

00567

1
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DE UNA
BACTERIA LACTICA AISLADA DEL POZOL.**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS
(OPCION QUIMICA DE ALIMENTOS),
P R E S E N T A :
G L O R I A D I A Z R U I Z



MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: DR. EDUARDO BARZANA GARCÍA
PRIMER VOCAL: DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUIA CANALES
SECRETARIO: DRA. AMELIA FARRES GONZÁLEZ-SARAVIA
1er. SUPLENTE: DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVAN
2o. SUPLENTE: M. en C. FRANCISCA AÍDA ITURBE CHIÑAS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUSTENTANTE

I. A. GLORIA DÍAZ RUIZ

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO 324,
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA.

No te conformes con el éxito. No lo repitas fácilmente. Imponte desafíos imposibles. Más te vale fracasar por lo alto que triunfar por lo bajo. Apártate de la seguridad. Asume el riesgo.

Carlos Fuentes.

DEDICATORIAS

A mis Padres, porque basta mirar su ejemplo para saber que debo luchar siempre por conseguir mis metas. Gracias por su apoyo y su cariño. Los quiero mucho.

A Carlos, Claudia y César, por todo lo vivido juntos, por lo que nos une y nos unirá siempre.

A mis Amigos, especialmente a Mónica Serrano.

AGRADECIMIENTOS

A Carmen Wachter, por confiarme su proyecto de investigación, por su apoyo ilimitado y porque siempre tuvo tiempo y disposición para oírme.

A Eduardo Barzana, a Agustín López-Munguía, a Amelia Farres, a Edgardo Escamilla y a Francisca Iturbe por sus valiosas sugerencias y el interés mostrado durante la revisión del presente trabajo.

A Jean Pierre Guyot y a Oscar Monroy, por todas las facilidades otorgadas para la realización de la fermentación anaerobia.

A Rocío Santillana, por su apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio y por su ayuda en la realización del análisis estadístico.

A Agustín Reyo, por el apoyo técnico brindado, principalmente en el área de cromatografía de líquidos de alta resolución.

A mis compañeros de laboratorio: Tere, Martha, Esmeralda, Andrea, Laura, Rina, Samuel y Jesús; por su apoyo y amistad.

Al personal académico y estudiantes del Departamento que en su momento me brindaron una mano amiga.

A CONACYT.

A la UNAM, y muy especialmente a la Facultad de Química.

CONTENIDO

Lista de Tablas.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Resumen.....	1
Capítulo I. Introducción.....	3
Capítulo II. Generalidades.....	5
2.1 El pozol.....	5
2.1.1 Descripción.....	5
2.1.2 Elaboración.....	5
2.1.3 Microbiología.....	6
2.1.4 Cambios nutricionales, bioquímicos y sensoriales durante la fermentación del pozol.....	8
2.2 Carbohidratos del maíz y del nixtamal.....	9
2.3 Bacterias lácticas.....	9
2.4 Leuconostoc.....	10
2.5 Metabolismo de carbohidratos de bacterias lácticas.....	13
2.5.1 Transporte.....	13
2.5.2 Metabolismo de carbohidratos.....	15
2.5.2.1 Metabolismo de hexosas.....	16
2.5.2.1.1 Ruta Embden Meyerhoff-Parnas.....	16
2.5.2.1.1 Ruta fosfocetolasa.....	17
2.5.2.2 Metabolismo de pentosas.....	18
2.5.2.3 Metabolismo de disacáridos.....	18
2.5.3 Estudios recientes del metabolismo de carbohidratos por bacterias lácticas.....	20
2.6 Metabolismo aeróbico.....	22
2.6.1 Cambios inducidos por la aireación en el metabolismo de carbohidratos.....	23
2.7 Aceptores de electrones alternativos.....	26
2.8 Antecedentes de trabajo.....	27
Capítulo III. Objetivos.....	29
Capítulo IV. Materiales y Métodos.....	30
4.1 Cuantificación enzimática de carbohidratos.....	30
4.1.1 Cuantificación enzimática de carbohidratos en muestras de harina y masa de maíz nixtamalizado y de pozol mediante el uso de sistemas enzimáticos comerciales.....	30
4.1.1.1 Preparación de muestras.....	30

4.1.2 Implementación de una metodología para la cuantificación enzimática de carbohidratos.....	31
4.2 Fermentaciones en medio líquido definido.....	31
4.2.1 Microorganismo de estudio.....	31
4.2.2 Conservación de la cepa.....	31
4.2.3 Identidad y pureza de la cepa.....	31
4.2.3.1 Pureza.....	31
4.2.3.2 Identidad.....	32
4.2.4 Preparación del medio líquido definido HSH.....	33
4.2.4.1 Base E de minerales.....	33
4.2.4.1.1 Soluciones stock de minerales.....	33
4.2.4.1.2 Mezcla de metales traza.....	33
4.2.4.1.3 Preparación de la Base E de minerales (doble fuerza).....	34
4.1.4.2 Mezcla de aminoácidos.....	35
4.1.4.3 Solución stock de vitaminas.....	36
4.1.4.4 Cisteína-HCl.....	37
4.1.4.5 Tirosina.....	37
4.1.4.6 Sulfato de adenina.....	37
4.1.4.7 Guanina-HCl.....	37
4.1.4.8 Uracilo.....	37
4.1.4.9 Xantina.....	37
4.1.4.10 Composición del medio HSH.....	37
4.1.4.11 Prueba de esterilidad del medio líquido definido HSH.....	38
4.1.4.12 Control de calidad del medio líquido definido HSH.....	38
4.2.5 Preparación del inóculo.....	39
4.2.6 Condiciones de crecimiento.....	39
4.2.6.1 Aerobiosis.....	39
4.2.6.2 Anaerobiosis.....	39
4.2.6.3 Microaerobiosis.....	40
4.2.7 Inoculación.....	40
4.2.8 Seguimiento de la fermentación.....	41
4.2.8.1 Muestreo.....	41
4.2.8.2 Evaluación del crecimiento de Pz 12.....	41
4.2.8.2.1 Densidad óptica.....	41
4.2.8.2.2 pH.....	42
4.2.8.3 Determinación de la concentración de biomasa.....	42
4.2.8.3.1 Determinación de peso seco.....	42
4.2.8.4 Parámetros de crecimiento.....	42
4.2.8.4.1 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ).....	42
4.2.8.4.2 Rendimientos del crecimiento (Y_s).....	44
4.2.8.4.3 Productividad celular (P).....	44
4.2.8.4.4 Cociente metabólico.....	44
4.2.8.4.5 Conversión de sustrato.....	44
4.2.8.5 Cuantificación de carbohidratos y productos de la fermentación.....	44

4.2.8.5.1 Preparación de muestras.....	44
4.2.8.5.2 Cuantificación de carbohidratos por el método enzimático.....	44
4.2.8.5.3 Cuantificación de carbohidratos y metabolitos de la fermentación por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	45
4.2.8.6 Balance de la fermentación.....	45
Capítulo V. Resultados.....	47
5.1 Caracterización del sustrato.....	47
5.1.1 Cuantificación enzimática de carbohidratos en muestras de harina y masa de maíz nixtamalizado y de pozol mediante el uso de sistemas enzimáticos comerciales.....	47
5.2 Fermentaciones de carbohidratos solubles encontrados en el pozol por la cepa Pz 12.....	49
5.2.1 Fermentación de Pz 12 en el medio HSH-sacarosa 2.92 mM.....	49
5.2.1.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por la cepa Pz 12 en el medio HSH-sacarosa 2.92 mM.....	49
5.2.1.2 Parámetros de crecimiento de la cepa Pz 12 en sacarosa.....	51
5.2.1.3 Balance de la fermentación de sacarosa por Pz 12.....	51
5.2.1.4 Discusión de resultados.....	52
5.2.2 Fermentación de Pz 12 en el medio HSH-fructosa 2.92 mM.....	55
5.2.2.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por la cepa Pz 12 en fructosa.....	55
5.2.2.2 Parámetros de crecimiento de la cepa Pz 12 en fructosa.....	57
5.2.2.3 Balance de la fermentación de fructosa por Pz 12.....	57
5.2.2.4 Discusión de resultados.....	59
5.2.3 Fermentación de Pz 12 en el medio HSH-glucosa 2.92 mM.....	62
5.2.3.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por Pz 12 en glucosa.....	62
5.2.3.2 Parámetros de crecimiento de Pz 12 en glucosa.....	62
5.2.3.3 Balance de la fermentación de glucosa por Pz 12.....	62
5.2.3.4 Discusión de resultados.....	64
5.2.4 Fermentación de Pz 12 en el medio HSH-glucosa+fructosa 2.92 mM.....	66
5.2.4.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por Pz 12 en glucosa+fructosa.....	66
5.2.4.2 Parámetros de crecimiento de Pz 12 en glucosa+fructosa.....	66
5.2.4.3 Balance de la fermentación de glucosa+fructosa por Pz 12.....	68
5.2.4.4 Discusión de resultados.....	68
5.2.5 Fermentación de Pz 12 en el medio HSH-sacarosa+fructosa 2.92 mM.....	70
5.2.5.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por Pz 12 en sacarosa+fructosa.....	70
5.2.5.2 Parámetros de crecimiento de Pz 12 en sacarosa+fructosa.....	70
5.2.5.3 Balance de la fermentación de sacarosa+fructosa por Pz 12.....	72
5.2.5.4 Discusión de resultados.....	72

5.2.6 Evaluación de los sustratos utilizados por la cepa Pz 12 (glucosa, fructosa y sacarosa).....	74
5.3 Efecto del oxígeno en el metabolismo de sacarosa por Pz 12.....	77
5.3.1 Fermentación aerobia de sacarosa por la cepa Pz 12.....	78
5.3.1.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por Pz 12 en sacarosa bajo condiciones aerobias.....	78
5.3.1.2 Parámetros de crecimiento de Pz 12 en sacarosa bajo condiciones aerobias.....	78
5.3.1.3 Balance de la fermentación de sacarosa en condiciones aerobias por Pz 12.....	80
5.3.1.4 Discusión de resultados.....	80
5.3.2 Fermentación anaerobia de sacarosa por la cepa Pz 12.....	82
5.3.2.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos por Pz 12 en condiciones anaerobias.....	82
5.3.2.2 Parámetros de crecimiento de Pz 12 en sacarosa en condiciones anaerobias por Pz 12.....	84
5.3.2.3 Balance de la fermentación de sacarosa en condiciones anaerobias.....	84
5.3.2.4 Discusión de resultados.....	84
5.3.3 Efecto de los niveles de oxígeno en los parámetros de crecimiento de Pz 12.....	86
Capítulo VI. Conclusiones.....	90
Capítulo VII. Referencias.....	92
Apéndice I.....	100
Apéndice II.....	116

LISTA DE TABLAS

No.	Titulo	Página
1	Soluciones stock necesarias para preparar la Base E de minerales.....	33
2	Reactivos necesarios para preparar la mezcla de metales traza.....	34
3	Volúmenes requeridos de solución stock para preparar 1000 mL de Base E de minerales (Doble Fuerza).....	34
4	Concentración de aminoácidos requeridos para la solución stock de aminoácidos.....	35
5	Mezcla I de vitaminas.....	36
6	Mezcla II de vitaminas.....	36
7	Mezcla III de vitaminas.....	36
8	Volúmenes de soluciones stock requeridas para preparar 1000 mL de medio HSH.....	38
9	Concentración de glucosa, fructosa y sacarosa en masas y harinas de nixtamal y en masas de pozol por el sistema enzimático Boehringer Mannheim.....	47
10	Concentración de glucosa, maltosa y sacarosa en muestras de harinas y masas de nixtamal y en masas de pozol por el sistema enzimático Boehringer Mannheim.....	48
11	Balance de la fermentación de sacarosa 2.92 mM por Pz 12 (Condiciones microaerofílicas).....	52
12	Fermentación de diferentes concentraciones de fructosa por la cepa Pz 12.....	57
13	Balance de la fermentación de 2.92 mM de fructosa por Pz 12 después de 48 horas de incubación.....	57
14a.	Balance de la fermentación de fructosa por Pz 12 . Concentración de fructosa 5.54 mM, 48 h de incubación.....	58
14b.	Balance de la fermentación de fructosa por Pz 12 . Concentración de fructosa 11 mM, 48 h de incubación.....	59
15	Concentración de los productos metabólicos finales (mol/mol fructosa) obtenidos de diversas cepas de <i>Leuconostoc</i>	60
16	Balance de la fermentación de glucosa 2.92 mM por Pz 12 después de 48 horas de incubación.....	64
17	Balance de la fermentación de glucosa+fructosa 2.92 mM por Pz 12 después de 48 horas de incubación.....	68
18	Balance de la fermentación de sacarosa+fructosa 2.92 mM por Pz 12 después de 24 horas de incubación.....	72
19	Efecto de los sustratos utilizados por Pz 12 en los parámetros de crecimiento bajo condiciones microaerofílicas.....	74
20	Balance de la fermentación de sacarosa 2.92 mM por Pz 12 (Condiciones aerobias).....	80
21	Balance de la fermentación de sacarosa 2.92 mM por Pz 12 (Condiciones anaerobias).....	84

22	Efecto de los niveles de oxígeno en los parámetros de crecimiento de la cepa Pz 12 en el medio HSH-sacarosa 2.92 mM.....	86
23	Reacciones enzimáticas para la cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa mediante los sistemas Boehringer Mannheim.....	101
24	Efecto de la reducción del volumen de reacción y de la preparación del buffer ATP/NADP en la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.....	104
25	Evaluación del uso de diferentes enzimas para la cuantificación enzimática de glucosa, fructosa y sacarosa.....	106
26	Efecto global de las enzimas utilizadas en la cuantificación de una mezcla 0.5 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa.....	106
27	Efecto global de las enzimas utilizadas en la cuantificación de una mezcla 1.0 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa.....	107
28	Carbohidratos liberados de la solución de invertasa.....	108
29	Cuantificación de carbohidratos totales en la solución de invertasa antes y después de realizarle lavados.....	108
30	Determinación de la actividad de la invertasa, por medio de la cuantificación de una solución estándar de sacarosa 0.5 g/L.....	109
31	Efecto de la concentración de α -glucosidasa en la cuantificación de una solución estándar de maltosa 0.5 g/L.....	110
32	Efecto de la concentración de sustrato en el comportamiento de la enzima α -glucosidasa.....	111
33	Metodología propuesta para la cuantificación simultánea de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa.....	113
34	Diferencias de absorbancias para la cuantificación enzimática de carbohidratos.....	114
35	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones microaerófilas.....	116
36	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de fructosa por Pz 12 en condiciones microaerófilas.....	117
37	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de glucosa por Pz 12 en condiciones microaerófilas.....	118
38	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de glucosa+fructosa por Pz 12 en condiciones microaerófilas.....	119
39	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa+fructosa por Pz 12 en condiciones microaerófilas.....	119
40	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones aerobias.....	120
41	Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones anaerobias.....	121

LISTA DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	Fermentación homoláctica de la glucosa por las bacterias lácticas.....	11
2	Fermentación heteroláctica por las bacterias lácticas.....	12
3	Metabolismo de pentosas en bacterias lácticas.....	19
4	Curva de calibración. Densidad óptica vs. peso seco.....	43
5	Fermentación de sacarosa por Pz 12. Condiciones microaerofílicas.....	50
6	Fermentación de fructosa por Pz 12. Condiciones microaerofílicas.....	56
7	Fermentación de glucosa por Pz 12. Condiciones microaerofílicas.....	63
8	Fermentación de glucosa+fructosa por Pz 12. Condiciones microaerofílicas.....	67
9	Fermentación de sacarosa+ fructosa por Pz 12. Condiciones microaerofílicas.....	71
10	Efecto del sustrato en los rendimientos celulares obtenidos a diferentes conversiones de sustrato.....	76
11	Fermentación de sacarosa por Pz 12. Condiciones aerobias.....	79
12	Fermentación de sacarosa por Pz 12. Condiciones anaerobias.....	83
13	Efecto de las condiciones de oxígeno en los rendimientos celulares por Pz 12.....	89

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DE UNA BACTERIA LÁCTICA AISLADA DEL POZOL

RESUMEN

Se profundizó en el conocimiento del metabolismo de las bacterias lácticas del pozol, que es una bebida ácida que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado, a partir del estudio del metabolismo de los principales carbohidratos solubles presentes en el maíz nixtamalizado (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, por una bacteria láctica que predomina al inicio de la fermentación del pozol (*Leuconostoc* Pz 12).

Se realizaron fermentaciones en un medio líquido definido bajo condiciones microaerofílicas con sacarosa, glucosa, glucosa+fructosa y sacarosa+fructosa. Se observó una mayor velocidad específica de crecimiento en sacarosa que en los demás carbohidratos. En la fermentación de sacarosa, *Leuconostoc* sp. Pz 12 consumió inmediatamente la glucosa y utilizó parte de la fructosa como aceptor de electrones y parte como donador de electrones, sin agotarla. Los productos de su metabolismo fueron: ácido láctico, ácido acético, etanol y manitol. En un medio con una mezcla de glucosa y fructosa utilizó preferencialmente la glucosa sobre la fructosa, sin agotar éste último azúcar. En un medio con sacarosa+fructosa no aumentó la proporción de fructosa a utilizarse como aceptor de electrones.

Se demostró que existe un efecto de la presencia del oxígeno en la fermentación de sacarosa, similar al que se ha reportado para la fermentación de glucosa: en condiciones anaeróbicas se produjeron 1.5 moles de ácido láctico, 1.4 moles de etanol, 0.2 moles de manitol y 0.2 moles de ácido acético a partir de 1 mol de sacarosa; en condiciones aeróbicas se alcanzó la misma concentración de ácido láctico, y una mayor concentración de ácido acético (1.8 moles), a expensas de la de etanol (0.3 moles) y no se detectó manitol.

Se estableció entonces la importancia de la presencia de sacarosa para la acidificación eficiente de la masa de nixtamal por esta cepa y de un aceptor de electrones (oxígeno o fructosa) para la mayor producción de ácido acético, de importancia en esta fermentación por presentar mayor actividad antimicrobiana que el ácido láctico.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida refrescante, ácida, no alcohólica que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. Es de origen maya y hasta la fecha la siguen consumiendo grupos indígenas y mestizos del sureste de México (Ulloa, 1983).

La fermentación es efectuada por una microbiota muy compleja, que incluye bacterias, levaduras y hongos. De las bacterias, se han identificado a las lácticas como un grupo importante, y se les asocia como iniciadoras de la fermentación; como producto de su actividad se acidifica la masa y se obtienen algunos aromas y sabores característicos del producto. Entre las bacterias lácticas se han detectado grupos homo y heterofermentativos, siendo éstas últimas las predominantes al inicio de la fermentación (Ulloa, 1983; Nuraida, 1995).

Aún cuando el principal carbohidrato de las masas de maíz nixtamalizado es el almidón, se ha demostrado que la actividad amilolítica no es un factor indispensable para la fermentación de la masa, ya que las bacterias lácticas tienen buen crecimiento y logran acidificar masas esterilizadas inoculadas con cepas de bacterias lácticas sin actividad amilolítica (Wacher, 1995). Si las bacterias lácticas no necesitan hidrolizar el almidón para desarrollarse en la masa requieren necesariamente de otro u otros sustratos. Aún cuando la concentración de carbohidratos solubles es pequeña, se piensa que puede ser suficiente para la acidificación de la masa o para iniciarla. Los principales carbohidratos solubles del maíz nixtamalizado son glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. Este último, que es el más abundante, se encuentra en una concentración de 0.1 a 0.4 g/100 g de materia seca (Santillana, 1995). Es de gran importancia saber si las concentraciones detectadas de esos carbohidratos pueden ser limitantes para el desarrollo de las bacterias lácticas y poder determinar el tipo y la concentración de los metabolitos producidos a partir de cada carbohidrato.

La mayoría de los estudios del metabolismo de carbohidratos en *Leuconostoc* se han realizado en glucosa o lactosa, pero existe muy poca información sobre el metabolismo de sacarosa (Cogan y Jordan, 1994). Este carbohidrato se encuentra en una variedad de alimentos vegetales fermentados por bacterias lácticas y en especial siendo el principal carbohidrato soluble del maíz, debe determinarse su importancia en la acidificación de las masas.

Dada la heterogeneidad del sustrato de estudio y por ser una fermentación en estado semisólido, es de esperarse la presencia de zonas con diferentes niveles de oxigenación que podrían afectar el tipo y la proporción de metabolitos producidos. Por esto se decidió evaluar el efecto de diferentes niveles de oxigenación en el metabolismo de los carbohidratos mencionados.

CAPITULO II. GENERALIDADES

2.1 EL POZOL.

2.1.1 Descripción.

El pozol, del nahuatl *pozolli* que significa espumoso, es una masa de maíz fermentada moldeada en forma de bolas de diferentes formas y tamaños que van de 10 a 12 cm de longitud y de 5 a 8 cm de amplitud, con un peso entre 70 y 170 g, aunque algunas pueden pesar 1 Kg o más. El pozol es consumido por pueblos indígenas y mestizos principalmente en estados del sureste de México como Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, y en menor proporción en Veracruz y Oaxaca.

Para su consumo, las bolas de pozol son diluidas con agua, para obtener una bebida no homogénea de sabor ácido a la que opcionalmente puede adicionársele sal, chile, azúcar o miel.

La bebida hecha con pozol se consume durante las jornadas de trabajo, en la comida, o como refresco a cualquier hora del día. Los chamulas y lacandones consumen el pozol cuando realizan viajes largos a la selva, debido a su alto grado de conservación.

Esta bebida se ha utilizado desde épocas prehispánicas con fines alimenticios, ceremoniales y medicinales por diferentes grupos indígenas como los chontales, mayas, lacandones, tzeltales, tzotziles, tojolabales, chamulas, mames, zoques y zapotecos (Ulloa, 1983).

2.1.2 Elaboración.

Ulloa y col. (1983) indicaron que el pozol se prepara para consumo familiar o comercial a baja escala, según un proceso tradicional que se ha transmitido generacionalmente. En dicho proceso, 0.5-1 Kg de maíz, preferentemente blanco, se desgrana y se hierve en dos litros de agua con cal (aproximadamente 10% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$) durante 1 hora o hasta que los granos se hinchen y el pericarpio pueda desprenderse con facilidad; a estos granos fríos y enjuagados con agua, se les denomina nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se

obtiene una masa martajada a la que se le da forma esférica manualmente. Las bolas así formadas, se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se fermentan de 1 a 14 días dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevalecientes.

Cañas y col. (1993) indicaron que: 1) Existen dos tipos básicos de pozol, en función de los factores sociales y culturales del productor: ladino e indígena; 2) Que existen diferencias en el proceso de elaboración de pozol que determinan las características del producto final, como son: tipo de maíz y grado de madurez, la adición de otros componentes a la masa de nixtamal, el tipo de envoltura, y la presencia o ausencia de una segunda cocción o "reventado" de los granos de maíz después de la nixtamalización. Esta última es la variación más importante, pues marca la diferencia entre el pozol indígena y el mestizo.

2.1.3 Microbiología.

Ulloa (1974) estudió la sucesión de hongos y levaduras en muestras de pozol del Estado de Tabasco. En dicho estudio se estableció que la mayoría de estos microorganismos presentes en los granos de maíz utilizados para preparar el pozol, son destruidos durante el tratamiento térmico-alkalino, y que es durante el tratamiento del nixtamal cuando ocurre la inoculación. En las primeras horas de la fermentación se detectaron *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida*. En pozol con superficie seca y bajo pH se detectó *Cladosporium cladosporioides* o *C. herbarum*, *Monilia sitophila*, y *Mucor rouxianus* o *Mucor racemosus*. Además de los mohos anteriores, se aislaron los siguientes: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium lanosoviride*, *Phialophora richardsiae*, *Rhizopus nigricans* y *Trichoderma viride*. *Hansenula fabianii*, *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron las levaduras aisladas.

Hasta hace poco tiempo, no se había profundizado en el estudio de las bacterias del pozol. *Bacillus cereus* y *Paracolobactrum aerogenoides* fueron

aisladas por Salinas (1958). Ulloa y Herrera (1972) aislaron del pozol *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter (Alkaligenes) pozoilis*. Fuentes (1974) aisló *Escherichia coli* var. *neapolitana* y *Pseudomonas mexicana*. Es importante mencionar que Salinas y Herrera (1974) aislaron *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)*.

Se encontró que las bacterias *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)* son fijadoras de nitrógeno (Taboada y col., 1975).

Los estudios de Silva-Villarreal (1984), Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado (1988), Ramírez (1987) y Nuraida (1988) confirmaron las inferencias de Steinkraus (1983) en el sentido de que durante las primeras horas de fermentación predominan las bacterias lácticas y que son las responsables de la producción de ácido láctico en ese periodo de tiempo.

Nuraida y col. (1995) caracterizaron bacterias lácticas aisladas del pozol por Owens y Wachter en 1987, y encontraron las siguientes especies: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus (Lactococcus) lactis* y *Streptococcus (Lactococcus) raffinolactis*. También determinaron que *Leuconostoc* predominaba en masas en fermentación.

Wachter (1995) profundizó en el estudio microbiológico del pozol y determinó que las bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias mesófilas no lácticas (*Bacillus*), mohos y levaduras, son los grupos de microorganismos que sistemáticamente se encuentran en la masa de pozol recién elaborado; que la microbiota del pozol es muy estable, y que las diferencias del proceso ladino o mestizo y el indígena no influyen en la composición bacteriana del pozol. En las masas de pozol encontró bacterias lácticas homo y heterofermentativas y detectó el predominio de las heterofermentativas. También determinó que algunas de las bacterias lácticas caracterizadas poseían actividad amilolítica, coincidiendo con las observaciones de Velázquez-Corona y col. (1984).

Wachter (1995) también determinó que durante la molienda ocurre la mayor inoculación tanto de bacterias lácticas, como de contaminantes microbianos indeseables. Así mismo, determinó que todos los grupos microbianos presentes

en las masas recién preparadas crecen en la masa y que las bacterias lácticas y las mesófilas no lácticas crecen más rápidamente que los demás grupos. Sin embargo, no observó una predominancia de las bacterias lácticas. Como algo inesperado, no observó una inhibición de bacterias mesófilas no lácticas ni de enterobacterias como resultado de la acidificación de las masas.

