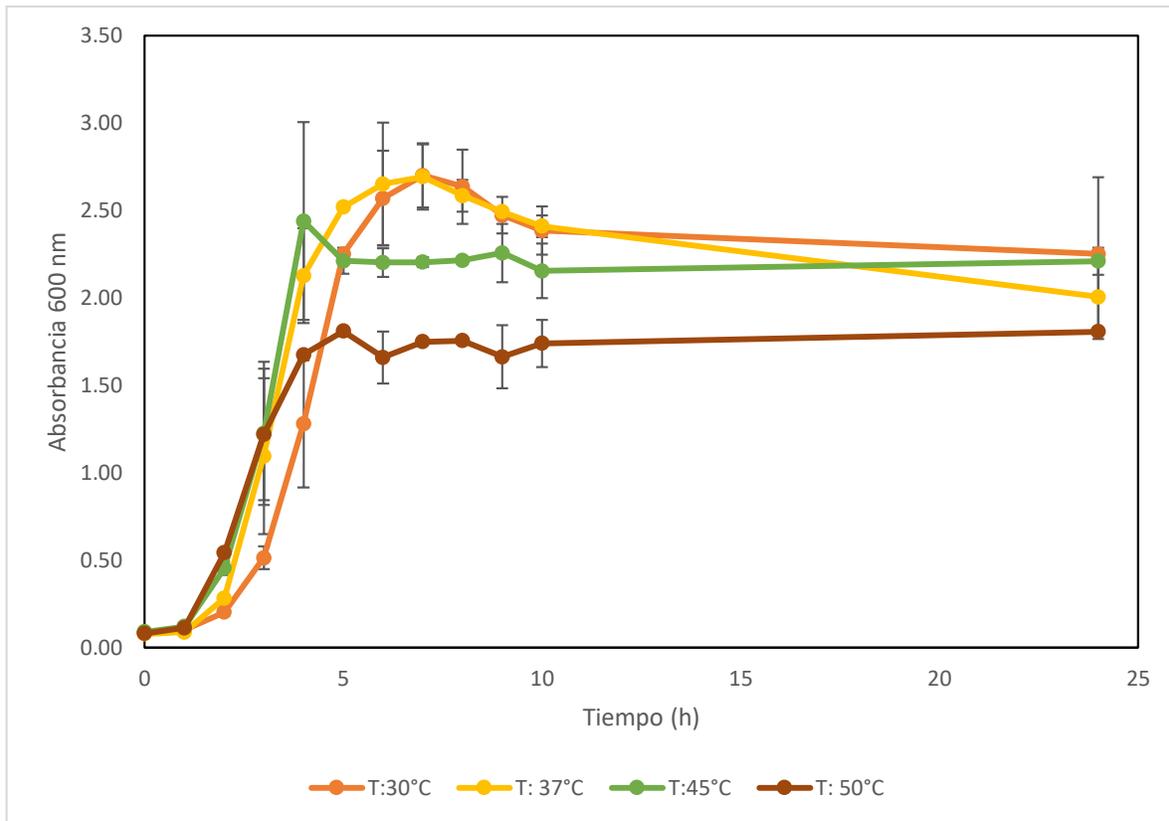


Figura 5. Evaluación de resistencia térmica en curva de crecimiento de *W. confusa* L9 en caldo APT incubada a temperaturas de 30, 37, 45 y 50°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

De acuerdo con la literatura, las temperaturas en las que puede crecer *W. confusa* son 25, 35 y 42°C (Olano *et al.*, 2001; Vásquez *et al.*, 2015). A 30°C la bacteria presentó una fase log que comenzó una hora más tarde que en las demás temperaturas. A 45 y 50°C alcanzó más rápido esta fase; sin embargo a 45°C presentó un pico máximo muy notorio en comparación con las demás temperaturas cuatro horas después de comenzar la fermentación y a partir de esta hora disminuyó

significativamente, entrando en la fase estacionaria, en la cual el número de células que muere es mayor que las que se replican (“Crecimiento microbiano”, 2018)

La curva de 50°C se llevó a cabo para observar el comportamiento de la bacteria a esta temperatura ya que de acuerdo con la literatura la temperatura máxima de crecimiento de *W. confusa* (aislada de un caso de bacteremia humana) el máximo es de 42°C (Olano *et al.*, 2001). Se realizó la curva de crecimiento de la cepa a 50°C y la bacteria creció e inclusive presentó una fase log antes de la que presentó la temperatura óptima (30°); sin embargo, su crecimiento fue menor que en las demás temperaturas y presentó un máximo a las diez horas después de la fase estacionaria. En las temperaturas 30 y 37°C presentó un comportamiento similar después de la sexta hora; sin embargo de acuerdo con lo observado en la figura 5, la temperatura que más favorece su crecimiento es 37°C, ya que entra en la fase log aproximadamente una hora antes que la que se observó a los 30°C.

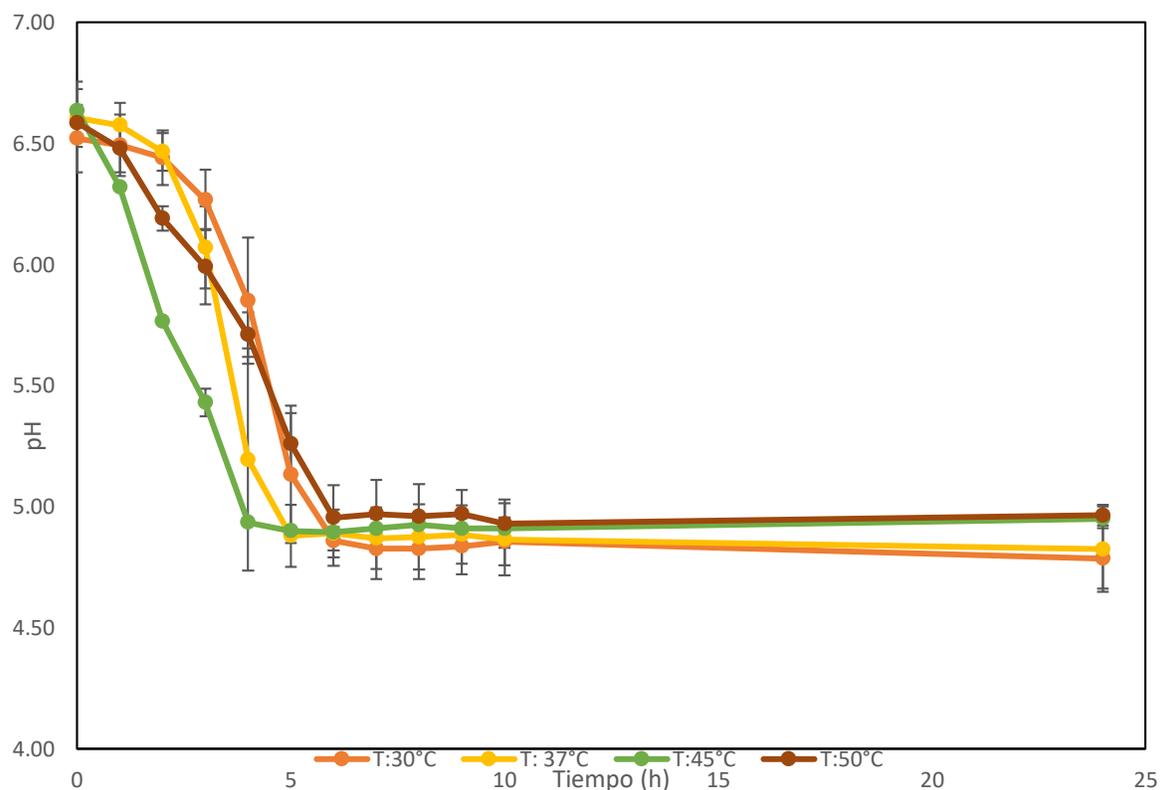


Figura 6. Valor de pH en la curva de crecimiento de *Weissella confusa* L9 en caldo APT incubada a temperaturas de 30, 37, 45 y 50°C. Se presentan promedios de

tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Como se mencionó anteriormente para cada curva de crecimiento se llevaron a cabo las determinaciones de absorbancia y de pH (figura 6). La sobrevivencia de la cepa fue congruente con lo que se observó en la figura 5, ya que a mayor absorbancia el descenso de pH fue mayor y a menor absorbancia el pH fue mayor, que fue el caso de la temperatura a 50°C.

Debido a que *Weissella confusa* L9 fue capaz de sobrevivir a una temperatura de 50°C, se evaluó también a las temperaturas 55°C y 60°C, con el principal objetivo de observar si presentaba sobrevivencia y si sus características macroscópicas y microscópicas eran similares a las mostradas en su temperatura óptima.

