

66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA ACCION DE MICROORGANISMOS  
AMILOLITICOS EN LA FERMENTACION DEL POZOL

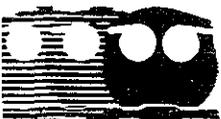
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**ALICIA RIVERA NORIEGA**



MEXICO, D. F.

2001



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: Prof. Olga Velázquez Madrazo  
VOCAL: Prof. Ma. del Carmen Wachter Rodarte  
SECRETARIO: Prof. Eduardo Bonilla Espinosa  
1er. SUPLENTE: Prof. Amelia Ma. de Guadalupe González Saravia  
2o. SUPLENTE: Prof. Norma Trejo Medina

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
UNAM, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y  
Biotecnología, Edif. E, Laboratorio 324

ASESOR DEL TEMA: Ma. del Carmen Wachter  
Dra. Ma. del Carmen Wachter R.

SUPERVISOR TÉCNICO: Francisco Ruiz Terán  
Dr. Francisco Ruiz Terán

SUSTENTANTE: Alicia Rivera Noriega  
Alicia Rivera Noriega

A MIS PADRES Y HERMANOS  
POR SU AMOR Y SU PACIENCIA

## AGRADECIMIENTOS:

❖ A DIOS POR REGALARME LA VIDA ❖

❖ A la Dra. Patricia Lappe por su colaboración en la reactivación de los hongos del pozol, así como por las facilidades otorgadas para trabajar en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la UNAM.

❖ A la M. en C. Teresita Sainz por permitirme trabajar en su Laboratorio del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco.

❖ A la M. en C. Rocío Santillana H. y al Q. F. B. Agustín Reyó H. por su apoyo técnico en la determinación de carbohidratos y ácidos por HPLC.

❖ Al Dr. Francisco Ruiz T. y a la M. en C. Gloria Díaz R. por sus valiosas observaciones y sugerencias durante la realización de esta tesis.

❖ A la Dra. Carmen Wachter R. por la confianza depositada en mí para la realización de una pequeña parte de este gran proyecto, por todo lo que aprendí de ella, por su amistad.

❖ Al M. en C. Francisco García F. del Instituto de Investigaciones Nucleares de la UNAM, por su apoyo en la irradiación de las masas de nixtamal.

❖ A mi familia de la Facultad (Agustín Reyó, Andreita, Gaby Nieto, Ale Barrios, Edurne, Nelly, Naiely, Paty M., Elizabeth, Omar Lerma, Marcos, Juan-ito, Oscarito y todos aquellos con quien conviví durante la carrera y durante mi estancia en el Laboratorio 324) por todo lo que vivimos y aprendimos juntos.

❖ A mis amigos fuera de la Facultad, Jorge Ríos, Irasema y Anabel, por acompañarme en días felices y consolarme y alentarme en los difíciles, por sus consejos y regaños.

❖ A los miembros del H. Jurado por sus comentarios para mejorar ésta tesis.

# ÍNDICE

Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iv
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	
3.1 Maíz	3
3.2 Enzimas amilolíticas	5
3.3 Alimentos fermentados	9
3.3.1 "Ogi"	10
3.3.2 "Yuca"	12
3.3.3 "Pozol"	15
3.4 <i>Bacillus</i>	18
Objetivos	20
4. Materiales y Métodos	
4.1 Microorganismos utilizados	21
4.1.1 Bacteria láctica no amilolítica	
4.1.2 Bacterias no lácticas	21
4.1.3 Mohos	21
4.2 Identificación de bacterias no lácticas	
4.2.1 Identificación microscópica	21
4.2.2 Identificación bioquímica	22
4.3 Determinación de actividad amilolítica	
4.3.1 Bacterias	22
4.3.2 Hongos	24
4.4 Fermentación	
4.4.1 Preparación del sustrato	25
4.4.2 Esterilización del sustrato	25
4.4.3 Prueba de esterilidad de las masas	26
4.4.4 Preparación del inóculo	26

4.4.5 Inoculación del microorganismo	26
4.4.6 Sistema de fermentación	26
4.4.7 Muestreo	27
5. Análisis realizados a las muestras fermentadas	
5.1 Determinación del crecimiento microbiano	27
5.2 Análisis Fisicoquímicos	
5.2.1 Determinación de pH	28
5.2.2 Acidez titulable	28
5.3 Determinación de actividad amilolítica	28
5.4 Cuantificación de carbohidratos y ácidos orgánicos	
5.4.1 Procedimiento de extracción y clarificación	28
5.4.2 Preparación de los estándares de ácidos	29
5.4.3 Cuantificación de los ácidos	29
5.4.4 Cuantificación enzimática de carbohidratos simples	30
6. Resultados y discusión	
6.1 Aislamiento e identificación de bacterias no lácticas amilolíticas	31
6.2 Actividad amilolítica	
6.2.1 Bacterias	35
6.2.2 Hongos	37
6.3 Fermentaciones	
6.3.1 Fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con la cepa no amilolítica <i>L. plantarum</i> (42 Lilis).	40
6.3.2 Fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con la cepa amilolítica <i>Bacillus lentus</i> (48 HG).	44
6.3.3 Fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con <i>Bacillus lentus</i> (48 HG) y <i>L. plantarum</i>	45
7. Conclusiones	48
8. Recomendaciones	48
9. Apéndices	49
10. Bibliografía	59

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pág
1	Principales carbohidratos del grano de maíz, en peso seco.	5
2	Algunos alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo.	14
3	Microorganismos aislados del pozol.	16
4	Características de las bacterias no lácticas aisladas del pozol.	32
5	Patrón de fermentación de azúcares por medio del sistema API 50CHB para las cepas no lácticas aisladas del pozol.	33
6	Resultados del análisis del perfil de fermentación de carbohidratos con el programa APILAB PLUS.	34
7	Concentración de azúcares encontrados durante las fermentaciones en masa de maíz nixtamalizada.	40
8	Concentración de ácidos encontrados durante las fermentaciones en masa de maíz nixtamalizada.	42
9	Cuenta de microorganismos y concentración de biomasa de las cepas de <i>Bacillus</i> en estudio.	51
10	Resultados de actividad amilolítica de las cepas de <i>Bacillus</i> en estudio.	51
11	Resultados de la actividad específica de las cepas de <i>Bacillus</i> en estudio.	52
12	Actividad amilolítica de la cepa <i>L. plantarum</i> (42 Lilis)	52
13	Resultado de la concentración de biomasa de los mohos en estudio.	53
14	Resultados de actividad amilolítica de los mohos en estudio.	53
15	Resultados de actividad específica de los mohos en estudio.	53
16	Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de Maltosa/Sacarosa/D-glucosa.	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pág.
1	Acción de las enzimas amilolíticas.	6
2	Actividad enzimática de las cepas de <i>Bacillus</i> en Caldo Nutritivo-Almidón.	36
3	Actividad específica de las cepas de <i>Bacillus</i> en Caldo Nutritivo-Almidón.	37
4	Actividad enzimática de las cepas de mohos en Caldo Almidón Extracto de Levadura	38
5	Actividad específica de las cepas de mohos en Caldo Extracto de Levadura.	39
6	Valores de pH obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada.	41
7	Valores de acidez titulable obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada.	42
8	Concentración de microorganismos obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada.	43
9	Valores de actividad amilolítica obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada.	44
10	Curva estándar de Glucosa (DNS).	54
11	Curva estándar de ácido láctico (HPLC).	54
12	Curva estándar de ácido acético (HPLC).	54
13	Curva estándar. Cuenta Total-Peso seco ( <i>Bacillus lentus</i> / 48 HG)	55
14	Curva estándar. Cuenta Total-Peso seco ( <i>Bacillus mycoides</i> / 070672).	55
15	Curva estándar. Cuenta Total-Peso seco ( <i>Bacillus cereus</i> / 070772).	56
16	Curva estándar. Cuenta Total-Peso seco (cepa 090172).	56

## 1. RESUMEN

El pozol es una bebida producida por fermentación láctica de masa de nixtamal. La concentración de carbohidratos simples (glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa) del maíz nixtamalizado es baja (Santillana, 1995) por tal motivo se sugiere el estudio de la actividad de las bacterias amilolíticas. Aunque la actividad amilolítica de las bacterias lácticas es baja, la masa alcanza valores de pH cercanos a 4 (Wacher et al. 1993) por lo que se postula que miembros de la microbiota, diferentes de las bacterias lácticas, son capaces de hidrolizar almidón aportando a éstas carbohidratos simples necesarios para su desarrollo.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la presencia de un microorganismo amilolítico en el crecimiento de una bacteria láctica no amilolítica durante la fermentación del nixtamal.

Se aislaron bacterias no lácticas amilolíticas del pozol en Agar Cuenta en Placa-Almidón y se identificaron por medio del sistema API 50 CHB (BioMérieux). Las bacterias no lácticas amilolíticas aisladas del pozol se identificaron como *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides*, siendo *B. lentus* la que mostró mayor actividad.

Se realizaron fermentaciones con cultivos puros y mixtos de *Lactobacillus plantarum* no amilolítico y de *Bacillus lentus* en masas de maíz nixtamalizado (MASECA, México) esterilizadas por radiación gamma. Se determinaron durante las fermentaciones las cuentas viables de ambos microorganismos, la concentración de sacarosa, maltosa y glucosa por métodos enzimáticos, el pH, la acidez titulable y la actividad amilolítica

En cultivo puro, *B. lentus* creció en la masa hasta alcanzar una cuenta de  $10^9$  UFC/g, sin modificar el pH del medio. A partir de las 24 horas, cuando se agotaron los azúcares simples del medio, se detectó actividad amilolítica, que alcanzó un valor máximo de 14 Unidades a las 168 horas. En cultivo mixto *L. plantarum* creció de igual forma que en el cultivo puro, disminuyendo el valor de pH de 7 a 5. *B. lentus* no se

desarrolló considerablemente en las primeras horas y la actividad amilolítica detectada fue baja (0.1 unidades a las 48 horas) durante toda la fermentación.

En la fermentación mixta de la masa de maíz nixtamalizada, el crecimiento de *B. lentus* se ve inhibido por los ácidos producidos por *L. plantarum*, por lo que *B. lentus* no aporta azúcares simples para la bacteria láctica.

## 2. INTRODUCCIÓN.

Existen una enorme variedad de productos fermentados tradicionales muy localizados que se producen y consumen en pequeñas regiones del mundo. Sin embargo, forman parte esencial de la dieta de grandes núcleos de población en el Lejano Oriente, Asia, India, Medio Oriente, África y América Latina.

Cada cultura está íntimamente ligada a ciertos alimentos que forman parte de su dieta (Vargas, 1984). México cuenta con cerca de 56 grupos étnicos (Leyva, 1980), muchos de los cuales han consumido alimentos fermentados desde épocas prehispánicas. De hecho, el uso de los alimentos no se restringe a la nutrición sino que también son empleados con fines medicinales y religiosos.

El pozol es una bebida ácida que se consume en el sureste de México y que se prepara a partir de masa de nixtamal fermentada. No se conoce la importancia de la hidrólisis del almidón durante la fermentación, aunque no se excluye la posibilidad de que un bajo nivel de actividad amilolítica sea suficiente para un máximo crecimiento microbiano y la acidificación de la masa. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de la interacción de los microorganismos amilolíticos con las bacterias lácticas para la acidificación de la masa.

La siguiente investigación se hace con la finalidad de conocer si existen en el pozol microorganismos con actividad amilolítica y si son capaces de proveer a las bacterias lácticas de azúcares simples.

## 2. ANTECEDENTES

### 3.1 MAÍZ

#### 3.1.1. Carbohidratos simples.

Los carbohidratos juegan un rol esencial en el metabolismo intermediario de todos los tejidos de la planta del maíz. Polímeros estructurales, de almacenamiento y una gran variedad de carbohidratos simples (azúcares) se sintetizan en el desarrollo del grano de maíz. En la maduración, cuando la síntesis está completa, los azúcares llegan a ser sólo el 2% del peso seco del grano. Aunque los azúcares simples generalmente aparecen en bajos niveles éstos son importantes en procesos de transferencia de energía y síntesis de componentes del maíz (Pomeranz, 1987)

Los monosacáridos simples que están libres en el endospermo, D-fructosa y D-glucosa, se encuentran aproximadamente en proporciones iguales. Se han reportado concentraciones de 1.8 mg de glucosa y 1.6 mg de fructosa en los granos. Otros azúcares (xilosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, manosa) se encuentran en forma de nucleótidos. Estos son continuamente usados para la biosíntesis de polímeros, encontrándose solo bajos niveles de ellos en el grano (Watson y Ramstad, 1987).

La sacarosa es el disacárido más abundante en los granos de maíz. Después de la sacarosa, los granos de maíz contienen también bajos niveles de maltosa la cual se encuentra generalmente en menos del 0.4% del peso seco del grano. Los trisacáridos,

como la rafinosa, y los oligosacáridos son constituyentes minoritarios en el grano del cereal (Watson, 1987).

### **3.1.2. Carbohidratos complejos**

#### **Almidón**

El almidón es el carbohidrato de almacenamiento más abundante en el mundo. El gránulo de almidón se compone por dos polímeros de glucano, amilosa y amilopectina. La amilosa, la cual constituye del 25-30% del almidón es esencialmente una molécula lineal de glucosa con uniones  $\alpha$ -(1→4). La amilopectina constituye 70-75 % del almidón, es una molécula ramificada con uniones  $\alpha$ (1→6)

La amilosa y la amilopectina en la célula del endospermo están estructuralmente arregladas en un gránulo insoluble. El gránulo de almidón se encuentra dentro del organelo celular llamado amiloplasto. Los gránulos de maíz difieren en tamaño y en diámetro. En general los gránulos de maíz son redondos, pero toman una forma poligonal en las células del endospermo convirtiéndose en paquetes con los gránulos de almidón expandidos.