Aún cuando el principal carbohidrato de las masas es el almidón, demostró que las bacterias lácticas no necesitan de otro microorganismo para desarrollarse en la masa de nixtamal y que pueden crecer aún sin la capacidad de hidrolizar almidón, por lo anterior, propone que la concentración de carbohidratos directamente fermentables no es limitante ó que las bacterias usan otro sustrato fermentable diferente a los anteriores.

Utilizando un modelo de la fermentación del pozol, determinó que la función de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* es la acidificación rápida en las primeras horas de fermentación y producción de textura esponjosa de la masa; *Lactobacillus plantarum* contribuye incrementando la acidez hasta valores altos. Ambas bacterias produjeron un aroma frutal.

2.1.4 Cambios nutricionales, bioquímicos y sensoriales durante la fermentación del pozol.

Básicamente ocurren dos cambios sensoriales esenciales en la masa durante la fermentación del pozol, el desarrollo del sabor ácido y de un aroma característico que dan al pozol sus propiedades refrescantes.

Inicialmente los granos de maíz tienen un pH de 5.75, éste se ve incrementado hasta 7.5 por el tratamiento alcalino. Una vez formada la masa, tiene un pH de 6.8 y éste valor puede llegar hasta 3.9 en el octavo día de fermentación. La humedad de la masa permanece al 30% aproximadamente (Ulloa, 1974).

Los estudios de Cravioto (1955), demostraron que hay un incremento en el valor nutritivo del pozol con respecto a los granos de maíz utilizados en su preparación. Se encontró que el pozol tiene mayor contenido de niacina,

riboflavina, lisina y triptofano que el maíz; además, que el contenido proteico es mayor y de mejor calidad en el pozol que en el maíz. Ramírez (1987) determinó que después de 10 días de fermentación aumentan las concentraciones de lisina, triptofano y niacina.

2.2 CARBOHIDRATOS DEL MAIZ Y DEL NIXTAMAL.

El principal carbohidrato del maíz es el almidón (72-73%) y los carbohidratos solubles, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, representan solo del 1 al 3% del grano (Watson, 1987). Sin embargo, la concentración de carbohidratos fermentables seguramente disminuye durante el proceso de nixtamalización debido a las pérdidas de azúcares del maíz en las aguas de cocción y lavados. Trejo-González y col. (1982) reportan una concentración de 14.5 g/L de carbohidratos totales en el nexayote (agua de cocción de nixtamal para la producción de tortillas).

Santillana (1995) desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar algunos carbohidratos simples como glucosa, sacarosa y maltosa en nixtamal y pozol. Con dicho método, estableció que la sacarosa es el único carbohidrato soluble presente en la harina de nixtamal, y que dicha concentración se encuentra entre 0.1 y 0.4 g / 100 g de materia seca.

2.3 BACTERIAS LACTICAS.

Las bacterias lácticas son un grupo heterogéneo con un gran número de géneros. Morfológicamente son heterogéneos pero bioquímicamente se caracterizan por su producto final principal: **el ácido láctico**.

En general se aceptan dos grandes divisiones de bacterias lácticas: cepas homofermentativas y cepas heterofermentativas. Esta división está basada en el porcentaje de subproductos diferentes al lactato, que se forman durante la fermentación. Además de la determinación de sus productos finales, las bacterias lácticas pueden agruparse en tres tipos de acuerdo con su equipamiento enzimático:

a) Homofermentativas obligadas: aquéllas que tienen fructosa-bifosfato aldolasa pero no glucosa-6-P-deshidrogenasa ni 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

b) Heterofermentativas obligadas: tienen ambas deshidrogenasas pero no fructosa-bifosfato aldolasa.

c) Homofermentativas facultativas: tienen las tres enzimas y son capaces de utilizar cualquiera de las dos rutas.

En general, los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus* (*Lactococcus*) y algunas cepas de *Lactobacillus* son homofermentativas, mientras que *Leuconostoc* y algunas cepas de *Lactobacillus* son heterofermentativas.

Las bacterias lácticas homofermentativas utilizan glucosa por medio de la ruta EMP para producir lactato. El piruvato sirve como aceptor final de electrones. El rendimiento de ATP en esta fermentación es de 2 moles de ATP/mol de glucosa (Figura 1).

La fermentación heteroláctica es idéntica a la ruta fosfoetolasa (Figura 2), en ella la enzima fosfoetolasa transforma la xilulosa-5-P en gliceraldehído-3-P y acetil fosfato, el primero se metaboliza hasta ácido láctico vía piruvato y el segundo hasta acetato (bajo la influencia de la acetatocinasa) o etanol, vía acetil-CoA y acetaldehído. El rendimiento energético es la mitad del obtenido por homofermentación (Doelle, 1981).

2.4 LEUCONOSTOC.

Los "Leuconostoc" conforman un grupo de bacterias que se encuentran principalmente en vegetales y en raíces, por lo que es común encontrarlos en alimentos fermentados de origen vegetal; generalmente actuando como iniciadores de la fermentación (Daeschel y col., 1987). Aún cuando estas bacterias se han encontrado en leche y en ciertos productos lácteos, tienen su nicho ecológico en las plantas. Se dice que los tipos de *Leuconostoc* encontrados en productos lácteos no se encuentran en su hábitat natural. En cultivos puros, los leuconostoc son inertes en leche, pero cuando se asocian con *Lactococci* y

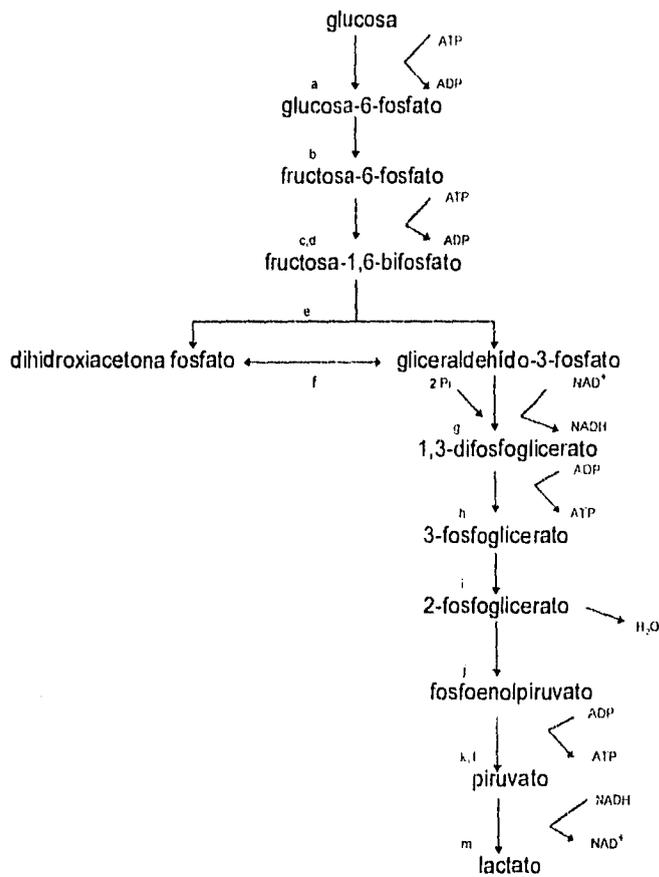


Figura 1. Fermentación homoláctica de la glucosa por las bacterias lácticas. a: hexocinasa, b: fosfoglucosa isomerasa, c: fosofructocinasa, d: fructosa-1,6-bisfosfatasa, e: fructosa bisfosfato aldolasa, f: triosa fosfato isomerasa, g: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, h: fosfogliceratocinasa, i: fosfogliceromutasa, j: enolasa, k: piruvatocinasa, l: fosfoenolpiruvato sintelasa y m: lactato deshidrogenasa. Pi= fosforo inorgánico (Modificado de Doelle, 1981).

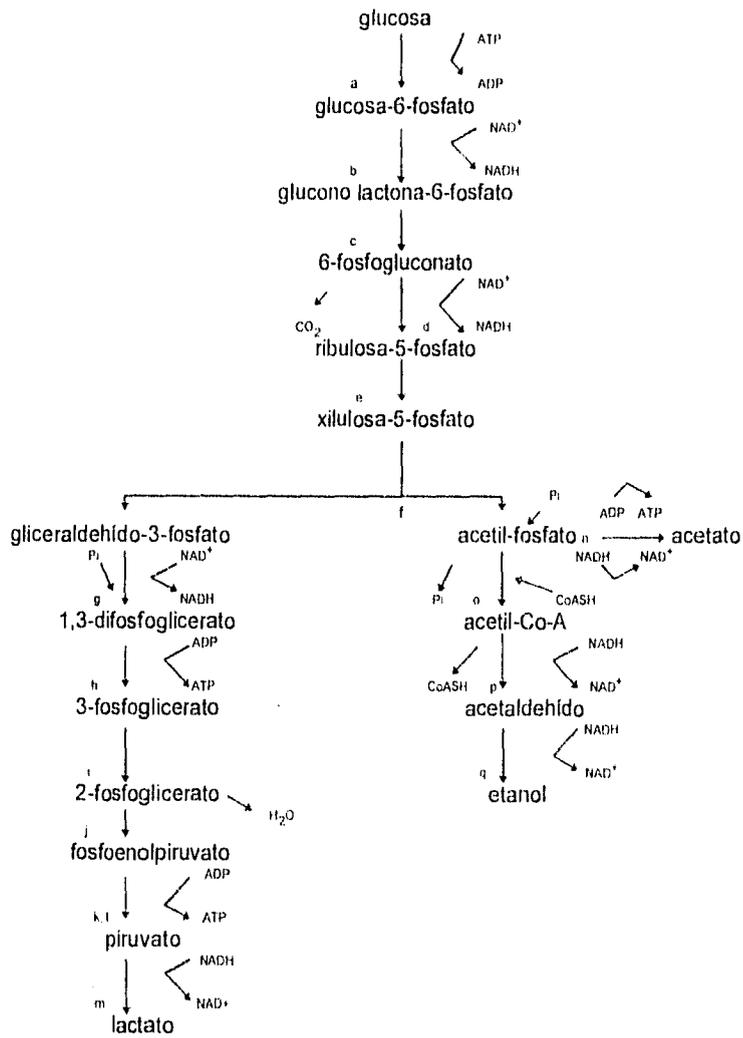


Figura 2. Fermentación heteroláctica por las bacterias lácticas. a: hexocinasa, b: glucosa-6-P-deshidrogenasa, c: gluconolactonasa, d: 6-P-gluconato deshidrogenasa, e: ribulosa-3-P-epimerasa, f: fosfoacetilasa g: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, h: fosfogliceratocinasa, i: fosfogliceromutasa, j: enolasa, k: piruvatocinasa, l: fosfoenolpiruvato sintetasa m: lactato deshidrogenasa, n: acetato cinasa, o: fosfato acetiltransferasa, p: acetaldehído deshidrogenasa, q: alcohol deshidrogenasa. Pi= fosforo inorgánico, CoASH= coenzima A y -CoA= forma de alta energía de la coenzima A (Modificado de Doelle, 1981).

algunas veces con otras bacterias lácticas, pueden fermentar el citrato presente en leche para producir diacetilo y otros compuestos de cuatro carbonos. Los leuconostoc son principalmente importantes en la generación de sabores en alimentos lácteos fermentados (Vedamuthu, 1994).

Aún cuando *Leuconostoc* es deseable en la mayoría de los alimentos por su efecto en el desarrollo del sabor y conservación del producto, es indeseable en la industria del azúcar debido a que se producen gomas (dextranas) a partir de sacarosa que interfieren con la subsecuente extracción del azúcar y disminuyen el rendimiento.

Leuconostoc se encuentra en cultivos de cepas mixtas mesófilas, pero no en cultivos iniciadores termófilos (Cogan y Jordan, 1994). En la edición más reciente del Manual Bergey se mencionan 4 especies de *Leuconostoc*: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc oenos*. *Leuconostoc mesenteroides* tiene 3 subespecies: *mesenteroides*, *cremoris* y *dextranicum*. Las subespecies *cremoris* sólo fermentan algunos carbohidratos como glucosa, galactosa, lactosa y maltosa, pero no sacarosa; esto parece ser una adaptación específica de *Leuconostoc mesenteroides* para crecer en leche (Marshall, 1987).

2.5 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS DE BACTERIAS LACTICAS.

2.5.1 Transporte.

En bacterias en general, el sistema de transporte de solutos puede dividirse en tres mecanismos que difieren en la forma de energía que se utiliza y la forma en que esta energía es transducida en los procesos de translocación: primario (luz, energía química), secundario (energía quimiosmótica) y translocación de grupo (Modificación química concomitante con transporte).

Los sistemas primarios de transporte utilizan energía luminosa ó química para transportar moléculas a través de la membrana citoplasmática; como ejemplo se puede mencionar la extrusión de los iones H^+ y lactato generados en la

fermentación y la producción simultánea de ATP por medio de la actividad FoF₁-ATPasa.

El transporte secundario involucra el movimiento de moléculas a través de la membrana citoplasmática a expensas de gradientes de protones electroquímicos u otros cationes previamente establecidos. Existen 3 tipos de transporte secundario: simporte (transporte simultáneo de dos sustratos por medio de un acarreador común en la misma dirección), antiporte (transporte simultáneo de dos sustratos por medio de un acarreador pero en direcciones opuestas) y uniporte (flujo de cationes dentro de la célula, ó de aniones fuera de la célula). En bacterias lácticas, el sistema secundario antiportero es el mas común.

La translocación de grupo sólo se ha observado para carbohidratos en bacterias lácticas, e involucra la fosforilación del carbohidrato concomitante con el transporte por el sistema fosfotransferasa:fosfoenolpiruvato (PTS:PEP) (Poolman, 1993; Cogan y Jordan, 1994).

Las translocaciones de grupo son mecanismos que alteran químicamente los sustratos derivados impermeables mientras cruzan la membrana citoplasmática. La entrada de un sustrato por translocación de grupo constituye un ahorro neto de energía metabólica por lo que es común que se encuentre en anaerobios estrictos y facultativos, como las bacterias lácticas. El sistema fosfotransferasa es el mejor establecido de las translocaciones de grupo. El transporte fosfotransferasa conserva energía, así que, debido a que las fermentaciones producen menos ATP que la respiración, se podría esperar encontrar el transporte fosfotransferasa asociado predominantemente con microorganismos fermentativos (Neidhardt, 1990).

Poolman (1993) indicó que recientemente se ha descrito un sistema de transporte dependiente de proteínas acarreadoras: ATP-asas transportadoras de carbohidratos. Dicho sistema facilita el consumo de carbohidratos múltiples como la rafinosa, la melobiosa y la isomaltotriosa. En general, los transportadores dependientes de proteínas acarreadoras se unen a sus sustratos con una alta

afinidad, lo que puede ser ventajoso para un microorganismo, dado que permiten un transporte eficiente de concentraciones en el rango nano y submicromolar.

En bacterias lácticas se han observado diferentes mecanismos para transportar una gran variedad de carbohidratos, sin embargo, los más estudiados son los que median el transporte de la lactosa (Poolman, 1993).

Poco se sabe acerca de los sistemas de transporte para carbohidratos en *Leuconostoc*. Se sabe que la lactosa es hidrolizada por la β -GAL para producir glucosa y galactosa, indicando que no está involucrada la translocación de grupos, pero que sí puede participar el transporte secundario (Cogan y Jordan, 1994).

Algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis* y *Streptococcus mutans* transportan sacarosa por medio del sistema PTS:PEP. La sacarosa-6-P que es producto intracelular de este transporte, se hidroliza hasta glucosa-6-P y fructosa por medio de la sacarosa-6-P-hidrolasa (Moat, 1988).

2.5.2 Metabolismo de carbohidratos.

La célula necesita energía para la polimerización, biosíntesis y algunas veces para la formación de precursores de metabolitos. También necesita energía adicional para otras funciones como llevar ciertos sustratos dentro de la célula, conservar metabolitos dentro de la misma, mantener una presión de turgencia adecuada, pH interno y movilidad. El requerimiento energético global es cubierto por reacciones comburentes por medio de dos mecanismos bioquímicos generales: fosforilación a nivel de sustrato y transporte de electrones (Neidhart, 1990).

Las bacterias lácticas no tienen ciclo de ácidos tricarbóxicos o un sistema citocromo, por lo que no pueden obtener energía a partir de la fosforilación oxidativa. En lugar de eso, la obtienen por medio de una fosforilación a nivel sustrato durante la fermentación de carbohidratos a ácido láctico, etanol o acetato y CO₂ (Cogan y Jordan, 1994).

2.5.2.1 Metabolismo de hexosas.

En general, se distinguen cuatro rutas diferentes para el metabolismo de la glucosa:

- a) Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)
- b) Ruta Hexosa Monofosfato (HMP)
- c) Ruta Fosfocetolasa (PK)
- d) Ruta Entner-Doudoroff (ED)

Estas cuatro rutas tienen un gran número de enzimas e intermediarios en común. Hay algunas enzimas que se presentan en una ruta particular y no en alguna de las otras rutas. Estas enzimas denominadas "enzimas clave" son por ejemplo: fosfofructocinasa (EMP), 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (HMP), 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (ED) y xilulosa-5-fosfocetolasa (PK).

El uso de la ruta fosfocetolasa se restringe a un pequeño grupo de bacterias: "los lactobacilos heterofermentativos", pero las otras tres rutas son utilizadas individualmente o en combinaciones por la mayoría de los microorganismos.

Cada una de las tres rutas puede servir para diferentes aspectos del metabolismo. La ruta EMP provee la mayor cantidad de ATP pero no produce precursores importantes para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, DNA y RNA. A los microorganismos que sólo utilizan esta ruta para degradar la glucosa, se les debe acompañar de factores de crecimiento y no son capaces de crecer en un medio líquido definido que sólo tenga glucosa y sales minerales.

En contraste, la ruta HMP produce todos los precursores necesarios para la biosíntesis de purina y pirimidina, pero sólo produce la mitad de la cantidad de ATP.

La ruta ED es la preferida por la mayoría de los microorganismos aerobios estrictos.

2.5.2.1.1 Ruta Embden Meyerhoff-Parnas.

Los puntos importantes en la secuencia de esta ruta son:

a) La glucosa tiene que activarse con ATP, lo cual puede ocurrir dentro de la célula o en la membrana celular dependiendo del mecanismo de transporte.

b) Posteriormente se requiere de un mol de ATP para obtener fructosa 1,6-bifosfato, la cual se rompe en dos triosas fosfato: gliceraldehído-3-P e hidroxiacetona fosfato. Las triosas se conservan en equilibrio por medio de una isomerasa.

c) La oxidación de las triosas fosfato está acoplada a la reducción de NAD^+ y está acompañada por una esterificación del fosfato inorgánico. En este caso, cada mol de triosafosfato oxidada produce un mol de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y un mol de 1,3 bifosfo-glicerato.

d) En los pasos subsecuentes hasta piruvato, ambos grupos fosfato son transferidos a ADP a partir de un mol de glucosa. Para ninguna de las reacciones se requiere oxígeno, pero el NAD reducido tiene que regenerarse por algún mecanismo. Esta regeneración ocurre ya sea en conexión con la cadena de transporte de electrones (que las bacterias lácticas no poseen) o por la reducción de compuestos orgánicos.

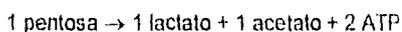
2.5.2.1.2 Ruta Fosfocetolasa.

Las bacterias que utilizan esta ruta carecen de la enzima aldolasa, la cual convierte la fructosa-1,6-bifosfato en dos triosas fosfato: gliceraldehído-3-P e dihidroxiacetona-fosfato, así como de las enzimas transaldolasa y transcetolasa de la ruta HMP. Los tres primeros pasos del metabolismo de la glucosa, oxidación de la glucosa incluyendo la descarboxilación de 6-fosfogluconato, son idénticos a los de la ruta HMP. La ribulosa-5-fosfato formada de este modo, es isomerizada hasta xilulosa-5-P, la cual se fragmenta después en una reacción que requiere fosfato inorgánico para la formación de componentes fosfato de alta energía (el acetil fosfato y el gliceraldehído-3-P). Este último es metabolizado después usando enzimas de la ruta EMP. Si el acetil-P se convierte en acetato, se conserva el enlace de alta energía y se tiene una ganancia neta de dos moles de ATP, la misma que se tiene en la ruta EMP. Sin embargo, si la conversión lleva a

la producción de etanol, el enlace de alta energía se pierde, y la ganancia neta de energía sería un mol de ATP/mol de glucosa (Doelle, 1981).

2.5.2.2 Metabolismo de pentosas.

Todas las bacterias lácticas heterofermentativas utilizan pentosas. En la fermentación de pentosas no se forma CO₂ y se produce acetato en lugar de etanol por medio de la reacción general siguiente:



En el metabolismo de pentosas por la vía fosfoctolasa, únicamente se produce 1 mol de NADH (en la oxidación del gliceraldehído-3-P hasta ácido-1,3-difosfoglicérico) que es oxidado por medio de la formación de lactato, por lo que no es necesario reducir el acetyl-P a etanol; en lugar de eso se oxida para formar acetato, con la ganancia de un ATP formado. Esto significa que la fermentación de pentosas es más eficiente en producción de energía (2 mol ATP/mol) que la fermentación de glucosa (1 mol ATP/mol). La xilulosa-5-P es el carbohidrato clave en la fermentación, y otras pentosas deben convertirse en ella antes de que puedan metabolizarse (Figura 3) (Cogan, 1995).

Westby (1993) reportó que es común que las bacterias lácticas no puedan crecer en un medio definido con pentosas como única fuente de carbono; sin embargo, son capaces de fermentar pentosas en un medio complejo. Demostró que la habilidad de *Lactobacillus plantarum* para metabolizar ribosa es inducible, que la adaptación requiere además de la ribosa la presencia de glucosa, aminoácidos y factores de crecimiento, y que el crecimiento previo en presencia de ribosa no provoca que las cepas crezcan con ribosa como única fuente de carbohidrato fermentable.

2.5.2.3 Metabolismo de disacáridos.

Del metabolismo de disacáridos, indudablemente el más estudiado ha sido el de la lactosa, que involucra ya sea la hidrólisis del azúcar libre por la β -galactosidasa para producir glucosa y galactosa, o la hidrólisis de la lactosa-6-P

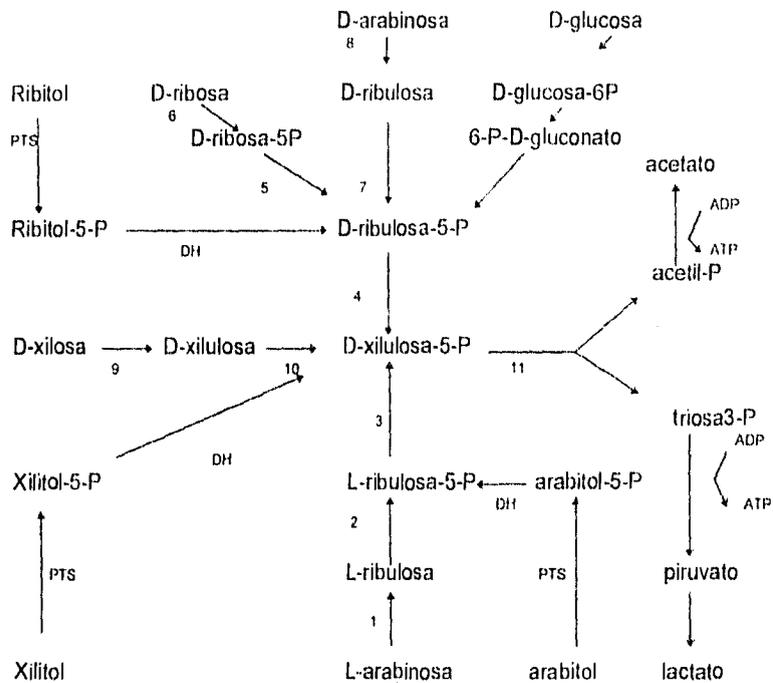


Figura 3. Metabolismo de pentosas en bacterias lácticas. 1: arabinosa cetol-isomerasa, 2: ATP:L-ribulosa-5-fosfotransferasa, 3: L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa, 4: D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa, 5: D-ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa, 6: ATP:D-ribosa-5-fosfotransferasa, 7: ATP:D-ribulosa 5-fosfotransferasa, 8: D-arabinosa cetol-isomerasa, 9: D-xilosa cetol-isomerasa, 10: ATP:D-xilulosa 5-fosfotrasferasa y 11: D-xilulosa-5-fosfato D-gliceraldehído 3-fosfato liasa. PTS= fosfotransferasa, P= fosfato y DH= deshidrogenasa. (Cogan, 1994).

por la P- β -galactosidasa produciendo glucosa y galactosa-6-P. La glucosa puede metabolizarse por las rutas EMP ó PK, dependiendo si la bacteria láctica es homo o heterofermentativa. La galactosa se metaboliza después por la vía Leloir, mientras que la galactosa-6-P utiliza la ruta Tagatosa-6-P (Poolman, 1993).

De acuerdo con Cogan y Jordan (1994), la P- β -galactosidasa (P- β -GAL) es la enzima inicial en la fermentación de la lactosa en *Lactococci*, mientras que en *Leuconostoc* la enzima es la β -galactosidasa. Sin embargo, Smart (1993) menciona que se encuentran poco definidos los mecanismos del uso de la lactosa y su regulación entre los grupos de bacterias lácticas menos estudiadas (*Lactobacilli*, *Leuconostoc* y *Pediococci*) y en bifidobacterias.

2.5.3 Estudios recientes del metabolismo de carbohidratos por bacterias lácticas.

Existen estudios mediante los cuales ha sido posible demostrar la manera como algunas bacterias lácticas utilizan carbohidratos presentes en alimentos fermentados. Algunos de ellos se resumen a continuación.

Smart (1993) estudió el mecanismo del uso de la lactosa por bacterias lácticas y bifidobacterias. El autor determinó que la mayoría de las cepas de *Lactococcus* estudiadas tenían actividad P- β -galactosidasa y que en cepas de *Leuconostoc* se detectaron bajos niveles en la actividad de la P- β -galactosidasa, asociada con niveles altos de actividad β -galactosidasa. Además, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* 253 mostró un crecimiento lento en galactosa y lactosa, comparado con un mayor crecimiento en glucosa y un crecimiento escaso en lactulosa.