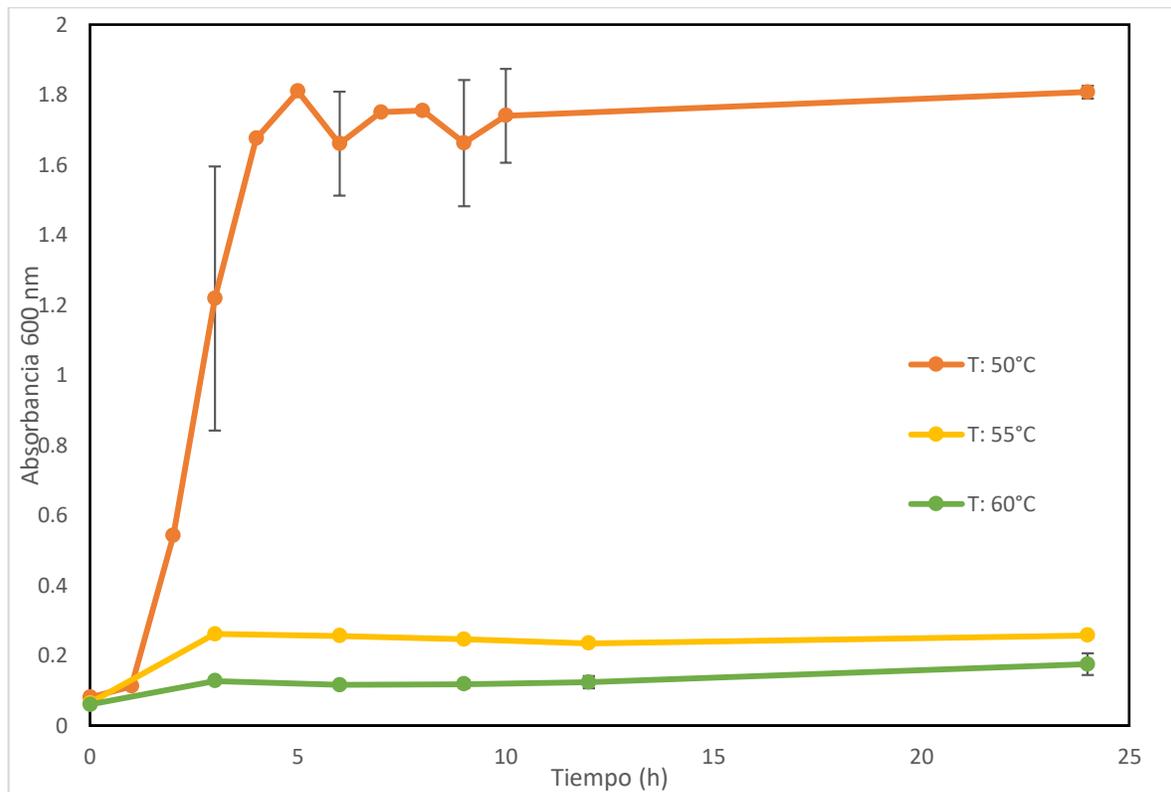


Figura 7. Evaluación de resistencia térmica en curva de crecimiento de *W. confusa* L9 en caldo APT incubada a temperaturas de 50, 55 y 60°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

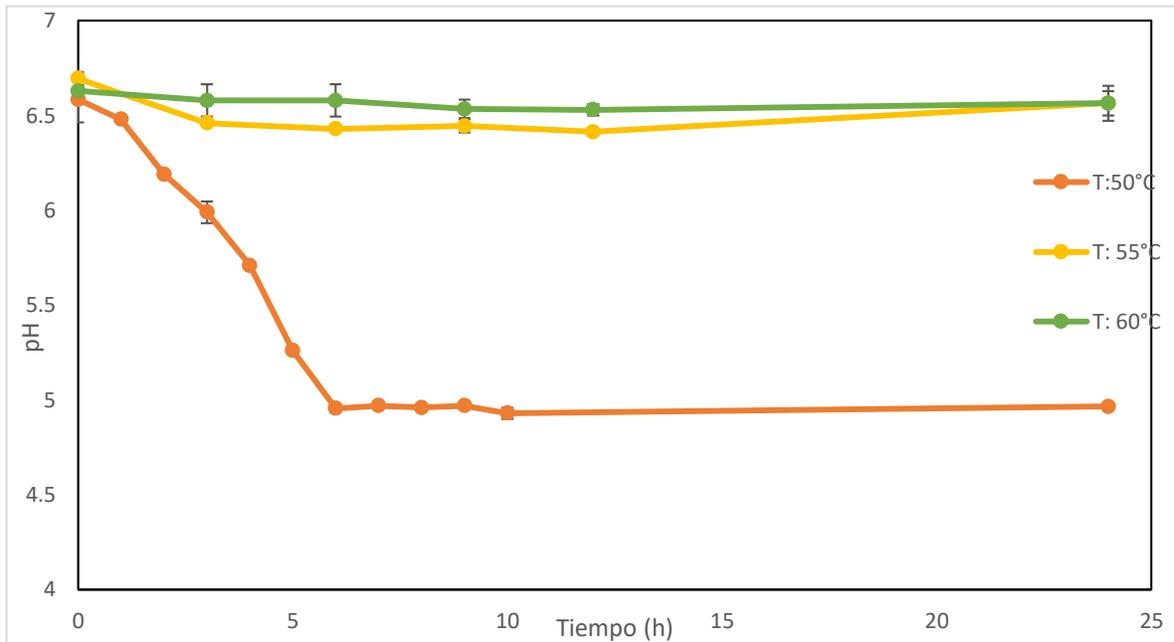


Figura 8. Valor de pH en la curva de crecimiento de *Weissella confusa* L9 en caldo APT incubada a temperaturas de 50, 55 y 60°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Se evaluó la sobrevivencia de la cepa *Weissella confusa* L9 a 50, 55 y 60°C para determinar su termorresistencia (Figuras 7, 8 y 9). Su crecimiento en la densidad óptica no fue afectado a 50°C, comparado con 55°C; sin embargo, a 55°C, se observan sobrevivientes después de las primeras tres horas de iniciada la fermentación (Figura 7). Esto se corrobora con los resultados mostrados en la figura 8 en la que después de las tres horas de fermentación a 55°C ya no hay cambios significativos en el descenso de pH, y después de este tiempo se detiene el crecimiento para iniciar un proceso de sobrevivencia, en el cual permanece hasta las seis horas (figura 9) para después morir. A 60°C no fue capaz de sobrevivir (Figuras 7, 8 y 9), ya que de acuerdo con los datos de absorbancia, después de las 3 horas de fermentación la bacteria entro en la fase estacionaria. Sin embargo, en la cuenta microbiana se comprobó que a partir de esta hora la bacteria ya no fue capaz de crecer, lo que también se corroboró con el pH porque no hubo un descenso significativo del valor inicial.

Se ha observado que cuando las bacterias lácticas son sometidas a estrés, pueden sobreexpresar unas proteínas llamadas proteínas del choque térmico (Hsp, del inglés Heat Shock Proteins) (Papadimitriou *et al.*, 2016). Varias Hsp funcionan como “chaperonas moleculares” impidiendo la agregación y promoviendo el repliegamiento adecuado de las proteínas desnaturalizadas (Lomiwes *et al.*, 2014), proporcionando propiedades de termorresistencia a estas bacterias.

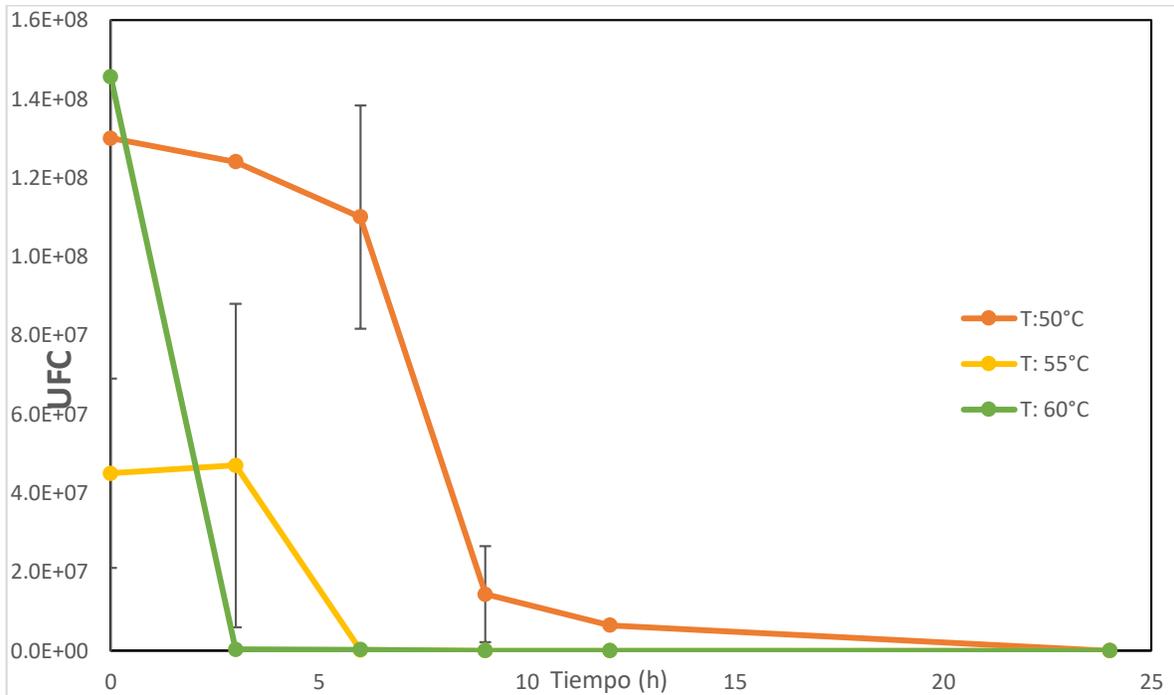


Figura 9. Resultados del conteo en placa de *Weissella confusa* L9 en curvas de crecimiento a las temperaturas 50, 55 y 60°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Se determinó entonces el valor D a 55°C.