Aunque sólo está compuesto por dos polímeros de glucosa, el gránulo de almidón es una estructura compleja. Está organizado como anillos crecientes, los cuales son claramente visualizados después de una digestión parcial ácida.

Los gránulos de almidón de maíz tienen una estructura cristalina y muestran birrefringencia de luz polarizada. La cristalinidad del almidón se cree que esta dada por la amilopectina (Watson y Ramstad 1987)

**Tabla 1.** Principales carbohidratos del grano de maíz, en peso seco (Boyer y Shannon, 1987)

Monosacáridos	glucosa y fructosa (1-3%)
Disacáridos y trisacáridos	sacarosa (4-8%), maltosa (0.4%), rafinosa, maltotriosa
Azúcar-alcohol	sorbitol, fitato (0.9%)
Polisacáridos	Almidón (61-78%), hemicelulosa (6-7%), celulosa (3%) y lignina (0.2%)

### 3.2 ENZIMAS AMIOLÍTICAS

Las enzimas que son capaces de hidrolizar las uniones  $\alpha$ -glucosídicas del almidón son llamadas enzimas amilolíticas o  $\alpha$ -glucanasas, y el sustrato es llamado  $\alpha$ -glucano. Estas enzimas son producidas por animales, plantas y microorganismos (Vihinen & Mäntsälä 1989).

Hay esencialmente cinco grupos de enzimas relacionadas con la hidrólisis del almidón. Endo y exoamilasas que actúan primeramente en las uniones  $\alpha(1\rightarrow4)$ , mientras que las enzimas de derivación actúan exclusivamente en las uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$ ; la  $\alpha$ -amilasa, la cual hidroliza cadenas glucosídicas en el interior del sustrato, la  $\beta$ -amilasa, la cual hidroliza unidades de maltosa en el extremo terminal no reductor al final del sustrato, y la glucoamilasa, la cual hidroliza unidades de glucosa del extremo terminal no reductor al final del sustrato. Un cuarto grupo, las isomerasas, actúan sobre la glucosa convirtiéndola en fructosa. Finalmente, las ciclodextrina-glucosiltransferasas degradan el almidón por reacciones de catalización, ciclización y desproporción.

Existe otro grupo de enzimas que degradan el almidón, las amilasas formadoras de oligosacáridos, estas producen polisacáridos específicos tales como maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa y maltohexosa, entre otros.



grupo de endoamilasas, las  $\alpha$ -amilasas termolábiles son derivadas de fuentes fúngicas, usualmente *A. oryzae*.

La mayoría de estas enzimas son extracelulares aunque se han encontrado algunas intracelulares. No se explica la razón de la producción de  $\alpha$ -amilasas intracelulares, ya que el almidón no puede penetrar en la célula.

### 3.2.2. Exoamilasas

Estas enzimas actúan en el mismo sustrato que las endoamilasas pero por diferente camino. Algunas de ellas son capaces de romper uniones  $\alpha$ -1,6, pero el nivel de reacción es lento comparado con su hidrólisis de uniones  $\alpha$ -1,4. Las exoamilasas actúan externamente en las cadenas del sustrato por el extremo no reductor, dando como resultado productos de menor peso molecular.

Comunmente dos tipos de exoamilasas son importantes en la hidrólisis del almidón: las exoamilasas glucogénicas y las maltogénicas.

La *exoamilasa glucogénica*, amiloglucosidasa o glucosidasa es de origen fúngico. Esta enzima ataca las uniones  $\alpha$ -1,4 del extremo no reductor liberando moléculas D-glucosa en configuración  $\beta$ . La amiloglucosidasa remueve moléculas de D-glucosa hacia el punto de ramificación en la molécula de amilopectina. La hidrólisis se puede dar también en uniones  $\alpha$ -1,6 pero es mucho más lenta que en uniones  $\alpha$ -1,4. El uso más importante de la glucoamilasa es la producción de jarabes de alta glucosa (96-98% de glucosa) y jarabes de alta fructosa (55% de fructosa).

La amiloglucosidasa actúa sinérgicamente con la  $\alpha$ -amilasa en la hidrólisis del almidón crudo.

La *exoamilasa maltogénica*,  $\beta$ -amilasa originaria de las plantas, ha sido conocida desde hace muchos años. Las fuentes más comunes de estas enzimas son cebada, trigo y camotes. La  $\beta$ -amilasa actúa en el extremo no reductor de las cadenas externas

del almidón o polisacáridos relacionados, dando como resultado unidades de maltosa en forma  $\beta$ -anomérica.

La amilosa se convierte casi completamente en maltosa, mientras que la amilopectina y otros polímeros ramificados son hidrolizados en varias extensiones dependiendo del grado de ramificación; esta hidrólisis resulta en casi un 50-60% de conversión en maltosa. Esto se debe a la incapacidad de la  $\beta$ -amilasa en hidrolizar uniones  $\alpha$ -1,6.

La enzima *glucoamilasa* es una carbohidrasa extracelular, la cual rompe 1,6-, 1,4-, y también algunas uniones glucosídicas 1,3- de los  $\alpha$ -glucanos. Produce  $\beta$ -D-Glucosa a partir del extremo no reductor del sustrato. Es producida por muchos hongos aunque también lo producen un número mínimo de bacterias como *B. stearothermophilus*.

*Enzimas  $\alpha$ -1,6.* La presencia de uniones  $\alpha$ -1,6 hace la producción de derivados amilolíticos del almidón más difícil de lo que podrían ser en su ausencia. La amiloglucosidasa puede romper uniones  $\alpha$ -1,6 pero en niveles muy bajos. Por otro lado, la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasa no tienen actividad en estas uniones.

La enzima *pululanasa* fue descubierta en 1961, atrajo interés debido a que tiene acción específica en uniones  $\alpha$ -1,6 en el pululano, (un polímero de D-glucosa constituido esencialmente por unidades de maltotriosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6), almidón, amilopectina y oligosacáridos relacionados. La pululanasa es producida por organismos mesófilos como *Klebsiella aerogenes*, cuya temperatura óptima es alrededor de 60° C. El pululano no puede ser degradado por amilasas  $\alpha$  o  $\beta$ , la isoamilasa, que rompe uniones  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina tampoco hidroliza el pululano.

La enzima *isoamilasa*, descubierta en 1949, es producida por un gran número de microorganismos como *K. aerogenes* y *Pseudomonas sp.* Esta enzima hidroliza uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,6 en la amilopectina y en muy baja actividad o nula en pululano.

La enzima *ciclodextrin glucosil transferasa*, (CGT-asa) es capaz de hidrolizar almidón de series de maltooligosacáridos no reductores referidos como ciclodextrinas. Estos compuestos contienen seis, siete, u ocho moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ - (1,4) glucosídico para formar un anillo, y son llamados  $\alpha$ -ciclodextrinas,  $\beta$ -ciclodextrinas y  $\gamma$ -ciclodextrinas respectivamente. La enzima CGT-asa degrada almidón por reacciones de catálisis ciclización y desproporción (Guzmán y Paredes 1995).

Las enzimas CGT-asas son producidas por varios géneros de bacterias tales como *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Clostridium*, etc (Gawande. 1999)

### 3.3 ALIMENTOS FERMENTADOS

En forma muy general, los alimentos fermentados son aquéllos en cuyo proceso de manufactura intervienen los microorganismos. Estos alimentos han existido desde tiempos muy remotos, asociados a las primeras culturas y surgiendo, probablemente, de manera espontánea. Entre los que se consideran más antiguos están algunas bebidas ancestrales de origen chino y se estima que aparecieron hace 6000 o 7000 años, cuando el hombre empezó a usar los granos como alimento (Wang y Fang, 1986).

Los cereales han sido conocidos por el hombre desde tiempos muy antiguos. Inicialmente, se consumieron crudos, después se trituraron en superficies rocosas para elaborar papillas (Steinkraus, 1996).

Las papillas ácidas preparadas de cereales son aun consumidas en cantidades variables en diferentes partes del mundo, particularmente en países en vías de desarrollo, donde se presentan dentro de una dieta básica. El "Ogi" (Nigeria), "Uji"

(Kenya), "koko" (Ghana), son ejemplos de estas papillas preparadas por la fermentación del maíz, sorgo, mijo, o cassava (Steinkraus, 1996).

### **3.3.1. OGI**

La papilla de "ogi" tiene una textura suave, sabor ácido parecido al del yogur. Su color depende del cereal utilizado, crema si se trata de maíz, café rojizo si es de sorgo y gris fuerte cuando es de mijo.

El "ogi" es consumido como papilla; éste es el alimento tradicional más importante para los bebés en la etapa de destete y el cereal mayormente consumido por los adultos en el desayuno. Como cereal de desayuno el "ogi" se consume con un trozo de carne y plátano frito, o pan y huevos fritos.

#### **Métodos de producción**

El grano limpio se remoja en objetos de barro o plástico de uno a tres días. Durante este tiempo se desarrollan los microorganismos deseables responsables del proceso de acidificación. Generalmente 24 horas de remojo son suficientes para suavizar el grano. Después el grano se muele en molinos y a nivel casero en un mortero. El material molido se remoja con agua en un contenedor de plástico y se pasa a través de un tamiz. El filtrado se deja sedimentar y fermentar de 1 a 2 días a temperatura ambiente (30-32° C), mientras el producto que quedó en el cernidor se tira o se usa como forraje. El sedimento es el ogi, el cual se hierve en agua o con el sobrenadante (agua de ogi) para producir la papilla ogi. En la práctica comercial el ogi sin cocción se vende envuelto en envases plásticos después de remover el exceso de agua. La vida de anaquel es de menos de 30 horas sin refrigeración (Steinkraus, 1996)

#### **Microbiología de la fermentación**

La fermentación de la papilla ácida tiene lugar sin la adición intencional de algún inóculo. Se han aislado e identificado los microorganismos presentes en el ogi. Los

hongos asociados en la fermentación del maíz en la microflora de la superficie son: *Cephalosporium*, *Rhizopus*, *Oospora*, *Cercospora*, *Fusarium* y *Aspergillus*. *Cephalosporium* predomina en la fermentación, el resto son eliminados alrededor de las 6 horas de remojo. Se encontraron las bacterias *Corynebacterium*, *E. cloacae*, *L. plantarum*, *L. brevis*, y *Acetobacter*. Las levaduras aisladas fueron *S. cerevisiae*, *Rhodotorula sp.*, y *Candida micoderma*. No todos los microorganismos mencionados se encontraron en todas las fermentaciones con los diferentes sustratos (mijo, sorgo, maíz), sin embargo el microorganismo que se aisló en la fermentación de todos los productos fue *L. plantarum*, responsable de la producción del ácido mayoritario, ácido láctico (Steinkraus, 1996). Los lactobacilos fueron encontrados en concentraciones de  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/g. Esto, junto con el pH bajo (4.5) demuestra que los lactobacilos pertenecen a las bacterias dominantes en estos productos (Johansson et al., 1995).

*L. plantarum* produce la mayor cantidad de ácido, probablemente porque es capaz de utilizar las dextrinas del maíz después del consumo de los azúcares iniciales fermentables. Se dice que *Corynebacterium* hidroliza almidón de maíz para formar ácidos orgánicos, mientras *S. cerevisiae* y *C. mycoderma* contribuyen a la aceptabilidad del sabor (Steinkraus, 1996).

Johansson et al. (1995) reportan además de *L. plantarum* a *L. confusus* como las dos especies dominantes de lactobacilos que pudieron ser identificadas a partir de los productos nigerianos y sugieren que *L. plantarum* puede ser un excelente candidato para ser usado como cultivo iniciador.

Agati et al. (1998), reportaron dos nuevas cepas pertenecientes a la especie *Lactobacillus fermentum*, aisladas en Benin, del ogi y mawè (productos de la fermentación ácida de la masa de maíz). Las cepas OgiE1 y Mw2 fueron Gram positivas, no móviles, catalasa negativas y no formadoras de esporas. Hidrolizaron rápidamente el almidón en las primeras horas de la fermentación. Produjeron ácido láctico como principal ácido orgánico, aunque también se presentó la formación de ácido acético, etanol y gas a partir de almidón. Estos resultados indican que las cepas

fueron bacterias ácido lácticas del tipo heterofermentativas. Al final del periodo de crecimiento ambas cepas acidificaron el medio a pH 4.3. El máximo de actividad amilasa se obtuvo a pH 5 y 45° C con la cepa OgiE1, y a pH 4.5 y 35° C con la cepa Mw2.

### 3.3.2. YUCA

La yuca es una raíz que crece en varias regiones del mundo, es una importante fuente de alimento para mucha gente que vive en países tropicales y subtropicales. En América Latina y Europa es consumida de igual manera que la papa, o es procesada para obtener harina o almidón de yuca, los cuales son usados en diferentes productos de cocina, como elaboración de pan.

El almidón de yuca ácido se obtiene por una fermentación natural, la cual toma de 20 a 30 días. Este producto es muy apreciado en varios países, en Colombia es conocido como "almidón agrio", y como "polvillo azedo" en Brasil (Parada et al.,1996).