Gobbetti (1994) estudió el comportamiento de las bacterias lácticas (*Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 o *Lactobacillus plantarum* DC400) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* 141 o *Sacc. exiguus* M14) de la masa ácida en un medio definido, en el que pudo reproducir el metabolismo de los carbohidratos solubles individuales de la harina de trigo. Los patrones de

fermentación de las dos bacterias lácticas coincidieron con los del Manual Bergey. *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 de cultivo individual creció más rápido en maltosa que en glucosa, mientras que *L. plantarum* DC400 prefirió la maltosa y la glucosa sobre la fructosa para un crecimiento rápido. Sólo *L. plantarum* fermentó débilmente la sacarosa. La carencia de competencia entre *S. exiguus* M14 y *L. brevis* subsp. *lindneri* CB1 por la maltosa aumentaron la contribución de los metabolitos de bacterias lácticas en la masa ácida. La liberación de carbohidratos disponibles (glucosa para ambas bacterias lácticas y fructosa para *L. plantarum* DC 400) por medio de la hidrólisis de la sacarosa con levaduras representa otra interacción metabólica que facilita el crecimiento de las bacterias lácticas en la fermentación de la masa ácida. En contraste, la fuerte competencia por maltosa y glucosa entre *S. cerevisiae* 141 y *L. brevis* subsp. *lindneri* CB1 disminuyeron la actividad bacteriana. Durante el metabolismo de maltosa de *L. brevis* subsp. *lindneri* CB1 solo se metaboliza la glucosa-1-P producida por la maltosa fosforilasa, mientras que la glucosa restante no es utilizada y se excreta fuera de la célula (relación molar final aproximadamente 1:1).

Stolz (1992) reportó que durante el metabolismo de maltosa por *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1, se produce glucosa y glucosa-1-P como resultado de la maltosa fosforilasa. La glucosa-1-P se metaboliza, mientras que la glucosa no fosforilada se excreta fuera de la célula en una relación molar 1:1.

Bonestroo (1992) indicó que algunas bacterias lácticas aisladas de plantas no poseen gran capacidad para fermentar sacarosa como única fuente de carbono, mencionando como posibles causas los bajos niveles constitutivos de permeasas específicas y de enzimas hidrolíticas (β -fructofuranosidasa y sacarosa hidrolasa). Se cree, sin embargo, que estas enzimas están mediadas por plásmidos y que pueden ser inducibles.

Rodríguez (1994) estudió el metabolismo de ácidos orgánicos y carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa) en cultivos mixtos de *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc oenos* aislados del vino, observando que el primero prefirió glucosa que fructosa para crecer y que el segundo mostró una mayor

afinidad por fructosa con respecto a glucosa. En cultivo mixto, se prefirió glucosa sobre fructosa en las primeras horas de crecimiento. Esta diferencia disminuyó en las últimas horas, donde la concentración de sacarosa también disminuyó.

Salou (1994) estudió el cometabolismo de glucosa con citrato o fructosa de *Leuconostoc oenos* y observó un crecimiento muy pobre del microorganismo en presencia de citrato como única fuente de carbono. Las células crecieron más rápido en la mezcla glucosa+citrato (37 y 55 mM) que en un medio sólo con glucosa. El autor sugiere que el metabolismo de fructosa procedió por dos rutas distintas, el 44% de la fructosa se redujo a manitol asociado con la oxidación del NADH, y el resto se transformó por medio de la ruta fosfoetolasa en lactato, etanol, acetato y CO₂. La reducción de parte de la fructosa a manitol provocó un cambio a favor de la producción de acetato a expensas de etanol cuando se comparó con el metabolismo de la glucosa. También realizó el crecimiento de *L. oenos* con una mezcla glucosa+fructosa observando un crecimiento más rápido en un medio con la mezcla de los dos carbohidratos que con cada carbohidrato. La glucosa y la fructosa se consumieron simultáneamente y durante el cometabolismo de ambos sustratos, el 83% de la fructosa consumida se redujo a manitol. Su estudio confirmó que la estimulación del crecimiento puede deberse al cometabolismo de los dos sustratos y que debido a la necesidad de mantener el balance de equivalente reducidos se reorientan las rutas metabólicas cuando los sustratos adicionales son consumidos.

2.6 METABOLISMO AEROBICO.

Algunas bacterias lácticas metabolizan el oxígeno hasta O²⁻, peróxido de hidrógeno o agua en presencia de un sustrato oxidable (Cogan y Jordan, 1994).

Un grupo reducido de enzimas del tipo flavoproteína oxidasa son las responsables de la interacción directa de las bacterias lácticas con el oxígeno. A través de éstas y de la NADH peroxidasa, el oxígeno y el peróxido de hidrógeno pueden aceptar electrones procedentes del metabolismo de carbohidratos, provocando el ahorro en el uso de intermediarios metabólicos, tales como el

piruvato o acetaldehído como aceptores de electrones. Como consecuencia, el metabolismo de carbohidratos en cultivos aireados de bacterias lácticas puede ser diferente que en cultivos no aireados (Condon, 1987).

2.6.1 Cambios inducidos por la aireación en el metabolismo de carbohidratos.

Cuando las bacterias lácticas crecen en ausencia de oxígeno utilizan principalmente lactato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa para regenerar el NAD^+ necesario para las reacciones de deshidrogenación del metabolismo de carbohidratos. A su vez, cuando crecen en presencia de oxígeno utilizan NADH oxidasas y NADH peroxidasas como mecanismos alternos para regenerar el NAD^+ .

Los productos finales de la fermentación anaeróbica de la glucosa en *Leuconostoc* son lactato, etanol y CO_2 ; durante el crecimiento aeróbico se produce acetato en lugar de etanol. Las cepas que carecen de la enzima NADH oxidasa forman lactato, etanol y CO_2 en presencia o ausencia de oxígeno. La producción de etanol de la ruta heteroláctica es necesaria para regenerar el NAD^+ por medio de la deshidrogenación de glucosa-6-P y 6-fosfogluconato. Cuando hay oxígeno disponible las actividades específicas de NADH oxidasa y de acetato-cinasa son altas, y bajas las de acetiltransferasa y alcohol deshidrogenasa; de esta forma, se favorece la síntesis de acetato y la conservación del fosfato de alta energía. En ausencia de oxígeno, *Leuconostoc* responde con mayores cantidades de acetilfosfotransferasa y alcohol deshidrogenasa, y actividades menores de NADH-oxidasa y acetato cinasa.

Cambiar la síntesis de etanol a la de acetato duplica la cantidad de ATP que se forma a partir de glucosa, ya que se forma un ATP adicional mediante la conversión de acetil-fosfato en acetato. El rendimiento de crecimiento molar de *L. mesenteroides* (NADH-oxidasa positivo) creciendo aeróbicamente en glucosa es aproximadamente el doble que el obtenido durante el crecimiento anaeróbico. Además, la rapidez de crecimiento en glucosa en presencia de oxígeno es mucho

mayor que en su ausencia, lo que indica que la velocidad de formación de ATP a partir de carbohidratos es un paso limitante en la velocidad de crecimiento de estas bacterias (Condon, 1987).

Ito (1983) demostró que la exposición al oxígeno del aire de las células de *Leuconostoc mesenteroides* IFO 3426 induce la pérdida de su actividad glicolítica anaeróbica como consecuencia de la incapacidad de las células para reoxidar el NAD(P)H vía el sistema formador de etanol. El crecimiento en glucosa bajo condiciones anaerobias se favoreció, mientras que el crecimiento aeróbico en glucosa no oxidada se vio limitado.

Cogan (1989) indicó que *Streptococcus lactis* (*Lactococcus lactis*) fue incapaz de crecer en cultivos por lotes o quimiostato fuertemente aireados de un medio definido con glucosa. La aireación creó un requerimiento por acetato o ácido lipoico. (Se sabe que dicho compuesto es un cofactor esencial para la dihidrolipoamida aciltransferasa, que es parte del complejo piruvato deshidrogenasa). Esto sugiere que el ácido lipoico es necesario para la síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato en cultivos aerobios de *Streptococcus lactis*. El requerimiento de acetato o lipoato en cultivos aerobios pero no anaerobios puede explicarse porque la formación de acetil-CoA a partir de piruvato en cultivos anaerobios es catalizado por la piruvato-formato-licasa, la cual se inactiva con oxígeno. La principal diferencia entre cultivos aerobios y anaerobios fue la identidad de los productos finales. De los tres productos finales característicos del cultivo anaerobio (acetato, etanol y formato), sólo acetato se produjo en grandes cantidades en cultivos aerobios. Sus resultados mostraron que manipulando la composición del medio y las condiciones de crecimiento es posible desviar el metabolismo de carbohidratos de *Streptococcus lactis* hacia la síntesis de compuestos de 4-C sin dañar su crecimiento.

Henry (1972) utilizó cepas heterofermentativas de Lactobacilli y encontró que la proporción de ácido acético y la preferencia por la fuente de carbono dependen casi completamente del grado de aireación. Observó que bajo condiciones anaeróbicas se produjeron bajas concentraciones de ácido acético

(5% o menos), mientras que en condiciones aeróbicas se produjeron altos niveles de ácido acético (23-39% del total). Los efectos anteriores se produjeron tanto en presencia de glucosa como de maltosa como sustrato.

Firme (1994) evaluó el efecto del CO₂, del nitrógeno del aire y del pH en presencia o ausencia de ácido málico en el comportamiento del metabolismo de carbohidratos por *Leuconostoc oenos* y observó que existe una influencia de las condiciones de aireación del medio sobre las cantidades de los productos finales formados a partir del metabolismo de carbohidratos. Bajo condiciones anaerobias la fructosa se metabolizó más rápido que la glucosa, el consumo de carbohidratos y el crecimiento celular se estimularon bajo condiciones anaerobias y pH 4.8. La glucosa se utilizó totalmente. La presencia de aire permitió un incremento en los rendimientos molares de crecimiento celular.

Adler-Nissen (1994) realizó fermentaciones con aireación controlada como un mecanismo de control para la producción de ácido acético en fermentaciones heterolácticas. Su estudio no sólo confirma los efectos cualitativos encontrados previamente (crecimiento más rápido y formación de ácido acético en lugar de etanol), sino también demuestra que la formación de ácido acético se controla cuantitativamente por la rapidez de transferencia de oxígeno volumétrico.

Ciertas bacterias lácticas heterofermentativas como *Lact. buchneri* y *Lact. brevis* no pueden crecer anaeróbicamente en glucosa, pues no pueden reducir el acetil-P a etanol, un producto esencial para mantener el balance redox global. En cambio, *Lactobacillus reuteri* es capaz de cambiar la producción de compuestos ácidos a compuestos neutros en respuesta a cambios en el medio ambiente (como cambios de pH). Se ha sugerido que esta clase de reacción puede ayudar a mantener el balance adecuado en el estado de oxidación-reducción de la coenzimas nicotinamida en los microorganismos, y que la acumulación de otros metabolitos diferentes al lactato puede tener un efecto benéfico en las células. *Lact. reuteri* fue capaz de cambiar la producción de ácidos orgánicos a etanol, de acuerdo con las necesidades de regenerar NADH o de mantener la homeostasis de pH (Ragout, 1994).

2.7 ACEPTORES DE ELECTRONES ALTERNATIVOS.

Además del acetil-CoA y del oxígeno utilizados durante el crecimiento anaerobio y aerobio (respectivamente) de *Leuconostoc* spp., existen otros compuestos que las bacterias lácticas pueden usar como aceptores de electrones alternativos; dentro de ellos se encuentran la fructosa, el piruvato y el glicerol. El piruvato se ha usado como aceptor externo de electrones en *Leuconostoc mesenteroides* y se ha reportado que es el precursor de acetoina y diacetilo en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Lactobacillus plantarum* (Nuraida, 1992).

Talarico y col. (1990) reportaron que *Lactobacillus reuteri* utilizó glicerol como aceptor de electrones provocando la formación de 1,3-propanodiol, y que no se ha reportado el uso de glicerol como aceptor de electrones por *Leuconostoc* spp.

Un aspecto importante en la formación de ácido acético es que la fructosa también puede servir como un aceptor de electrones. Por cada mol de ácido acético formado se producen dos moles de manitol por reducción de la fructosa. La fracción de fructosa en la sacarosa también muestra este efecto (Adler-Nissen, 1994).

Para establecer si existía una preferencia por el uso de aceptores de electrones para la regeneración del NAD⁺, Röcken (1995) realizó fermentaciones con cultivos iniciadores heterofermentativos de bacterias lácticas en masas ácidas de centeno, en las que había oxígeno que se incorporaba durante el mezclado y fructosa que es constituyente común de la harina. Midió el manitol acumulado como un indicador cuantitativo de la reducción de la fructosa considerando que se forman dos moles de manitol por mol de acetato; comprobó que durante las primeras horas de la fermentación se utilizó oxígeno como aceptor de electrones dado que no se detectó manitol y que la concentración de oxígeno disuelto disminuyó drásticamente durante esas horas. Este comportamiento cambió después de las primeras horas, en las que se observó que se utilizó la fructosa como aceptor de electrones, pues la relación manitol/acetato se mantuvo

constante después de la quinta hora. Esto sugiere que la producción de acetato depende casi totalmente de la disponibilidad de fructosa como aceptor de electrones.

2.8 ANTECEDENTES DEL TRABAJO.

El presente estudio forma parte de un proyecto global denominado "Estudio integrado de la microbiología y bioquímica de la fermentación del pozol"; el objetivo del proyecto es comprender los cambios microbiológicos y bioquímicos, así como las interacciones microbianas que ocurren durante la fermentación del pozol. A continuación se presenta una breve descripción de los avances logrados en dicho proyecto.

Con respecto a la fermentación láctica, que es esencial, se ha determinado que las bacterias del género *Leuconostoc* predominan al inicio de la misma, creciendo más rápidamente que *Lactobacillus* (Wacher, 1995).

La sacarosa es el azúcar que se encuentra en mayor concentración en el nixtamal; ésta es sin embargo muy baja (0.1 - 0.4 g / 100 g materia seca). El estudio sobre el metabolismo de la sacarosa en *Leuconostoc* se ha dirigido a la producción de dextranas; pero se conoce poco sobre su fermentación para la acidificación de sustratos. Su estudio es particularmente interesante, considerando que uno de los monómeros de la sacarosa, la fructosa, puede ser utilizado como aceptor de electrones, confiriéndole a *Leuconostoc* ventajas al producirse una mayor cantidad de ATP y de ácido acético, que tiene propiedades antimicrobianas más acentuadas que el ácido láctico. Es importante entonces determinar la forma como *Leuconostoc* metaboliza este azúcar.

El nixtamal es un sustrato complejo, debido a su composición química, su estado físico y condiciones heterogéneas de aireación. Debido a esto se trabajó con un modelo experimental que involucró el uso de un medio definido y con una de las bacterias aisladas, del género mencionado.

Se consideró al oxígeno como un parámetro importante en el estudio de las fermentaciones lácticas a realizar, dado que en el pozol se esperarían zonas con

diferentes grados de aireación y ésto seguramente tendría repercusiones en el tipo y en la concentración de metabolitos producidos.

CAPITULO III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento del metabolismo de las bacterias lácticas en el pozol, a partir del estudio del metabolismo de los principales carbohidratos solubles presentes en el maíz nixtamalizado, empleando como modelo a una bacteria láctica predominante aislada del pozol.

Objetivos particulares:

- 1.- Establecer cómo se metaboliza la sacarosa:
 - 1.1 Determinando la rapidez y preferencia de consumo de sus monosacáridos glucosa y fructosa.
 - 1.2 Determinando si se utiliza la fructosa proveniente de la sacarosa como aceptor de electrones.
 - 1.3 Determinando el tipo y concentración de metabolitos que se obtienen a partir de la sacarosa.

- 2.- Determinar los productos metabólicos a partir de glucosa y de fructosa por la bacteria láctica seleccionada.

- 3.- Precisar el efecto del oxígeno en el metabolismo de sacarosa por una bacteria láctica aislada del pozol.

CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS

4.1.1 CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS EN MUESTRAS DE HARINA Y MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y DE POZOL MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS ENZIMATICOS COMERCIALES.

Santillana (1995) desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar algunos carbohidratos simples como glucosa, sacarosa y maltosa en nixtamal y pozol. En el presente trabajo no fue posible utilizar la metodología anterior debido básicamente a problemas de interferencia de ciertos componentes del medio de crecimiento y a que se requería detectar concentraciones muy bajas de carbohidratos.

Para determinar la utilidad de la cuantificación enzimática de carbohidratos, se evaluaron los mismos sustratos que Santillana (1995) utilizó en sus estudios, para lo cual se utilizaron dos sistemas enzimáticos comerciales glucosa/fructosa/sacarosa (Boehringer 716 260) y glucosa/sacarosa/maltosa. (Boehringer 1113 950)

4.1.1.1 Preparación de muestras.

Para efectuar la cuantificación enzimática se requieren muestras claras, sin color o ligeramente coloreadas. Dadas las características de las harinas y masas de maíz, así como del pozol, se realizó el procedimiento de limpieza y clarificación reportado por Santillana (1995).

En un tubo de centrifuga se pesaron 5 g de muestra y se adicionaron 20 ml de agua destilada a 65 ° C, la mezcla se homogenizó durante 3 minutos a velocidad media y se centrifugó 15 min/10000 rpm. El sobrenadante se aforó a 25 ml y se congeló por 4 días. Las muestras descongeladas se centrifugaron 1 min/3000 g y se filtraron con prefiltró (Millipore AP12 010) y membrana de 0.22 µ

CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS

4.1.1 CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS EN MUESTRAS DE HARINA Y MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y DE POZOL MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS ENZIMATICOS COMERCIALES.

Santillana (1995) desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar algunos carbohidratos simples como glucosa, sacarosa y maltosa en nixtamal y pozol. En el presente trabajo no fue posible utilizar la metodología anterior debido básicamente a problemas de interferencia de ciertos componentes del medio de crecimiento y a que se requería detectar concentraciones muy bajas de carbohidratos.

Para determinar la utilidad de la cuantificación enzimática de carbohidratos, se evaluaron los mismos sustratos que Santillana (1995) utilizó en sus estudios, para lo cual se utilizaron dos sistemas enzimáticos comerciales glucosa/fructosa/sacarosa (Boehringer 716 260) y glucosa/sacarosa/maltosa (Boehringer 1113 950)

4.1.1.1 Preparación de muestras.

Para efectuar la cuantificación enzimática se requieren muestras claras, sin color o ligeramente coloreadas. Dadas las características de las harinas y masas de maíz, así como del pozol, se realizó el procedimiento de limpieza y clarificación reportado por Santillana (1995).

En un tubo de centrifuga se pesaron 5 g de muestra y se adicionaron 20 ml de agua destilada a 65 ° C, la mezcla se homogenizó durante 3 minutos a velocidad media y se centrifugó 15 min/10000 rpm. El sobrenadante se aforó a 25 ml y se congeló por 4 días. Las muestras descongeladas se centrifugaron 1 min/3000 g y se filtraron con prefiltro (Millipore AP12 010) y membrana de 0.22 μ

(Millipore GSWP 013). De esta forma, las muestras quedaron claras y se procedió a la cuantificación.

4.1.2 IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA PARA LA CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS.

Se adquirieron los reactivos y enzimas necesarios para implementar una metodología que tuviera el mismo principio del sistema enzimático comercial y que cuantificara glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa.

La serie de pasos realizados para llegar a la implementación de la metodología se presentan en el Apéndice I.

4.2 FERMENTACIONES EN MEDIO LIQUIDO DEFINIDO

4.2.1 MICROORGANISMO DE ESTUDIO.

La cepa de estudio (*Leuconostoc* sp. Pz 12) se encuentra depositada en el laboratorio 324 del Edificio E de la Facultad de Química.

4.2.2 CONSERVACION DE LA CEPA.

La conservación a corto plazo se efectuó inoculando por picadura la cepa en medio APT semisólido (Difco), incubando a 30 °C por 24 horas y conservando a temperatura de refrigeración (4 °C); se realizaron resiembras bimestrales.

La conservación a largo plazo se realizó a - 20 °C en el sistema de viales con perlas de vidrio y glicerol como agente crioprotector (Feltham y col. 1978). Para ello fue necesario crecer la cepa en caldo APT durante 24 horas a 30 °C, centrifugar 15 min/5000 rpm, lavar las células con agua estéril, transferir a los viales, eliminar el glicerol en exceso y congelar a - 20 °C.

4.2.3 IDENTIDAD Y PUREZA DE LA CEPA.

4.2.3.1 Pureza

Se inocularon 3 ml de caldo APT con una perla de vidrio que contenía células de Pz 12 y se dejó incubando por 24 horas a 30°C. Del cultivo anterior se

inocularon por estría cajas con medio MRS. Después de 18 h de crecimiento a 30 °C se tomó una colonia típica a la que se le hizo la prueba catalasa y tinción de Gram.

4.2.3.2 Identidad

Después de comprobar la pureza de una colonia típica de Pz 12 se realizó una prueba de identidad de la cepa utilizando un Sistema API 50 CHL. (Bio-mérieux).

La galería API permite realizar el estudio del metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. La fermentación del sustrato se detecta por un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis, revelado por el indicador de pH del medio elegido.

A partir de un cultivo de Pz 12 en medio APT semisólido, se sembraron por estría cajas con medio MRS que se dejaron incubando 24 horas a 30° C. Se verificó la pureza de la cepa observando la uniformidad de las colonias, realizando la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Las colonias se transfirieron con ayuda de un hisopo estéril a un vial con 2 ml de agua estéril hasta lograr una suspensión turbia (S1). De la suspensión anterior se transfirieron un cierto número de gotas (n) a un vial con 5 ml de agua estéril hasta lograr una turbidez equivalente al estándar de Mc Farland No. 2 * (S2). El medio API 50 CHL 5041 se inoculó adicionando el doble de gotas (2n) que se adicionó a la suspensión S2. Se llenaron los tubos de la galería con el Medio 50 CHL 5041 ya inoculado y se llenaron las cúpulas con aceite mineral estéril. Las galerías se incubaron anaeróticamente a 30 °C. La lectura de las galerías se efectuó diariamente durante 7 días.

Una prueba positiva correspondió a la acidificación, indicada como un cambio a un color amarillo del indicador púrpura de bromocresol. En el caso de la esculina se observó un cambio de color púrpura a negro.

* Estándar de Mc Farland No. 2: Se preparó adicionando 0.2 ml de BaCl₂ al 1% y 9.8 ml de H₂SO₄ al 1%. Se leyó la absorbancia de la solución a 600 nm.

4.2.4 PREPARACION DEL MEDIO LIQUIDO DEFINIDO HSH.

Se usó el medio HSH (Owens, 1969), que contiene los nutrimentos necesarios para el crecimiento de bacterias lácticas.

Se utilizaron soportes Swinnex (Millipore SX00025) de 25 mm de diámetro, sobre los cuales se colocaron membranas de filtración de 25 mm de diámetro y 0.22 μ de diámetro de poro (Millipore GSWP025), para esterilizar las soluciones que lo requirieran.

4.2.4.1 Base E de minerales.

4.2.4.1.1 Soluciones stock de minerales.

En la Tabla 1 se muestran los minerales a partir de los cuales se prepararon soluciones stock por separado. Dichas soluciones se almacenaron a temperatura de refrigeración (4-6°C).

Tabla 1. Soluciones stock necesarias para preparar la base E de minerales.

MINERAL	g/l
$K_2 HPO_4$	200
$KH_2 PO_4$	156
$CaCl_2 \cdot 6H_2 O$	4.96
$MgSO_4 \cdot 7H_2 O$	20
NaCl	10
$(NH_4)_2 SO_4$	50

4.2.4.1.2 Mezcla de metales traza.

Se preparó una mezcla de metales traza a partir de los reactivos mostrados en la Tabla 2. Estos se disolvieron secuencialmente en aproximadamente 700 ml de agua destilada; después de cada adición se ajustaba el pH a 6.0. Después de adicionar todos los metales, la solución se aforó a 1000 ml, se esterilizó por filtración y se almacenó a una temperatura de 4-6 ° C.

Tabla 2. Reactivos necesarios para preparar la mezcla de metales traza.

METALES TRAZA	g/l
EDTA Na ₂ · 2H ₂ O	6.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.57
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.229
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.161
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.157
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.151

4.2.4.1.3 Preparación de la Base E de Minerales (Doble fuerza).

En la Tabla 3 se muestran los volúmenes requeridos de soluciones stock para preparar 1000 mL de base E de minerales (doble fuerza). Después de adicionar el agua destilada y los volúmenes correspondientes de cada una de las soluciones stock, se ajustó el pH a 6.8 de la solución final. Esta solución se preparaba fresca cada vez que se requería preparar el medio HSH.

Tabla 3. Volúmenes requeridos de soluciones stock para preparar 1000 mL de base E de minerales (Doble fuerza).

SOLUCIÓN STOCK	VOLUMEN (mL)	g/L
Agua	900.0	-
K ₂ HPO ₄	10.4	2.08
KH ₂ PO ₄	9.6	1.50
CaCl ₂ 6H ₂ O	20.0	0.10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	20.0	0.40
NaCl	20.0	0.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0	1.00
Metales traza	6.0	-

4.2.4.2 Mezcla de aminoácidos.

En la Tabla 4 se muestra la concentración de los aminoácidos requeridos para preparar 1000 mL de solución stock de aminoácidos. Los aminoácidos se disolvieron consecutivamente en agua destilada. Después de cada adición el pH se ajustó a 5-6 con KOH 4M. Una vez aforada la solución, se esterilizó por filtración y se almacenó a una temperatura de - 20°C.

Tabla 4. Concentración de aminoácidos requeridos para la solución stock de aminoácidos.

AMINOACIDO	g/l
D-L alanina	5
L- arginina	5
D-L ácido aspártico	5
Acido L- glutámico	5
L-lisina HCl	1
D-L metionina	1
Glicina	0.5
L- histidina	0.5
L- isoleucina	0.5
L- leucina	0.5
L- fenilalanina	0.5
L- prolina	0.5
L- serina	0.5
L- treonina	0.5
L- triptofano	0.5
L- valina	0.5

4.2.4.3 Solución stock de vitaminas.

La solución stock de vitaminas se obtuvo combinando 100 mL de cada una de las mezclas I, II, y III, mostradas en las Tablas 5, 6 y 7 respectivamente. El pH se ajustó a 5-6 y se aforó a 1000 mL. La mezcla se esterilizó por filtración y se almacenó a - 20 °C.