Las cuentas que se obtuvieron por el método de cuenta en placa se utilizaron para hacer el ensayo térmico de *Weissella confusa* L9 en caldo APT a 55°C. Se realizó la gráfica de Log ufc/ml contra el tiempo para evaluar la resistencia de las células al calor. Se muestra la línea de regresión lineal ajustada que se describe con la siguiente ecuación:  $\text{Log UFC/mL} = -0.1161 (t) + 8.8403$ ,  $r^2 = 0.993$ , en donde  $\text{Log UFC/mL} = \text{Log UFC/mL}$ ,  $t = \text{valor D (min)}$ ,  $r^2 = \text{valor de regresión lineal}$  (figura 9), por lo tanto, el tiempo necesario para destruir el 90% de la población microbiana de *W. confusa* L9 a una temperatura de 55°C es de 8 minutos ( $D_{55} = 8 \text{ min}$ ).

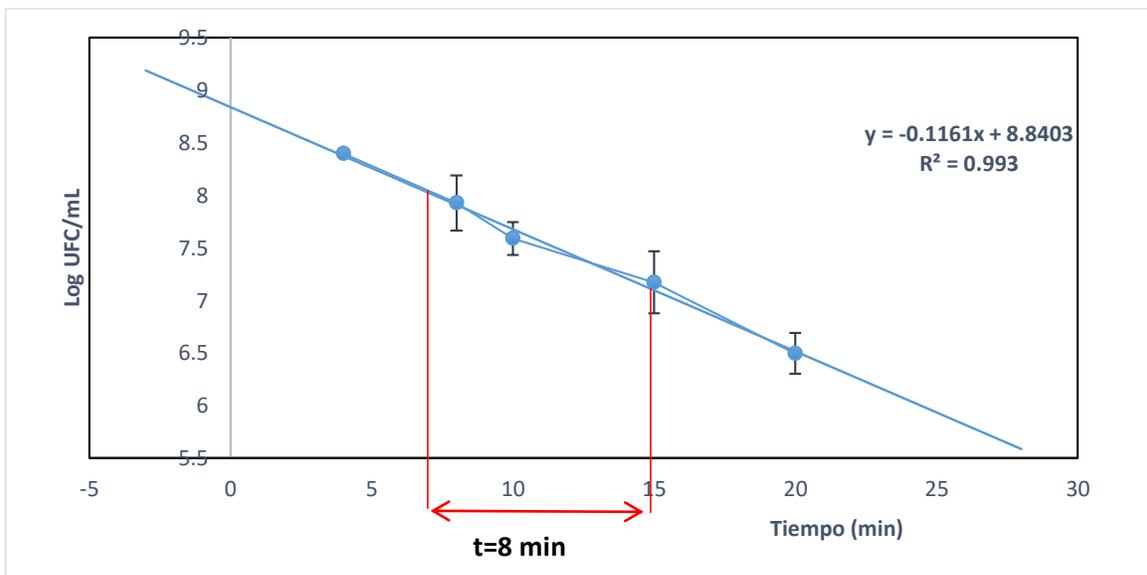


Figura 10. Determinación del valor D de *Weissella confusa* L9 a 55°C en medio APT por método de cuenta en placa. Se presentan promedios de dos fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Evaluación de la termorresistencia de la cepa *Weissella confusa* 3A.

La segunda parte del experimento consistió en la evaluación de la resistencia térmica de *Weissella confusa* 3A para observar si existían diferencias entre cepas de la misma especie y los resultados fueron los siguientes:

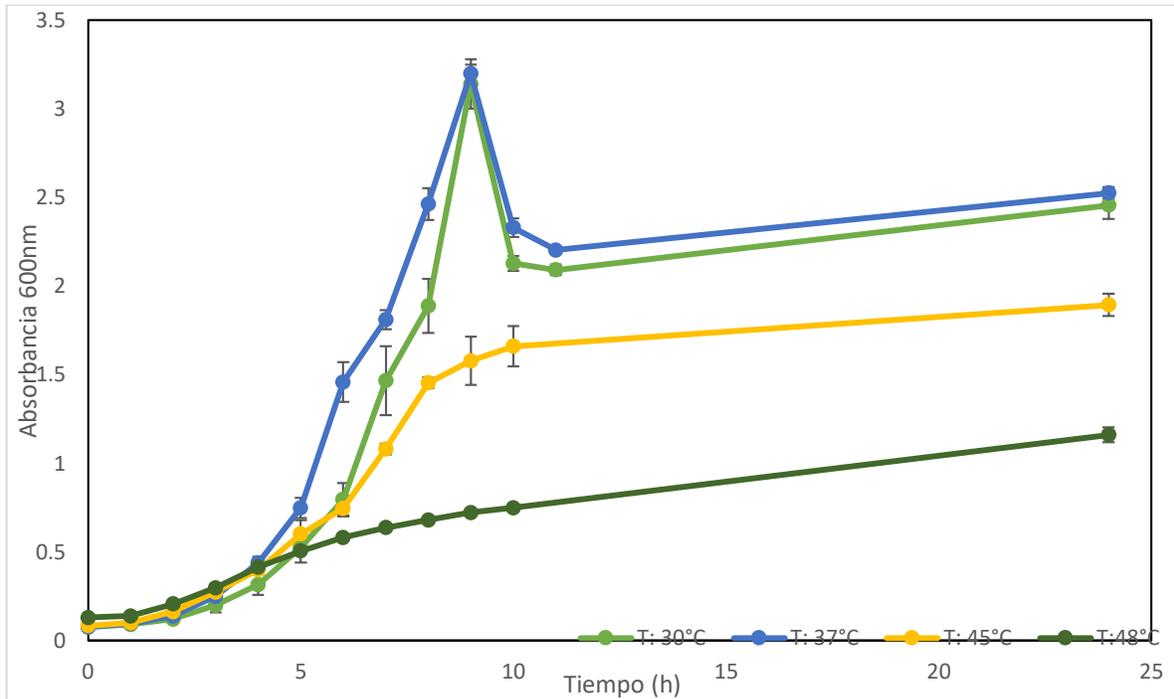


Figura 11. Evaluación de resistencia térmica en curva de crecimiento de *W. confusa* 3A en caldo APT incubada a temperaturas de 30, 37, 45 y 48°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Al iniciar la evaluación de la resistencia térmica a diferentes temperaturas con *Weissella confusa* 3A, la primera diferencia que se encontró con *Weissella confusa* L9 es que, esta bacteria tarda más tiempo en crecer ya que *W. confusa* L9 mostró un pico máximo de crecimiento a las 4 ó 5 horas y *W. confusa* 3A tuvo un máximo crecimiento hasta las 9 horas de iniciada la fermentación (Figura 11). No obstante, se obtuvo como temperatura óptima 37°C y a diferencia de *W. confusa* L9, requiere un tiempo mayor para entrar a la fase exponencial y su duración es más corta, ya que inicia ésta fase a las 5 horas, a diferencia de *W. confusa* L9, que lo hace a las 2 horas, sin embargo, *W. confusa* 3A obtiene una densidad óptica (DO) máxima de

3.2 a las 9 horas a una temperatura de 37°C y *W. confusa* L9 tiene una DO máxima de 2.69 a las 7 horas a la misma temperatura.