Al hacer un estudio de la microflora presente en la fermentación se encontró que consiste mayormente de bacterias aerobias y microaerobias, levaduras y muy pocos hongos. Estuvieron presentes microorganismos Gram positivos y levaduras en los gránulos de almidón, algunos cocos y bacilos formadores de esporas y no formadores de esporas. Se identificaron microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Una cepa de *Bacillus* tuvo mayor actividad  $\alpha$ -amilasa que los estreptococos, lactobacilos y levaduras aisladas. Aunque cinco de las bacterias y levaduras aisladas fueron amilolíticas no se encontraron productos de degradación del almidón (maltosa o glucosa). No se detectó actividad en las células lavadas, toda la actividad  $\alpha$ -amilasa pareció ser extracelular, ya que así las enzimas pueden interactuar con la superficie de los gránulos de almidón (Parada et al.,1996).

Giraud E. et al., (1993) aislaron de la yuca una cepa de *L. plantarum* (cepa A6) y se examinó su actividad para degradar almidón. Se encontró que este microorganismo

sintetiza una gran cantidad de  $\alpha$ -amilasa extracelular y su cinética de crecimiento es similar en medios con glucosa o almidón. Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la enzima fueron 5.5 y 65° C respectivamente.

Guyot et al., (1998) indican que se aislaron dos especies de una nueva bacteria ácido láctica capaz de degradar almidón, esta nueva bacteria fue aislada de un proceso tradicional de fermentación de yuca en Colombia para producir almidón ácido. Las células de *Lactobacillus manihotivorans* (Lat. *manihot* yuca; Lat *vorare* devorar) fueron bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, mesofílicas, no móviles, homofermentadoras obligadas, formadoras de ácido L (+) láctico, anaerobias facultativas, catalasa negativas, las cuales, por sus características morfológicas y fisiológicas son consistentes con la descripción del genero *Lactobacillus*. La cepa OND 32 T con capacidad amilasa extracelular y la otra cepa YAM 1 con capacidad amilasa asociada a la célula.

Es interesante notar que existen similitudes entre alimentos fermentados de regiones geográficamente lejanas. Tanto en Africa como en América Latina predominan los alimentos fermentados preparados a base de sustratos amiláceos (de cereales y tubérculos ), la tabla 2 muestra algunos otros alimentos fermentados de maíz.

**Tabla 2.** Algunos alimentos fermentados de maíz de diferentes países del mundo (Steinkraus, 1996)

Nombre	Descripción	Tratamiento del maíz previo a la fermentación	País donde se consume
Chicha	bebida alcohólica de maíz, clara, efervescente, amarillenta	Adición de saliva o germinación del maíz	Ecuador, Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Argentina
Pozol*	Bebida ácida no embriagante preparada diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado	Nixtamalización y molienda de granos	México
Uji	Sopa cremosa preparada a partir de una suspensión de maíz fermentado antes o después de la cocción	Preparación de una pasta mezclando el cereal crudo molido con agua	Kenya
Ogi	Papilla de sabor ácido, parecido al del yogurt	Remojo de los granos del maíz.	Nigeria
Mahewu	Bebida ácida no alcohólica de maíz	Preparación de una suspensión de maíz molido con agua, a la que se le agrega harina o pasta de trigo.	Sudáfrica
Kenkey	Masa agria de maíz que se consume cocida con caldos de carne o pescado	Remojo de los granos de maíz en agua.	Kenya
Cerveza Kaffir	Bebida alcohólica efervescente, con sabor ácido parecido al del yogurt.	Remojo y germinación de una parte de los granos de maíz, la otra parte se muele, se mezcla con agua y se cuece.	Sudáfrica

\*Cruz Ulloa y Ulloa, 1973

### 3.3.3. POZOL

Desde tiempos anteriores a la conquista, en el sureste de México, se consume una bebida ácida y refrescante que se conoce con el nombre de pozol, del náhuatl *pozolli* que significa espumoso. Se elabora a partir de nixtamal (maíz hervido en agua con cal). Para su consumo se prepara suspendiendo en agua masa de nixtamal fermentada y se bebe adicionada de sal, azúcar, miel o chiles secos (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Cruz y Ulloa (1973) señalan que el maíz se remoja en agua con cal, se lava, se frota con las manos para desprender la cascavilla y se cuece en agua hasta que revienta el grano. Éste se enfría, se machaca y se amasa, formando bolas, las cuales se envuelven en hojas de plátano, platanillo y hoja blanca. Se dejan fermentar por lo general durante 4 o 5 días. La masa se suspende en agua y se bebe sola o adicionada de sal, pimienta y chile. Algunos componentes fibrosos no se solubilizan completamente durante la nixtamalización y se presenta un sedimento en la bebida cuando la masa se suspende en agua. A la población mestiza, no le agrada este sedimento y ha modificado aparentemente el proceso indígena, adicionando una segunda cocción de los granos del nixtamal en agua, antes de la molienda para reducir el sedimento (Cañas et al., 1993).

#### **Microbiología del pozol**

La fermentación de la masa se lleva a cabo en estado semisólido, con la intervención de una microbiota compleja compuesta por diferentes grupos de bacterias, mohos y levaduras.

La flora microbiana está dominada por bacterias ácido lácticas (Nuraida et al., 1995) Wachter et al., (1993), reporta una concentración máxima (UFC/ g) de  $10^9$  para bacterias ácido lácticas,  $10^7$  para bacterias mesófilas aerobias,  $10^0$  para enterobacterias,  $10^6$  para levaduras y  $10^4$  para hongos.

Dentro de los microorganismos que se han aislado (Tabla 3) es importante mencionar a las bacterias *Agrobacterium azotophilum* y *Klebsiella pneumoniae*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico en la masa y se piensa que podrían estar involucradas en el aumento de proteína de la misma. *Agrobacterium azotophilum* además produce diferentes grados de antagonismo hacia diferentes microorganismos como *B. subtilis*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* entre otros. (Herrera y Ulloa 1975). Dentro de los mohos *Geotrichum candidum*, que está frecuentemente asociado a alimentos fermentados del maíz, podría estar relacionado con la producción de sabores. Este moho posee también la capacidad de utilizar ácidos orgánicos, como el ácido láctico, como única fuente de carbono y no se reporta como amilolítico (Nuraida et al., 1995). Wachter et al., 2000 realizó un estudio para elucidar si el paso adicional de cocción a los granos de maíz para elaborar el pozol mestizo influía en la microbiología de la fermentación. No se encontró diferencia significativa entre las microbiotas de las masas frescas indígenas y mestizas, y los tipos de bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras fueron similares en ambas masas. Muchas de las cepas de hongos y levaduras han sido reportadas anteriormente en el pozol (Ulloa et al., 1987).

**Tabla 3.** Microorganismos aislados del pozol (Ulloa y col., 1987)

Bacterias	Mohos	Levaduras
<i>Achromobacter pozolis</i>	<i>Alternaria tenuis</i>	<i>Candida quilliermindii</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i> ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Agrobacterium azotophilum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Escherichia coli</i> var. <i>neapolitana</i>	<i>Epicoccum sp</i>	<i>Hansenula fabiani</i>
<i>Paracolobactrum mexicana</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>

Bacterias	Mohos	Levaduras
<i>Pseudomonas mexicana</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Trichosporom cutaneum</i>
	<i>Penicillium italicum</i>	

La acidificación de las masas no inhibe a las enterobacterias. Estas crecen bien en las primeras horas de la fermentación y sobreviven después de que los valores de pH bajos han sido alcanzados (Wacher et al., 2000).

Sainz (1998) encontró enterobacterias en cuentas altas en las primeras horas de fermentación del pozol, aunque dichas cuentas disminuyen conforme avanza el proceso de fermentación, éstas no desaparecen. De las enterobacterias que se suponía que podrían estar presentes como *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* sólo se aislaron cepas de *E.coli* hallándose diversos serogrupos patógenos.

El pozol cuenta con una concentración baja de azúcares simples (Santillana, 1995), una alta concentración de almidón y una microbiota muy compleja, por lo que es importante determinar que microorganismos aportan, gracias a su actividad amilolítica, azúcares fermentables. Nuraida et al., (1995) menciona que se detectó actividad amilolítica en condiciones anaerobias por parte de las bacterias lácticas, sin embargo ésta fue baja.

Es de gran interés el estudio de las interacciones microbianas presentes y de la dinámica del crecimiento microbiano. Un estudio amplio sobre esta fermentación permitirá establecer recomendaciones para su producción en condiciones controladas a nivel rural, o inclusive para su industrialización.

### 3.4 BACILLUS

El género *Bacillus* está compuesto por bacilos gram positivos, caracterizados por su capacidad para producir endosporas: el género es amplio e incluye microorganismos aerobios estrictos y anaerobios facultativos. Muchas otras especies del género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se hallan en la mayor parte de suelos, agua y polvo. Los miembros del género *Bacillus* son usualmente móviles por la presencia de flagelos, bacilos Gram positivos, catalasa positivo, crecen bien en medios simples que contienen azúcares o ácidos orgánicos como única fuente de carbono, amonio como única fuente de nitrógeno y minerales. Muchos metabolizan polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos por medio de enzimas hidrolíticas extracelulares. La mayoría de las especies son mesófilas, pero existen también miembros termofílicos que no crecen en temperaturas menores de 40° C (ejemplo *B. sterothophilus*) y miembros psicrótrofos (Stolp, 1988).

Se tiene reportado un amplio número de *Bacillus* amilolíticos (Vihinene y Mäntsälä, 1989). Achi (1990) reporta en un estudio microbiológico realizado al “obiolor” (bebida no alcohólica fermentada, obtenida a partir del malteo de sorgo, maíz o mijo), la presencia de *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* spp. y *Strep. Lactis*. También menciona que los microorganismos responsables de la fermentación del obiolor son mayoritariamente microorganismos capaces de hidrolizar almidón, y que varias cepas de *Bacillus* encontradas fueron capaces de hidrolizar este sustrato. Se han encontrado a estos microorganismos en cuantías altas en la fermentación de cassava ( $10^7$  ufc/g), así como altas cuentas de esporas en los utensilios empleados para su producción ( $10^8$  ufc/g), y se ha demostrado que poseen actividad amilolítica (Amoa, 1995). Ekundayo (1969) propone que la presencia de tales microorganismos en ambientes como los granos de maíz y sorgo tienen un papel importante, y explica que las enzimas amilolíticas extracelulares de estos organismos ayudan a romper el almidón del

sustrato en productos que son utilizados para el crecimiento de otros microorganismos como las bacterias lácticas, sin embargo no se ha demostrado la actividad amilolítica directamente en el producto.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estudiar el efecto de la presencia de microorganismos amilolíticos en el crecimiento de bacterias lácticas no amilolíticas durante la fermentación del nixtamal.

### **Objetivos Específicos**

- Aislar del pozol bacterias no lácticas capaces de hidrolizar almidón.
- Determinar el efecto de una bacteria amilolítica no láctica en el crecimiento de una bacteria láctica en nixtamal .

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Microorganismos utilizados**

#### **4.1.1. Bacteria láctica no amilolítica**

Se utilizó una bacteria láctica no amilolítica, aislada del pozol e identificada por Flores (1996), como *Lactobacillus plantarum* (cepa 42 L).

#### **4.1.2 Bacterias no lácticas**

Se aislaron de muestras de pozol blanco de Villahermosa, Tabasco, de diferentes tiempos de fermentación (0,3,6,9,12,24,48,72 horas y 1 semana). Se prepararon diluciones decimales de muestras correspondientes a cada tiempo de fermentación en Peptona (OXOID L37 ) al 0.1% y se inocularon en ACP (Agar Cuenta en Placa Oxoid CM 325 ). Se incubaron a 30° C durante 48 horas. Se aislaron colonias de bacilos Gram positivos, catalasa positiva. Se resembraron las colonias para purificar en Agar Cuenta en Placa-Almidón (Apéndice1). Se incubaron las cajas 24 horas a 30° C y se observó la hidrólisis del almidón como halos incoloros en un fondo azul oscuro, después de agregar lugol (Apéndice 1). Se seleccionaron las bacterias que presentaron actividad amilolítica .

#### **4.1.3 Mohos**

Se contó con 2 mohos amilolíticos aislados del pozol e identificados por Lappe P y Ulloa M. (Wacher et al.,2000). Estos hongos son: *Cladosporium cladosporoides* y *Phoma glomerata*.

### **4.2. Identificación de bacterias no lácticas.**

#### **4.2.1 Identificación microscópica**

Se realizó tinción de Gram y se observó la morfología microscópica utilizando las técnicas descritas por Harrigan y Mc Cance (1976).

Para la observación de esporas se preparó el medio Finley y Fields descrito en el Manual BioMérieux (Apéndice 1). Se inoculó el microorganismo y se incubó a 30° C durante 24 horas. Se realizó observación en microscopio.

#### **4.2.2 Identificación Bioquímica**

Se verificó la pureza de cada cepa, así como su pertenencia al género *Bacillus* (bacilo esporulado, aerobio, Gram positivo). Se sembraron en cajas con Agar Nutritivo (Apéndice 1) y se incubaron 24 horas a 30° C. Se inocularon en tubos de centrifuga de 50 mL que contenían 10 mL de Caldo Nutritivo Oxoid . Se incubaron a 30° C durante 24 horas y se centrifugaron en centrifuga Beckman a 15000 r.p.m. durante 15 min. a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células 2 veces, para lavarlas, en 10 mL de solución salina al 0.85% (cloruro de sodio Baker # 3624-01). Después del último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo en 2 mL de solución salina al 0.85%. Se inoculó en una ampollita de medio API 50 CHB y se procedió a la inoculación en la galería e incubación según lo indica el instructivo del proveedor.