Tabla 5. Mezcla I de vitaminas.

VITAMINA	mg/100 ml
Riboflavina	50
Acido nicotínico	50
Pantotenato - Ca	50
Tiamina-HCl	50

La riboflavina se disolvió en agua ligeramente caliente, el pH se ajustó a 5-6. En orden consecutivo se adicionaron las otras vitaminas, ajustando el pH a 5-6 después de cada adición.

Tabla 6. Mezcla II de vitaminas.

VITAMINA	mg/100 ml
Acido fólico	10
Acido p-aminobenzoico	10
Piridoxal-HCl	10

El ácido fólico se disolvió en agua a temperatura de ebullición. Se adicionaron las otras vitaminas, ajustando el pH a 5-6 después de cada adición.

Tabla 7. Mezcla III de vitaminas.

VITAMINA	mg/1000 ml
Biotina	10
Cianocobalamina	10

4.2.4.4 Cisteína - HCl

Se disolvieron 0.5 g de cisteína-HCl en una cantidad mínima de HCl 3M, la mezcla anterior se aforó a 100 mL con agua destilada. La solución stock se esterilizó por filtración y se almacenó de 4-6 °C.

4.2.4.5 Tirosina

Se preparó igual que la cisteína- HCl (0.5 g/100 mL).

4.2.4.6 Sulfato de Adenina

Se preparó igual que la cisteína-HCl. (0.1 g/ 100 ml)

4.2.4.7 Guanina - HCl

A 0.1 g de guanina-HCl se le adicionaron aproximadamente 50 ml de agua y suficiente HCl 3M para disolverla. La solución se aforó a 100 ml, se esterilizó por filtración y se almacenó de 4-6 °C.

4.2.4.8 Uracilo

Se preparó igual que la guanina-HCl.

4.2.4.9 Xantina

A 0.1 g de xantina se le adicionaron 50 ml de agua y suficiente hidróxido de amonio para disolver el sólido. La solución se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración y se almacenó de 4-6 °C.

4.2.4.10 Composición del medio HSH

Los volúmenes de las soluciones stock requeridas para preparar 1000 mL de medio HSH se muestran en la Tabla 8. La L-histidina se disolvió en la base E de minerales y se le adicionó el agua. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1 N. En forma aséptica se adicionaron los volúmenes de soluciones stock. El carbohidrato correspondiente se adicionó en peso (g) después de agregar las soluciones stock

correspondientes y antes de esterilizar. El medio se esterilizó 15 minutos a 121 °C.

Tabla 8. Volúmenes de soluciones stock requeridas para preparar 1000 mL de medio HSH.

SOLUCIONES STOCK	VOLUMEN (mL)
Agua	480
Base E de Minerales	500
L-histidina	3.0 g
Mezcla de aminoácidos	10
Cisteína - HCl	1.0
Tirosina	1.0
Adenina-sulfato	1.0
Guanina-HCl	1.0
Uracilo	1.0
Xantina	1.0
Mezcla de vitaminas	1.0
Carbohidrato	- (variable)

4.2.4.11 Prueba de esterilidad del medio líquido definido HSH

Una vez esterilizado el medio líquido, se dejó incubando 48h a 37°C. El medio líquido se consideró apto para usarse (estéril) si después de ese tiempo no se observó turbidez.

4.2.4.12 Control de calidad del medio líquido definido HSH.

El control de calidad del medio líquido se realizó con todas las variantes de carbohidratos y mezclas de ellos utilizadas en las diferentes fermentaciones.

Se efectuó inoculando una asada de un cultivo semisólido de Pz 12 en un tubo 180x20 mm con tapón de rosca que contenía 10 ml del medio líquido a evaluar. El medio líquido se consideró adecuado para el crecimiento de Pz 12 si después de 24 h de incubación a 30 °C se observaba crecimiento, manifestado como un enturbiamiento del mismo.

4.2.5 PREPARACION DEL INOCULO.

Se inocularon 10 ml del medio líquido HSH-correspondiente con una asada de un cultivo semisólido de Pz 12 y se incubó 24 h (Medio HSH sacarosa, glucosa, glucosa+fructosa o sacarosa+fructosa) o 72 h (Medio HSH-fructosa) a 30°C, de tal forma que al inocular 1% (v/v) del precultivo anterior en el medio HSH-correspondiente se tuviera una cuenta inicial de 10^6 ufc/ml.

4.2.6 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

4.2.6.1 Aerobiosis.

El crecimiento aerobio de Pz 12 se efectuó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 30 ml de medio líquido HSH, que se colocaron en una incubadora con agitación rotatoria (Innova 4330, New Brunswick Scientific) a 150 rpm y 30 °C.

4.2.6.2 Anaerobiosis.

La preparación anaerobia del medio HSH se realizó en el sistema Bio-Azteca 2000 de la UAM-Iztapalapa, facilitado amablemente por el M. en C. Oscar Monroy.

El crecimiento anaerobio de Pz 12 se efectuó en viales de 50 ml (Wheaton Glass Co.) a los que se les adicionó 20 ml del medio líquido HSH tratado como a continuación se explica:

El medio HSH-sacarosa se preparó en la forma descrita anteriormente, pero antes de adicionar el carbohidrato se adicionó un exceso de agua (aprox. 25 % del volumen total del medio), marcando previamente el volumen original del medio. El matraz se tapó con un trozo de papel aluminio con dos perforaciones.

Se calentó a ebullición el tiempo necesario para llegar al nivel original del medio previamente marcado. Se enfrió en un baño con agua y al mismo tiempo se comenzó a burbujear nitrógeno.

Una vez enfriado el medio, se adicionó el peso requerido de sacarosa (g) y se continuó burbujear nitrógeno hasta el momento de vaciar.

El llenado y cerrado de los viales se realizó en series de 12. Se colocó un vial en cada una de las 12 líneas de salida de nitrógeno y se dejaron saturando con el gas durante dos o tres minutos. Con un dosificador automático (Unispense II, Wheaton) se vaciaron 20 ml del medio en cada vial sin dejar de burbujear nitrógeno dentro del mismo. Una vez que se llenaron los 12 viales se procedió a cerrarlos utilizando tapones de goma (Bellco Glass, Inc.); la salida de nitrógeno se retiró simultáneamente a la colocación del tapón.

Una vez que se llenaron y taparon todos los viales, se sellaron colocando una cápsula de aluminio (Chromatography Research Supplies, Inc.) sobre el tapón de goma y oprimiéndola con las pinzas engargoladoras (Chromatography Research Supplies, Inc.).

Los viales sellados se esterilizaron 15 min a 121°C y se realizó la prueba de esterilidad mencionada anteriormente. La incubación de los viales inoculados se realizó a 30 °C sin movimiento.

4.2.6.3 Microaerobiosis.

El crecimiento de Pz 12 en condiciones microaerobias se realizó en tubos de vidrio 180x20 mm con tapón de rosca, los cuales contenían 10 ml del medio líquido. La incubación se realizó sin movimiento a 30 °C.

4.2.7 INOCULACION.

Para el crecimiento aerobio de Pz 12 se inocularon 0.3 ml del precultivo en cada matraz con ayuda de una pipeta automática de 1 ml (Gilson). De la misma forma se inocularon 0.1 ml del precultivo en cada tubo donde se efectuaría el crecimiento microaerobio de Pz 12.

La inoculación de los viales para el crecimiento anaerobio de Pz 12 se efectuó con jeringas estériles Plastipak de 1 ml y con agujas estériles (Yale, Becton Dickinson). Se adicionaron 0.2 ml del precultivo a cada vial, previa desinfección del tapón de goma y la cápsula de aluminio flameando con alcohol.

4.2.8 SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACION.

Las fermentaciones se muestrearon cada hora desde el tiempo cero hasta las 12 h, y finalmente a las 24 h (o incluso a las 48 h dependiendo del carbohidrato de estudio).

Las fermentaciones se realizaron por triplicado en cada punto de análisis, de tal forma que se prepararon 3 viales/tubos/matracas (dependiendo de las condiciones de crecimiento) para cada punto de la fermentación. Al tiempo cero se inocularon todos los viales/tubos/matracas y comenzó el muestreo.

4.2.8.1 Muestreo.

De cada repetición se tomaron asépticamente 2 muestras de 5 ml c/u. Una de ellas para evaluar el crecimiento de Pz 12 y la otra para la cuantificación de carbohidratos y productos de la fermentación previo tratamiento de la muestra.

4.2.8.2 Evaluación del crecimiento de Pz 12.

La evaluación del crecimiento de Pz 12 durante las fermentaciones se realizó determinando la densidad óptica y el pH de los cultivos previamente almacenados en congelación.

4.2.8.2.1 Densidad óptica.

Se determinó leyendo absorbancia de los cultivos a $\lambda = 600 \text{ nm}$ en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3B. Para la calibración de la celda de referencia se utilizó agua destilada.

4.2.8.2.2 pH.

Se midió en un potenciómetro Jenway 3020 a 25 ° C

4.2.8.3 Determinación de la concentración de biomasa.

La concentración de biomasa se determinó en forma indirecta midiendo la densidad óptica y leyendo de una curva estándar de densidad óptica vs. peso seco (Figura 4).

4.2.8.3.1 Determinación de peso seco.

La determinación de peso seco se realizó según lo reportado por Cooney (1981). Se secaron membranas de 0.45 μ y 45 mm de diámetro (Millipore) hasta peso constante en un horno Felisa a 80°C. Las membranas se colocaron en el equipo de filtración (Millipore) y se humedecieron uniformemente con agua destilada. El cultivo a filtrarse se homogenizó y se procedió a filtrar. Al final, se adicionaron 20 mL de agua destilada para lavar la membrana. La membrana se secó hasta peso constante. El peso de la muestra se obtuvo restando el peso inicial del peso final.

Pz 12 creció en 100 mL de medio HSH-sacarosa durante 24 horas a 30°C bajo condiciones microaerófilas; después de ese tiempo se determinó la densidad óptica y el peso seco para poder obtener la curva estándar densidad óptica vs. peso seco mostrada en la Figura 4.

4.2.8.4 Parámetros de crecimiento.

4.2.8.4.1 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ).

La velocidad específica de crecimiento se obtuvo de la pendiente de la recta ($m = \mu$) obtenida al graficar el ln de la densidad óptica de los cultivos vs. tiempo (h) (Bailey, 1977).

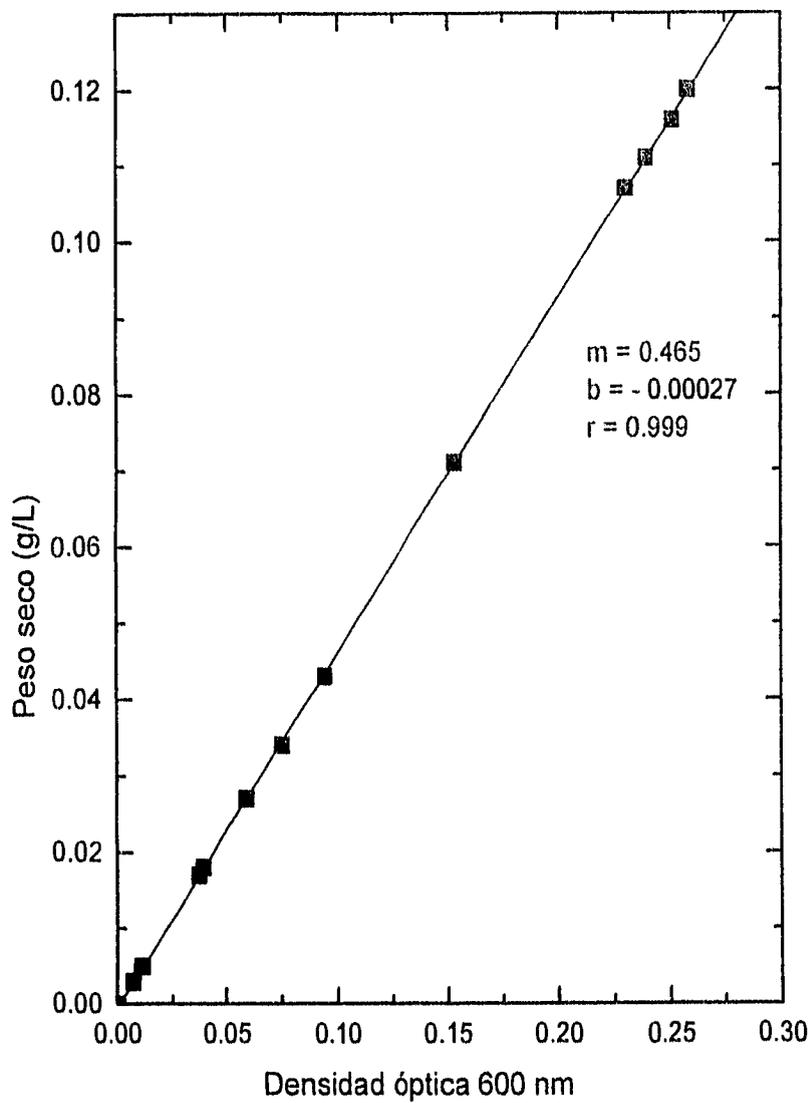


Figura 4. Curva de calibración. Densidad óptica vs. peso seco.

4.2.8.4.2 Rendimientos del crecimiento (Ys).

El rendimiento (Ys), que es un parámetro adimensional, se obtuvo de la relación del peso seco producido de las células por unidad del nutrimento limitante, (Ys = g biomasa formada/ g sustrato utilizado) (Fiechter, 1981).

4.2.8.4.3 Productividad celular (P).

La productividad celular (P) se calculó considerando la relación entre los gramos de células producidas por litro durante el tiempo total de la fermentación. ($P = \Delta X / t_{total}$) (g células / L - hora).

4.2.8.4.4 Cociente metabólico (qs).

El cociente metabólico (qs) es la relación obtenida de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento (μ / Y) (g sustrato / g células-h) (Quintero, 1987).

4.2.8.4.5 Conversión de sustrato.

La conversión de sustrato se consideró como la relación de sustrato consumido (So - St) a un tiempo dado de la fermentación (t) respecto al sustrato inicial (So). De tal forma que se consideró la relación siguiente: (So - St) / So.

4.2.8.5 Cuantificación de carbohidratos y productos de la fermentación.

4.2.8.5.1 Preparación de muestras.

Para separar las células se filtraron 5 mL del cultivo utilizando un Swinmex de 25 mm de diámetro con membranas de 0.22 μ de diámetro de poro (Millipore). Los filtrados libres de células se almacenaron a - 20 °C hasta su análisis.

4.2.8.5.2 Cuantificación de carbohidratos por el método enzimático.

Se cuantificaron glucosa, fructosa, sacarosa o mezclas de ellos, mediante el metodología descrita en el apéndice I.

4.2.8.5.3 Cuantificación de carbohidratos y metabolitos de la fermentación por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Por esta técnica se cuantificaron glucosa, fructosa, manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol, para lo cual se utilizó una bomba isocrática modelo 250, un detector de índice de refracción LC-30 RI y un integrador modelo 1020s; todos de Perkin Elmer. Se utilizó una columna de intercambio iónico AMINEX HPX 87 H (300 x 7.8 mm) y una precolumna Micro Guard 125-0129, ambas de Bio Rad Labs. El equipo operó con una fase móvil de H₂SO₄ 0.01 N y un flujo de 0.6 ml/min a temperatura ambiente.

La cuantificación de los compuestos antes mencionados se realizó por el método de estándar externo, que consiste en realizar curvas de calibración de los compuestos de interés relacionando concentraciones conocidas con las áreas correspondientes, de tal forma que si la calibración es lineal e intercepta el origen, el factor de calibración S (área del pico vs. concentración) se calcula como la pendiente de la curva de calibración. De esta forma, se relacionaron las áreas de la muestras con el factor S para establecer su concentración (Snyder, 1979).

4.2.8.6 Balance de la fermentación.

Los balances de las fermentaciones se realizaron a las 24 o a las 48 h, e incluyeron el porcentaje de carbono recuperado y la relación oxido-reducción, de acuerdo con lo reportado por Moat (1995). El carbono recuperado se consideró como la relación $\text{mmol producto/mmol sustrato} \times 100$ para lo cual primero se calculó el número de milimoles de carbono de cada componente multiplicando los milimoles de cada componente por el número de átomos de carbono correspondientes. Para calcular la relación oxido-reducción de cada componente (productos oxidados / productos reducidos) primero se calculó el valor de oxidación de cada componente ($\text{número de átomos de oxígeno} - \text{número de átomos de hidrógeno}/2$) de tal forma que al multiplicarlo por el número de milimoles de cada componente se tuviera la cantidad de productos oxidados o reducidos correspondientes. Cabe mencionar que no se midió la concentración de CO₂

producido, el valor considerado en todos los casos es teórico, considerando la fermentación heteroláctica realizada por las bacterias lácticas (Figura 2).

CAPITULO V. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACION DEL SUSTRATO.

5.1.1 CUANTIFICACION ENZIMATICA DE CARBOHIDRATOS EN MUESTRAS DE HARINA Y MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADO Y DE POZOL MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS ENZIMATICOS COMERCIALES.

Los resultados de la cuantificación de glucosa-fructosa-sacarosa y glucosa-sacarosa-maltosa de harinas y masas de nixtamal y de masas de pozol con los sistemas Boehringer Mannheim, se encuentran en las Tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 9. Concentración de glucosa, fructosa y sacarosa (g /100 g muestra seca) en masas y harinas de nixtamal y en masas de pozol por el sistema enzimático Boehringer, Mannheim.

MUESTRA	GLUCOSA	FRUCTOSA	SACAROSA
Harina Minsa	0.094	0.008	0.964
Harina Quaker Oats	0.062	0.044	1.273
Masa Minsa	0.045	0.022	0.470
Masa Quaker Oats	0.044	0.024	0.738

Tabla 10. Concentración de glucosa, maltosa y sacarosa (g /100 g muestra seca) en muestras de harinas y masas de nixtamal y en masas de pozol por el sistema enzimático Boehringer, Mannheim.

MUESTRA	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA
Masa Minsa	0.051	0.098	0.495
Masa Quaker Oats	0.050	0.100	0.727

De los resultados anteriores se puede ver que la sacarosa es el principal carbohidrato soluble de harinas de maíz nixtamalizado coincidiendo con lo reportado por Santillana (1995).

5.2. FERMENTACIONES DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES ENCONTRADOS EN EL POZOL POR LA CEPA Pz 12

Las bacterias lácticas son fermentativas y generalmente utilizan carbohidratos como sustrato. En el nixtamal, el sustrato más disponible para éstas son los carbohidratos sencillos, principalmente sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa (aunque en baja concentración) (Ver resultados previos).

5.2.1 FERMENTACION DE Pz 12 EN EL MEDIO HSH-SACAROSA 2.92 mM.

Dado que la sacarosa es el carbohidrato que se encuentra en mayor concentración en el nixtamal (0.1 - 0.4 g / 100 g materia seca), es muy probable que las bacterias lácticas puedan utilizar dicho sustrato. Se seleccionó la cepa Pz 12 (*Leuconostoc* sp.) ya que las bacterias de ese género tienden a predominar al inicio de la fermentación (Wacher, 1995).

Se utilizó una concentración de sacarosa en el medio de 1.0 g/L (2.9 mM) semejante a la concentración mínima reportada en el pozol.

Sabiendo que en el pozol existen zonas heteróneas en cuanto al nivel de oxigenación, seguramente con predominancia de zonas poco oxigenadas, se realizaron las fermentaciones a bajos niveles de oxigenación (Condiciones microaerobias de crecimiento), en tubos de vidrio de 180x20 mm con tapón de rosca, con 10 mL de medio líquido y sin agitación. La fermentación se monitoreó durante 24 horas.

5.2.1.1 Crecimiento, consumo de carbohidratos y producción de metabolitos (Figura 5).

Durante las primeras cinco horas se detectaron pequeños incrementos en el crecimiento y el crecimiento exponencial de la cepa se presentó de la 6a. a la 11a. hora de la fermentación. De las 12 a las 24 horas no se observó crecimiento.

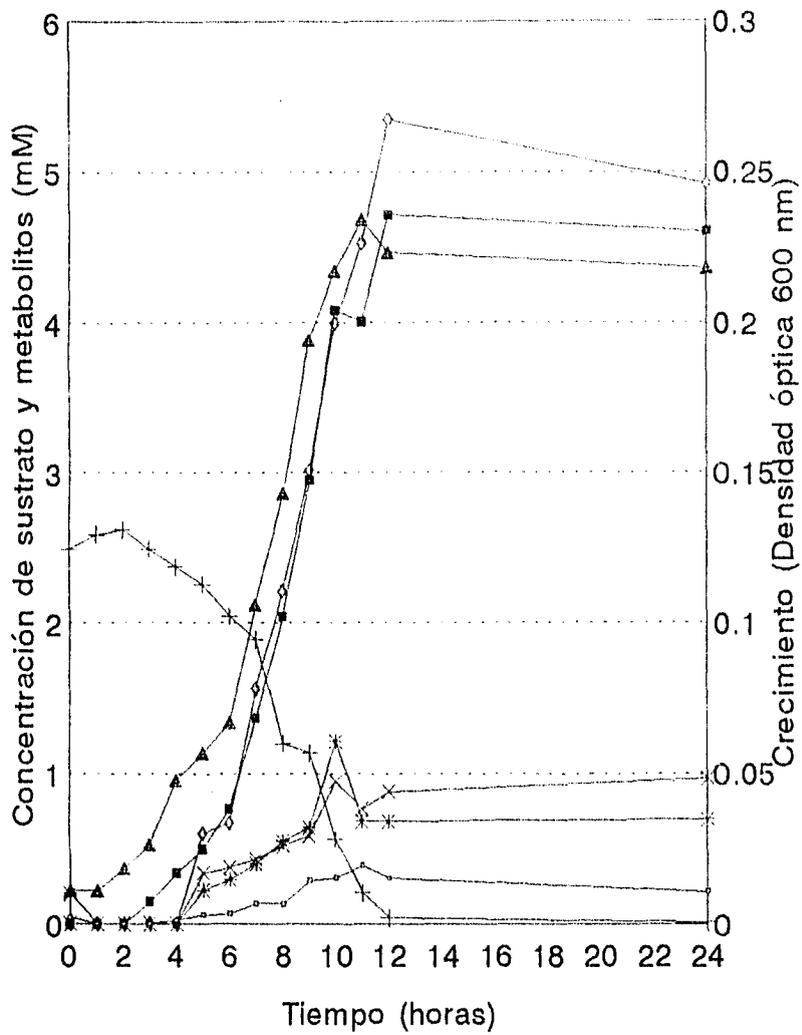


Figura 5. Fermentación de sacarosa por la cepa Pz 12 en condiciones microaerofílicas. (Ver apéndice II). ▲- Densidad óptica; + Sacarosa; -○- Fructosa -■- Acido láctico; × Acido acético; ◇ Etanol; * Manitol.

La concentración de sacarosa disminuyó gradualmente a partir de la segunda hora, hasta su casi total agotamiento a partir de las 12 h de iniciada la fermentación.

Se produjeron concentraciones similares de ácido láctico y etanol hasta las 8 horas de fermentación y a partir de ese tiempo, la concentración de ácido láctico fue menor. Desde la 5a. hora se detectó ácido acético y manitol pero en concentraciones menores que las de los metabolitos anteriores. También a esa hora se detectó fructosa, la cual se acumuló en el medio con una concentración que fué aproximadamente la mitad de la concentración de manitol.

5.2.1.2 Parámetros de crecimiento.

Los datos de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de sustrato se presentan en la Tabla 19.

5.2.1.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 11 se muestra el balance de la fermentación de sacarosa por Pz 12 después de 24 horas de incubación bajo condiciones microaerofílicas.

Tabla 11. Balance de la fermentación de 2.92 mM de sacarosa por Pz 12 después de 24 h de incubación (Condiciones microaerofílicas).

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Sacarosa					
glucosa	2.92	17.52	0		
fructosa	2.70	16.21	0		
Lactato	4.6	13.8	0		
Acetato	0.96	1.92	0		
Etanol	4.9	9.8	- 2		9.8
CO ₂ *	4.93	4.93	+ 2	9.86	
Manitol	0.69	4.14	- 1		0.69

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

De acuerdo con el balance anterior, el porcentaje de carbono recuperado fue de 102.5%, y la relación oxido-reducción de 0.94.

5.2.1.4 Discusión de resultados

No se detectó glucosa durante toda la fermentación lo que hace pensar que se consume inmediatamente. En cambio, se acumularon pequeñas concentraciones de fructosa en el medio de crecimiento, por lo que el consumo de los monosacáridos de la sacarosa no se realizó simultáneamente, prefiriendo a la glucosa sobre la fructosa.

La acumulación de manitol en el medio de crecimiento demuestra la utilización de parte de fructosa de la sacarosa como aceptor de electrones por *Leuconostoc* sp. Dado que la fermentación se realizó bajo condiciones no controladas del nivel de oxígeno presente, parte de la fructosa (el 25 % del total) se redujo a manitol, el resto debió haber seguido la ruta fosfocetolasa. Lo anterior confirma los estudios de Salou (1994) que sugieren que el metabolismo de la

fructosa por *Leuconostoc oenos* procede por dos rutas distintas: ruta fosfocetolasa y la reducción de la fructosa hasta manitol. Sin embargo, es importante mencionar que en la fermentación realizada el porcentaje de fructosa que se reduce a manitol y la que se metaboliza por la ruta fosfocetolasa es menor al reportado por el autor. Que el microorganismo no se haya encontrado en condiciones anaerobias podría ser causa de los menores porcentajes de fructosa reducida a manitol y de la que se metaboliza por la ruta fosfocetolasa, dado que debió haber oxígeno disponible al menos durante las primeras horas de fermentación para usarse como aceptor de electrones (se calcula una concentración de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento del orden de 0.25 mM a 30 ° C) (Perry, 1984).

Nuraida (1992a) detectó lactato, acetato, etanol, manitol y fructosa en fermentaciones de sacarosa por diversas cepas de *Leuconostoc* bajo condiciones anaerobias. Sin embargo, al realizar los balances de las fermentaciones se observaron diferencias entre cepas; sólo una pequeña parte de la fructosa se utilizó como aceptor de electrones y debido a la variabilidad entre cepas no le fué posible generalizar sobre los productos metabólicos finales de la fermentación de sacarosa por *Leuconostoc* sp.