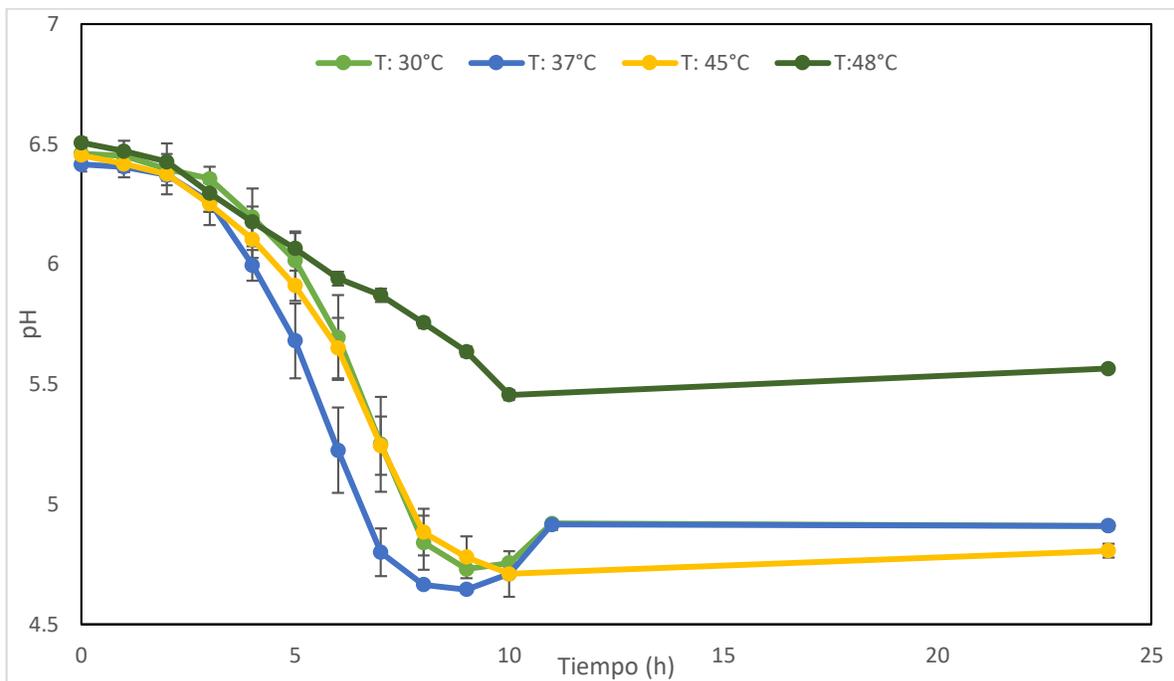


Figura 12. Valor de pH en la curva de crecimiento de *Weissella confusa* 3A en caldo APT incubada a temperaturas de 30, 37, 45 y 48°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Se llevó a cabo la medición de pH en los mismos tiempos en que se tomó la medición de absorbancia y lo que se observó es que hay congruencia con los datos ya que a mayor crecimiento de la bacteria el descenso de pH es más drástico tal es el caso de la temperatura de 37°C como ya se demostró que esta temperatura le favorece su crecimiento entonces la producción de ácidos orgánicos es mayor (figura 12). A las 10 horas de iniciada la fermentación alcanza el valor de pH más bajo (4.64) contrario a lo que se muestra en la temperatura de 48°C ya que al no haber tanto crecimiento no hay producción de ácido láctico suficiente para reducir el pH por lo cual solo alcanza un mínimo de (5.45).

Debido a que la máxima temperatura en la cual se observó la sobrevivencia de esta cepa fue de 48°C, se evaluó su valor D a esta temperatura. La concentración de

los sobrevivientes fue tan alta (no fue capaz de reducir su concentración aún después de 80 min.), que no fue posible obtener datos confiables por lo cual se decidió aumentar la temperatura para evaluar la resistencia térmica a 49, 50 y 52°C.

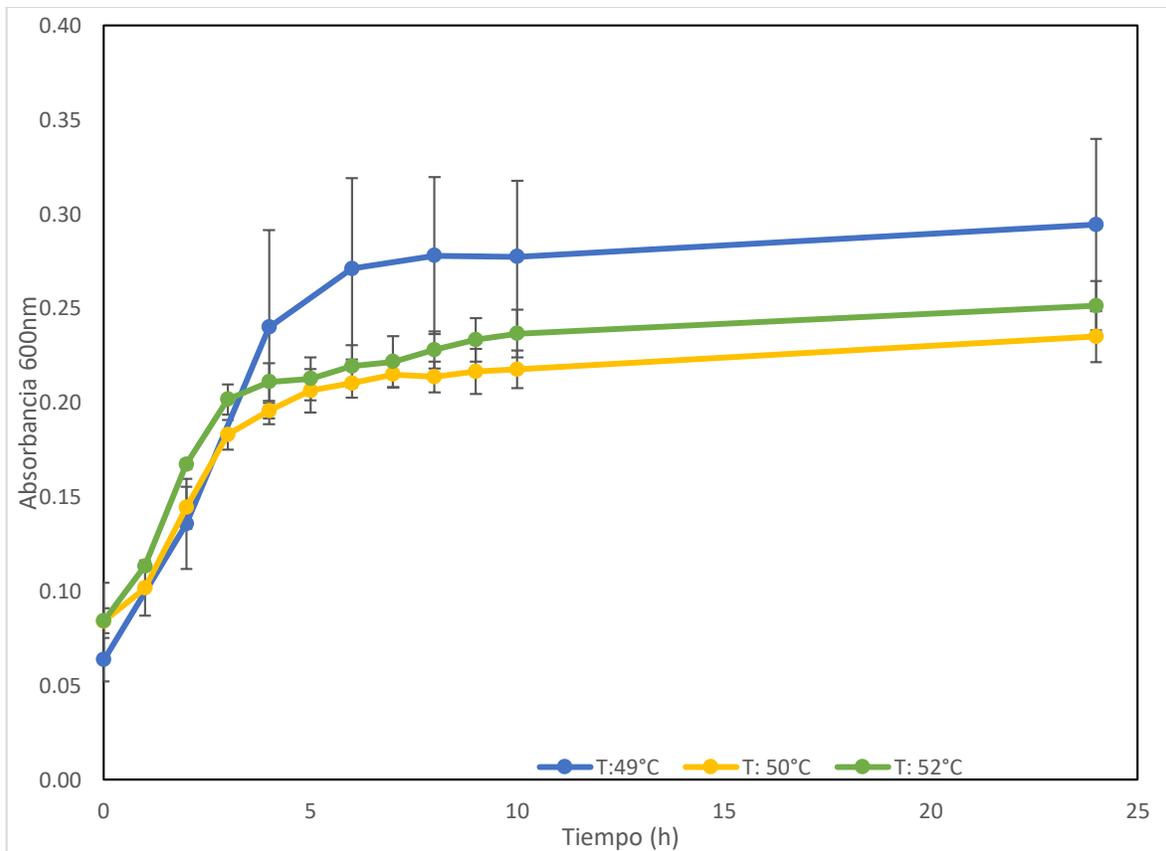


Figura 13. Evaluación de resistencia térmica en curva de crecimiento de *W. confusa* 3A en caldo APT incubada a temperaturas de 49, 50 y 52°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos al evaluar su resistencia térmica a temperaturas de 49, 50 y 52°C. A 52°C hay mayor crecimiento que a 50°C pero como observó con el primer experimento, arriba de 50°C el medio presenta cambios en su coloración, tornándose más oscuro, lo cual interfiere en las mediciones, sin embargo, con la medición de pH se corroboró que a 50°C hubo más crecimiento que a 52°C debido a que hubo mayor descenso en la acidez del medio, además en la cuenta microbiana se observa que a 49°C aún presenta crecimiento a 9 horas y a 52°C a las 3 horas disminuye su crecimiento entrando en la fase estacionaria (figuras 14 y 15).

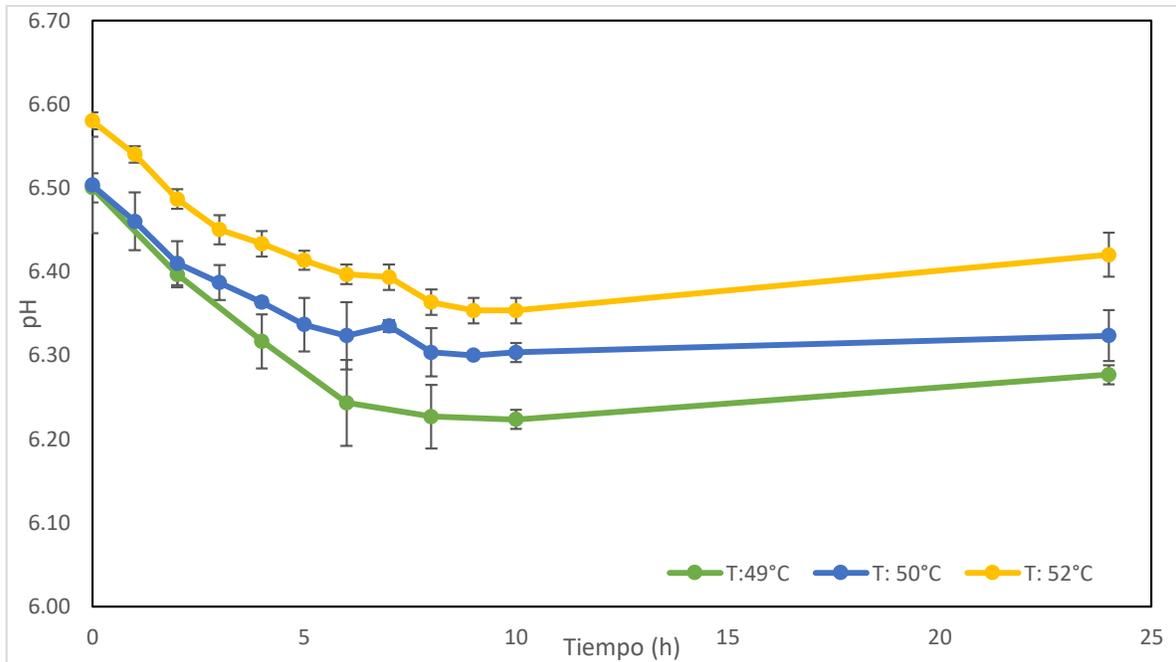


Figura 14. Valor de pH en la curva de crecimiento de *Weissella confusa* 3A en caldo APT incubada a temperaturas de 49, 50 y 52°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