Se analizaron los resultados en el programa APILAB Plus (BioMérieux).

### **4.3. Determinación de actividad amilolítica**

#### **4.3.1 Bacterias**

Se sembraron las bacterias por estría en cajas de Agar Nutritivo-Almidón (Apéndice 1) y se incubaron a 30° C durante 24 horas. Se inoculó una asada de este cultivo en Caldo Nutritivo-Almidón y se incubó 24 horas a 30° C sin agitar. Se centrifugó el cultivo a 15000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C. Se tomó 0.1 mL del sobrenadante del cultivo centrifugado y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 0.8 mL de una solución 1.2% de almidón disuelta en buffer de fosfatos 0.1M pH=6. Se incubó a diferentes tiempos con agitación en agitadora Bigger Bill Thermolyne, a una temperatura de

30°C y se añadió 0.1 mL de NaOH 5M para detener la reacción. Se determinaron azúcares reductores por el método de DNS (Miller, G. L., 1959)

Se consideró una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 mg de reductores (glucosa) a partir de almidón en 30 min. a 30° C (Hamilton, 1999).

### **Cinética de producción enzimática**

Para determinar la cinética de la producción de la enzima de las cepas en estudio, se llevó a cabo la técnica descrita anteriormente hasta el centrifugado del cultivo, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células dos veces con 10 mL de solución salina al 0.85%. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de Caldo Nutritivo-Almidón. Este volumen se inoculó en 95 mL de Caldo Nutritivo-Almidón. Se incubó a 30° C durante 24 horas. Se tomaron 10 mL de medio durante diferentes tiempos (0,3,6,9 y 24 horas), se centrifugaron y se determinó la actividad amilolítica como se describió anteriormente.

### **Determinación de biomasa**

Con la finalidad de obtener la actividad específica de las cepas en estudio, se determinó el peso seco de la biomasa en los diferentes tiempos de la cinética.

Se transfirió una perla de vidrio del medio Caldo Nutritivo + glicerol donde se conservó el microorganismo y se incubó 24 horas a 30° C. Se inoculó 1 mL de medio con crecimiento en 9 mL de Caldo Nutritivo (por duplicado). Se incubó a 30° C durante 24 horas. Se transfirió este volumen a un matraz que contenía 90 mL de Peptona Bacteriológica y se hicieron diluciones decimales en el mismo medio. Se determinó el peso seco de la biomasa (Apéndice 2) en cada dilución filtrando con vacío en equipo Millipore usando una membrana Whatman de 0.45  $\mu$  y se secaron en horno FELISA a 80°C hasta peso constante de las muestras. Se determinó la cuenta de

microorganismos en la dilución más concentrada en el medio Agar Nutritivo. Se realizó una curva estándar de peso seco vs cuenta total de microorganismos (Apéndice 3).

#### **4.3.2 Hongos**

##### **Cinética de producción enzimática**

Se tomó una superficie de 1 cm<sup>2</sup> del crecimiento del hongo en una caja con agar, se colocó éste en una caja con Agar Papa (Apéndice 1). Se incubó 72 horas a una temperatura de 26-28° C. Se cortó con la parte superior de una punta estéril una circunferencia del agar con crecimiento (8mm diámetro), y se inoculó en tubos de centrifuga que contenían 10 mL de caldo ELA modificado (Apéndice1). Se incubó 24 horas a una temperatura de 26-28° C.

Se centrifugaron las células a 15000 r.p.m. durante 15 min. a 4° C en la centrifuga Beckman. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 10 mL de solución salina isotónica (0.85%) estéril y se agitaron en vortex con la finalidad de lavarlas. Se repitió este procedimiento 2 veces. En el último lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3 mL de caldo ELA modificado estéril.

Con una punta de pipeta recortada previamente de la parte inferior, se tomaron 0.5 mL de la suspensión homogenizada con agitación, y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 200 mL de caldo ELA modificado. Se incubó con agitación a 26° C. Se sacrificaron 2 matraces en cada tiempo de fermentación (0, 24, 48 y 72 horas). Se determinó actividad amilolítica de la misma forma que para las bacterias.

##### **Determinación de biomasa**

Se determinó la concentración de biomasa de las muestras en cada tiempo de la fermentación de la siguiente manera. Se secaron las membranas de 0.45 µ y 45 mm

de diámetro (Millipore) hasta peso constante en 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 (200 mL) se homogenizó agitándolo manualmente y se procedió a filtrar con vacío. Al final se adicionaron 20 mL de agua destilada para lavar la membrana. La membrana se secó hasta peso constante en horno FELISA a 80° C.

### **Cuantificación de azúcares reductores**

Se utilizó la técnica de DNS (Miller, G. L., 1959) para lo cual se colocaron 0.5 mL del medio de reacción en un tubo de ensayo (todas las muestras se hicieron por duplicado). Se adicionaron 0.5 mL del reactivo DNS, se tapó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 min. exactamente. Se transfirió a un baño de agua fría, se agregaron 5 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 540 nm con un blanco de agua + reactivos en espectrofotómetro (MILTON ROY Spectronic 21D). Se realizó una curva estándar con soluciones de 0.1 a 1 mg/mL de glucosa tratadas de la misma forma que la muestra problema (Apéndice 3)

## **4.4. Fermentación**

### **4.4.1 Preparación del sustrato**

Se pesaron 69 g de harina de maíz nixtamalizada marca Maseca en bolsas de Stomacher, se agregó el 50% de agua estéril, se cerraron y se colocaron en bolsas de plástico que fueron selladas con calor, procurando sacar el mayor volumen de aire antes de cerrarlas.

### **4.4.2 Esterilización del sustrato**

Las masas se irradiaron en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM con una dosis de 2.5 Mrad, radiación gamma, con una fuente de <sup>60</sup>Co.

#### 4.4.3 Prueba de esterilidad de las masas

Una vez irradiada la masa, se realizó la prueba de esterilidad. La prueba consistió en hacer una cuenta viable de microorganismos en Agar nutritivo, Agar MRS y Agar Papa Dextrosa. Se pesaron 10 g de masa en una bolsa de Stomacher, se adicionaron 90 mL de agua peptonada, se homogenizó en stomacher durante 30 seg. a velocidad normal, se realizaron diluciones decimales. Se tomó 0.1 mL de las tres primeras diluciones y se inocularon en las cajas con agar, se extendió el inóculo con varilla de vidrio doblada en L, flameada previamente. Se incubaron las cajas a 30° C durante 24 horas.

#### 4.4.4 Preparación del inóculo

Se inoculó la cepa en un tubo con 10 mL de Caldo Nutritivo para el caso de *Bacillus lentus* y Caldo MRS para el caso de *L. plantarum*. Se incubaron a 30° C por 18 horas. Se homogenizaron las muestras en vortex, se tomó 1 mL del cultivo y se inoculó en un tubo con 9 mL del caldo correspondiente, se incubó 24 horas a 30° C, se homogenizó la muestra en vortex, se tomó 1 mL del medio y se inoculó en un tubo de centrifuga con 9 mL del caldo correspondiente. Se incubaron 24 horas a 30° C. Se centrifugaron a 15000 r.p.m. por 15 min., se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces las células con solución salina isotónica (0.85 %). Después del último lavado, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de agua estéril.

#### 4.4.5 Inoculación del microorganismo

Se cortaron las bolsas con la masa estéril por la parte superior con tijeras flameadas con alcohol y se adicionó el volumen de agua que contenía el inóculo necesario para obtener cuentas de  $10^6$  UFC/g (*L. plantarum*),  $10^5$  UFC/g (*Bacillus lentus*).

#### 4.4.6 Sistema de fermentación

Se amasó cada una de las muestras dentro de la bolsa y se repartieron con la ayuda de una espátula y/o cuchara 50 g de masa en frascos de vidrio previamente

esterilizados. Se compactó la masa para eliminar la mayor cantidad de aire, se taparon los frascos con papel aluminio sujeto con una liga. Se incubaron a 30° C y se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 horas y una semana, sacrificando 3 frascos en cada tiempo de muestreo.

#### **4.4.7 Muestreo**

Se tomaron de cada frasco 10 g de masa para el análisis microbiológico y se procedió a realizarlo de acuerdo al punto 5.1. Después se tomaron 10 g de masa para la determinación de pH y acidez titulable de acuerdo a los puntos 5.2.1 y 5.2.2. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

El resto de la masa se almacenó en bolsas de plástico en ultracongelador a -70° C para posterior análisis.

### **5. Análisis realizados a las muestras fermentadas.**

#### **5.1 Determinación del crecimiento microbiano**

Se tomaron 10 g de masa del centro del frasco con espátula flameada previamente en alcohol y se depositaron en una bolsa de Stomacher. Se añadieron 90 mL de agua peptonada al 0.1% y se homogenizó en Stomacher a velocidad normal durante 30 segundos. Se realizaron diluciones decimales en peptona al 0.1%. Se Inoculó 0.1 mL de cada dilución en las cajas y se extendieron con una varilla de vidrio en doblada en L, flameada previamente con alcohol. Se incubaron a 30° C durante 24 horas y se contaron las colonias al término de este periodo.

Se utilizaron cajas con agar MRS para cuantificación de bacterias lácticas. Agar Nutritivo para *Bacillus* y posibles contaminantes y Agar Papa Dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10% para cuantificación de hongos. Para confirmar la selectividad del medio, se realizó Gram y prueba de catalasa a colonias representativas de cada caja.

esterilizados. Se compactó la masa para eliminar la mayor cantidad de aire, se taparon los frascos con papel aluminio sujeto con una liga. Se incubaron a 30° C y se tomaron muestras a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 horas y una semana, sacrificando 3 frascos en cada tiempo de muestreo.

#### **4.4.7 Muestreo**

Se tomaron de cada frasco 10 g de masa para el análisis microbiológico y se procedió a realizarlo de acuerdo al punto 5.1 Después se tomaron 10 g de masa para la determinación de pH y acidez titulable de acuerdo a los puntos 5.2.1 y 5.2.2 Todos los análisis se realizaron por triplicado.

El resto de la masa se almacenó en bolsas de plástico en ultracongelador a -70° C para posterior análisis.

### **5. Análisis realizados a las muestras fermentadas.**

#### **5.1 Determinación del crecimiento microbiano**

Se tomaron 10 g de masa del centro del frasco con espátula flameada previamente en alcohol y se depositaron en una bolsa de Stomacher. Se añadieron 90 mL de agua peptonada al 0.1% y se homogenizó en Stomacher a velocidad normal durante 30 segundos. Se realizaron diluciones decimales en peptona al 0.1%. Se Inoculó 0.1 mL de cada dilución en las cajas y se extendieron con una varilla de vidrio en doblada en L, flameada previamente con alcohol. Se incubaron a 30° C durante 24 horas y se contaron las colonias al término de este periodo.

Se utilizaron cajas con agar MRS para cuantificación de bacterias lácticas, Agar Nutritivo para *Bacillus* y posibles contaminantes y Agar Papa Dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10% para cuantificación de hongos. Para confirmar la selectividad del medio, se realizó Gram y prueba de catalasa a colonias representativas de cada caja.

## 5.2 Análisis Físicoquímicos

### 5.2.1 Determinación de pH

Se tomaron 10 g de la muestra y se dispersaron en 50 mL de agua destilada. Se determinó el pH en un potenciómetro JENWAY 3020, calibrado previamente con soluciones buffer de pH 4 y 7.

### 5.2.2 Acidez Titulable

Se tomó una alícuota de 10 mL de la suspensión preparada para la determinación de pH. Se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se añadió 0.1 mL de fenolftaleína como indicador (solución al 0.1% en etanol). Se tituló con una solución valorada de NaOH 0.1 N, hasta la aparición de un color rosado que permaneciera durante 30 segundos. Se calculó el contenido de acidez y se expresó como ácido láctico por 100 g de muestra, utilizando el valor de 0.09 que representa los miliequivalentes de ácido láctico.

$$\% \text{de ácido láctico} = \frac{\text{mL gastados} \times N(\text{NaOH}) \times 0.09 \text{ meq de ácido láctico} \times 100}{\text{g muestra}}$$

## 5.3 Determinación de actividad amilolítica

Se tomaron 10 mL de la primera dilución y se depositaron en tubos de centrifuga estériles, se centrifugó la muestra a 15000 r.p.m. durante 12 min. y se procedió a la determinación por el método antes mencionado.