Lo anterior podría sugerir que el metabolismo de la fructosa por *Leuconostoc* depende de la cepa en cuestión. Sin embargo, sería necesario realizar fermentaciones de sacarosa tanto en condiciones aerobias como anaerobias para establecer la forma en que Pz 12 metaboliza a la fructosa de la sacarosa.

De acuerdo con Wachter (1995), en la fermentación de masa de nixtamal estéril inoculada con una cepa de *Leuconostoc* no amilolítica, donde se espera una concentración de sacarosa de 0.1-0.4 / 100 g de materia seca, se produjo una acidez titulable de 0.55 g de ácido láctico / 100 g de materia húmeda. De acuerdo con los resultados de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones microaerofílicas, la cepa de estudio solo fue capaz de producir 0.13 g de ácido láctico / 100 mL a partir de 0.4 de de sacarosa / 100 mL de medio.

Los balances de carbono y de oxido-reducción son correctos, pues se acercan a los valores teóricos de 100% y 1 respectivamente.

5.2.2. FERMENTACION DE Pz 12 EN EL MEDIO HSH-FRUCTOSA 2.92 mM.

Dadas las bajas concentraciones de fructosa que se encontraron en las muestras de nixtamal (0.022 g de fructosa / 100 g muestra seca), se creyó conveniente utilizar una concentración mayor (2.92 mM) para evitar problemas de detección en la cuantificación de carbohidratos y metabolitos. Además, al utilizar dicha concentración se tendrían condiciones de equimolaridad con la sacarosa y la comparación de resultados sería más representativa.

5.2.2.1 Crecimiento, producción de metabolitos y consumo de carbohidrato (Figura 6).

La fase lag de crecimiento se prolongó durante 12 horas. Dicho tiempo marcó el inicio de la fase exponencial de crecimiento, que se observó hasta las 48 horas de fermentación; dado que la fermentación sólo se siguió durante ese lapso de tiempo, no pudo detectarse la fase estacionaria de crecimiento.

El consumo de fructosa por el microorganismo siguió su patrón de crecimiento. Se detectaron metabolitos (ácidos láctico y acético) a las 24 horas de incubación e incluso a las 48 horas, cuando se detectó etanol. No se detectó manitol.

Cuando Pz 12 creció en concentraciones de fructosa mayores a las utilizadas en la fermentación anterior (5.54 y 11.09 mM), sí se detectó la presencia de manitol en las muestras, ver Tabla 12.

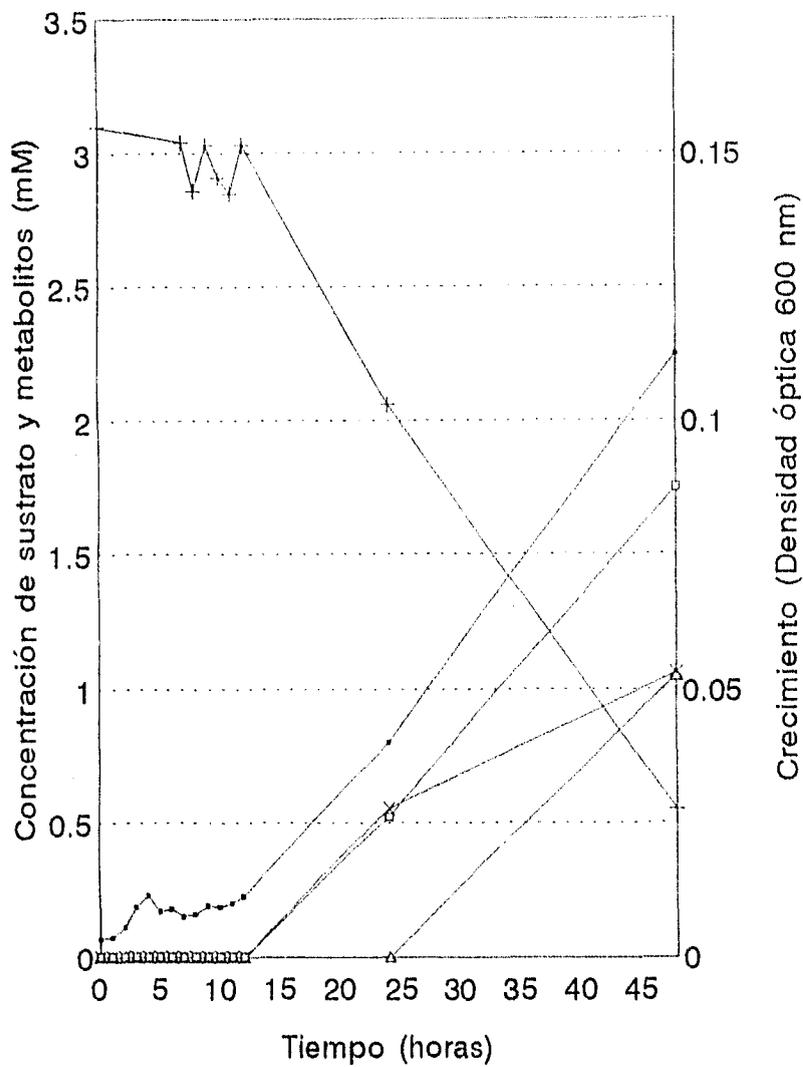


Figura 6. Fermentación de fructosa por la cepa Pz 12 en condiciones microaerófilas. (Ver apéndice II). → Densidad óptica; + Fructosa; ⇄ Acido láctico; × Acido acético; Δ Etanol.

Tabla 12. Fermentación de diferentes concentraciones de fructosa por la cepa Pz 12.

Componente	Fructosa 2.92 mM		Fructosa 5.54 mM		Fructosa 11.09 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48h
Acido láctico	0.52	1.74	2.43	4.38	7.67	8.61
Acido acético	0.55	1.06	0.83	1.08	1.59	1.74
Etanol	0	1.04	2.74	4.33	7.70	9.06
Manitol	0	0	0.85	0.82	1.27	1.25

5.2.2.2 Parámetros de crecimiento

En la Tabla 19 se resumen los valores de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de sustrato de la fermentación de fructosa en el medio HSH-fructosa 2.92 mM.

5.2.2.3 Balance de la fermentación

En la Tabla 13 se muestra el balance de la fermentación de fructosa por Pz 12 después de 48 horas de fermentación.

Tabla 13. Balance de la fermentación de 2.92 mM de fructosa por Pz 12 después de 48 h de incubación.

Compuesto	mM	mM	Valor de	Productos	Productos
		carbono	oxidación	oxidados	reducidos
Fructosa	2.36	14.16	0		
Lactato	1.74	5.22	0		
Acetato	1.06	2.12	0		
Etanol	1.05	2.1	- 2		2.1
CO ₂ *	1.74	1.74	+ 2	3.48	

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

De acuerdo al balance realizado, el carbono recuperado fue de 79%, y la relación oxidación/reducción fue de 1.65. Los resultados anteriores sugieren que no existe un balance entre el sustrato inicial y los productos obtenidos, pues el carbono recuperado es mucho menor al esperado, y la relación redox fué mayor a la esperada.

Contrario al balance de la fermentación de fructosa a baja concentración, los balances a concentraciones mayores muestran porcentajes más cercanos a los valores teóricos. La falta de congruencia entre los valores teóricos y los obtenidos en el balance de la fermentación de fructosa a baja concentración se puede explicar porque no se detectó manitol (Tablas 14, a y b).

Tabla 14 a. Balance de la fermentación de 5.54 mM de fructosa por Pz 12 después de 48 h de incubación.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Fructosa	5.22	31.32	0		
Lactato	4.38	13.14	0		
Acetato	1.0	2.0	0		
Etanol	4.3	8.6	- 2		8.6
CO ₂ *	4.38	4.38	+ 2	8.8	
Manitol	0.82	4.92	- 1		0.82

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100 = 105.5%

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos = 0.93

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

Tabla 14 b. Balance de la fermentación de 11 mM de fructosa por Pz 12 después de 48 h de incubación.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Fructosa	10.96	65.76	0		
Lactato	8.6	25.8	0		
Acetato	1.74	3.48	0		
Etanol	9.0	18.0	- 2		18
CO ₂ *	8.6	8.6	+ 2	17.2	
Manitol	1.25	7.5	- 1		1.25

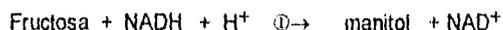
Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100 = 96.38%

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos = 0.89

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

5.2.2.4 Discusión de resultados.

Se ha reportado que la fermentación de fructosa involucra la producción de manitol y de acetato, además de lactato, etanol y CO₂. En este experimento se espera que la fructosa sea utilizada como aceptor externo de electrones, por medio de su reducción a manitol:



① Manitol deshidrogenasa.

Esta reacción incrementa la producción de ATP debido a que menos acetil-P se reduce a etanol para regenerar el NAD⁺ requerido para continuar la fermentación. Por cada mol de acetil-P que no se reduce a etanol se forman dos moles de manitol (Cogan y Jordan, 1994; Cogan, 1995).

En concordancia con los resultados de este experimento Busse (1961) y Nuraida (1992a) indican que diversas cepas de *Leuconostoc* metabolizan la fructosa a lactato, acetato, etanol y manitol. Aún cuando todas las cepas estudiadas produjeron dichos metabolitos como se puede observar en la Tabla 15,

las cantidades producidas fueron muy variables y sólo una pequeña cantidad de fructosa se utilizó como aceptor de electrones.

Tabla 15. Concentración de los productos metabólicos finales (mol/mol de fructosa) obtenidos de diversas cepas.

Sustrato	Compuesto	CEPAS			
		12291 *	NCDO 518	Pz 45	Pz 10
Fructosa	Ac. láctico	0.6	0.6	0.9	0.6
	Ac. acético	0.2	0.3	0.1	0.2
	Etanol	0.4	0.3	0.7	0.3
	Manitol	0.4	0.4	0.1	0.3

* Cepa estudiada por Busse (1961)

Las tres cepas restantes corresponden a los estudios realizados por Nuraida (1992).

Leuconostoc puede utilizar la fructosa como donador y como aceptor de electrones. Si en el medio de crecimiento hay oxígeno disponible, es posible que el microorganismo también lo utilice como aceptor de electrones. Dado que la fermentación se realizó en condiciones microaerofílicas donde se calcula que exista una concentración de oxígeno de 0.25 mM (calculado a partir del oxígeno disuelto en agua a 30 ° C) (Perry, 1984), entonces el microorganismo estuvo en presencia de dos aceptores de electrones, la fructosa y el oxígeno. Cuando Pz 12 creció en el medio con fructosa a baja concentración (2.9 mM), el microorganismo creció más lentamente que a concentraciones mayores y no utilizó la fructosa como aceptor de electrones.

Para establecer si existía una preferencia por el uso de aceptores de electrones para la regeneración del NAD⁺, Röcken (1995) realizó fermentaciones con cultivos iniciadores heterofermentativos de bacterias lácticas en masas ácidas de centeno, en las que había oxígeno que se incorporaba durante el mezclado y fructosa que es constituyente común de la harina. Midió el manitol acumulado como un indicador cuantitativo de la reducción de la fructosa, considerando que

se forman dos moles de manitol por mol de acetato y comprobó que durante las primeras horas de la fermentación se utilizó al oxígeno como aceptor de electrones dado que no se detectó manitol y que el pO₂ disminuyó drásticamente durante esas horas. Este comportamiento cambió después de las primeras horas, en las que se observó que se utilizó a la fructosa como aceptor de electrones pues la relación manitol/acetato se mantuvo constante después de la quinta hora, lo que indicó que la producción de acetato dependía totalmente de la disponibilidad de fructosa como aceptor de electrones.

Cabe mencionar que las proporciones de los metabolitos producidos fueron diferentes a bajas y a altas concentraciones de fructosa. En estas últimas se observó una relación lactato/etanol=1 y acético/manitol = 1. Moat (1995), Cogan (1995), Adler-Nissen (1994) y Busse (1961) reportan una relación acetato /manitol =0.5, sin embargo, Nuraida (1992a) y Salou (1994) sugieren que esta relación podría ser próxima a 1.

A bajas concentraciones de fructosa no se produjo manitol, la relación lactato/acetato es diferente a 1, ya que se produjo mas ácido láctico que etanol y concentraciones similares de acetato y etanol. Dado que no se produjo manitol, podría pensarse que Pz 12 utilizó la fructosa según lo reportado por Salou (1994) para la fructosa que no se reduce a manitol; sin embargo, solo coinciden la relación lactato/acetato (aproximadamente 1.5 en ambos casos), pues la relación lactato/etanol reportada por el autor es casi el doble de la obtenida.

Los resultados obtenidos confirman el uso de la fructosa como donador y aceptor de electrones aún en condiciones microaerofílicas.

5.2.3 FERMENTACION DE Pz 12 EN EL MEDIO HSH-GLUCOSA 2.92 mM.

Para seleccionar la concentración de glucosa del experimento, se consideraron los mismos aspectos que en la fermentación con fructosa. La concentración de glucosa utilizada fue 2.92 mM. La fermentación se monitoreó durante 48 horas.

5.2.3.1 Crecimiento, producción de metabolitos y consumo de sustrato (Figura 7).

Las variaciones en el crecimiento del microorganismo no permitieron establecer con claridad las diferentes etapas de su crecimiento. Así mismo, se observa que el consumo de glucosa inició a la 5a. hora de fermentación, agotándose a las 48 horas. La producción de ácido láctico se inició antes que la del etanol, sin embargo, la concentración final de éste último fue mayor. La concentración final de ácido acético fue mucho menor que la de los metabolitos anteriores; su producción inició tardíamente (10a. hora), manteniéndose casi estable desde la 11a. hora y hasta el final de la fermentación.

5.2.3.2 Parámetros de crecimiento.

En la Tabla 19 se resumen los valores de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de sustrato de la fermentación de glucosa en el medio HSH-glucosa 2.92 mM.

5.2.3.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 16 se muestra el balance de la fermentación de glucosa por Pz 12 después de 48 horas de incubación.

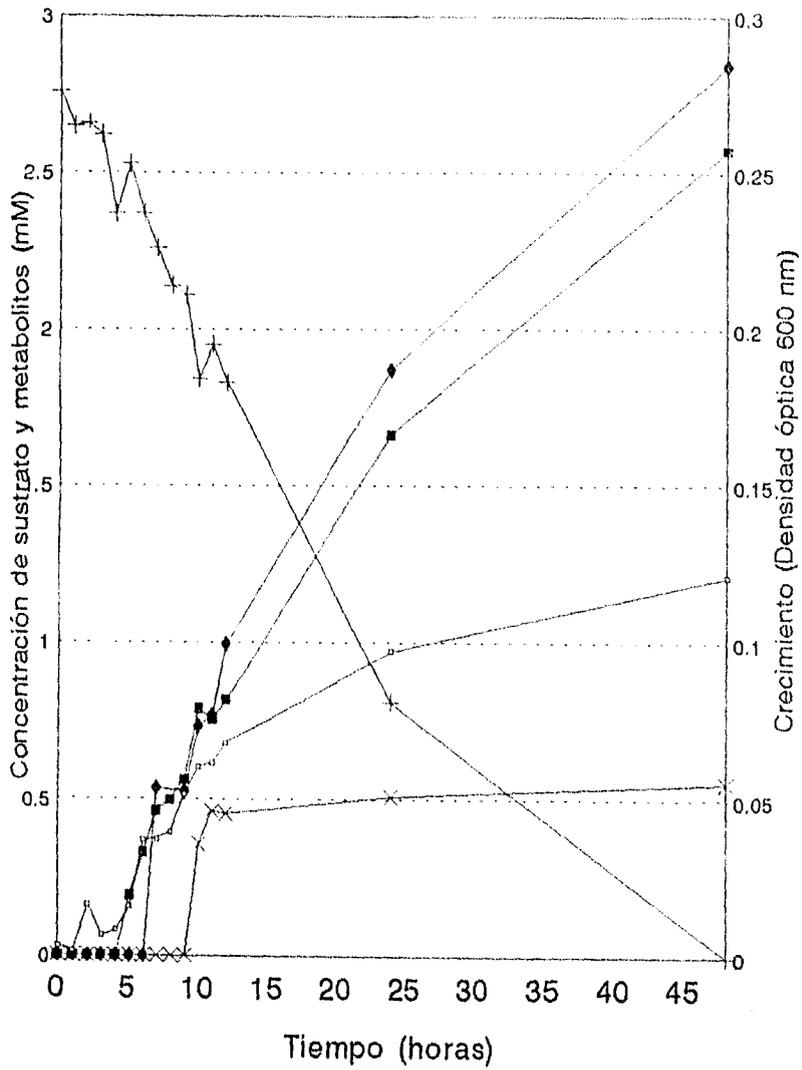


Figura 7. Fermentación de glucosa por Pz 12 en condiciones microaerófilicas. (Ver apéndice II). -○- Densidad óptica; + Glucosa; ■ Acido láctico; × Acido acético; ◆ Etanol.

Tabla 16. Balance de la fermentación de 2.92 mM de glucosa por Pz 12, después de 48 horas de incubación.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Glucosa	2.92	17.52	0		
Lactato	2.57	7.71	0		
Acetato	0.55	1.10	0		
Etanol	2.84	5.68	- 2		5.68
CO ₂ *	2.92	2.92	+ 2	5.84	

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

De acuerdo al balance realizado, el carbono recuperado fue de 99.37%, y la relación oxidación/reducción fue de 1.02. Existe un balance adecuado entre el carbono utilizado como sustrato y el recuperado en los productos; la relación oxido-reducción coincidió con el valor teórico.

5.2.3.4 Discusión de resultados.

Condon (1987) establece que los productos metabólicos de la fermentación anaerobia en glucosa por *Leuconostoc* son principalmente lactato, etanol y CO₂, y que durante el crecimiento aerobio se produce acetato en lugar de etanol. Las condiciones de las fermentación de glucosa por Pz 12 fueron intermedias entre aerobiosis y anaerobiosis. Ello provocó que los metabolitos producidos no coincidieran con lo reportado por Condon (1987) ni por Nuraida (1992b).

De acuerdo con la velocidad específica de crecimiento, Pz 12 creció más rápido en glucosa que en fructosa, lo que confirma los resultados de Gobbetti (1994).

De acuerdo con Perry (1984) se calculo una concentración de oxígeno en el medio de crecimiento de 0.25 mM a 30 ° C, lo que explica que se haya producido una baja concentración de ácido acético en relación al etanol. Según lo

anterior, el poco oxígeno disponible lo utilizó durante las primeras horas como aceptor de electrones, dado que en ese tiempo se incrementó la concentración de acetato hasta llegar a un nivel muy similar desde la 11a. hasta la 48a. hora de fermentación. El que se haya mantenido constante la producción de acetato desde la 11a. hora sugiere que el oxígeno disponible se utilizó como aceptor de electrones hasta que se agotó. De hecho, la concentración de ácido acético producida es mayor a la que se hubiera esperado por el uso del oxígeno como aceptor de electrones.

Los resultados obtenidos de la fermentación realizada confirman el efecto de la presencia de oxígeno, aún en concentraciones bajas de las condiciones microaerobias, en la desviación del metabolismo de carbohidratos de *Leuconostoc*.

5.2.4 FERMENTACION DE Pz 12 EN EL MEDIO HSH-GLUCOSA+FRUCTOSA 2.92 mM.

Una vez comprobado que el crecimiento de Pz 12 se vió afectado por el carbohidrato a metabolizar, y que Pz 12 vió disminuido su crecimiento en presencia de los monosacáridos glucosa y fructosa, se estudió la mezcla de ambos carbohidratos para tratar de entender cómo la bacteria metaboliza la sacarosa.

El medio utilizado para esta fermentación contenía una concentración equimolar de ambos carbohidratos (2.92 mM de glucosa y 2.92 mM de fructosa): la fermentación se monitoreó durante 48 horas

5.2.4.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustratos y producción de metabolitos (Figura 8).

El crecimiento exponencial de Pz 12 se presentó a partir de la 3a. hora, aunque entre la 6a. y 9a. horas de la fermentación se presentaron variaciones en el crecimiento. El crecimiento se mantuvo en aumento hasta las 48 horas, aunque en forma menos acelerada.

El nivel original de fructosa se mantuvo con poca variación hasta las 12 horas de fermentación. Desde ese tiempo y hasta las 48 horas disminuyó pero no se agotó. En cambio, la concentración de glucosa disminuyó desde la 5a. hora, agotándose en el intervalo entre 25 y 48 horas de fermentación.

El patrón de producción de metabolitos fue muy similar al de sacarosa, excepto que en este caso no se detectó manitol.

5.2.4.2 Parámetros de crecimiento.

a) Velocidad específica de crecimiento.

Se calcularon dos velocidades específicas de crecimiento, una para glucosa (μ_{glucosa} , considerando las horas 10, 11 y 12) y otra para la mezcla glucosa + fructosa ($\mu_{\text{glucosa+fructosa}}$, considerando las horas 12, 24 y 48).

$$\mu_{\text{glucosa}} = 0.17 \text{ h}^{-1}.$$

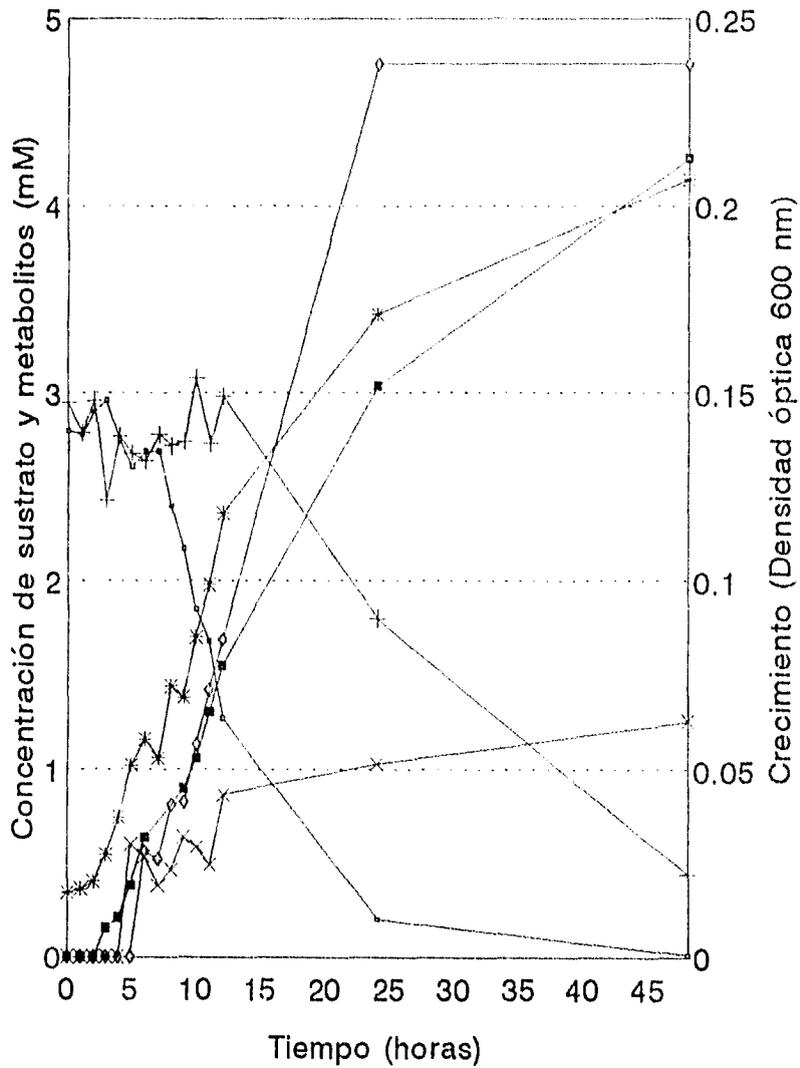


Figura 8. Fermentación de glucosa+fructosa por la cepa Pz 12 en condiciones microaerofílicas. (Ver apéndice II). * Densidad óptica; ○ glucosa; + fructosa; ■ Acido láctico; × Acido acético; ◇ Etanol.

$$\mu_{\text{glucosa+fructosa}} = 0.014 \text{ h}^{-1}$$

5.2.4.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 17 se muestra el balance de la fermentación de glucosa+fructosa por Pz 12 después de 48 horas de incubación:

Tabla 17. Balance de la fermentación de 2.92 mM de glucosa+fructosa por Pz 12 después de 48 horas de incubación.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Glucosa	2.90	17.4	0		
Fructosa	2.48	14.88	0		
Lactato	4.25	12.75	0		
Acetato	1.25	2.5	0		
Etanol	4.75	9.5	- 2		9.5
CO ₂ *	4.25	4.25	+ 2	8.5	

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

El carbono recuperado fue 111%, y la relación óxido-reducción de 0.89.

5.2.4.4 Discusión de resultados.

De acuerdo con Nuraida (1992a), el metabolismo anaerobio de la mezcla glucosa+fructosa por *Leuconostoc* produciría ácido láctico, ácido acético, etanol y manitol. Aun cuando se esperaba que Pz 12 tuviera un comportamiento similar al reportado, no se obtuvo el mismo patrón de metabolitos producidos, pues no se produjo manitol. Sin embargo, es necesario considerar que las condiciones de la fermentación no fueron las mismas a las reportadas, pues a diferencia de la de Nuraida, en la fermentación realizada es posible que hubiera oxígeno en el medio aunque en bajas concentraciones. Podría pensarse que al igual que en la

fermentación de fructosa por Pz 12, la ausencia de manitol pudo deberse al escaso crecimiento del microorganismo. Es importante hacer notar que, contrario a lo esperado, la fermentación realizada tampoco se comportó igual que la fermentación de sacarosa.

La velocidad específica de crecimiento de la mezcla glucosa+fructosa fue significativamente menor que en sacarosa, lo que indica que Pz 12 creció más rápido en presencia de sacarosa que en sus monosacáridos correspondientes. Además, la velocidad específica de crecimiento fué mayor que la de la mezcla glucosa+fructosa cuando Pz 12 creció solo en glucosa y en fructosa. De acuerdo con Rodríguez (1994), *Leuconostoc oenos* creció a mayor velocidad en un medio (sin condiciones controladas de oxígeno) con glucosa+fructosa que con cada carbohidrato por separado, la glucosa y la fructosa se consumieron al mismo tiempo, y el 83% de la fructosa consumida se redujo a manitol, por lo que los resultados de este experimento no coinciden con lo reportado por el autor.