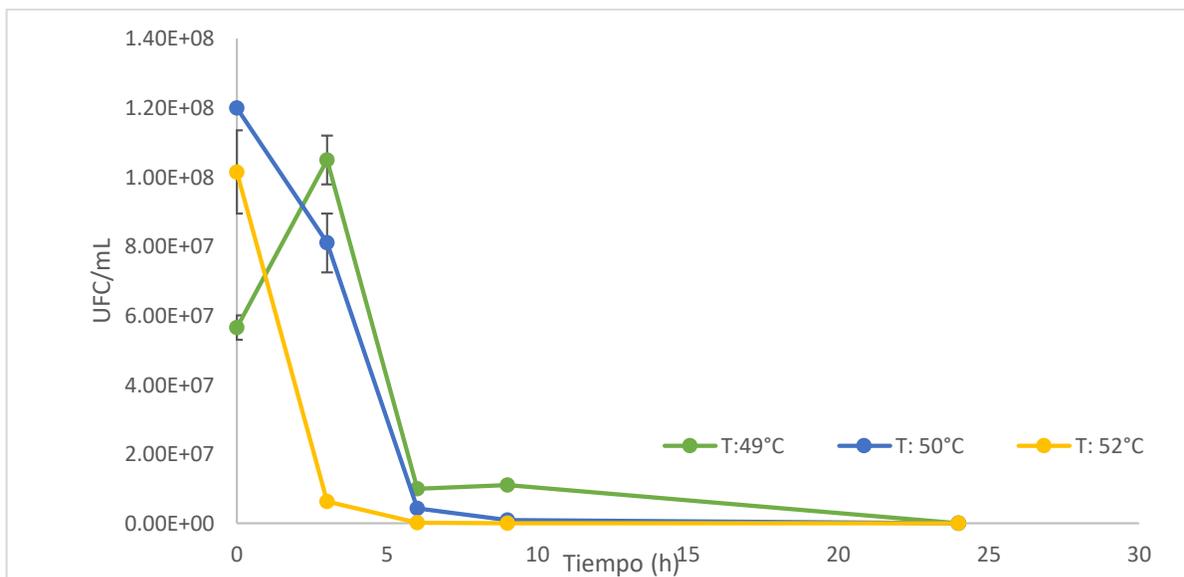


Figura 15. Resultados del conteo en placa de *Weissella confusa* 3A en curvas de crecimiento a temperaturas de 49, 50 y 52°C. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

Se determinó entonces el valor D a 52°C (Figura 16).

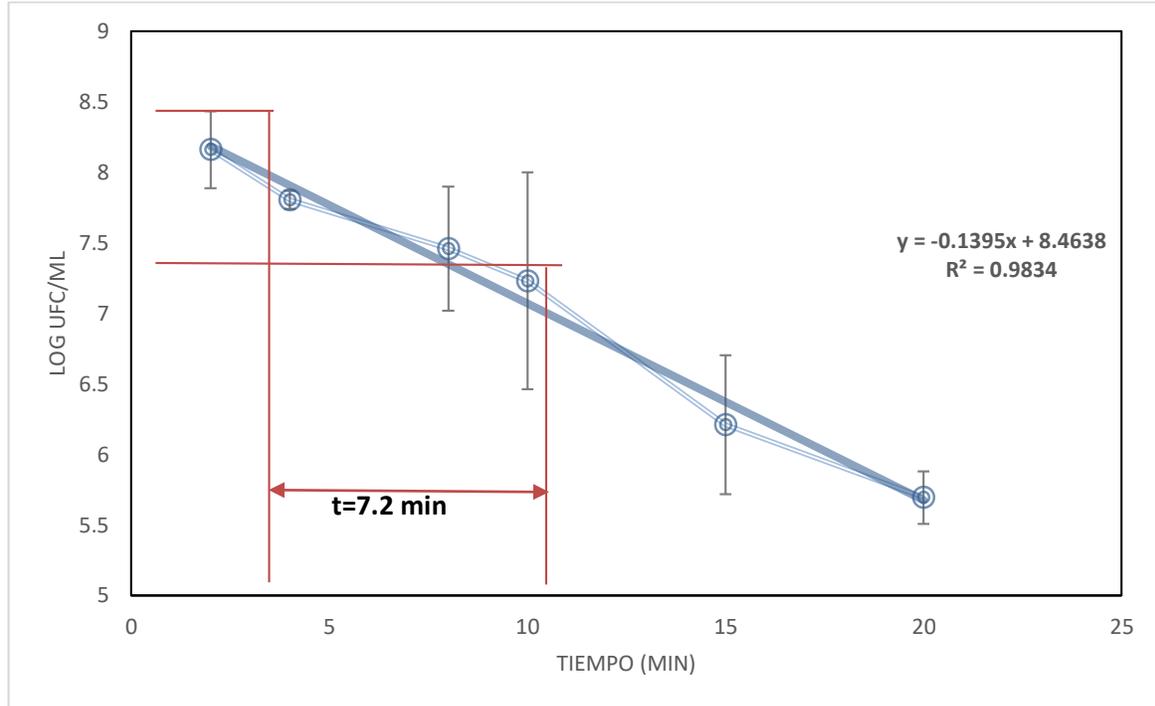


Figura 16. Determinación del valor D de *Weissella confusa* 3A a 52°C en medio APT por método de cuenta en placa. Se presentan promedios de tres fermentaciones independientes y se muestran las desviaciones estándar de cada punto como líneas verticales.

La primer diferencia que se detectó entre las diferentes cepas fue que *W. confusa* L9 tiene una mayor capacidad para tolerar temperaturas altas que *W. confusa* 3A (Valor D: 8 min a 55°C y Valor D: 7.2 min a 52°C, respectivamente), otro aspecto importante es que *W. confusa* L9 le es fácil adaptarse al medio ya que presenta una fase Lag de 5 o 6 horas, mientras que *W. confusa* 3A lo hace en 9 horas; sin embargo como ya se mencionó anteriormente las bacterias ácido lácticas son mesófilas por lo que las temperaturas en las cuales pueden crecer son atípicas para el género.

Los resultados mostraron que las cepas *Weissella confusa* L9 y *Weissella confusa* 3A son termorresistentes, ya que presentan valores D de 8 min a 55°C y 7.2 min a 52°C respectivamente, siendo la primera la más termorresistente.

En la tabla I, se muestran las temperaturas de crecimiento de cada cepa evaluada y se obtuvo que para *Weissella confusa* L9 la temperatura óptima en donde se observó un mejor crecimiento fue 37°C y la máxima fue de 55°C, así mismo para *Weissella confusa* 3A la temperatura óptima de crecimiento fue de 37°C y una máxima de 52°C.

Tabla I. Temperaturas en las que se evaluó la termorresistencia y/o crecimiento de las cepas *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A.

Cepa	Temperaturas en las que se evaluó la termorresistencia (°C)
<i>Weissella confusa</i> L9	30, 37, 45, 50, 55 y 60
<i>Weissella confusa</i> 3A	30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52

Tabla II. Valor D para las cepas estudiadas y para algunas cepas del mismo género que se han reportado.

Cepa	Valor D
<i>Weissella confusa</i> L9	D <sub>55°C</sub> = 8 minutos
<i>Weissella confusa</i> 3A	D <sub>52°C</sub> = 7.2 minutos
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> cepa 25124*	D <sub>62°C</sub> = 2 minutos
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258**	D <sub>62°C</sub> = 1.83 minutos

\*(Domínguez-Ramírez *et al.*, 2018) Artículo enviado

\*\* (Flint *et al.*, 2002)

Es importante el estudio de la termorresistencia de las bacterias ácido lácticas debido a que no se ha reportado mucho sobre ellas y mucho menos para la especie *Weissella confusa*, en la tabla II, se muestran las determinaciones del valor D de dos cepas de *Streptococcus* que se han encontrado en la literatura y esto es debido a que esta especie es la más estudiada dentro de las BAL por su importancia a nivel industrial.