## 5.4 Cuantificación de carbohidratos y ácidos orgánicos

### 5.4.1 Procedimiento de extracción y clarificación

El proceso de extracción y clarificación de las muestras se realizó en base al método desarrollado por Santillana (1995). De las muestras de masa conservadas en ultracongelador se pesaron 5 gramos en tubos de centrifuga, se adicionaron 20 mL de

agua destilada a 65° C. Se homogenizó a velocidad máxima en un homogenizador (Glas-Col Núm. Cat. 099C K44) durante 3 min. Se centrifugaron los tubos en centrífuga (Beckman J2-21M/E) a 15000 r.p.m. durante 15 min. a 4° C. Se separó el sobrenadante y se aforó este a 25 mL con agua destilada. Este volumen se transfirió a bolsas de plástico previamente etiquetadas y se congelaron a -20° C durante 4 días. Al término de este tiempo se descongelaron las muestras, se homogenizaron y se tomó una alícuota de 6 mL. Este volumen se centrifugó en microcentrífuga HERMLE LABNET Z320 a 8000 r.p.m. durante 5 min. Se colectó el sobrenadante en tubos viales. Se tomaron 2 mL de este sobrenadante y se pasaron por cartuchos Sep-Pak C18 (WAT051910) previamente activados (Santillana, 1995). El volumen filtrado se colectó en un matraz aforado de 10 mL y se aforó a este volumen con agua destilada. Se filtró el líquido a través de prefiltro (Millipore AP2501000) y membrana de 0.45 µm (Millipore HVLP01300) obteniéndose la muestra cristalina y lista para el análisis por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia).

#### **5.4.2 Preparación de los estándares de los ácidos.**

Se prepararon soluciones estándar de ácido láctico Sigma (como Lactato de litio) (1.0074%) y ácido acético Merck (como Acetato de Sodio)(1.0046%). Se hicieron diluciones para obtener concentraciones (0.2-1% aproximadamente), las cuales se inyectaron por duplicado en cromatógrafo de líquidos.

A partir de la respuesta obtenida en el cromatograma se calculó la ordenada al origen y la pendiente para cada compuesto. Las curvas estándar de los ácidos se presentan en el Apéndice 3.

#### **5.4.3 Cuantificación de los ácidos**

Se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos Perkin Elmer series 250, bomba LC 250, un loop de 20 µL y una columna AMINEX-HX87H de intercambio iónico. Se usó un detector de Índice de Refracción LC-30 RI con un integrador personal modelo 1022S.

Se mantuvo la temperatura de la columna a 55° C con autotransformador "Electro Industrias Delta" mod. CH 140-10. La fase móvil utilizada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N, la cual se desgasificó utilizando el sonicador (Branson Ultrasonic Cleaners modelo 2210). Este eluyente se usó con un flujo de 0.6 mL/min.

Antes de analizar las muestras se inyectó una solución estándar con el fin de determinar los tiempos de retención y la estabilidad del equipo. La concentración de los ácidos se reportó como g/100 g de masa en base seca.

#### **5.4.4 Cuantificación enzimática de carbohidratos simples**

Para la cuantificación de carbohidratos se utilizó un sistema enzimático comercial Maltosa/Sacarosa/D-Glucosa (Boehringer 1 113 950), cuyo principio se explica en el Apéndice 4, utilizando un volumen total de prueba de 1 mL.

La concentración de carbohidratos se reportó como g/100 g de m

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento e identificación de bacterias no lácticas amilolíticas

Se aislaron 6 cepas de bacterias Gram positivas, catalasa positivas. Cuatro de éstas presentaron halos de hidrólisis de almidón en el medio Agar Nutritivo-Almidón. La cepa 48 HG se aisló de la masa con 48 horas de fermentación, las cepas 070672\*, 070772\* y 090172\* de la masa con 72 horas de fermentación. Las características de estas cepas, que se identifican pertenecientes al género *Bacillus* se resumen en la Tabla 4.

Se realizó la identificación de las cepas mediante el sistema API CHB, con el medio API 50 CHB (BioMérieux) y se analizó en el programa APILAB PLUS (BioMérieux). Los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6. Las cepas 48 HG, 070772, 070672 se identificaron como *Bacillus lentus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, respectivamente. No fue posible identificar la cepa 090172 con este sistema

\*NOTA: Los primeros dos dígitos del número asignado a la cepa se refieren a la dilución, los siguientes dos a la colonia y los dos últimos al tiempo de fermentación del que fueron aislados.

**TABLA 4 Características de las bacterias no lácticas amilolíticas aisladas del pozol**

NÚMERO DE CEPA	TIEMPO DE FERMENTACIÓN*	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	PRESENCIA DE ESPORAS	CATALASA	GRAM
48 HG	48 horas	Forma circular, borde entero, elevado color blanco. Colonias grandes. Textura viscosa	Bacilos redondos	+	+	+
070672	72 horas	Forma circular, borde crenado, elevación rugosa. Colonias blancas. Textura membranosa	bacilos redondos	+	+	+
070772	72 horas	Forma circular, borde crenado, elevación rugosa. Colonias blancas. Textura membranosa	bacilos redondos	+	+	+
090172	72 horas	Forma circular borde entero, elevación convexa, colonias pequeñas color amarillo, textura viscosa	Bacilos cortos	+	+	+

(+) Indica que la característica es positiva.

\*Indica el tiempo de fermentación del que fueron aisladas

**Tabla 5.** Patrón de fermentación de azúcares por medio del sistema API 50CHB BióMerieux para cada una de las cepas en estudio.

Número	Azúcar	48 HG	070672	070772	090172
0	Control	-	-	-	-
1	Glicerol	-	-	-	-
2	Entrol	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	-	-	-	-
4	L-Arabinosa	-	-	-	-
5	Ribosa	-	+	+	-
6	D-Xilosa	-	-	-	+
7	L-Xilosa	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-
9	$\beta$ -metil-xilosido	-	-	-	+
10	Galactosa	-	-	-	+
11	D-Glucosa	+	+	+	+
12	D-Fructosa	+	+	+	+
13	D-Manosa	+	+	-	+
14	L-Sorbosa	-	-	-	-
15	Ramnosa	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-
18	Manitol	-	-	-	+
19	Sorbitol	-	-	-	-
20	$\alpha$ -metil- D- manosido	-	-	-	-
21	$\alpha$ -metil- D- glucosido	-	-	-	-
22	N-Acetil-glucosamina	-	+	+	-
23	Amigdalina	-	-	-	-
24	Arbutina	-	+	+	+
25	Esculina	+	+	+	+
26	Salicina	-	+	+	+
27	Celobiosa	+	+	+	+
28	Maltosa	+	+	+	+
29	Lactosa	-	-	-	-
30	Melibiosa	-	-	-	+
31	Sacarosa	+	-	-	+
32	Trehalosa	-	+	+	-
33	Inulina	-	-	-	-
34	Melesitosa	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	-	-	-	+
36	Almidón	-	+	+	+
37	Glicogeno	-	+	+	+
38	Xilitol	-	-	-	-
39	$\beta$ Gentiobiosa	-	-	-	-
40	D-Turanosa	-	-	-	-
41	D- Lososa	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	-	-	-	-
43	D-Fucosa	-	-	-	-
44	L-Fucosa	-	-	-	-
45	D-Arabitól	-	-	-	-
46	L-Arabitól	-	-	-	-
47	Gluconato	-	-	-	-
48	2 ceto-gluconato	-	-	-	-
49	5 ceto-gluconato	-	-	-	-

**Tabla 6.** Resultados del análisis del perfil de fermentación de carbohidratos con el programa APILAB PLUS

CEPA	IDENTIFICACION	%ID*	T**	Pruebas dudosas
48 HG	<i>Bacillus lentus</i> 1	99.4	.83	2 (N acetil glucosamina, celobiosa 10%)
48 HG	<i>Bacillus circulans</i> 2	99.9	.57	3 (galactosa 87%, lactosa 87%, xilitol 1%)
070772	<i>Bacillus cereus</i> 1	96.9	.98	0
070672	<i>Bacillus mycoides</i>	59.4	.87	2 (celulosa 25%, sacarosa 87%)
070672	<i>Bacillus cereus</i> 1	40.5	.81	1 (galactosa 2%)
090172	<i>Bacillus stearothermophilus</i>			4

\*Porcentaje de identificación. Estimado de cuánto corresponde el perfil obtenido al taxón especificado en relación al resto de los taxones de la base de datos.

\*\*Valor T. Estimado de la proximidad del perfil al conjunto de reacciones más típicas para el taxón especificado

La bacteria identificada como *Bacillus lentus* se ha reportado como amilolítica.

Wijbenga, et al., (1991) aislaron una bacteria perteneciente al complejo *Bacillus firmus/lentus* de los residuos de un equipo de una planta procesadora de almidón de papa, observaron una completa degradación en gránulos de almidón nativo de papa, maíz y trigo a una temperatura de 37° C. La glucosa se encontró como el mayor producto de degradación, aunque también se detectaron maltosa, maltotriosa y maltotetrosa. Se concluyó que la actividad para degradar almidón nativo proviene de enzimas  $\alpha$ -amilasas y la actividad para degradar almidón soluble de enzimas glucoamilasas o  $\alpha$ -glucosidasas. El cultivo de este microorganismo en glucosa, maltosa o almidón soluble disminuye cuantitativamente la actividad para degradar almidón nativo.

El-Aassar et al., (1992) purificaron y caracterizaron una enzima amilolítica producida por *B. lentus*. La cromatografía en capa fina de los productos de la hidrólisis del almidón que resultaron con la enzima en estudio en diferentes intervalos de tiempo mostr{ó una baja concentración de glucosa, mientras que

se observó una mayor concentración de oligosacáridos. Concluyen entonces que la enzima aislada de este microorganismo es una  $\alpha$ -amilasa.

Sabioni y Kun (1992) reportaron una cepa de *Bacillus lentus* aislada de un suelo de cultivo. Este microorganismo presentó actividad extracelular de ciclodextrin glucosiltransferasa usando medios de cultivo alcalinos. El pH óptimo y los rangos de temperatura para la formación de la enzima ciclodextrin glucosiltransferasa fueron 6.5-7.5 y 45-55° C respectivamente.

Mikami, et al , (1999) describieron la estructura de una  $\beta$ -amilasa producida por *Bacillus cereus*.

## 6.2. Actividad amilolítica

### 6.2.1. Bacterias

En la Fig. 2 se muestran los resultados de la cinética de actividad enzimática por las cepas en estudio. Este experimento se realizó con la finalidad de seleccionar la cepa de *Bacillus* con mayor actividad amilolítica. Durante las primeras 3 horas de la fermentación no se observó actividad considerable. A partir de las 9 horas las cepas *Bacillus cereus* y *Bacillus lentus* presentaron un ligero aumento en la actividad, siendo mayor a las 24 horas con un valor máximo de 1.1 Unidades/mL para *Bacillus lentus* y 0.41 Unidades/ mL para *B. cereus*. Las cepas *B. mycoides* y 090172 presentaron valores más bajos de actividad a las 24 horas (0.15 y 0.12 Unidades/ mL respectivamente).

Se puede observar en la Fig. 3 que *Bacillus cereus* muestra valores de actividad específica altos en las primeras horas de la fermentación, que disminuyen con el tiempo. Sin embargo a partir de las 9 horas se nota un incremento, presentando un valor máximo de 2.3 Unidades/mg de biomasa en las 24 horas. *Bacillus lentus* presentó un aumento en los valores de actividad específica a partir de las

6 horas de fermentación, registrando el máximo valor (2.8 Unidades/mg de biomasa) de las cuatro bacterias a las 24 horas. Las cepas 090172 y *B. mycooides* presentaron valores bajos durante toda la fermentación. Se seleccionó la cepa *Bacillus lentus* para llevar a cabo este estudio, ya que fue la que presentó la mayor actividad amilolítica.

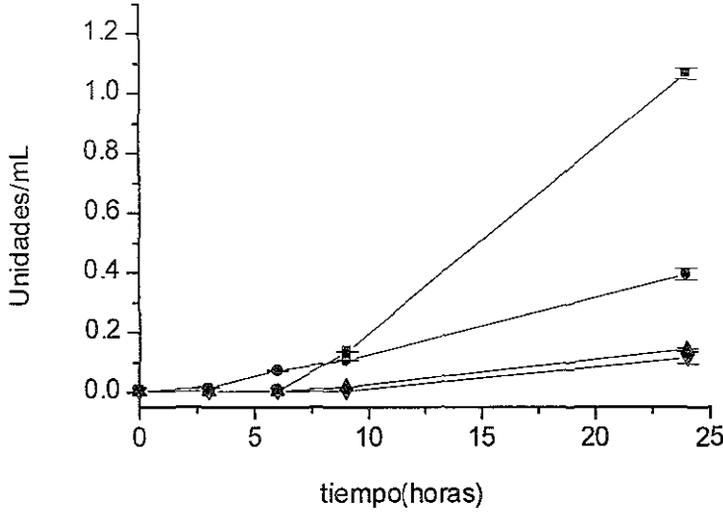


Fig. 2. Actividad enzimática de las cepas *Bacillus lentus* (■), *Bacillus cereus* (●), *Bacillus mycooides* (▲), cepa 090172 (▼), en Caldo Nutritivo-Almidón incubadas a 30° C (Los resultados graficados son el promedio de dos valores).

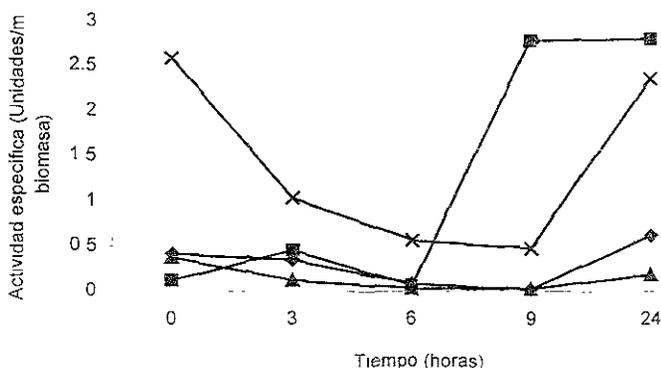


Fig. 3. Actividad específica de las cepas *Bacillus lentus* (■), *Bacillus cereus* (x), *Bacillus mycoïdes* (▲), cepa 090172 (◆), en Caldo Nutritivo-Almidón incubadas a 30° C. (Los resultados graficados son el promedio de dos valores).