Los resultados de la fermentación coinciden con lo reportado por Nuraida (1992a) quien sugiere que diversas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* prefieren a la glucosa sobre la fructosa cuando crecen en una mezcla con ambos carbohidratos y que sólo una pequeña parte de la fructosa se utiliza como aceptor de electrones. Sin embargo, al autor no le fue posible predecir la proporción de fructosa que se reduce.

De acuerdo a lo anterior, es posible que Pz 12 vea favorecido su crecimiento en presencia de sacarosa que en los monosacáridos glucosa+fructosa, pues en el primer caso inicia utilizando la glucosa y gran parte de la fructosa hidrolizada, lo que no sucede en el segundo caso, pues aunque la glucosa se utiliza inmediatamente, el consumo de fructosa se inicia a las 12 horas.

5.2.5 FERMENTACION DE Pz 12 EN EL MEDIO HSH SACAROSA+FRUCTOSA 2.92 mM.

Conocido ya el efecto de la sacarosa en el crecimiento de Pz 12 y el uso de la fructosa como aceptor alternativo de electrones, se realizó una fermentación con la mezcla de ambos carbohidratos para establecer si la cepa era capaz de utilizar la sacarosa y la fructosa simultáneamente, el primer carbohidrato para crecer y el segundo como aceptor de electrones dadas las bajas concentraciones de oxígeno del medio.

Se usó una concentración equimolar 2.92 mM de sacarosa y fructosa.

5.2.5.1 Crecimiento, consumo de sustrato y producción de metabolitos (Figura 9).

La fase exponencial de crecimiento del microorganismo se efectuó entre la 6a. y la 12a. horas de fermentación, mientras que entre la 12a. y la 24a. horas no se observaron grandes diferencias, lo que indicó la fase estacionaria de crecimiento.

El consumo de la sacarosa inició desde las primeras horas de fermentación, con una caída notable entre la 6a. y la 12a. hora de fermentación cuando prácticamente se agotó el sustrato. Lo anterior no sucedió con la fructosa, pues mantuvo su concentración inicial hasta la 6a. hora de fermentación y a partir de ese momento dicha concentración disminuyó en forma gradual, alcanzando su mínimo a las 24 horas, pero sin agotarse.

En cuanto a los metabolitos, se vió que al igual que en la fermentación con sacarosa, se produjeron altas concentraciones equimolares de ácido láctico y etanol, comparadas con las obtenidas de ácido acético y de manitol.

5.2.5.2 Parámetros de crecimiento.

a) Velocidad específica de crecimiento.

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento se realizó en la zona comprendida entre las 6 y 12 horas, y dado que los muestreos se hicieron a

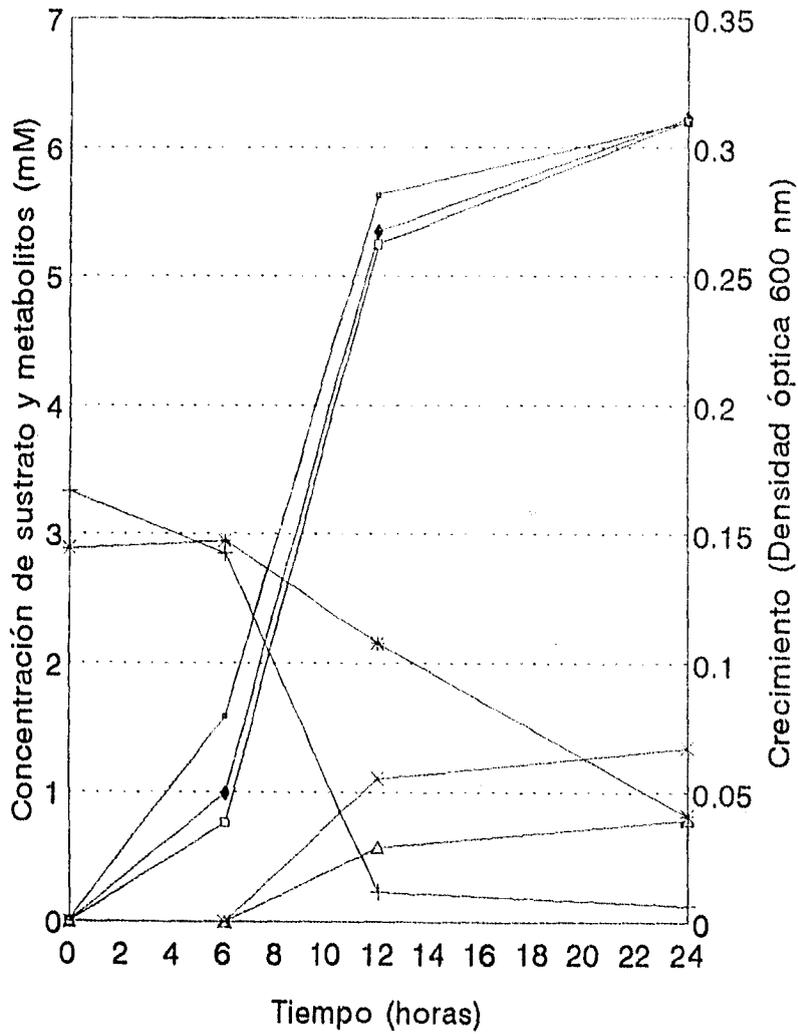


Figura 9. Fermentación de sacarosa+fructosa por la cepa Pz 12 en condiciones microaerofílicas. (Ver apéndice II). -- Densidad óptica; +- Sacarosa; * Fructosa; - Acido láctico; x Acido acético; ♦ Etanol; △ Manitol.

intervalos de 6 horas, solo se consideraron dos puntos para obtener la línea, lo cual pudo significar una fuente de error. La velocidad específica de crecimiento fue $\mu = 0.211 \text{ h}^{-1}$.

5.2.5.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 18 se muestra el balance de la fermentación de sacarosa+fructosa por Pz 12 después de 24 horas de incubación.

Tabla 18. Balance de la fermentación de 2.92 mM de sacarosa+fructosa por Pz 12 después de 24 horas de incubación.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Sacarosa	2.77	33.24	0		
Fructosa	2.08	12.48	0		
Lactato	6.2	18.6	0		
Acetato	1.35	2.70	0		
Etanol	6.22	12.44	- 2		12.44
CO ₂ *	6.83	6.83	+ 2	13.66	
Manitol	0.79	4.76	- 1		0.79

Carbono recuperado = mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción = Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

El balance de la fermentación mostró que se recuperó el 99.2% del carbono, y que la relación oxido-reducción fue de 1.03.

5.2.5.4 Discusión de resultados.

De acuerdo con la concentración de manitol detectada, sólo un 16% de la fructosa total (del monosacárido adicionado y la proveniente de la sacarosa), se redujo a manitol, por lo que se considera que el resto de la fructosa siguió la ruta fosfocetolasa. Considerando lo anterior y el hecho de que en la fermentación de

sacarosa bajo condiciones microaerofilicas se redujó el 25 % de la fructosa, se puede decir que el aumento en la concentración de fructosa en el medio de crecimiento no incrementa la proporción de fructosa a reducirse.

Esta fermentación guardó similitudes con la de sacarosa, como fué la relación acético/manitol producido y la fructosa remanente.

De acuerdo con las velocidades específicas de crecimiento, Pz 12 creció más rápido en sacarosa que en un medio con sacarosa+fructosa.

El inicio del metabolismo de sacarosa antes que el de fructosa no coincide con lo reportado por Rodríguez (1994), que sugiere la preferencia de diversas cepas de *Leuconostoc oenos* por glucosa o fructosa antes que la sacarosa. Seguramente el nicho ecológico del cual provienen las cepas de *Leuconostoc* les confiere ciertas aptitudes y preferencias para un sustrato dado. En productos vegetales fermentados, las bacterias lácticas tienen como sustrato a la glucosa, fructosa y sacarosa, por lo que la mayoría de ellas pueden metabolizarlos con facilidad (Daeschel y col. 1987). En el jugo de uva se encuentran presentes los mismos carbohidratos, y el hecho de que *Leuconostoc oenos* prefiera la fructosa antes que la sacarosa puede deberse a la relación de concentraciones de los mismos, según lo reportado por Rodríguez y Manca de Nadra (1994).

**5.2.6 EVALUACION DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS POR LA CEP
Pz 12 (GLUCOSA, FRUCTOSA Y SACAROSA).**

La evaluación de los sustratos utilizados se realizó comparando las velocidades específicas de crecimiento, los rendimientos, los cocientes metabólicos y la productividad del sustrato en cuestión, tal como se observa en la Tabla 19. En todos los casos, las fermentaciones se realizaron bajo condiciones microaerobias y con una concentración de sustrato de 2.92 mM. En todas la fermentaciones realizadas bajo condiciones microaerofilicas se tuvo un pH final en el rango 6.13 a 6.6.

Tabla 19. Efecto de los sustratos utilizados por Pz 12 en los parámetros de crecimiento bajo condiciones microaerofilicas.

Parámetro de crecimiento	Glucosa 2.92 mM	Fructosa 2.92 mM	Sacarosa 2.92 mM
X (g células/L)	0.056	0.052	0.109
μ (h^{-1})	0.21	0.06	0.351
Y (g células / g sustrato)	0.106	0.121	0.117
q (g sustrato/g células-h)	1.98	0.495	3
P (g células / L h)	0.00116	0.0011	0.0045

Respecto a las velocidades específicas de crecimiento, es claro que Pz 12 creció más rápido en sacarosa y que el crecimiento en fructosa fue el más lento.

Dado que los rendimientos de las fermentaciones se calcularon al término de la fase logarítmica y que no se observaron diferencias en los valores obtenidos con los diferentes sustratos, se graficaron los rendimientos celulares a diferentes conversiones de los sustratos utilizados (excepto fructosa, ya que mostró escaso crecimiento durante las primeras horas de fermentación) (Figura 10). De esa

figura se puede ver que aun cuando los rendimientos celulares de la glucosa fueron ligeramente mayores que los de sacarosa a bajos niveles de conversión de sustrato, conforme aumentó la conversión se invirtieron los papeles hasta igualarse en la máxima conversión de sustrato. Dado que los rendimientos de biomasa fueron similares a diferentes conversiones con ambos carbohidratos, se puede decir que Pz 12 no desvía su metabolismo cuando crece en presencia de sacarosa, aunque es necesario considerar que los rendimientos están referidos a peso en gramos y no a moles del carbohidrato.

Los datos mostrados respecto a los cocientes metabólicos muestran claramente que Pz 12 metaboliza con mayor eficiencia a la sacarosa con respecto a la glucosa y la fructosa, y que la fructosa es el carbohidrato que se metaboliza con menor eficiencia, considerando que con la misma biomasa se metaboliza más sacarosa que fructosa en un tiempo dado.

Aun cuando la productividad celular fue muy similar para la fermentación de glucosa y fructosa, se observa un incremento en este parámetro cuando el microorganismo creció en presencia de sacarosa.

Después de analizar los parámetros anteriores, es claro que para Pz 12 la sacarosa es el mejor sustrato con respecto a la glucosa y la fructosa. Dado que la sacarosa es el principal carbohidrato soluble del nixtamal y por lo tanto el más disponible, seguramente Pz 12 adapta su metabolismo para el aprovechamiento eficiente de dicho carbohidrato. Desconocemos con precisión si esto tiene una explicación fisiológica. Por ejemplo, se podría pensar que la sacarosa es transportada al interior de la célula en forma más eficiente. Sin embargo, esto estaría claramente por probarse.

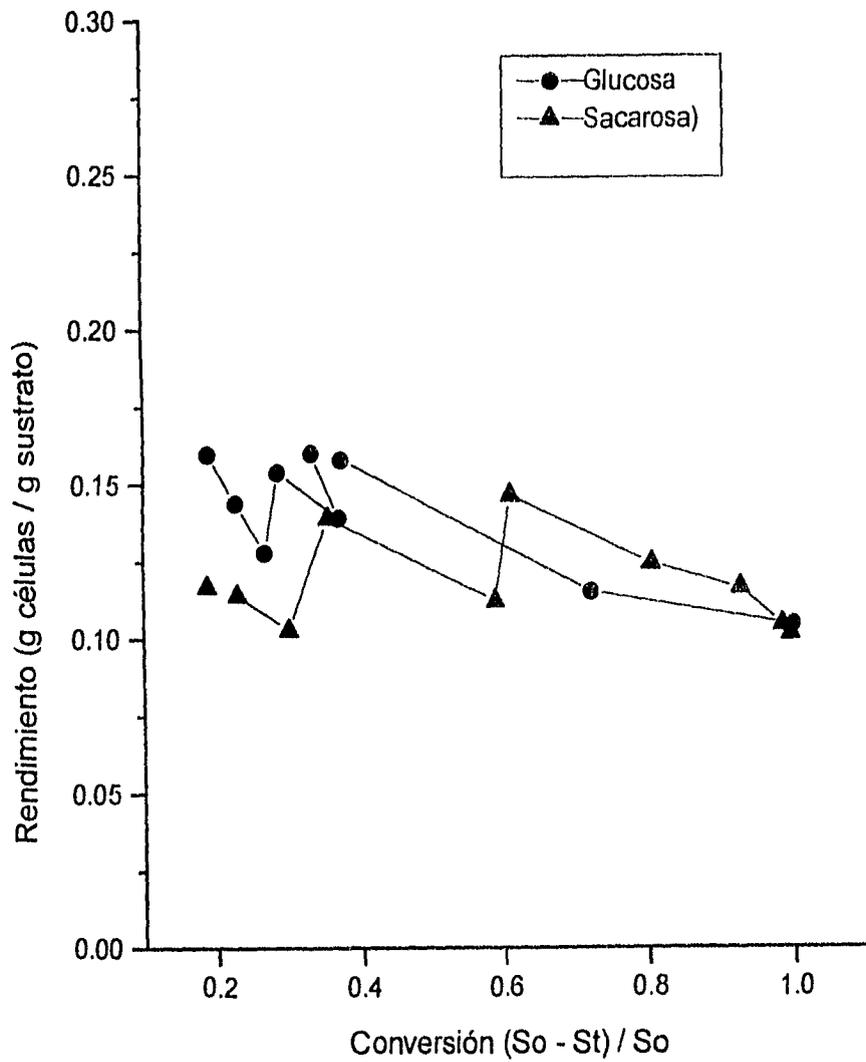


Figura 10. Efecto del sustrato en los rendimientos celulares obtenidos a diferentes conversiones de sustrato por la cepa Pz 12.

5.3. EFECTO DEL OXIGENO EN EL METABOLISMO DE SACAROSA POR LA CEPA Pz 12.

En la literatura existen evidencias que señalan al oxígeno como un factor importante en el metabolismo de carbohidratos de algunas especies de bacterias lácticas, en especial de *Leuconostoc*.

De acuerdo con Cogan y Jordan (1994) ciertas bacterias lácticas, incluyendo *Leuconostoc*, metabolizan el oxígeno hasta O_2 , peróxido de hidrógeno o agua en presencia de un sustrato oxidable. La mayoría de los *Leuconostoc* se comportan como aerobios, ya que crecen más rápido en presencia de oxígeno, producen más biomasa y acetato, y menos etanol a partir de la fermentación del carbohidrato.

Dado que la fermentación del pozol se lleva a cabo en un sustrato semisólido donde es de esperarse la presencia de zonas con diferentes niveles de oxígeno, se considera que el oxígeno es un factor importante en el metabolismo de la cepa de estudio.

Para evaluar el efecto del oxígeno en el metabolismo de carbohidratos de dicha cepa, se realizaron dos experimentos, uno con una concentración alta de oxígeno obtenida por la agitación vigorosa de un lecho de espesor reducido del medio HSH en un volumen grande de espacio de cabeza, y otro a la menor concentración posible de oxígeno logrado mediante la saturación del medio y del espacio de cabeza con nitrógeno.

5.3.1 FERMENTACION AEROBIA DE SACAROSA POR LA CEPA Pz 12.

5.3.1.1 Crecimiento, producción de metabolitos y consumo de carbohidratos (Figura 11).

Las cuatro primeras horas de la fermentación se caracterizaron por no mostrar aumentos en el crecimiento. A partir de la 5a. y hasta la 9a. horas de fermentación existió un aumento continuo y uniforme en el crecimiento de la cepa. De la hora 10 a la 12 todavía hubo aumento en el crecimiento, pero sin la tendencia acelerada de las horas anteriores. Claramente puede verse que el crecimiento se mantuvo casi constante de las 12 a las 24 horas de fermentación.

Se observó una disminución gradual en la concentración de sacarosa de la 5a. a la 12a. horas, tiempo que coincidió con el agotamiento del sustrato. De la 2a. a la 12a. horas se observó un incremento gradual pero no acelerado en la concentración de fructosa. En ningún momento de la fermentación se detectó glucosa libre.

Se observó un comportamiento similar en la producción de ácido láctico y acético. Aproximadamente a la 5a. hora inició la detección de dichos metabolitos, y se mantuvo en ascenso hasta las 24 horas. Se obtuvieron concentraciones equimolares de ácido láctico y acético en cada punto de la fermentación.

A la 11a. hora de iniciada la fermentación se detectó la presencia de etanol en las muestras, dicha producción se observó también a las 12 y 24 horas. Es importante mencionar que las concentraciones de etanol detectadas fueron muy bajas en comparación con las obtenidas para el ácido láctico y acético.

5.3.1.2 Parámetros de crecimiento.

Los parámetros de crecimiento de Pz 12 en presencia de sacarosa bajo condiciones aerobias se muestran en la Tabla 22.

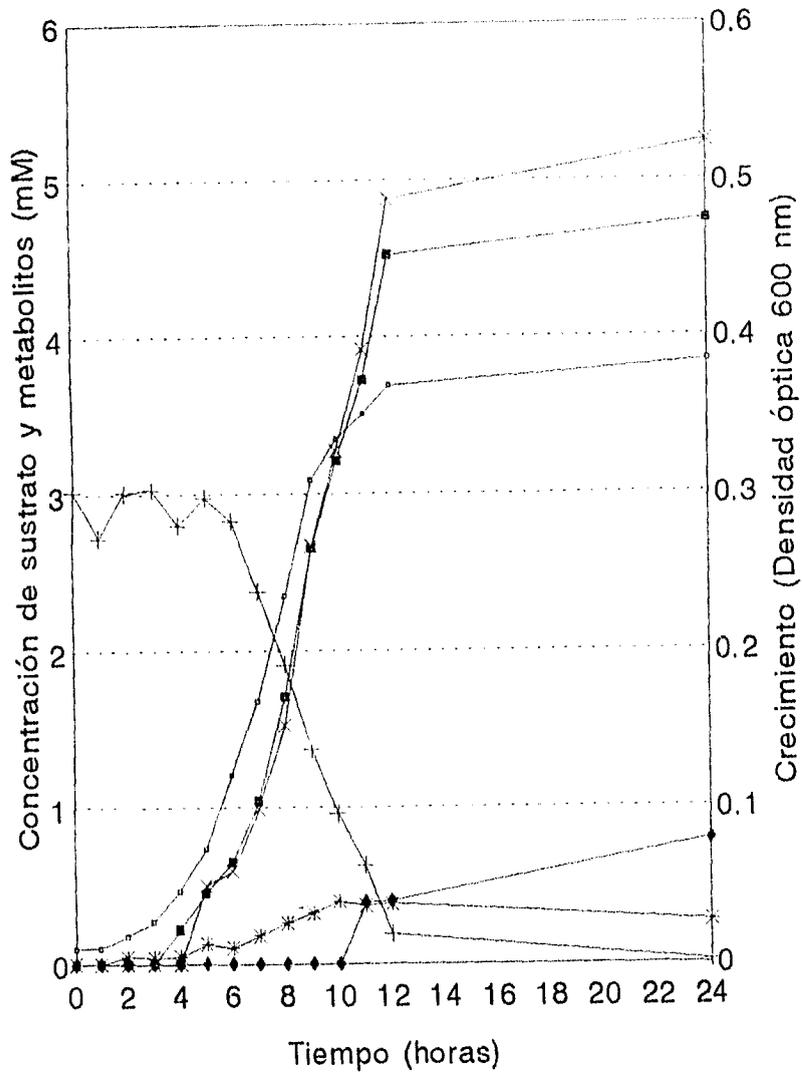


Figura 11. Fermentación aerobia de sacarosa por la cepa Pz 12. (Ver apéndice II).

—○— Densidad óptica; —+— Sacarosa; —*— Fructosa; —■— Acido láctico; —*— Acido acético; —◆— Etanol.

5.3.1.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 20 se muestra el balance de la fermentación de sacarosa por Pz 12 bajo condiciones aerobias de crecimiento, después de 24 horas de incubación, la concentración inicial de sacarosa fué 2.92 mM.

Tabla 20. Balance de la fermentación de 2.92 mM de sacarosa por Pz 12 en condiciones aerobias.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Sacarosa					
glucosa	2.92	17.52	0		
fructosa	2.65	15.91	0		
Lactato	4.74	14.22	0		
Acetato	5.24	10.48	0		
Etanol	0.79	1.58	- 2		1.58
CO ₂ *	4.74	4.74	+ 2	9.48	

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

De acuerdo con los resultados de la Tabla anterior, se recuperó 93% de carbono y se tuvo una relación de oxido-reducción de 6.

5.3.1.4 Discusión de resultados.

No se tienen reportes del metabolismo de sacarosa por *Leuconostoc* bajo condiciones aerobias, sin embargo, el patrón de metabolitos obtenidos en la fermentación realizada coincidió con lo reportado por Condon (1987) y Nuralda (1992b) para el metabolismo aerobio de la glucosa, lo que podría sugerir un metabolismo similar.

En condiciones aerobias no aumentó la velocidad específica de crecimiento, comparado con su crecimiento en condiciones microaerobias, aunque Condon (1987) indica lo contrario.

La presencia de etanol en la fermentación coincide con lo reportado por Lucey (1986) y Plihon (1995) quienes indican que si hay producción de etanol durante el crecimiento aerobio de cepas de *Leuconostoc*.

5.3.2 FERMENTACION ANAEROBIA DE SACAROSA POR LA CEPA Pz 12.

5.3.2.1 Crecimiento de la cepa, consumo de sustrato y producción de metabolitos (Figura 12).

De la 5a. y hasta la 12a. horas el crecimiento aumentó gradualmente, sin embargo, la fase log del crecimiento de la cepa solo se observó de la 7a. a la 10a. hora de fermentación. Entre las 12 y 24 horas no se observó aumento en el crecimiento.

El consumo del sustrato (sacarosa) coincidió con el crecimiento, pues durante las 5 primeras horas de la fermentación prácticamente no disminuyó el nivel de sacarosa en el medio. A partir de la 6a. y hasta la 12a. horas se observó una disminución paulatina en la concentración de sacarosa hasta que se agotó a las 24 horas. Desde el inicio de la fermentación se detectaron pequeñas concentraciones de fructosa en el medio y se mantuvo en aumento con respecto al tiempo, alcanzando su concentración máxima a las 12 horas de fermentación, aunque disminuyó en las muestras de 24 horas.

La producción de ácido láctico y etanol coincidió con el inicio del crecimiento acelerado de la cepa. Durante las 12 primeras horas de la fermentación no coincidieron la concentración de ácido láctico y etanol producidos; esto sólo sucedió en la etapa final del crecimiento (24 horas) en la que se obtuvieron concentraciones equimolares aproximadas de dichos metabolitos. Desde la 8a. hora de fermentación que se detectó la presencia de ácido acético en el medio. Dicha concentración se incrementó hasta el final de la misma. Cabe hacer notar que en general la proporción de ácido acético producido en cada tiempo fué de 1:10 con respecto al etanol. La producción de manitol también coincidió con el inicio del crecimiento de la cepa, y se observó un aumento gradual durante el transcurso de la fermentación, la concentración final de manitol producido fue muy baja en relación al ácido láctico y etanol.

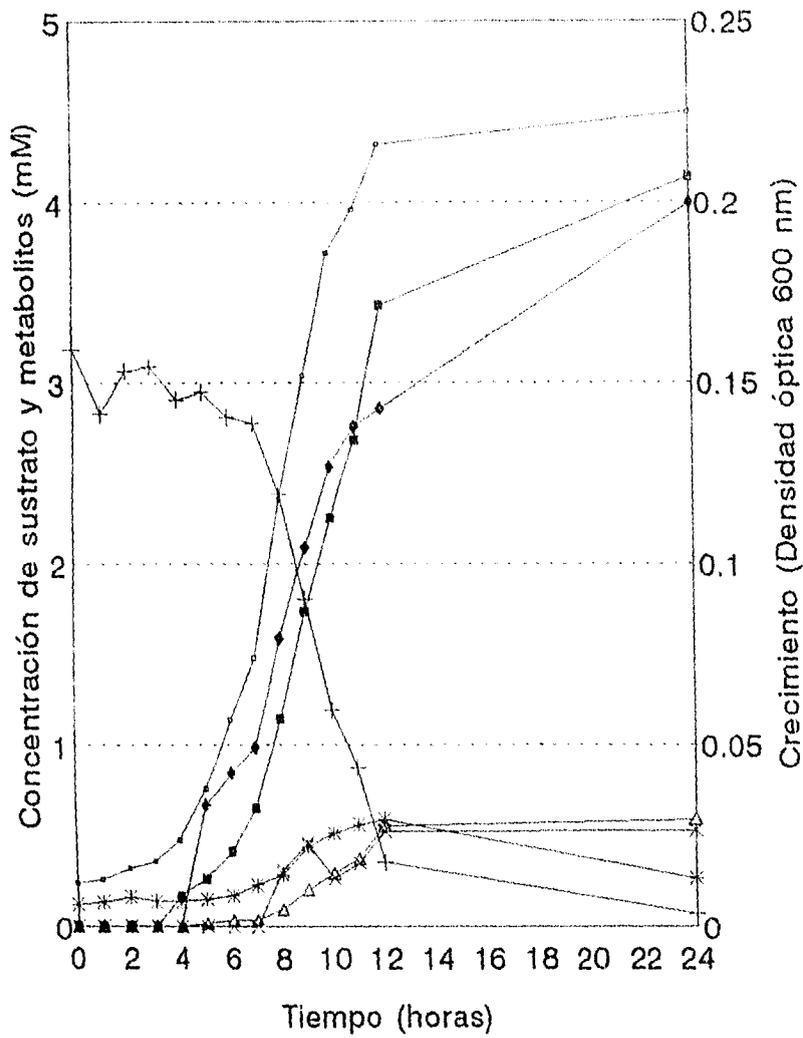


Figura 12. Fermentación anaerobia de sacarosa por la cepa Pz 12. (Ver apéndice II). -- Densidad óptica; + Sacarosa; * Fructosa; ■ Acido láctico; × Acido acético; ◆ Etanol; △ Manitol.