La aplicación de bacterias ácido lácticas (BAL) en los alimentos fermentados tiene 2 objetivos principales. Primero, es el desarrollo de sabores y olores característicos durante la fermentación; y segundo, inhibir la microbiota competitiva mediante la reducción del pH del medio, es por eso que el estudio de la termorresistencia de las mismas es de suma importancia; sin embargo, los estudios reportados para este género son muy pocos.

Por ejemplo, durante la vida de anaquel de salchichas, la microbiota predominante son las bacterias lácticas, pseudomonas y enterobacterias, ya que las condiciones de almacenamiento permiten su desarrollo. Las enterobacterias o bacterias entéricas son de importancia en alimentos, sobre todo por incluir géneros de bacteria patógenas, las que más comúnmente causan enfermedades (Prescott *et al.*, 2000). En este trabajo se estudiaron las BAL presentes en las salchichas y la termorresistencia y se obtuvo que *L. alimentarius*, *L. lactis*, *L. piscicola* y *Enterococcus* sp tuvieron conteos mayores de 300 UFC después de ser sometidas a 50, 60 y 70 °C durante 30, 45 y 60 min. *L. sake*, *L. minor*, *L. helveticus* y *L. divergens* no sobrevivieron al tratamiento térmico a 50 °C durante 30 min, ni a mayores temperaturas y/o tiempos (Victoria-León *et al.*, 2006).

## Conclusiones

*Weissella confusa* L9 y *Weissella confusa* 3A aisladas del pozol son bacterias termorresistentes, ya que son capaces de resistir temperaturas de 30, 37, 45, 50 e incluso 55°C y 30, 37, 45, 48, 49, 50 y hasta 52°C respectivamente, en las cuales aún se encuentran en estado viable.

El valor D fue de 8 minutos a 55°C para *W. confusa* L9 y 7.2 minutos a 52°C para *W. confusa* 3A, *Weissella confusa* L9 es más resistente que *Weissella confusa* 3A.

La resistencia a estas temperaturas es inusual para bacterias del género *Weissella*.

## Perspectivas

Analizar el efecto que tienen estas altas temperaturas en el alimento que fueron aisladas, es decir, realizar el mismo experimento pero ahora en las fermentaciones directas de las masas.

Debido a que existen escasos estudios realizados sobre la resistencia térmica de bacterias ácido lácticas, específicamente para el género *Weissella* spp., se propone, con el fin de complementar este estudio, realizar estudios a nivel genético para identificar los genes que codifican para las HSPs y en el caso de encontrar que la termorresistencia es debida a la activación de éstos, realizar una identificación y cuantificación de las proteínas, para saber cuáles son las proteínas de choque térmico responsables de su termotolerancia.

## Bibliografía

1. Adebayo, C. O., Aderiye, B. & Akpor, O. B. (2013). Occurrence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria during the fermentation of cassava mash, maize and sorghum grains. *Microbiology Research International*, 1(2), 27-32.
2. Albesharat R., Ehrmann M. A., Korakli M., Yazaji S., Vogel R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 148–155.
3. Ampe, F.; Ben Omar, N.; Moizan, C.; Wachter, C. y Guyot, J.P. (2000) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 12 pp. 5464-5473
4. Anfisen CB, Harber E. (1961) Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds *J Biol Chem* 236: 1361-1363.
5. Barnard, H., Dooley, A. K., Areshian, G., Gasparyan, B., Faull, K. F. (2010). Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science*, xxx, 1-8.
6. Battcock M. and Azam-Ali S. (1998) Chapter 1-2: Introduction, The benefits of fermenting fruits and vegetables. In: *Fermented fruits and vegetables a global perspective*. FAO Agricultural Services Bulletins. URL: <http://www.fao.org/docrep/x0560e/Cx0560e00.HTM> Consultado el 14.09.17
7. Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 1998; 379: 245-59.
8. Benjamin I, McMillan DR. Stress (Heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83: 117-32.
9. Björkroth J., Holzapfel W. H. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, in *The Prokaryotes*, eds Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E., editors. (New York, NY: Springer; ), 267–319.

10. Bjorkroth, K.J; Schillinger, U.; GEisen, R.; Weiss, N.; Hoste, B.; Holzapfel, W. H.; Korkeala, H.J. y Vandamme, P. (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. Nov., detected in food and clinical samples International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 52, pp.141-148
11. Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. Food Research International, 36, 527-543.
12. Camacho de la Rosa, N.A.; Díaz Gutiérrez, K.M.; Santillana Hinojosa, M.R. y Velázquez Madrazo, O.C. (2007) "Nixtamalización" en Manual de Prácticas. Productos de Cereales y Leguminosas. 4ª ed. Comité Editorial de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, pp.95-97
13. Caplice E, Fitzgerald GF. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation International Journal of Food Microbiology. 50: 131-149
14. Cascales M. (2002). Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas: Real Academia de Farmacia. Madrid
15. Cañas A., *et al.*, (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 9, pp 269-274
16. Collins M. D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol. 75, 595–603
17. Crecimiento microbiando (2018) [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4a\\_CrecimientoMicrobiano\\_19836.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4a_CrecimientoMicrobiano_19836.pdf) consultado 22.octubre.2018
18. De Bruyne, N.; Camun, K.; De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2010) *Weissella fabaria* sp. Nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Vol. 60, pp.1999-2005

19. Delwen, S. (1996). (a). Archaeology of ancient Egyptian beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(1), 3-12.
20. Delwen, S. (1996). (b). Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science*, 273, 488.
21. Difco™ & BBL™ (2018). Manual, 2nd Edition. APT Agar • APT Broth. [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/265430.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/265430.pdf)  
consultado 22.Octubre.2018
22. Difco™ & BBL™ (2018). Manual, 2nd Edition. Intended Use. Lactobacilli MRS Agar and Lactobacilli MRS  
[www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/288110.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/288110.pdf)  
consultado 22.Octubre.2018
23. Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K.-H., and Holzappel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. Journal Food Microbiology*. 88, 105–122.
24. Flint S., Brooks J., Bremer P., Walker K. and Hausman E. (2002) The resistance to heat of thermos-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 134-136.
25. Huot J, Houle F, Spitz D, Landry J. (1996) HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res*; 56: 273-9.
26. Hurst A. (1977). Bacterial injury: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 23:935-944.
27. Jeurink P. V., van Bergenhenegouwen J., Jiménez E., Knippels L. M., Fernández L., Garssen J. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Benefies Microbes*. 4, 17–30.
28. Katina, K.; Maina, N.H.; Juvonen, R.; Flander, L.; Johansson, L.; Virkki, L.; Tenkanen, M. y Laitila, A. (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food microbiology* Vol. 26, pp. 734-743
29. Keller WL (1999) Molecular chaperones: how J domains turn on Hsp70s. *Current Biology* 9: R305-R308.

30. Kindas-Mügge I, Trautinger F. (1994) Increased expression of the Mr27,000 heat shock protein (hsp27) in in vitro differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth & Differentiation*; 5: 777-81.
31. Kulwichit W., Nilgate S., Krajiw S., Unhasuta C., Chatsuwan T., Chongthaleong A. (2008). *Weissella* spp.: lactic acid bacteria emerging as a human pathogen. Abstract number: P1847, in 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
32. Kumar, R. S., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. & Arul, V. (2012). Traditional Indian fermented foods: a rich source of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(4), 415-428.
33. Lahtinen S., Ouwehand A. C., Salminen S., Von Wright A., editors. (eds.). (2012). *Lactic Acid Bacteria—Microbiological and Functional Aspects*, 4th Edn. Boca Raton, FL: CRC Press (Taylor and Francis Group).
34. Lee J, Kaletunc G. (2002). Calorimetric determination of inactivation parameters of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 93:178-189.
35. Lepock J, Frey H, Inniss W. (1990). Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: relationship of protein denaturation in situ to maximum growth temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1055:19-26.
36. Lomiwes, D., Farouk, M. M., Wiklund, E., & Young, O. A. (2014). Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. *Meat Science* 96(1), 26-40.
37. López-Hernández M., Rodríguez-Alegría M., López- Munguía A. and Wacher C. (2018). Evaluation of xylan as a carbon source for *Weissella* spp., a predominant strain in pozol fermentation. *Food Science and Technology*. 192-197.
38. Mackey BM, Miles CA, Parsons SE, Seymour DA. (1991). Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137:2361-2374.