### 6.2.2 Hongos

La actividad amilolítica para el caso de los hongos se presentó en un mayor tiempo de fermentación. A partir de las 24 horas (Fig. 4) se observó aumento en la actividad amilolítica de *Phoma glomeratta*, alcanzando un valor máximo de 0.3 Unidades/mL a las 72 horas. La cepa de *Cladosporium sp.* (hongo verde café), presentó un aumento en la actividad amilolítica después de las 48 horas teniendo un valor máximo de 0.26 Unidades/mL en el tiempo 72 horas. *Cladosporium cladosporoides* presentó aumento en el valor de actividad a partir de las 24 horas, alcanzando el valor máximo de 0.18 Unidades/mL también a las 72 horas, sin embargo este valor es bajo con respecto al obtenido con las cepas anteriores.

La cinética de actividad específica (Fig. 5) permite observar que *Phoma glomerata* presentó valores mayores de actividad, con respecto a los otros mohos, desde las primeras horas de fermentación, siendo el máximo a las 48 horas, con un valor de 0.6 Unidades/mg de biomasa. Como en el caso de las bacterias, este experimento se realizó para seleccionar el moho con mayor actividad amilolítica.

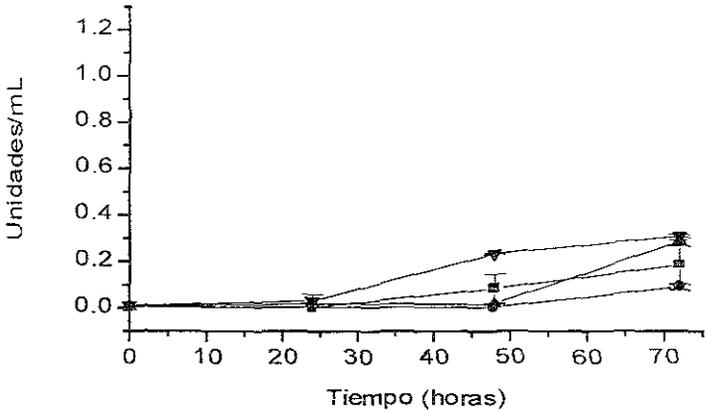


Fig. 4. Actividad enzimática de los mohos *Phoma glomerata* (▼), *Cladosporium sp.* (▲), *Cladosporium sp.* (◆), *Cladosporium cladosporoides* (■), en Caldo Almidón Extracto de Levadura incubado a 28° C. (Los resultados graficados son el promedio de dos valores).

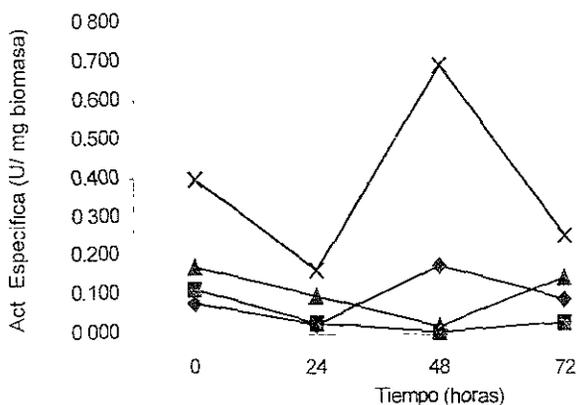


Fig. 5. Actividad específica de los mohos *Phoma glomerata* (x), *Cladosporium cladosporoides* (◆), *Cladosporium* sp (■), *Cladosporium* sp (▲), en Caldo Almidón Extracto de Levadura incubado a 28° C. (Los resultados graficados son el promedio de dos valores).

Se han encontrado reportes donde se ha identificado a algunas cepas de *Cladosporium* como amilolíticas. El-Abyad, et al., (1992) estudiaron la actividad amilolítica de 21 especies de hongos de suelo. Seis especies se seleccionaron por producir activamente la enzima, entre ellas *Cladosporium herbarum*. Las condiciones más favorables para la producción de la enzima de todos los hongos estudiados fueron: un periodo de incubación de 8 días a 27° C y un pH inicial en el rango de 4-6.

Oh, et. al., (1999) aislaron y estudiaron las propiedades de la enzima extracelular  $\beta$ -glucosidasa de un moho filamentoso, *Cladosporium resinae*, aislado de keroseno.

### 6.3. FERMENTACIONES

#### 6.3.1 Fermentación de masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con la cepa no amilolítica *L. plantarum* (42 Lilis).

Se comprobó que la cepa *L. plantarum* (42 Lilis) no presentaba actividad amilolítica (Apéndice 2) antes de inocularse en la masa de maíz nixtamalizada irradiada. En la masa inoculada con este microorganismo se encontraron sacarosa, maltosa y glucosa (Tabla 7) en concentraciones iniciales de 1.28, 0.26 y 0.12 g/100 g muestra seca respectivamente.

*L. plantarum* utilizó la glucosa maltosa y sacarosa disponibles en la masa en las primeras 24 horas de fermentación (Tabla 7); el valor de éstos a las 168 horas fue de 0, 0.01, y 0.02 g/ 100 g de muestra seca respectivamente hasta el final del ensayo.

Tabla 7. Concentración de azúcares encontrados durante las fermentaciones en masa de maíz nixtamalizada.

t*	<i>L. plantarum</i> (42 Lilis)			<i>Bacillus lentus</i>			<i>B. lentus-L. plantarum</i>		
	Maltosa**	Sacarosa**	Glucosa**	Maltosa**	Sacarosa**	Glucosa**	Maltosa**	Sacarosa**	Glucosa**
0	0.258	1.28	0.124	0.127	0.905	0.066	0.023	0.497	0.109
24	0.03	0.05	0.031	0.053	0.031	0.096	0.014	0	0.015
72	0.022	0.022	0.011	1.9	0.088	0.184	0.014	0.009	0.005
168	0.014	0.02	0	1.28	0	1.57	0.023	0	0.005

\*t. tiempo en horas.      \*\*Concentración g/100 g

Ocurrió una disminución en el pH (Fig. 6) de la masa así como un aumento en la acidez (Fig. 7) de la misma producidos por la acción de este microorganismo. Este aumento en la acidez se presentó durante todo el tiempo en que se llevó a cabo la fermentación; sin embargo alcanzó un valor de pH de 5, que es mayor al reportado para el pozol que es aproximadamente de 4 (Wacher et al., 1993).

El microorganismo produjo los ácidos láctico y acético, por lo que la fermentación fue heteroláctica (Tabla 8); la concentración del ácido láctico aumentó desde las 12 horas y del ácido acético a partir de las 72 horas de fermentación.

El pH que se alcanza no es lo suficientemente ácido como para lograr inhibir algunas bacterias patógenas que se presentan en el pozol en forma natural. Esto lleva a pensar que a largo plazo y en la complejidad del medio (pozol natural) sí se requiere de actividad amilolítica para producir más azúcares disponibles y así las bacterias lácticas acidifiquen mas eficientemente el producto.

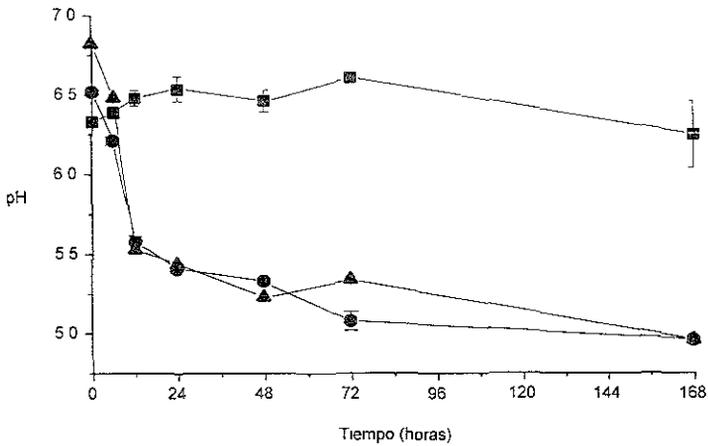


Fig 6. Valores de pH obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada e inoculada con *Bacillus lentus* (■), *L. plantarum* (●), *Bacillus lentus*-*L. plantarum*. (▲),

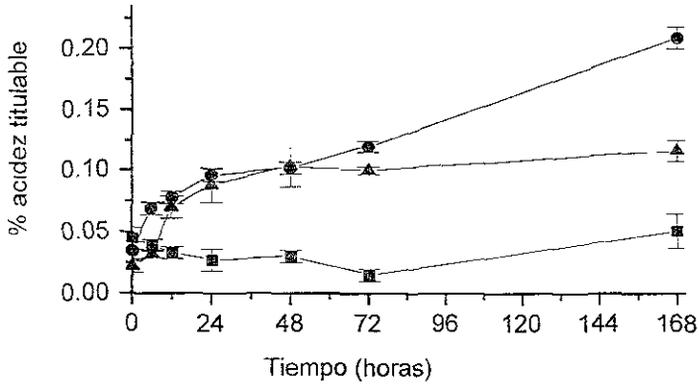


Fig. 7. Valores de acidez titulable obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada e inoculada con *Bacillus lentus* (■), *L. plantarum* (●), *Bacillus lentus* - *L. plantarum* (▲).

Tabla 8. Concentración de ácidos encontrados durante las fermentaciones en masa de maíz nixtamalizada.

Tiempo (h)	<i>L. plantarum</i>		<i>Bacillus lentus</i>		<i>B. lentus</i> - <i>L. plantarum</i>	
	Ac láctico**	Ac Acético**	Ac Láctico**	Ac Acético**	Ac. Láctico**	Ac. Acético**
0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
12	0.103	0	0	0	0.214	0
24	0.403	0	0	0	0.224	0
48	0.233	0	0	0	0.378	0
72	0.361	0	0	0	0.319	0
168	0.449	0.745	0.199	0	0.390	0.320

\*\*Concentración g/100 g masa en peso seco

La bacteria láctica presentó un crecimiento acelerado alcanzando una cuenta total de microorganismos viables de  $10^9$  UFC/g a partir de las seis horas de fermentación (Fig. 8), manteniéndose en este valor hasta las 12 horas; a las 24 horas alcanzó el valor máximo de  $10^{10}$  UFC/g y a las 48 horas disminuyó la cuenta a  $10^8$  UFC/g, finalizando la fermentación con un valor de  $10^7$  UFC/g a las 168 horas. La bacteria láctica fue capaz de crecer satisfactoriamente en la masa de maíz.

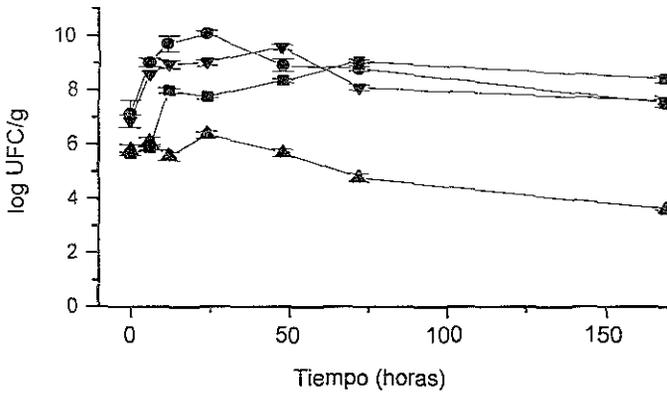


Fig 8. Concentración de microorganismos obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada e inoculada con *Bacillus lentus* (cultivo puro) (■), *L. plantarum* (cultivo puro) (●), *Bacillus lentus* (cultivo mixto) (▲), *L. plantarum* (cultivo mixto) (▼),

Como se esperaba, *L. plantarum* no presentó actividad amilolítica en la masa de maíz nixtamalizada (Fig. 9) en el transcurso de la fermentación.

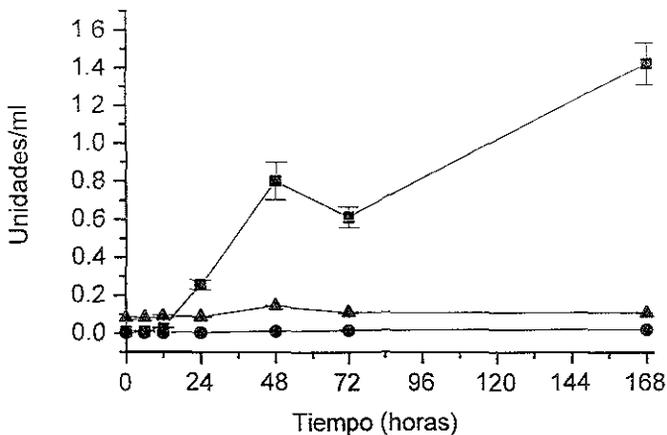


Fig. 9. Valores de actividad amilolítica obtenidos en la fermentación de la masa de maíz nixtamalizada irradiada e inoculada con *Bacillus lentus* (■), *L. plantarum* (●), *Bacillus lentus* - *L. plantarum*. (▲),

### 6.3.2 Fermentación de masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con la cepa amilolítica *Bacillus lentus* (48 HG)

En la masa inoculada con este microorganismo se encontró sacarosa, maltosa y glucosa (Tabla 7) en concentraciones iniciales de 0.90, 0.13 y 0.07 g/100 g de muestra seca respectivamente. Se observó una disminución en la concentración de estos carbohidratos durante las primeras horas de la fermentación. A partir de las 24 horas cuando se habían agotado los carbohidratos simples, aumentó la

concentración de maltosa, llegando a un valor máximo de 1.90 g/100 g de muestra seca a las 72 horas y la glucosa aumentó a partir de las 72 horas alcanzando un valor máximo de 1.57 g/100 g muestra seca a las 168 horas (Tabla 7). Esto confirma la actividad amilolítica de este microorganismo en la masa.