5.3.2.2 Parámetros de crecimiento.

En la Tabla 22 se resumen los parámetros de crecimiento en sacarosa de la cepa Pz 12 en condiciones anaerobias.

5.3.2.3 Balance de la fermentación.

En la Tabla 21 se presenta el balance de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones anaerobias de crecimiento después de 24 horas de incubación.

Tabla 21. Balance de la fermentación de 2.92 mM de sacarosa por Pz 12 en condiciones anaerobias.

Compuesto	mM	mM carbono	Valor de oxidación	Productos oxidados	Productos reducidos
Sacarosa					
glucosa	2.85	17.1	0		
fructosa	2.58	15.49	0		
Lactato	4.14	12.42	0		
Acetato	0.53	1.06	0		
Etanol	3.9	7.8	- 2		7.8
CO ₂ *	4.14	4.14	+ 2	8.28	
Manitol	0.59	3.54	- 1		0.59

Carbono recuperado= mmol producto/mmol sustrato x 100

Oxidación /Reducción= Productos oxidados/productos reducidos

* Valor teórico considerando la fermentación heteroláctica por bacterias lácticas.

El porcentaje de carbono recuperado fué de 88% y la relación oxido-reducción de 0.99.

5.3.2.4 Discusión de resultados.

De acuerdo con Nuraida (1992a), diversas cepas de *Leuconostoc* metabolizan la sacarosa bajo condiciones anaerobias para producir ácido láctico,

ácido acético, etanol, manitol y fructosa. Aun cuando el autor reporta concentraciones variables de los metabolitos anteriores de acuerdo a la cepa de estudio, en general las concentraciones de ácido láctico y etanol no son equimolares y la concentración de ácido acético y manitol son considerablemente elevadas, comparadas con las obtenidas en este estudio.

Las altas concentraciones de etanol detectadas coincidieron con las obtenidas por Cogan y Jordan (1994) y Nuraida (1992a). Las altas concentraciones de manitol y ácido acético encontradas por Nuraida (1992a) pudieron ser causadas por la variabilidad entre cepas, por lo que sería muy interesante y de gran importancia conocer los factores que determinan la proporción de fructosa a reducirse, como ejemplo, determinar la posibilidad de inhibición o represión de la manitol deshidrogenasa por presencia de manitol u otro metabolito producido durante el crecimiento de *Leuconostoc*.

De acuerdo a los resultados anteriores, durante el crecimiento anaerobio de sacarosa Pz 12 reduce el 23 % de la fructosa presente comparado con un 25 % que se reduce en la fermentación de sacarosa en condiciones microaerófilas.

5.3.3 EFECTO DE LOS NIVELES DE OXIGENO EN LOS PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE Pz 12.

El efecto de los niveles de oxígeno en el crecimiento de Pz 12 se realizó comparando las velocidades específicas de crecimiento, los rendimientos celulares, los cocientes metabólicos y las productividades obtenidas bajo las diferentes condiciones de cultivo de acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 22. En ambas fermentaciones el pH final alcanzado fue en el rango de 6.05 a 6.3.

Tabla 22. Efecto de los niveles de oxígeno en los parámetros de crecimiento de la cepa Pz 12 en el medio HSH-sacarosa 2.92 mM.

Parámetro de crecimiento	Anaerobiosis	Microaerobiosis	Aerobiosis
X (g células / L)	0.104	0.109	0.178
μ (h^{-1})	0.301	0.351	0.355
Y (g células / g sustrato)	0.106	0.117	0.179
q (g sustrato / g células-h)	2.83	3	1.98
P (g células / L h)	0.0043	0.0045	0.0074

De la Tabla anterior, es claro que no existen diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento, por lo que se sugiere que el oxígeno no es un factor determinante en ese parámetro.

Al término de las fermentaciones evaluadas, el mayor rendimiento celular se logró en condiciones aerobias, sin embargo, dado que el rendimiento en microaerobiosis y anaerobiosis fue similar, se graficaron los rendimientos obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo vs. las conversiones de

sustrato con el fin de comparar los rendimientos logrados durante la fermentación y no sólo en un punto de la misma (Figura 13). De esa figura puede verse que la aerobiosis favorece los rendimientos logrados en todos los niveles de conversión de sustrato, aun cuando tienden a disminuir conforme aumenta la conversión. Contrario a lo esperado, los rendimientos celulares en condiciones anaerobias empiezan siendo mayores que en microaerobiosis, sin embargo, al aumentar la conversión tienden a igualarse y permanecen con esa tendencia hasta la conversión máxima. De acuerdo a lo anterior, el oxígeno si favorece los rendimientos celulares logrados.

Nuraida (1992b) y Condon (1987) obtuvieron rendimientos celulares semejantes cuando realizaron fermentaciones anaerobias de glucosa por diversas cepas de *Leuconostoc*, sin embargo esto no sucedió bajo condiciones aerobias, ya que Condon observó que los rendimientos celulares aumentaron 2.5 veces al pasar de condiciones anaerobias a aerobias, mientras que Nuraida solo notó un aumento de 1.5 veces. Este último autor sugiere que la disminución de los rendimientos obtenidos se debe al uso de un medio químicamente definido contrario a Condon que utilizó un medio complejo.

No existen evidencias del efecto del oxígeno en el crecimiento de *Leuconostoc* en sacarosa por lo que se comparó con la información disponible que es sólo para glucosa.

Los resultados mostrados en la Tabla 26 indican que los rendimientos celulares del crecimiento de *Leuconostoc* en sacarosa no coinciden con lo reportado por Condon (1987), pero sí con lo reportado por Nuraida (1992b) para el crecimiento de *Leuconostoc* en glucosa por lo que seguramente el medio químico definido imprime características especiales al crecimiento de Pz 12.

Parece que las condiciones de mayor presencia de oxígeno no favorecen el cociente metabólico de Pz 12 en presencia de sacarosa.

Las productividades celulares obtenidas muestran un efecto claro de las condiciones de cultivo. Aun cuando prácticamente no existió diferencia entre las productividades obtenidas bajo condiciones anaerobias y microaerobias sí se

observó un cambio cuando el microorganismo creció en condiciones aerobias dado que la productividad casi se duplicó.

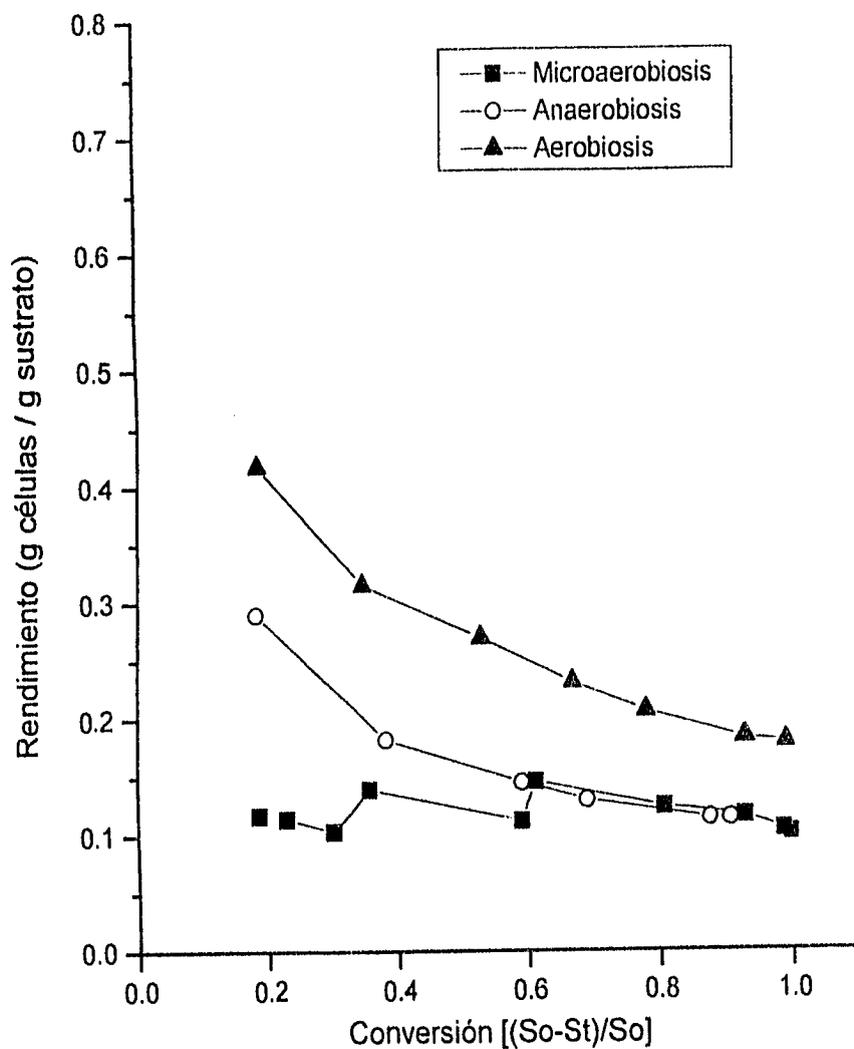


Figura 13. Efecto de las condiciones de oxígeno en los rendimientos celulares logrados por la cepa Pz 12.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

1.- En un medio con sacarosa, en condiciones de microaerobiosis, *Leuconostoc* sp. Pz 12 consume inmediatamente la glucosa y utiliza la fructosa como aceptor y como donador de electrones, sin agotarla.

Los productos de su metabolismo son: ácido láctico, ácido acético, etanol y manitol.

2.- La velocidad específica de crecimiento de la cepa fue mayor en sacarosa que en glucosa, en fructosa y aun que en una mezcla de glucosa y fructosa.

3.- De lo anterior se desprende la importancia de la presencia de sacarosa en la masa de nixtamal para su acidificación rápida por cepas de *Leuconostoc*. En este trabajo *Leuconostoc* Pz 12 produjo 0.13 g de ácido láctico / 100 mL de medio a partir de 0.4 g de sacarosa / 100 mL de medio. No es posible entonces que únicamente a partir de la concentración de sacarosa del nixtamal (0.1 - 0.4 g / 100 g de masa seca) *Leuconostoc* Pz 12 haya podido producir una acidez titulable de 0.55 g de ácido láctico / 100 g de materia húmeda reportada por Wachter (1995) en una fermentación de masa de nixtamal estéril inoculada con una cepa de *Leuconostoc* no amilolítica.

4.- En un medio con una mezcla de glucosa y fructosa, se consume preferentemente la glucosa sin agotar la fructosa. No mejoró el rendimiento celular ni aumentó la proporción de fructosa como aceptor de electrones en un medio con sacarosa+fructosa.

5.- Los metabolitos producidos a partir de glucosa, fructosa, sacarosa y mezclas de ellos en condiciones microaerobias son básicamente los mismos:

ácido láctico, ácido acético y etanol, excepto cuando hay fructosa pues además de los anteriores, se produce manitol.

6.- Existe un efecto marcado de la presencia o ausencia del oxígeno sobre el metabolismo de la sacarosa, como se ha reportado para la glucosa: en presencia de oxígeno aumenta el rendimiento celular, sin afectar la velocidad específica de crecimiento; se produce acetato en vez de etanol y no se afecta la producción de lactato.

CAPITULO VII. REFERENCIAS

Adams M.R. y Hall C.J. (1988) *Int. Journal Food Science Technol.* **23**, 287-292.

Adler-Nissen J. y Demain A.L. (1994) Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations. *J. Indust. Microbiol.* **13**, 335-343.

Bailey J. E., Ollis D. F. (1977) Kinetics of substrate utilization product yield and biomass production in cell cultures. En: *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, 335-410.

Bassit, N., Boquien C.Y., Picaque D. y Corrieu G. (1993) Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (6), 1893-1897.

Bobillo, M y Marshall V. (1992) Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 67-70.

Bonestroo M.H., Kusters B.J.M., de Wit J.C. y Rombouts F.M. (1992) Glucose and sucrose fermenting capacity of homofermentative lactic acid bacteria used as starters in fermented salads. *Int. J. Food Microbiol.* **15**, 365-376.

Cañas A.O., Bárzana E., Owens J.D. y Wachter M.C. (1993) La elaboración del pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia* **44**, 219-229.

Cogan J.F., Walsh D. y Condon S. (1989) Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 77-84.

Cogan T.M. y Jordan K.N. (1994) Symposium: The dairy *Leuconostoc*. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**, 2704-2717.

Condon S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 269-280.

Cooney C.L. (1981) Growth of microorganisms. En: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise, Vol 1*. H.J. Rhem y G. Reed (Eds.). Verlag Chemie, Weingheim, Deerfield Beech, Florida, 73-112.

Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G. y Guzmán G.J. (1955) El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia Mex.*, **15**, 27-30.

Daeschel M. A., Anderson R. E. y Fleming H.P. (1987) Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 357-367.

Doelle H. W. (1981) Basic metabolic processes. En: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise, Vol 1*. H.J. Rhem y G. Reed (Eds.). Verlag Chemie, Weingheim, Deerfield Beech, Florida, 113-233.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** (3), 350-356.

Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A. y Sneath P.H.A. (1978) A simple method for storage of bacteria at -76° C. *J. Appl. Bacteriol.* **44**, 313-316.

Fiechter A. (1981) Microbial fundamentals. En: *Biotechnology, a Comprehensive Treatise, Vol 1*. H.J. Rhem y G. Reed (Eds.). Verlag Chemie, Weingem, Deerfield Beech, Florida, 453-506.

Firme P., Leitão C. y San Romão V. (1994). The metabolism of sugar and malic acid by *Leuconostoc oenos*: effect of malic acid, pH and aeration conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 173-181.

Fuentes I., Herrera T. y Ulloa M. (1974). Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana* y determinación de *Escherichia coli* var. *neapolitana* aisladas del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **16**, 99-103.

Gobetti M., Corsetti A. y Rossi J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 456-460.

Henry N.G. (1972) Factors affecting organic acid production by sourdough (San Francisco) bacteria. *Appl. Microbiol.* **23**, 1153-1159.

Ito S., Kobayashi T., Ohta Y. y Akiyama Y. (1983). Inhibition of glucose catabolism by aeration in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Ferment. Technol.* **61**, 353-358.

Lucey C.A. y Condon S. (1986) Active Role of Oxygen and NADH Oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1789-1796.

Marshall V.M. (1987) Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. *J. Dairy Res.* **54**, 559-574.

Moat G.A. y Foster W.J. (1995) Carbohydrate metabolism and energy production. En: *Microbial Physiology*. 3a. ed. Wiley-Liss, Inc. New York, 363-376.

Neidhardt C.F. (1990) Quest for food. En: *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach*. Sinauer Associates, Inc. 174-183.

Mozqueda-González E. y Escamilla-Hurtado L. (1988) Chemical and microbiological study of lactic acid fermentation in pozol (a Mexican corn-based beverage). En: *Solid State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials*. M. Raimbault (Ed.), ORSTOM, 25, 26, 27 julio, Montpellier.

Nuraida L. (1988) *Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough*. MSc. Thesis, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 80 pp.

Nuraida L. (1992a) *Metabolic studies on lactic acid bacteria*. PhD thesis, Department of Food Science and Technology, University of Reading, United Kingdom, 237 pp.

Nuraida L., Grigolava I., Owens J.D. y Campbell-Platt G. (1992b) Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc spp.* *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 517-522.

Nuraida L., Wachter M.C. y Owens J.D. (1995) Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 567-571.

Owens J.D. y Keddie R.M. (1969) The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **32**, 338-347.

Perry R. H. y Green D. (1984) *Perry's Chemical Engineer Handbook*. International Student Edition. 6a. ed. Mc. Graw Hill. U.S.A. 3-101.

Plihon F., Taillandier P. y Strehaiano P. (1995) Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 117-122.

Poolman B. (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 125-148.

Quintero R. (1987) Cinética de Fermentaciones. En: *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Alhambra Mexicana, 49-50.

Ragout A., Siñeriz F., Diekmann H. y Font de Valdez G. (1994) Effect of environmental pH on the fermentation balance of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 388-391.

Ramírez J.F. (1987) *Biochemical studies on a Mexican fermented corn food--pozol*. PhD thesis, Faculty of the Graduate School, Cornell University, N. York, 176 pp.

Rodríguez A.V. y Manca de Nadra M.C. (1994) Sugar and organic acid metabolism in mixed cultures of *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc oenos* isolated from wine. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 61-66.

Salinas Ch.C. (1958) *Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol*. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63 pp.

Salinas Ch.C. y Herrera T. (1974) Aislamiento de *Aerobacter aerogenes* del pozol del estado de Campeche. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **16**, 95-98.

Salou P., Leroy M.J., Goma G y Pareilleux A. (1991) Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 87-91.

Salou P., Loubiere P. y Pareilleux A. (1994) Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1459-1466.

Santillana H. R. (1995) *Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol*. Tesis de Maestro en Ciencia de Alimentos (Química de alimentos). Facultad de Química, UNAM, México, 84 pp.

Serpa P.M.(1994) Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 42-48.

Silva-Villarreal E.C. (1984) *Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula, Chiapas*. Tesis profesional, Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, 44 pp.

Smart J.B., Pillidge C.J. y Garman J.H. (1993) Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of β -galactosidase and phospho- β -galactosidase. *J. Dairy Res.* **60**, 557-568.

Snyder L.B. y Kirkland J.J. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2a. ed. John Wiley and Sons, Inc., 549-552.

Stolz P., Vogel R.F. Hammes W.P. (1992) Accumulation of glucose from maltose by *Lactobacilli* isolated from sourdough. En: *Second bridge meeting of contractors, T project*, 23-27 may, Cork, Ireland, pp. 124.

Summer J.B. (1925) *J. Biol. Chem.* **65**, 393.

Steinkraus K.H. (1983) Indigenous fermented foods involving an acid fermentation. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, 226-233.

Taboada J., Salinas C., Ulloa M. y Herrera T. (1975) Fijación de nitrógeno en cultivos mono-específicos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum* usando distintas fuentes de carbono. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **17**, 157-159.

Talarico T.L., Axelsson L.T., Novotany J., Fiuzat M. y Dobrogosz W.J. (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 943-948.

Thomas T.D. y Crow V.L. (1983) Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **17** 13-17.

Trejo-González A., Fera-Morales A. y Wild-Altamirano C. (1982) The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation. En: *Advances in Chemical Series, No. 198, Modification of Proteins*. R.E. Feeney y J.R. Whitaker (Eds.). American Chemical Society, 245-263.

Ulloa M. y Herrera T. (1972) Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **14**, 15-24.

Ulloa M. (1974) Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* **8**, 17-48.

Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. (1983) Mexican pozol. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. K.H. Steinkraus (Ed.). Marcel Dekker, N. York, 226-233.

Vedamuthu E.R. (1994) The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *J. Dairy Sci.* **77**, 2725-2737.

Velázquez R., Pozo C., Rimbault M. y Viniegra G. (1984) Ecología de la fermentación láctica en alimentos amiláceos. En: *Simposio Internacional: Las fermentaciones de la industria alimentaria*. ONUDI/UAM-Iztapalapa, 27-29 Noviembre, México, D.F.

Wacher R.C. (1995) *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas (Alimentos). Facultad de Química, UNAM, México, 174 pp.

Watson S. (1987). Structure and composition. En: *Corn: Chemistry and Technology*. Watson S.A. y Ramstad P.E. (Eds.). The American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota U.S.A. pp 54-81.

Westby A., Nuraida L., Owens J.D. y Gibbs P.A. (1993) Inability of *Lactobacillus plantarum* and other lactic acid bacteria to grow on D-ribose as sole source of fermentable carbohydrate. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 168-175.

APENDICE I

IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA PARA LA CUANTIFICACION ENZIMATICA DE GLUCOSA, FRUCTOSA, SACAROSA Y MALTOSA, TOMANDO COMO MODELO EL SISTEMA ENZIMATICO COMERCIAL.

Se estableció una técnica para la cuantificación enzimática de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, con el mismo fundamento que los sistemas Boehringer Mannheim. La serie de pasos realizados para llegar a la implementación de la metodología se presentan en el presente apéndice.

1.- Fundamento de la determinación.

El sistema se basa en la cuantificación espectrofotométrica (340 nm) del NADPH formado a partir de glucosa-6-P mediante la reacción dos de la Tabla 23. La glucosa y la fructosa se convierten en glucosa-6-P mediante las reacciones 1, 3 y 4, respectivamente.

La maltosa y la sacarosa se hidrolizan (reacciones 5, 6 y 7) para convertir posteriormente la glucosa en glucosa-6-P mediante la reacción uno. De esta manera, se forma un mol de NADPH por cada mol de glucosa, fructosa, sacarosa y por cada medio mol de maltosa; lo que permite cuantificar dichos carbohidratos.

Tabla 23. Reacciones enzimáticas para la cuantificación de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa mediante los sistemas Boehringer Mannheim.

A) Determinación de D-glucosa antes de la inversión:

- 1) D-glucosa + ATP → Glucosa-6-P + ADP
- 2) Glucosa-6-P + NADP → Gluconato-6-P + NADPH + H

B) Determinación de D-fructosa:

- 3) D-fructosa + ATP → Fructosa-6-P + ADP
- 4) Fructosa-6-P → Glucosa-6-P

C) Hidrólisis enzimática:

- 5) Maltosa + H₂O → 2-D-glucosa
- 6) Sacarosa + H₂O → D-glucosa + D-fructosa
- 7) Sacarosa + H₂O → D-glucosa + D-fructosa

Lista de Enzimas que catalizan las reacciones antes señaladas (El número de la enzima corresponde al número de la que reacción que catalizan)

- 1 y 3.- Hexocinasa
- 2.- Glucosa-6-P-Deshidrogenasa
- 4.- Fosfoglucosa isomerasa
- 5 y 6.- α -Glucosidasa
- 7.- β -Fructosidasa

2.- Materiales y métodos.

2.1 Preparación de la solución buffer/coenzimas ATP-NADP. (Buffer II).

Dicha solución se preparó con los siguientes reactivos y concentraciones: Trietanolamina 0.8 M, MgSO₄ · 7H₂O 23 mM, NADP 3 mM, ATP 9.4 mM. El pH se ajustó a 7.6. (Todos los reactivos fueron Sigma, excepto la trietanolamina que fue Merck).

2.2 Evaluación de la efectividad de las soluciones enzimáticas preparadas.

Para evaluar la efectividad de cada una de las soluciones enzimáticas se utilizaron soluciones estándar de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, según la enzima a evaluar (todos los carbohidratos utilizados fueron Sigma. En el caso de la maltosa, además se utilizó Merck).

2.3 Preparación de soluciones enzimáticas.

2.3.1 Solución PGI (Sigma P5381)(Sol. III) : La enzima se diluyó con sulfato de amonio 3.2M para tener una solución con 700 U/ml.

2.3.2 Mezcla HK/G-6-PDH (Sigma-H5500 y G-6378 respectivamente) (Sol. II) : La solución enzimática consistió de 290 U/ml de hexocinasa y 145 U/ml de G-6-PDH, utilizando sulfato de amonio como diluyente.

2.3.3 Solución β -fructosidasa (Sigma I-9253): Solución enzimática con 720 U/10 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.6.

2.3.4 Solución α -glucosidasa (Sigma G-7256): La enzima se diluyó en sulfato de amonio 3.2 M, para tener una solución 6.56 U/0.2 ml.

2.3.5 Solución maltasa (Sigma M-3145) (Sol I): La enzima se diluyó en buffer de acetatos 0.1 M pH 4.6 para tener una solución 406 U/12.37 ml. El volumen de enzima adicionado a la celda fue de 66 μ L solo en aquellas determinaciones en que se utilizó esta enzima.

2.4 Purificación de la β -fructosidasa.

Dados los problemas de interferencia de carbohidratos provenientes de la enzima β -fructosidasa se hizo necesario realizar algunos pasos de limpieza de la enzima con el fin de disminuir a la concentración mínima los carbohidratos presentes. Los pasos realizados se describen a continuación:

2.4.1 Cuantificación de carbohidratos en la solución de invertasa.

Se molió finamente la β -fructosidasa y se preparó una solución 720 U/ml en buffer de acetatos 0.1 M, pH 4.6. Dicha solución se agitó magnéticamente y se tomaron muestras a diferentes tiempos (0.5, 1.5, 5, 10, 20 y 40 min). Cada muestra se centrifugó 3 min/ 3000 g y en el sobrenadante se cuantificaron carbohidratos reductores y totales .

Los carbohidratos totales se cuantificaron por el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col. 1956) y los reductores por el método de DNS (Summer, 1925).

2.4.2 Eliminación de carbohidratos de la solución de invertasa.

Se preparó una solución β -fructosidasa como se indicó anteriormente y se centrifugó 5 min/5000 rpm. 1er. Lavado: el precipitado se resuspendió en buffer de acetatos 0.1 M pH 4.6, se agitó y se aforó a 10 ml. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se determinaron carbohidratos totales del sobrenadante. Se repitieron los pasos del primer lavado para efectuar un segundo.

2.4.3 Preparación de una solución β -fructosidasa 720 U/10 ml sin carbohidratos de Interferencia.

Se pesaron 18.46 mg de β -fructosidasa, se realizó una molienda muy fina (considerando que la presentación original de la enzima es en forma de pequeños agregados) y se diluyó con 10 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.6. La solución enzimática se agitó durante 40 minutos. Después de ese tiempo, la solución se centrifugó 5 min/5000 rpm. El precipitado se resuspendió en buffer de acetatos, se agitó y se centrifugó. Este paso se repitió dos veces más. Finalmente, el precipitado se aforó a 10 ml con buffer de acetatos.

3.- Resultados.

A continuación se muestran los resultados de las pruebas realizadas para implementar dicha metodología:

3.1 Reducción del volumen de reacción y evaluación de la preparación del buffer ATP/NADP.

Se redujo el volumen de reacción de 3 a 1 ml y se evaluó el efecto del uso del buffer trietanolamina/ATP/NADP preparado a partir de reactivos. Las enzimas utilizadas en esta prueba fueron las del sistema enzimático original. Para evaluar los dos factores anteriores, se realizaron cuantificaciones de una solución estándar con la mezcla de glucosa/fructosa/sacarosa con 0.5 g/L de cada carbohidrato, los resultados de dichas cuantificaciones se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Efecto de la reducción del volumen de reacción y de la preparación del buffer ATP/NADP en la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.