39. Martín R., Heilig H. G., Zoetendal E. G., Jiménez E., Fernández L., Smidt H., (2007a). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res. Microbiology*. 158, 31–37
40. Méndez-Albores, J.A; Arámbula-Villa, G; Preciado-Ortiz, R.E y Moreno-Martínez E. (2004) Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food, *International Journal of Food Microbiology* Vol. 94, pp.211-215.
41. McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto- historic China. *PNAS*, 101(51), 17593-17598.
42. Morales Rodríguez Emmanuel. (2015). "Estudio de efecto antimicrobiano de bacterias del género *Streptococcus* aisladas del pozol". TESIUNAM DIGITAL, 307278393, 2-4. 09-0817, De: UNAM-Dirección General de Bibliotecas Base de datos.
43. Morimoto R, Tissières A, Georgopoulos C. (1990) The stress response, function of the proteins and perspectives. In: RI Morimoto, A. Tissières, C. Georgopoulos (eds) *Stress proteins in biology and medicine*, Cold Spring Harbor, CSH Press, p 1-36.
44. Nam, H.; Ha, M.; Bae, O. y Lee, Y., (2002). Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the Adherence and Grow of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 9, pp.4642-4646
45. Nistal E., Caminero A., Vivas S., Ruiz de Morales J. M., Sáenz de Miera L. E., Rodríguez-Aparicio L. B., *et al.*, (2012). Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie* 94, 1724–1729.
46. Ogier, J.-C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. Journal Food Microbiology*. 126, 291–301.
47. Olano A, Chua J, Schroeder S, Minari A, La Salvia M, Hall G (2011) "*Weissella confusa* (basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report." *Journal Clinic Microbiology*. 39(4):1604-7.

48. Padonou, S. W., Schillinger, U., Nielsen, D. S., Franz, C. M., Hansen, M., Hounhouigan, J. D., Nago, M. C. & Jakobsen, M. (2010). *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *Int J Syst Evol Microbiology* 60, 2193–2198.
49. Papadimitriou, K., Alegría, A., Bron A., De angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M. & Turrone, F. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (3): 837-890.
50. Patel S., Goyal A. (2011). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal Microbiology. Biotechnology.* 27, 1119–1128
51. Penna FJ. (1998) Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Rev Enfer Infec Ped;XI(6):182.*
52. Ponnusamy K., Choi J. N., Kim J., Lee S. Y., Lee C. H. (2011). Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *Journal Medical Microbiology.* 60, 817–827.
53. Rastall R. A., Gibson G. R. (2014). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opin. Biotechnology.* 32C, 42–46.
54. Ray, R. C. & Montet, D. (2016). *Fermented Foods, Part L: Biochemistry and Biotechnology.* Boca Raton: CRC Press.
55. Rees, J.A.G., Y Bettison, J. (1991). *Processing and Packaging of Heat Preserved Foods.* CMB Packaging Technology, Wantage, Berks. Blackie. Glasgow and London.
56. Ritossa F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*; 18: 571-3.
57. Ruddon RW, Bedows E. (1997) Assited protein folding *Journal Biology Chemistry* 272: 3125-3128.
58. Samali A, Cotter T. (1996) Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*; 223: 16370.
59. Silver PA, Way JC (1993). Eukariotic DnaJ homologs and the specificity of HSP70 activity. *Cell* 74: 5-6. Stackebrandt E., Liesack W. (1993). Nucleic acids and classification, in *Handbook of New Bacterial Systematics*, eds

- Goodfellow M., O'Donnell A. G., editors. (London: Academic Press Ltd; ), 151–194.
60. Stumbo CR. (1973). Thermobacteriology as applied to food processing. In thermobacteriology in food processing, Stumbo CR (ed). Academic Press: New York, pp.47-115.
61. Trautinger F, Kindas M, Mücke I, Dekrout B, Knobler R, Metzger D. (1995) Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immuno-histological study. *Br Journal Dermatology*; 133: 194-202.
62. Ulrich Hartl F. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*; 381: 571-80.
63. Vahjen W., Pieper R., Zentek J. (2010). Bar-coded pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons reveals changes in ileal porcine bacterial communities due to high dietary zinc intake. *Appl. Environmental Microbiology*. 76, 6689–6691
64. Vasan A, Mei Leong W, Ingham SC, Ingham BH. (2013). Thermal Tolerance Characteristics of Non-O157 Shiga Toxigenic Strains of *Escherichia coli* (STEC) in a Beef Broth Model System are similar to those of O157:H7 STEC. *Journal of Food Protection* 76:1120-1128
65. Vázquez A, Pancholi P, Balada-Llasat JM (2015) "Photo quiz: confusing bacteremia in a Crohn's disease patient. *Weissella confusa*." *Journal Clinical Microbiology*. 53(3):759, 1052.
66. Victoria-León, A. Totosaus, I. Guerrero & M. L. Pérez-Chabela (2006). Efecto de bacterias ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. *Journal of Food*, 135-141.
67. Wachter, C.; Cañas, A.; Cook, P.E.; Bárcena, E. y Owens, J.D. (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and biotechnology*. Vol.9, pp. 269-270
68. Wachter, C. (2014) La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitari*. Vol. 15, No. 8 pp, 1607
69. Welch W. (1993) Respuesta de las células al estrés. *Investigación y Ciencia*; 7:22-9.

## Anexo

### 1. *Weissella confusa* L9

Tabla 1. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el descenso de pH a las 2 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	1.029	5	0.206	70.781	19.2964	**
Repeticiones	0.030	2	0.015	5.116	5.7861	*
Error	0.015	5	0.003			
Total	1.130	12				

\*Diferencia significativa

\*\*Diferencia altamente significativa

El análisis de varianza indica que existe diferencia altamente significativa para la temperatura y diferencia significativa para la variable repeticiones, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 2. Prueba de rango múltiple para el pH a las 2 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C

Pruebas de rango múltiple	Temperatura	Clasificación del paquete estadístico SPPS			Interpretación
		1	2	3	
Student-Newman-Keuls	45°C	5.7650			a
	50°C		5.9900		b
	30°C			6.4400	c
	55°C			6.4600	c
	37°C			6.4650	c
	60°C			6.5800	c
Tukey B	45°C	5.7650			a

	50°C		5.9900		b
	30°C			6.4400	c
	55°C			6.4600	c
	37°C			6.4650	c
	60°C			6.5800	c
Duncan	45°C	5.7650			a
	50°C		5.9900		b
	30°C			6.4400	c
	55°C			6.4600	c
	37°C			6.4650	c
	60°C			6.5800	c

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 3 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó el pH máximo significativo, se consideró la temperatura 45 y 50°C indicados con las letras “a” y “b”, así se concluyó que las temperaturas 30, 37, 55 y 60°C no tuvieron diferencia significativa en las dos primeras horas de fermentación.

Tabla 3. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 2 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	1.760	5	0.352	14.162	3.9715	*
Error	0.174	7	0.025			
Total	1.934	12				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 2 horas de fermentación.

Tabla 4. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	7.045	5	1.409	199.023	5.0503	**
Repeticiones	0.022	2	0.011	1.547	5.7861	***
Error	0.035	5	0.007			
Total	7.264	12				

\*\*Diferencia altamente significativa

\*\*\*No hay diferencia significativa

El análisis de varianza indica que existe diferencia altamente significativa para la temperatura y no hay diferencia significativa para la variable repeticiones, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 5. Prueba de rango múltiple para el pH a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C

Pruebas de rango múltiple	Temperatura	Clasificación del paquete estadístico		Interpretación
		1	2	
Student-Newman-Keuls	30°C	4.8600		a
	37°C	4.8900		a
	45°C	4.8950		a
	50°C	4.9550		a
	55°C		6.4300	b
	60°C		6.5800	b
Tukey B	30°C	4.8600		a
	37°C	4.8900		a
	45°C	4.8950		a
	50°C	4.9550		a
	55°C		6.4300	b
	60°C		6.5800	b
Duncan	30°C	4.8600		a

	37°C	4.8900		a
	45°C	4.8950		a
	50°C	4.9550		a
	55°C		6.4300	b
	60°C		6.5800	b

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 2 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó el descenso de pH máximo significativo, se consideró la temperatura 30, 37, 45 y 50°C indicados con la letra “a” y las temperaturas 55 y 60°C en donde el descenso de pH fue mínimo significativo indicado con la letra “b”.

Tabla 6. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	12.270	5	2.454	81.785	19.2964	**
Repeticiones	0.149	2	0.075	2.490	5.7861	***
Error	0.150	5	0.030			
Total	14.058	12				

\*\*Diferencia altamente significativa

\*\*\*No hay diferencia significativa

El análisis de varianza indica que existe diferencia altamente significativa para la temperatura y no hay diferencia significativa para la variable repeticiones, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 7. Prueba de rango múltiple para la absorbancia a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Prueba de rango múltiple	Temperatura	Clasificación del paquete estadístico				Interpretación
		SPPS				
		1	2	3	4	
Student-Newman-Keuls	60°C	0.11550				a
	55°C	0.25550				a
	50°C		1.66000			b
	45°C			2.20250		c
	30°C			2.57000		c
	37°C			2.65250		c
Tukey B	60°C	0.11550				a
	55°C	0.25550				a
	50°C		1.66000			b
	45°C		2.20250	2.20250		bc
	30°C			2.57000		c
	37°C			2.65250		c
Duncan	60°C	0.11550				a
	55°C	0.25550				a
	50°C		1.66000			b
	45°C			2.20250		c
	30°C			2.57000	2.57000	cd
	37°C				2.65250	d

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 4 grupos (de acuerdo a la prueba de Duncan). Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó la absorbancia máxima significativa, se consideró la temperatura 30, 37°C indicados con la letra “d” y en donde la mínima absorbancia significativa, se consideró la temperatura 55 y 60°C indicados con la letra “a”.