Los resultados de pH y acidez se pueden observar en las Figs. 6 y 7 respectivamente. No se detectaron variaciones considerables en el pH de la masa y como consecuencia no se observó un aumento en la acidez. Este hecho puede corroborarse en la Tabla 8, donde se encuentran los resultados de los ácidos encontrados durante ésta fermentación; éstos aparecen hasta las 168 horas, debido a una contaminación al final de la misma, ya que se encontraron colonias con características macroscópicas diferentes a las de *B. lentus*.

*Bacillus lentus* mostró un crecimiento rápido hasta las 12 horas de la fermentación, alcanzando una cuenta de  $10^8$  UFC/g (Fig. 8), y un crecimiento menos rápido a las 24 horas ( $10^7$  UFC/g). A las 48 horas se observó un aumento en el crecimiento, obteniendo un máximo valor a las 72 horas ( $10^9$  UFC/g). El microorganismo se mantuvo viable hasta las 168 horas con una cuenta total de  $10^8$  UFC/g

En la Fig. 9 se puede observar que el bacilo presenta actividad amilolítica a partir de las 24 horas de la fermentación (0.25 Unidades/mL), y ésta continuó aumentando durante la fermentación, alcanzando un valor máximo de 1.4 Unidades/mL a las 168 horas.

### 6.3.3. Fermentación de masa de maíz nixtamalizada irradiada, inoculada con *Bacillus lentus* (48 HG) y *L. plantarum* (42 Lilis).

En la masa inoculada con estos dos microorganismos se encontraron sacarosa, maltosa y glucosa (Tabla 7) en concentraciones iniciales de 0.5, 0.02 y 0.11 g/100 g muestra seca respectivamente. Al igual que en las fermentaciones anteriores estos azúcares se agotaron en la primeras 24 horas de la fermentación.

Los valores de pH y acidez que se obtuvieron durante la fermentación mixta (Figs 6 y 7) fueron muy similares a los de la fermentación con cultivo de *L. plantarum* puro. Esta tendencia se observó durante todo el tiempo de la fermentación resultando un valor de 4.96 a las 168 horas. Esto indica que *L. plantarum* acidificó de igual manera en cultivo puro que en cultivo mixto con *Bacillus lentus*. Los ácidos producidos durante esta fermentación (Tabla 8) fueron, como en el caso de la fermentación con el cultivo de *L. plantarum* puro, ácido láctico y acético, producidos por este último microorganismo. En la Figura 8 se puede observar que la cuenta de *L. plantarum* aumentó con la misma tendencia que en el cultivo puro; sin embargo la cuenta de *Bacillus* fue muy variable probablemente debido al pH que ya era de 5.5 a partir de las 12 horas. A las 72 horas cuando el valor de pH era de 5.3 la cuenta viable de *B. lentus* disminuyó, obteniéndose una cuenta final de  $10^3$  UFC/g a las 168 horas (pH 4.96). Se han reportado valores de pH óptimos de 6.1 y actividad amilolítica ligeramente alterada en un rango de pH de 5.1 a 6.6 para una cepa de *B. lentus* (El-Aassar et al., 1992). Así mismo, Wijbenga et al., (1991) reportan que para una cepa del complejo *B. lentus/firmus*, el crecimiento en un medio de cultivo que contenía almidón cesó a un pH de 6.5 y no se observó crecimiento a un valor de pH de 5.7.

En la Fig. 9 se puede observar que no se detectó actividad amilolítica; esto pudo deberse a que *B. lentus* no produjo la enzima porque no tuvo oportunidad de crecer a consecuencia de la acidez en el medio o a que la enzima que pudo haber producido en las primeras 48 horas (Fig. 9) no estaba en el pH óptimo para actuar. Así, en cultivo mixto con *L. plantarum*, *Bacillus lentus* no es capaz de hidrolizar el almidón de la masa.

## 7. CONCLUSIONES

-Se aislaron del pozol 4 cepas pertenecientes al género *Bacillus* que fueron identificadas como *B. lentus*, *B. mycoides* y *B. cereus*, las cuales presentaron actividad amilolítica. *B. lentus* fue la cepa que presentó mayor actividad amilolítica.

-La cepa *Bacillus lentus* (48 HG) presentó actividad amilolítica en la masa de maíz nixtamalizada al ser inoculada individualmente.

-No se detectó actividad amilolítica considerable en la fermentación mixta (*L. plantarum*-*B. lentus*) en la masa de maíz nixtamalizada.

-En la fermentación mixta de *L. plantarum* y *B. lentus* en la masa de maíz nixtamalizada el crecimiento de *B. lentus* se ve inhibido por los ácidos producidos por *L. plantarum*, por lo que *B. lentus* no sería capaz de aportar a la bacteria láctica carbohidratos simples.

## 8. RECOMENDACIONES

Realizar una fermentación mixta con cultivos puros de un moho aislado del pozol (*Phoma glomerata*) y *L. plantarum*, con la finalidad de detectar si el moho posee la capacidad de producir enzimas amilolíticas en la masa de maíz nixtamalizada y proveer de azúcares simples a la bacteria láctica.

Se recomienda también realizar una fermentación mixta con cultivos puros de *Bacillus lentus*, *L. plantarum* y un moho (*Geotrichum candidum*) con capacidad para utilizar los ácidos producidos por *L. plantarum*, y así investigar si bajo estas condiciones *Bacillus lentus* es capaz de presentar actividad amilolítica en la masa.

## APÉNDICE 1. MEDIOS DE CULTIVO

### I. Agar Cuenta en Placa - Almidón 2% g/L

	<b>Agar</b>	<b>Modificado</b>
Extracto de Levadura	2.5 g	2.5 g
Peptona de caseína	5.0 g	5.0 g
Almidón	20.0 g	20.0 g
Agar	15.0 g	15.0 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL

### II. Lugol (g/L) Solución stock

Yoduro de potasio	30 g
Yodo	3 g

Preparar antes de utilizar una solución al 4% (v/v), a partir de la solución stock.

### III. Agar Nutritivo (Oxoid)-Almidón 2% (Merck)

	<b>Agar</b>	<b>Modificado</b>
Polvo Lab-Lemco	1.0 g	1.0 g
Extracto de levadura	2.0 g	2.0 g
Peptona	5.0 g	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	5.0 g
Agar	15.0 g	15.0 g
Almidón	-----	20 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL

### IV. Caldo Nutritivo (BIOXON)-Almidón 2%(Merck)

	<b>Caldo</b>	<b>Modificado</b>
Peptona de gelatina	5.0 g	5.0 g
Extracto de carne de res	3.0 g	3.0 g
Almidón soluble	-----	20 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL

V. Agar para test morfológico Finley y Fields (BioMérieux)

Agar Nutritivo	15 g
Agar Bacteriológico	5 g
Glucosa	0.5 g
Sulfato de Manganeso	0.030 g
Agua destilada	1000 mL

VI Agar Papa

Cuadritos de papa blanca pelada	300 g
Agar bacteriológico	39 g
Agua destilada	1000 mL

Se coció la papa durante 5 min. con el agua destilada. Se filtró por medio de una gasa, el agua de cocción se aforó a 1000 mL Se añadió el agar bacteriológico a esta solución y se esterilizó a 121 Kgf durante 15 minutos.

VII. Agar ELAA (Extracto de Levadura Agar Almidón)

	<b>Agar</b>	<b>Caldo</b>	<b>Modificado</b>
Extracto de levadura	4.0 g	4.0 g	4.0 g
Almidón soluble	15.0 g	15.0 g	20.0 g
Fosfato de potasio	1.0 g	1.0 g	1.0 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Agar	15 g	-----	-----
Agua destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL

## APÉNDICE 2

Tabla 9 Cuenta de microorganismos y concentración de biomasa de las cepas de *Bacillus* en estudio  
El resultado es el promedio de dos valores

Tiempo (h)	<i>Bacillus mycooides</i> (070672)			<i>Bacillus cereus</i> (070772)		
	Cta. (log ufc/mL)	Desv Est	Biomasa (g/L)	Cta (log ufc/mL)	Desv Est	Biomasa (g/L)
0	6.4	0.099	0.0107	6.4	0.099	0.0029
3	7.1	0.099	0.0330	6.9	0	0.0194
6	7.7	0.35	0.1222	7.8	0.25	0.1359
9	8.6	0.099	0.8936	8.1	0.05	0.2342
24	8.4	0.4	0.8097	8	0.05	0.1721

Cont. Tabla 9

TIEMPO (h)	cepa 090172			<i>Bacillus lentus</i> (48 HG)		
	Cta. (log ufc/mL)	Desv. Est	Biomasa (g/L)	Cta. (log ufc/mL)	Desv Est	Biomasa (g/L)
0	8	0.149	0.0097	6.4	0.05	0.0338
3	8.3	0.05	0.0115	6.4	0.099	0.0088
6	9.4	0.05	0.0482	7.7	0.099	0.0597
9	9.1	0	0.2249	7.6	0.099	0.0509
24	10	0	0.1965	8.6	0.099	0.3905

Tabla 10 Resultados de actividad amilolítica de las cepas de *Bacillus* en estudio (El resultado es promedio de dos valores)

TIEMPO (h)	Actividad Amilolítica unidades/mL							
	090172	Desv. Est.	cepa 48 HG	Desv. Est.	cepa 070672	Desv. Est	cepa 070772	Desv Est
0	0.004	0	0.004	0	0.004	0	0.007	0
3	0.004	0	0.004	0	0.004	0	0.02	0.002
6	0.004	0	0.004	0	0.004	0	0.077	0.003
9	0.004	0	0.142	0.002	0.022	0.0007	0.112	0.002
24	0.122	0.02	1.101	0.017	0.15	0.004	0.407	0.019

Tabla 11 Resultados de actividad específica de las cepas de *Bacillus* en estudio

TIEMPO (h)	Actividad Específica (Unidades/mg)			
	cepa 090172	cepa 48 HG	cepa 070672	cepa 070772
0	0.4082	0.1172	0.3740	2.5862
3	0.3443	0.4500	0.1200	1.0309
6	0.0821	0.0663	0.0324	0.5666
9	0.0176	2.7898	0.0246	0.4782
24	0.6208	2.8195	0.1853	2.3649

Tabla 12. Actividad amilolítica de la cepa *Lb. plantarum* (42 lilis)

TIEMPO (h)	Unidades/mL
	cepa 42 lilis*
0	0.004
3	0.004
6	0.004
9	0.004
24	0.004

## APÉNDICE 2

Tabla 13 Resultado de la concentración de biomasa de los mohos en estudio. (El resultado es el promedio de dos valores)

TIEMPO (horas)	Hongo verde		Hongo café		Hongo verde/café		Hongo rosa	
	Biomasa (g/L)	Desv. Est.	Biomasa (g/L)	Desv. Est.	Biomasa (g/L)	Desv. Est.	Biomasa (g/L)	Desv. Est.
0	0.051	0.0007	0.035	0	0.035	0	0.025	0.001
24	0.164	0.0148	0.141	0	0.205	0.004	0.195	0.007
48	0.4760	0	0.623	0.000	0.8450	0.0070	0.3370	0.011
72	2.0380	0	2.9230	0.1130	1.9510	0.1950	1.1970	0.009

Hongo verde= *Cladosporium cladosporoides*

Hongo cafe= *Cladosporium sp*

hongo verde/café= *Cladosporium sp*

hongo rosa= *Phoma glomeratta*

Tabla 14. Resultados de actividad amilolítica de los mohos en estudio. (El resultado es promedio de dos valores)

### Actividad Amilolítica (Unidades/mL)

TIEMPO (horas)	Hongo verde		H cafe		H verde/café		H rosa	
	Desv. Est.	H cafe	Desv. Est.	H verde/café	Desv. Est.	H rosa	Desv. Est.	
0	0.004	0	0.004	0	0.006	0.0007	0.01	0.002
24	0.004	0	0.004	0	0.02	0.001	0.032	0.028
48	0.084	0.062	0.004	0	0.017	0.002	0.234	0.004
72	0.186	0.108	0.091	0.012	0.287	0.019	0.309	0.007

Hongo verde= *Cladosporium cladosporoides*

Hongo cafe= *Cladosporium sp*

hongo verde/café= *Cladosporium sp*

hongo rosa= *Phoma glomeratta*

Tabla 15 Resultados de Actividad específica de los mohos en estudio

TIEMPO (horas)	Actividad Específica (Unidades/mg de biomasa)			
	Hongo verde	H cafe	H verde/café	H rosa
0	0.0638	0.0845	0.1448	0.3667
24	0.0536	0.0199	0.0547	0.2078
48	0.1637	0.0048	0.0118	0.6607
72	0.0600	0.027	0.1369	0.2579