CARBOHIDRATO	VOL. NORMAL	VOL. REDUCIDO
Sacarosa	0.4956	0.5309
Glucosa	0.4741	0.4227
Fructosa	0.4720	0.4180

La disminución del volumen de reacción y el cambio de buffer no tuvieron efecto en las cuantificaciones por lo que las pruebas sucesivas se realizaron bajo dichas condiciones.

3.2 Efecto de las enzimas.

Una vez verificada la efectividad del buffer ATP/NADP y la poca variación en los resultados al disminuir el volumen de reacción, se trabajó con las enzimas comerciales para ajustarlas a las condiciones del análisis. Se evaluaron individualmente o por pares, determinando su efecto en la cuantificación del carbohidrato correspondiente.

3.2.1 Mezcla: Hexocinasa/Glucosa-6-P-deshidrogenasa (HK/G-6-PDH).

Para analizar su comportamiento se cuantificaron una serie sucesiva de muestras de una solución estándar de glucosa 0.5 g/L. De la Tabla 25 se pudo ver que no existieron problemas en la adecuación de esta mezcla de enzimas ya que la cuantificación del estándar se efectuó adecuadamente.

3.2.2 Enzima: Fosfoglucosa Isomerasa (PGI).

Su efectividad se midió cuantificando muestras de una solución estándar de fructosa 0.5 g/L. De acuerdo con la Tabla 25 las cuantificaciones sucesivas de la solución de fructosa presentaron ligeras variaciones con respecto a la concentración de referencia, por lo que la enzima PGI funcionó adecuadamente.

3.2.3 Enzima: β -fructosidasa.

Para que la cuantificación enzimática pudiera efectuarse exitosamente, se hacía necesario el uso de reactivos y muestras sin problemas de turbidez. Debido a que la invertasa utilizada no estaba en forma pura, al preparar soluciones enzimáticas con dicha enzima se presentaron problemas de turbidez. Debido al alto costo y a los problemas de disponibilidad de una invertasa pura, se decidió utilizar la invertasa disponible, pero efectuando la reacción enzimática fuera de la celda, como un paso preliminar que permitiera desecharla una vez terminada la reacción enzimática.

Para evaluar la efectividad de la invertasa, se realizaron cuantificaciones sucesivas de una solución estándar de sacarosa 0.5 g/L. Los resultados

mostrados en la Tabla 25 indicaron que la reacción enzimática catalizada por la invertasa se efectuó adecuadamente.

Tabla 25. Evaluación del uso de diferentes enzimas para la cuantificación enzimática de glucosa, fructosa y sacarosa.

Enzima	Sol. estándar 0.5 g/L	Concentración promedio obtenida	Desviación estándar	Número de repeticiones
HK/G-6-PDH	glucosa	0.482	0.031	17
PGI	fructosa	0.509	0.006	10
β -fructosidasa	sacarosa	0.552	0.020	13

3.3 Efecto global de reactivos y enzimas sustituidos.

Después de comprobar la efectividad de las enzimas anteriores en la cuantificación individual de glucosa, fructosa y sacarosa, se decidió utilizarlas en forma conjunta para la cuantificación de una mezcla 0.5 y 1.0 g/L de los carbohidratos antes mencionados. Los resultados de dichas cuantificaciones se muestran en las Tablas 26 y 27 respectivamente.

Tabla 26. Efecto global de las enzimas utilizadas en la cuantificación de una mezcla 0.5 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa.

GLUCOSA	FRUCTOSA	SACAROSA
0.456	0.452	0.647
0.460	0.446	0.661
0.472	0.444	0.629

Tabla 27. Efecto global de las enzimas utilizadas en la cuantificación de una mezcla 1.0 g/L de glucosa, fructosa y sacarosa.

GLUCOSA	FRUCTOSA	SACAROSA
1.166	0.844	1.493
1.122	0.907	1.559
1.080	1.080	1.821

Se puede observar que existió una sobreestimación de sacarosa en ambas mezclas. Debido a que la invertasa utilizada no era pura, es posible que tuviera compuestos de interferencia, como carbohidratos.

3.3.1 Purificación de la β -fructosidasa.

3.3.1.1 Liberación y cuantificación de carbohidratos de interferencia de la solución de invertasa.

Dado que la presentación de la enzima era en forma de pellets pequeños se disminuyó el tamaño de partícula de la invertasa antes de preparar la solución enzimática y se agitó vigorosamente para ayudar a la liberación de los carbohidratos presentes en los pellets de la invertasa. No se detectó presencia de reductores pero sí de carbohidratos totales durante los diferentes tiempos de agitación de la misma, alcanzando su nivel más alto a los 40 minutos, que correspondió también al valor obtenido al cuantificar carbohidratos en una solución enzimática que había sido almacenada durante 30 días en refrigeración y que contenía los pellets completos. En la Tabla 28 se muestran las concentraciones de carbohidratos totales detectados durante los diferentes tiempos de agitación de la solución de invertasa.

Tabla 28. Carbohidratos liberados de la solución de invertasa.

Tiempo (minutos)	Carbohidratos totales* ($\mu\text{g/ml}$ glucosa)
0.5	71.6
1.5	68.3
5.0	69.3
10	69.5
20	70.7
40	78.4
30 días	84.5

*Cuantificados por el método fenol-sulfúrico.

3.3.1.2 Eliminación de carbohidratos de la solución de invertasa.

Se realizó una estrategia para eliminar los carbohidratos por medio de lavados consecutivos de la enzima. La efectividad de dichos lavados se verificó cuantificando carbohidratos totales de las diferentes soluciones de invertasa. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Cuantificación de carbohidratos totales en la solución de invertasa antes y después de realizarle lavados.

MUESTRA	GLUCOSA $\mu\text{g/ml}$
Invertasa sin lavados	98.2
Invertasa después de un lavado	13.1
Invertasa después de dos lavados	3.8

El realizar dos lavados a la solución de invertasa casi aseguró la eliminación de carbohidratos de interferencia.

3.3.1.3 Determinación de la actividad de la invertasa.

Los resultados anteriores demostraron que al realizar dos lavados a la enzima se eliminaban los carbohidratos de interferencia, sin embargo, no se sabía si la enzima actuaba adecuadamente después del tratamiento, por lo que se procedió a verificar su actividad. La actividad de la enzima se verificó en forma indirecta al cuantificar sacarosa en una solución estándar 0.5 g/L usando invertasa sin lavados, invertasa después de dos lavados y como patrón de referencia a la invertasa del sistema enzimático comercial, de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 30.

Tabla 30. Determinación de la actividad de la invertasa, por medio de la cuantificación de una solución estándar de sacarosa 0.5 g/L.

INVERTASA	SACAROSA g/L
Sistema Enzimático Comercial	0.541
Sin Lavados	0.794
Dos Lavados	0.537

Se comprobó que los dos lavados realizados a la solución de invertasa no provocaron una disminución en la actividad de la misma, pues la cuantificación de la solución estándar se realizó en forma muy similar a la del sistema enzimático comercial. Además, se pudo observar que los dos lavados realizados casi aseguraron la eliminación de los carbohidratos de interferencia.

3.4 Evaluación de la enzima α -glucosidasa.

Se efectuaron cuantificaciones sucesivas de una solución estándar de maltosa 0.5 g/L con el sistema establecido, usando la enzima α -glucosidasa (Sigma G-7256) para observar el comportamiento de dicha enzima, los resultados de dicha cuantificación dieron una concentración promedio de 0.392 g/L de maltosa con una desviación estándar de 0.027 para 9 repeticiones. Se observó un

déficit promedio de 21.6% en la cuantificación. Dado que ya se había evaluado el efecto del buffer ATP/NADP y de la mezcla de enzimas HX/G-6-PDH, dicho déficit solo pudo ser causado por irregularidades en la enzima α -glucosidasa.

La subestimación de valores pudo ser causada por una baja concentración de enzima, exceso de sustrato, tiempo de reacción muy corto, el uso de una enzima no adecuada para las necesidades de la prueba o por problemas con la maltosa utilizada como estándar. Se analizaron por separado cada uno de los factores señalados.

3.4.1 Efecto de la concentración de α -glucosidasa.

Se incrementó la concentración de enzima utilizada en la prueba hasta en un 40%, obteniéndose un déficit promedio de 22.4% en la cuantificación de la solución estándar de maltosa. Los resultados se resumen en la Tabla 31.

Tabla 31. Efecto de la concentración de α -glucosidasa en la cuantificación de una solución estándar de maltosa 0.5 g/L.

% Extra de α -glucosidasa*	Concentración de maltosa detectada (g/L)	% de déficit
0	0.408	18.4
10	0.399	20.2
20	0.336	32.8
30	0.411	17.8
40	0.407	18.6

*El volumen basal de enzima considerado fue de 6.6 μ L que es el correspondiente para la cuantificación de maltosa a volumen reducido.

3.4.2 Efecto de la concentración de sustrato.

Se analizó el comportamiento de la enzima a diferentes concentraciones de maltosa (desde 0.05 hasta 0.5 g/L), y se tuvo un déficit promedio en las cuantificaciones de 17.1%, de acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 32.

Tabla 32. Efecto de la concentración de sustrato en el comportamiento de la enzima α -glucosidasa.

Concentración de la solución estándar de maltosa g/L.	Concentración de maltosa detectada g/L*.	% de déficit promedio
0.05	0.042	16
0.10	0.090	15.1
0.20	0.172	13.9
0.30	0.232	19.5
0.40	0.315	21.3
0.50	0.395	21.1

* Promedio de 3 repeticiones.

3.4.3 Efecto del tiempo de reacción.

Se incrementó el tiempo de la reacción enzimática de 15 a 30 y 35 minutos y se evaluó su efecto en la cuantificación de una solución estándar de maltosa 0.5 g/L. La concentración promedio de maltosa cuantificada fue de 0.385 g/L con un déficit de 23.1% y de 0.386 g/L con un déficit de 22.8% respectivamente.

3.4.4 Sustitución de la enzima α -glucosidasa por una maltasa.

Se cuantificó una sol. estándar de maltosa 0.5 g/L con la enzima maltasa (Sigma M-3145) y se obtuvo una concentración promedio de 0.422 g/L (un déficit del 15.6%), lo cual significó que el cambio de enzima no mejoró los resultados anteriores.

3.4.5 Efecto del estándar utilizado (maltosa).

Para ver el efecto de la maltosa utilizada como estándar se cuantificaron soluciones estándar de maltosa 0.5 g/L de dos proveedores diferentes (Sigma y Merck). No se observaron grandes diferencias entre un reactivo y otro, pues para la maltosa Sigma se obtuvo una concentración promedio de 0.396 g/L (con un déficit de 20.8%), y para Merck 0.378 g/L (24.5 % como déficit).

La actividad de la α -glucosidasa no mejoró al modificar los factores antes mencionados, ya que el déficit en la cuantificación se mantuvo en un rango de 15.6 a 24.5%, aunque en la mayoría de los casos el déficit obtenido fue mayor al 20%. Lo anterior sugiere que la cuantificación de maltosa ya no puede optimizarse, pero sí podría utilizarse considerando dicho déficit como constante en la cuantificación. De esta forma, se podrían realizar las cuantificaciones de maltosa considerando dicho déficit como un factor de corrección en la fórmula de la cuantificación.

3.5 Metodología propuesta para la cuantificación simultánea de glucosa/fructosa/sacarosa/maltosa.

a) Inversión de sacarosa

En un tubo de polipropileno de 1.5 ml (Ependorf) se adicionaron 0.6 ml de solución β -fructosidasa sin carbohidratos de interferencia y 0.3 ml de muestra. La mezcla se dejó reaccionar por 15 min a una temperatura de 20-25 °C. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se centrifugó 3 min/3000 g. Del sobrenadante se tomó el volumen necesario para la muestra de sacarosa.

b) Reacciones enzimáticas para la cuantificación de los azúcares.

Se realizaron las reacciones añadiendo las muestras y los reactivos según se indica en la Tabla 33. Se utilizaron celdas desechables de metacrilato (Sarstedt) de 1.5 ml, paso de luz de 1 cm, calibradas contra agua o aire. Se prepararon muestras claras y libres de partículas, de acuerdo con el

procedimiento establecido por Santillana (1995), y se adicionaron estándares en lugar de muestras para verificar la técnica.

Tabla 33. Metodología propuesta para la cuantificación simultánea de glucosa/fructosa/sacarosa/maltosa.

Celda No.	1	2	3	4	5	6
Pipetear en las celdas	Blanco de maltosa	Muestra de maltosa	Blanco de sacarosa	Muestra de sacarosa	Blanco glucosa/fructosa	Muestra glucosa/fructosa
Sol. I *	0.066 ml	0.066 ml	-	-	-	-
Muestra	-	0.033 ml	-	-	-	0.033 ml
Buffer I *	-	-	0.066 ml	-	-	-
Muestra sacarosa	-	-	-	0.1 ml	-	-
Mezclar, esperar 20 minutos a temperatura 20-25 ° C.						
Buffer II *	0.33 ml	0.33 ml	0.33 ml	0.33 ml	0.33 ml	0.33 ml
Agua dest	0.60 ml	0.57 ml	0.60 ml	0.57 ml	0.60 ml	0.57 ml
Mezclar, esperar 3 minutos y leer absorbancias (A1) Iniciar reacción enzimática adicionando:						
Sol. II *	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
Mezclar, esperar 15 minutos aproximadamente hasta el final de la reacción y leer absorbancias de las soluciones. (A2). Adicionar:						
Sol. III *	-	-	-	-	0.0066 ml	0.0066 ml
Mezclar, esperar 15 minutos y leer absorbancias de las soluciones (A3).						

* Sol. I. Solución maltasa o α -glucosidasa.

Buffer I: Buffer de acetatos 0.1 M pH 4.6.

Buffer II: Buffer trietanolamina/coenzimas ATP-NADP.

Sol. II: Mezcla Hexocinasa/Glucosa-6-P-deshidrogenasa.

Sol. III: Solución Fosfoglucosa isomesara.

Una vez concluida la prueba, se determinan las diferencias de absorbancias ΔA de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 34.

Tabla 34. Diferencias de absorbancias para la cuantificación de los carbohidratos correspondientes.

Carbohidrato	ΔA
Glucosa	$\Delta A_{glu} = (A_2 - A_1)_{muestra\ glu} - (A_2 - A_1)_{blanco\ glu}$
Sacarosa	$\Delta A_{sac} = [(A_2 - A_1)_{muestra\ sac} - (A_2 - A_1)_{blanco\ sac}] - \Delta A_{glu}$
Maltosa	$\Delta A_{mal} = [(A_2 - A_1)_{muestra\ mal} - (A_2 - A_1)_{blanco\ mal}] - \Delta A_{sac}$
Fructosa	$\Delta A_{fru} = (A_3 - A_2)_{muestra\ fru} - (A_3 - A_2)_{blanco\ fru}$

3.5.1 Condiciones de la determinación.

Las cuantificaciones se realizaron en un intervalo de temperatura de 20 - 25 °C.

Todas las determinaciones se realizaron en espectrofotómetro Beckman DU-65 a una longitud de onda de 340 nm.

3.5.2 Cálculos para la concentración.

Los cálculos de la concentración de carbohidratos en las muestras se basan en la ecuación general siguiente:

$$c = [(V \times PM) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \times 2^*] \times \Delta A \quad (\text{g/L})$$

* Solo cuando se analiza maltosa.

donde:

V = volumen final (ml)

v = volumen de la muestra (ml)

PM = peso molecular de la sustancia a analizarse (g/mol)

d = paso de luz

ϵ = coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = $6.3(L \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

Si la muestra se diluyó durante la preparación, los resultados deberán multiplicarse por el factor de dilución F. Cuando se analicen muestras sólidas o semisólidas que necesiten pesarse para la preparación de la muestra, el resultado debe calcularse a partir de la cantidad pesada.

APENDICE II.

En el siguiente apéndice se presentan los promedios y las desviaciones estándar por hora y por parámetro para cada una de las fermentaciones. Los valores promedio y sus correspondientes desviaciones estándar, son el resultado de tres repeticiones.

Tabla 35. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones microaerofílicas.

Tiempo	Absorbancia		Sacarosa		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol		Manitol	
	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.011	0.002	2.486	0.080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.011	0.002	2.296	0.508	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.018	0.002	2.616	0.070	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.026	0.002	2.586	0.167	0	0	0.147	0.014	0	0	0	0	0	0
4	0.059	0.002	2.365	0.035	0.021	0	0.339	0.020	0	0	0	0	0	0
5	0.056	0.019	2.250	0.170	0.055	0.010	0.500	0.064	0.338	0	0.602	0.096	0.224	0.023
6	0.067	0.009	2.040	0.183	0.062	0.033	0.766	0.096	0.379	0.011	0.672	0.186	0.297	0.030
7	0.106	0.008	1.883	0.225	0.127	0.058	1.368	0.119	0.432	0.032	1.562	0.057	0.402	0.041
8	0.143	0.011	1.193	0.195	0.127	0.005	2.041	0.315	0.521	0.043	2.207	0.446	0.552	0.048
9	0.194	0.033	1.133	0.215	0.268	0.043	2.948	0.006	0.589	0.005	3.016	0.114	0.643	0.056
10	0.217	0.051	0.563	0.301	0.282	0.038	4.081	0	1.035	0.203	3.993	0	1.213	0.096
11	0.233	0.015	0.206	0.233	0.362	0.014	4.005	0.431	0.765	0.018	4.524	0.362	0.684	0.049
12	0.223	0.012	0.040	0.015	0.278	0.016	4.713	0.194	0.878	0.079	5.349	0.137	0.683	0.062
24	0.218	0.004	0.009	0.012	0.199	0.009	4.604	0.232	0.967	0.036	4.918	0.280	0.695	0.070

Tabla 36 . Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de fructosa por Pz 12 en condiciones microaerofílicas.

Tiempo	Absorbancia		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol	
	Media	Desv.E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.003	0.000	3.100	0.219	0	0	0	0	0	0
1	0.003	0.000	3.100	0.310	0	0	0	0	0	0
2	0.005	0.001	2.980	0.263	0	0	0	0	0	0
3	0.009	0.004	2.893	0.256	0	0	0	0	0	0
4	0.011	0.006	2.864	0.284	0	0	0	0	0	0
5	0.008	0.002	2.975	0.246	0	0	0	0	0	0
6	0.009	0.002	2.993	0.236	0	0	0	0	0	0
7	0.007	0.000	3.040	0.310	0	0	0	0	0	0
8	0.008	0.002	2.860	0.465	0	0	0	0	0	0
9	0.009	0.001	3.030	0.043	0	0	0	0	0	0
10	0.009	0.001	2.913	0.297	0	0	0	0	0	0
11	0.010	0.005	2.850	0.314	0	0	0	0	0	0
12	0.011	0.000	3.030	0.050	0	0	0	0	0	0
24	0.040	0.010	2.280	0.081	0.524	0.073	0.553	0.044	0	0
48	0.112	0.004	0.549	0.040	1.748	0.089	1.061	0.040	1.049	0.123

Tabla 37. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de glucosa por Pz 12 en condiciones microaerofilicas.

Tiempo	Absorbancia		Glucosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol	
	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.003	0.003	2.766	0.185	0	0	0	0	0	0
1	0.001	0.000	2.650	0.115	0	0	0	0	0	0
2	0.016	0.015	2.666	0.222	0	0	0	0	0	0
3	0.006	0.001	2.626	0.317	0	0	0	0	0	0
4	0.008	0.001	2.376	0.136	0	0	0	0	0	0
5	0.015	0.000	2.536	0.231	0.192	0.015	0	0	0	0
6	0.037	0.001	2.370	0.088	0.331	0.011	0	0	0	0
7	0.037	0.002	2.260	0.192	0.463	0.018	0	0	0	0
8	0.039	0.004	2.140	0.105	0.500	0.059	0	0	0	0
9	0.051	0.002	2.116	0.100	0.563	0.043	0	0	0.559	0.043
10	0.060	0.000	1.840	0.103	0.790	0.023	0.357	0	0.795	0.071
11	0.061	0.003	1.953	0.098	0.756	0.111	0.462	0	0.767	0.244
12	0.068	0.007	1.836	0.151	0.817	0.117	0.454	0	0.994	0.239
24	0.097	0.004	0.816	0.160	1.662	0.107	0.509	0	1.869	0.184
48	0.121	0.002	0	0	2.573	0.027	0.553	0.066	2.844	0.273

Tabla 38. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de glucosa+fructosa por Pz 12 en condiciones microaerofílicas.

Tiempo	Absorbancia		Glucosa		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol	
	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.017	0.003	2.800	0.280	2.956	0.565	0	0	0	0	0	0
1	0.018	0.004	2.776	0.140	2.790	0.098	0	0	0	0	0	0
2	0.020	0.002	2.903	0.178	2.960	0.176	0	0	0	0	0	0
3	0.027	0.003	2.960	0.045	2.433	0.435	0.151	0	0	0	0	0
4	0.037	0.002	2.750	0.030	2.776	0.416	0.209	0.017	0	0	0	0
5	0.051	0.008	2.610	0.137	2.683	0.155	0.381	0.070	0.595	0.169	0	0
6	0.058	0.019	2.693	0.343	2.643	0.032	0.493	0.244	0.533	0.185	0.559	0.103
7	0.053	0.007	2.686	0.080	2.783	0.110	0.469	0.044	0.378	0.026	0.519	0
8	0.072	0.003	2.400	0.086	2.726	0.161	0.747	0.109	0.463	0.009	0.813	0.148
9	0.069	0.016	2.163	0.654	2.740	0.155	0.897	0.054	0.635	0.224	0.824	0.055
10	0.085	0.007	1.856	0.126	3.080	0.247	1.059	0.084	0.585	0.054	1.132	0.049
11	0.099	0.001	1.686	0.096	2.730	0.105	1.305	0.057	0.488	0.009	1.421	0.068
12	0.118	0.014	1.273	0.102	2.983	0.361	1.548	0.259	0.862	0.197	1.687	0.089
24	0.171	0.009	0.207	0.142	1.803	0.202	3.036	0.183	0.685	0.100	3.615	0.391
48	0.207	0.005	0.014	0.024	0.446	0.295	4.253	0.153	1.255	0.200	4.75	0.351

Tabla 39. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa+fructosa por Pz 12 en condiciones microaerofílicas.

Tiempo	Absorbancia		Sacarosa		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol		Manitol	
	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0	0	3.333	0.266	2.886	0.040	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0.079	0	2.856	0.232	2.946	0.047	0.768	0.028	0	0	0.993	0.047	0	0
12	0.281	0.003	0.230	0.070	2.153	0.102	5.249	0.050	1.110	0.050	5.350	0.175	0.579	0.054
24	0.309	0.013	0.133	0.025	0.823	0.125	6.201	0.111	1.352	0.195	6.226	0.077	0.794	0.075

Tabla 40. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones aerobias.

Tiempo	Absorbancia		Sacarosa		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol	
	Media	Desv.E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.010	0.004	3.026	0.308	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.010	0.003	2.726	0.312	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.018	0.009	3.010	0.051	0.049	0.003	0	0	0	0	0	0
3	0.027	0.007	3.033	0.085	0.039	0.014	0	0	0	0	0	0
4	0.047	0.006	2.800	0.095	0.052	0.017	0.222	0.005	0	0	0	0
5	0.074	0.005	2.986	0.075	0.126	0.012	0.428	0.067	0.504	0	0	0
6	0.121	0.020	2.830	0.163	0.104	0.006	0.652	0.144	0.592	0.193	0	0
7	0.168	0.014	2.386	0.023	0.180	0.035	1.043	0.172	0.995	0.246	0	0
8	0.235	0.032	1.910	0.115	0.262	0.048	1.708	0.317	1.524	0.458	0	0
9	0.309	0.009	1.376	0.061	0.325	0.039	2.666	0.160	2.666	0.108	0	0
10	0.335	0.028	0.965	0.148	0.398	0.028	3.212	0.230	3.277	0.357	0	0
11	0.351	0.016	0.633	0.090	0.371	0.030	3.727	0.278	3.914	0.279	0.392	0.045
12	0.369	0.004	0.196	0.085	0.384	0.019	4.521	0.233	4.878	0.432	0.401	0.052
24	0.384	0.002	0.017	0.020	0.238	0.024	4.744	0.223	5.247	0.047	0.793	0.069

Tabla 41. Promedios y desviaciones estándar de la fermentación de sacarosa por Pz 12 en condiciones anaerobias.

Tiempo	Absorbancia		Sacarosa		Fructosa		Acido láctico		Acido acético		Etanol		Manitol	
	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.	Media	Desv. E.
0	0.012	0.001	3.195	0.131	0.121	0.017	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.013	0.002	2.838	0.154	0.135	0.018	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.016	0.002	3.067	0.050	0.162	0.003	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.018	0.002	3.093	0.132	0.138	0.011	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.024	0.003	2.909	0.247	0.138	0.002	0.170	0.001	0	0	0	0	0	0
5	0.038	0.003	2.950	0.134	0.150	0.009	0.263	0.024	0	0	0.672	0.030	0.014	0.001
6	0.057	0.002	2.810	0.174	0.170	0.025	0.415	0.052	0	0	0.847	0.130	0.034	0.003
7	0.074	0.002	2.667	0.062	0.229	0.002	0.645	0.097	0	0	0.987	0.034	0.035	0.003
8	0.118	0.009	2.386	0.152	0.287	0.038	1.146	0.169	0.308	0.001	1.590	0.213	0.093	0.008
9	0.152	0.003	1.806	0.114	0.442	0.044	1.735	0.105	0.459	0	2.090	0.200	0.202	0.023
10	0.186	0.013	1.192	0.120	0.516	0.027	2.251	0.193	0.267	0.001	2.536	0.519	0.293	0.030
11	0.198	0.005	0.878	0.215	0.563	0.049	2.684	0.358	0.351	0.049	2.758	0.201	0.374	0.034
12	0.216	0.005	0.357	0.042	0.593	0.052	3.430	0.168	0.527	0.002	2.857	0.129	0.557	0.056
24	0.225	0.003	0.068	0.023	0.267	0.022	4.140	0.066	0.533	0.051	3.994	0.302	0.592	0.052