Tabla 8. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	6.930	5	1.386	246.266	19.2964	**
Repeticiones	0.027	2	0.013	2.387	5.7861	***
Error	0.028	5	0.006			
Total	7.145	12				

\*\*Diferencia altamente significativa

\*\*\*No hay diferencia significativa

El análisis de varianza indica que existe diferencia altamente significativa para la temperatura y no hay diferencia significativa para la variable repeticiones, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 9. Prueba de rango múltiple para el pH a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Prueba de rango múltiple	Temperatura	Clasificación con el paquete estadístico		Interpretación
		1	2	
Student-Newman-Keuls	30°C	4.8367		a
	37°C	4.8850		a
	45°C	4.9100		a
	50°C	4.9700		a
	55°C		6.4450	b
	60°C		6.5350	b
Tukey B	30°C	4.8367		a
	37°C	4.8850		a
	45°C	4.9100		a
	50°C	4.9700		a
	55°C		6.4450	b
	60°C		6.5350	b

Duncan	30°C	4.8367		a
	37°C	4.8850		a
	45°C	4.9100		a
	50°C	4.9700		a
	55°C		6.4450	b
	60°C		6.5350	b

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 2 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó el descenso de pH máximo significativo, se consideró la temperatura 30, 37, 45 y 50°C indicados con la letra “a” y las temperaturas 55 y 60°C en donde el descenso de pH fue mínimo significativo indicado con la letra “b”.

Tabla 10. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	12.808	5	2.562	217.119	3.9715	**
Error	0.083	7	0.012			
Total	12.890	12				

\*\*Diferencia altamente significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 2 horas de fermentación.

## 2. *Weissella confusa* 3A

Tabla 11. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 4 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	0.241	6	0.040	12.651	3.0946	*
Error	0.035	11	0.003			
Total	0.276	17				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en el pH a las 4 horas de fermentación.

Tabla 12. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 4 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	0.158	6	0.026	20.290	3.0946	*
Error	0.014	11	0.001			
Total	0.172	17				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 4 horas de fermentación.

Tabla 13. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	2.715	6	0.452	48.177	3.0946	*
Error	0.103	11	0.009			
Total	2.818	17				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en el pH a las 6 horas de fermentación.

Tabla 14. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	2.789	6	.465	67.425	3.0946	*
Error	.076	11	.007			
Total	2.865	17				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 6 horas de fermentación.

Tabla 15. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	9.647	6	1.608	1062.227	3.0946	**
Error	0.017	11	0.002			
Total	9.664	17				

\*\*Diferencia altamente significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia altamente significativa para la variable temperatura en el pH a las 9 horas de fermentación, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 16. Prueba de rango múltiple para el pH a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Prueba de rango múltiple	Temperatura	Clasificación con el paquete estadístico SPPS					Interpretación
		1	2	3	4	5	
Student-Newman-Keuls	37°C	4.6500					a
	30°C		4.7300				b
	45°C		4.7800				b
	48°C			5.6350			c
	49°C				6.2233		d
	50°C				6.2933	6.2933	de
	52°C					6.3533	e
Tukey B	37°C	4.6500					a
	30°C	4.7300	4.7300				ab
	45°C		4.7800				b
	48°C			5.6350			c
	49°C				6.2233		d
	50°C				6.2933	6.2933	de
	52°C					6.3533	e
Duncan	37°C	4.6500					a
	30°C		4.7300				b
	45°C		4.7800				b
	48°C			5.6350			c
	49°C				6.2233		d
	50°C				6.2933	6.2933	de
	52°C					6.3533	e

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 5 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó el descenso de pH máximo significativo, se consideró la temperatura 37°C indicada con la letra “a” y después se consideró con la letra “b” al segundo grupo que también tuvo un mayor descenso en el pH que fueron las temperaturas 30 y 45°C, las temperaturas en donde el descenso de pH fue mínimo significativo indicado con las letras “d” y “e” fueron 50 y 52°C.

Tabla 17. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	24.641	6	4.107	502.777	3.0946	**
Error	0.090	11	0.008			
Total	24.731	17				

\*\*Diferencia altamente significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 9 horas de fermentación, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 18. Prueba de rango múltiple para la absorbancia a las 9 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45, 48, 49, 50 y 52°C.

	Temperatura	Subconjunto para alfa = 0.05				Interpretación
		1	2	3	4	
Student-Newman-Keuls	50°C	0.21843				a
	52°C	0.23333				a
	49°C	0.27733				a
	48°C		0.72150			b
	45°C			1.57667		c
	30°C				3.14000	d
	37°C				3.20000	d
Tukey B	50°C	0.21843				a
	52°C	0.23333				a
	49°C	0.27733				a
	48°C		0.72150			b
	45°C			1.57667		b
	30°C				3.14000	c
	37°C				3.20000	c
Duncan	50°C	0.21843				a
	52°C	0.23333				a
	49°C	0.27733				a
	48°C		0.72150			b

	45°C			1.57667		c
	30°C				3.14000	d
	37°C				3.20000	d

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 4 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó la máxima absorbancia significativa, se consideraron las temperaturas 30 y 37°C indicada con la letra “d”, el grupo que presentó la mínima absorbancia significativa fue el indicado con la letra “a” encabezado por las temperaturas 49, 50 y 52°C.

### 3. Diferencia significativa entre cepas

Tabla 19. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 6 horas de fermentación para el crecimiento de *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en las temperaturas 30, 37, 45 y 50°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	0.891	3	0.297	5.387	3.4903	*
Cepa	3.110	1	3.110	56.385	4.7472	*
Repeticiones	0.084	2	0.042	0.758	3.8853	***
Error	0.662	12	0.055			
Total	5.396	18				

\*Diferencia significativa

\*\*\*No hay diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura y entre cepas, y que no existe diferencia significativa en las repeticiones de cada temperatura en el pH a las 6 horas de fermentación.

Tabla 20. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 6 horas de fermentación para el crecimiento de *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en las temperaturas 30, 37, 45 y 50°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	3.067	3	1.022	25.689	3.4903	*
Cepa	10.154	1	10.154	255.174	4.7472	**
Repeticiones	0.081	2	0.040	1.016	3.8853	***
Error	0.478	12	0.040			
Total	15.19	18				

\*Diferencia significativa

\*\*Diferencia altamente significativa

\*\*\*No hay diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura, que hay diferencia altamente significativa entre cepas y que no hay diferencia significativa en las repeticiones en la absorbancia a las 6 horas de fermentación, por lo que se realizó la prueba de rango múltiple para identificar en que temperaturas hubo mayor diferencia significativa.

Tabla 21. Prueba de rango múltiple para la absorbancia a las 6 horas de fermentación para las temperaturas 30, 37, 45 y 50°C.

Prueba de rango múltiple	Temperatura	Clasificación del paquete estadístico SPPS			Interpretación
		1	2	3	
Student-Newman-Keuls	50°C	0.79020			a
	45°C		1.32820		b
	30°C			1.85960	c
	37°C			2.05500	c
Tukey B	50°C	0.79020			a
	45°C		1.32820		b
	30°C			1.85960	c
	37°C			2.05500	c
Duncan	50°C	0.79020			a
	45°C		1.32820		b
	30°C			1.85960	c

	37°C			2.05500	c
--	------	--	--	---------	---

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas.

Como resultado de la prueba de rango múltiple el paquete estadístico reportó 3 grupos. Para su interpretación, se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar las temperaturas donde se alcanzó la máxima absorbancia significativa, se consideraron las temperaturas 30 y 37°C indicada con la letra “c”, el grupo que presentó la mínima absorbancia significativa fue el indicado con la letra “a” encabezado por la temperatura 50°C.

Tabla 22. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el pH a las 9 horas de fermentación para el crecimiento de *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en las temperaturas 30, 37, 45 y 50°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	3.462	3	1.154	7.597	3.2874	*
Error	2.278	15	.152			
Total	5.740	18				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura y entre cepas, y que no existe diferencia significativa en las repeticiones de cada temperatura en el pH a las 9 horas de fermentación.

Tabla 23. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la absorbancia a las 9 horas de fermentación para el crecimiento de *W. confusa* L9 y *W. confusa* 3A en las temperaturas 30, 37, 45 y 50°C.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas ( $\alpha=0.05$ )	Interpretación
Temperatura	12.973	3	4.324	15.198	3.2874	*
Error	4.268	15	.285			
Total	17.241	18				

\*Diferencia significativa

El análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa para la variable temperatura en la absorbancia a las 9 horas de fermentación.