Hongo verde= *Cladosporium cladosporoides*

Hongo cafe= *Cladosporium sp*

hongo verde/café= *Cladosporium sp*

hongo rosa= *Phoma glomeratta*

### APÉNDICE 3

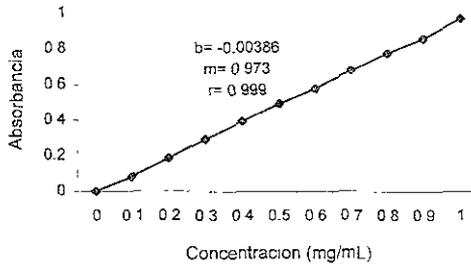


Fig 10 Curva estándar de glucosa (DNS)

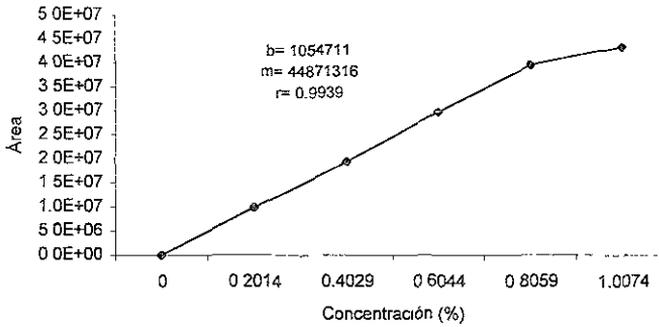


Fig 11 Curva estándar de ácido láctico (HPLC)

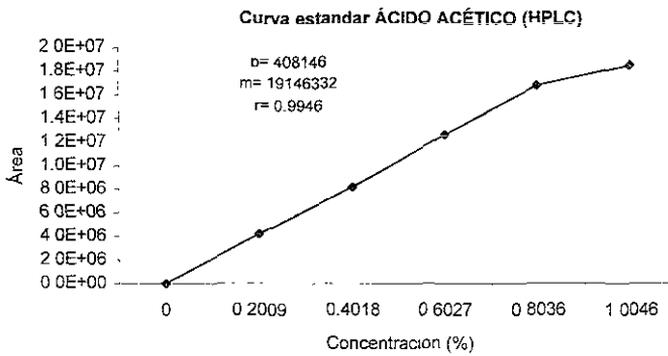


Fig 12. Curva estándar de ácido acético (HPLC)

### APÉNDICE 3

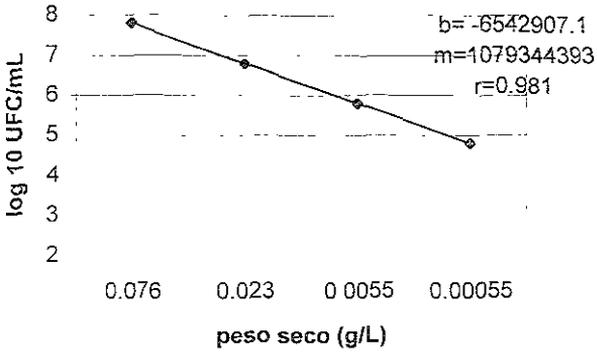


Fig. 13. Curva estándar. Cuenta total-Peso seco (*Bacillus lentus*/48 HG)

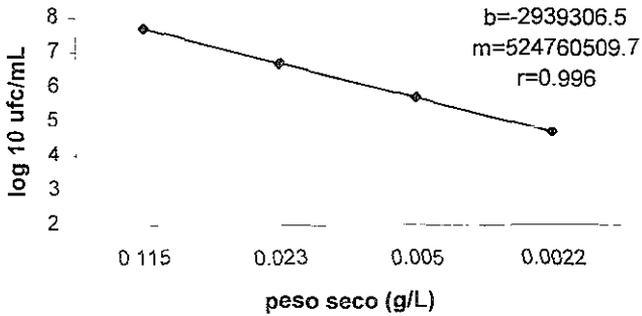


Fig. 14. Curva estándar. Cuenta total-Peso seco (*Bacillus mycoides*/070672)

### APÉNDICE 3

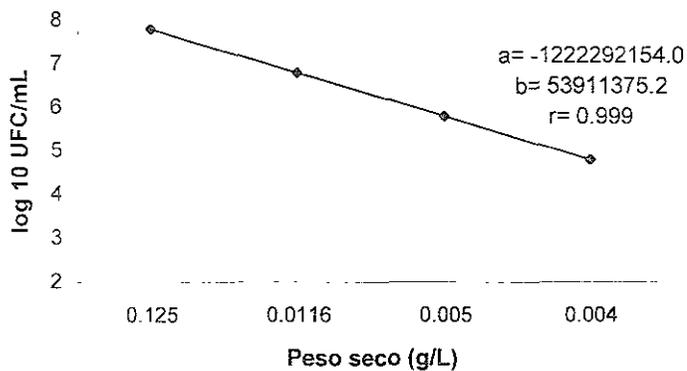


Fig. 15. Curva estándar. Cuenta total-Peso seco (*Bacillus cereus* /070772)

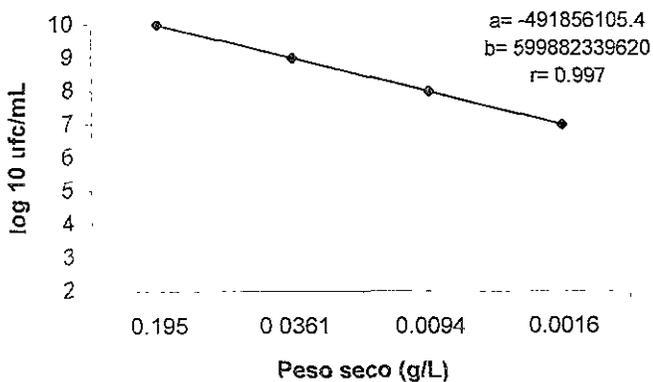
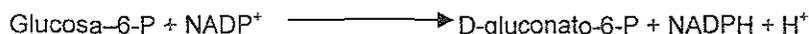


Fig. 16. Curva estándar. Cuenta total-Peso seco (cepa 090172)

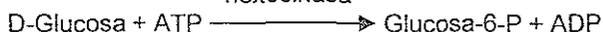
## APÉNDICE 4.

### PRINCIPIO DE LOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA, SACAROSA Y MALTOSA.

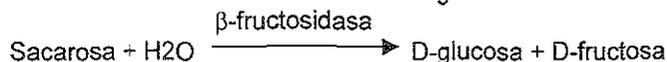
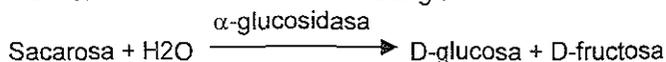
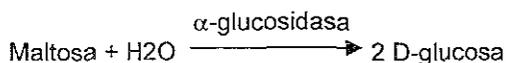
El sistema se basa en la cuantificación espectrofotométrica a 340 nm del NADPH formado a partir de la glucosa-6-P mediante la siguiente reacción:



La glucosa se convierte en glucosa-6-P  
hexocinasa



La maltosa y la sacarosa se hidrolizan primero mediante las reacciones.



Posteriormente la glucosa formada se transforma en glucosa-6-P. De esta manera, se pueden cuantificar los carbohidratos ya que se forma una mol de NADPH por cada mol de glucosa, sacarosa y por cada medio mol de maltosa.

El orden de adición de los reactivos para la cuantificación de los azúcares se muestran en la siguiente tabla..

**Tabla 16.** Orden de adición de los reactivos para la cuantificación de Maltosa/Sacarosa/D-Glucosa

Pipetear en las celdas	Blanco de maltosa	Muestra de maltosa	Blanco sacarosa	Muestra de sacarosa	Blanco de glucosa	Muestra de glucosa
Solución 1*	0.066 mL	0.066 mL	-	-	-	-
Solución 2*	-	-	0.066 mL	0.066 mL	-	-
Muestra	-	0.033 mL	-	0.033 mL	-	0.033 mL

Mezclar e incubar a 20-25 °C por 20 min.. Añadir:

Solución 3*	0.333 mL					
Agua desionizada	0.600 mL	0.570 mL	0.600 mL	0.570 mL	0.660 mL	0.630 mL

Mezclar, leer las absorbancias de las soluciones después de 3 min..(A<sub>1</sub>). Empezar la reacción por adición de:

Solución 4*	0.007 mL					
-------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Mezclar, esperar el final de la reacción (10-15 min.) y leer las absorbancias de las soluciones (A<sub>2</sub>).

- Solución 1: Buffer de acetatos, pH=6.6/ $\alpha$  glucosidasa  
 Solución 2: Buffer de acetatos, pH=4.6/ $\beta$  fructosidasa  
 Solución 3: Buffer trietanolamina, pH=7.6/NADP/ATP  
 Solución 4: Hexocinasa/Glucosa-6-P deshidrogenasa

El análisis se realizó en celdas desechables de metracrilato de 1.5 mL con un paso de luz de 1 cm. El equipo utilizado (Spectronic Genesis 5 de Milton Roy) se calibró con la celda sin solución.

Para calcular la concentración de los azúcares se tiene la siguiente ecuación:

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

Donde :

V= volumen final (mL)

v= volumen de la muestra (mL)

PM= peso molecular del compuesto a analizar [g/mol]

d= paso de luz (cm)

$\epsilon$ = coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm (6.3 L x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

( $\times 2^*$ )= se multiplica por dos para el caso de maltosa

Y  $\Delta A_x$ , se determina a partir de las diferencias de las absorbancias en base a los siguiente:

$$\Delta A_{\text{glucosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra de glucosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco de glucosa}}$$

$$\Delta A_{\text{maltosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra de msitosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{mtra de sacarosa}}$$

$$\Delta A_{\text{sacarosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{mtra de sacarosa}} - (A_2 - A_1)_{\text{mtra de glucosa}}$$

Si la muestra ha sido diluida durante la preparación, el resultado de la ecuación debe ser multiplicado por el factor de dilución.

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.

Según la metodología descrita en el sistema enzimático empleado (Boehringer 1113950), los límites de detección para la glucosa expresados en g/100g de masa es de 0.001 y para la sacarosa y maltosa de 0.005.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achi, O. K. (1990) Microbiology of "obiolor": a Nigerian fermented non alcoholic beverage. *Journal of Applied Bacteriology*. **69**: 321-325.
- Amoa-Awua, W. K. A. y Jakobsen, M. (1995) The role of the *Bacillus* species in the fermentation of cassava. *Journal of Applied Bacteriology*. **79**: 250-256.
- Boyer C. D., y Shanon J. C., (1987) Carbohidrates of the Kernel. En: *Corn Chemistry and Technology*. Watson S. A. y Ramstad P. E. (Eds) American Association of cereal Chemist, Inc., St Paul Minnessota. Pags 253-272.
- Cañas A. O., Barzana E., Owens J. D. y Wachter M. C. (1993). La elaboración del pozol en los Altos de Chiapas. *Ciencia*. **44**: 219-229.
- Cruz Ulloa S., M. Ulloa, (1973). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nt.* **24**:423-457.
- Ekundayo, J. A. (1969) The production of "pito" a Nigerian fermented beverage. *Journal of food technology*. **4**:217-225.
- El-Aassar S. A., Omar S. H., Gouda M. K., Ismail A. M., Abdel-Fattah A. F. (1992). Purification of alpha-amylase from *Bacillus lentus* cultures. *Appl. Microbiol. Biotech.* **38**(3): 312-314.
- El-Abyad, M. S., El -Sayed, F. A., Hafez, M. (1992). Effects of culture conditions on amylase production by some soil fungi. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**(1-2):23-34.
- Flores, M. T. (1996). Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias 71 pags.
- Giraud E., Gosseilin L., Marin B., Parada J. L. y Raimbault M. (1993<sup>a</sup>) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6 *Journal of Applied Bacteriology*. **75**:276-282.

- Guzman, M. H., Paredes, L. H., (1995). *Amylolitic Enzymes and products derived from starch: A review. Critical reviews in Food Science and Nutrition.* **35**(5): 373-403.
- Morlon-Guyot J., Guyot J. P., Pot B., Jacobe de Haut I., Raimbault M. (1998), *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *Internatinal Journal of Systematic Bacteriology.* **48**:1101-1109.
- Hamilton L. M., Kelly C. T., Fogarty W. M. (1999). Purification and properties of the raw starch-degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnology letters.* **21**:111-115.
- Harrigan W.F. y Mc Cance M. E. (1976) *Laboratory methods in food an dairy microbiology.* Academic Press Inc LTD London, Great Britain pag. 318
- Herrera T., Ulloa M. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre *Rev. Lat-amer. Microbiol.* (1975). **17**:143-147.
- Johansson M. L., Sanni A., Lönnner C. y Molin G. (1995). Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Internatinal Journal of Food Microbiology.* **25**:159-168.
- Leyva, J. A., México Indígena (Instituto Nacional Indigenista México 1980.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, **31**:426-428.
- Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R., Utsumi, S. (1999). Structure of Raw Starch-Digesting *Bacillus cereus*  $\beta$ -amylase Complexed with Maltose. *Biochemistry.* (Washington). **38**(22): 7050-7061.
- Nuraida, L., Wachter, M. C., and Owens, J. D. (1995). Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **11**: 567-571

- Oh, K B., Hamada, K., Saito, M , Lee, H-J., Matsuoka, H (1999). Isolation and properties of an extracellear beta-glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from keroseno. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **63**(2):281-287.
- Parada, J. L., Zapata E., De Fabrizio S. V., Martínez A. (1996). Microbiological and technological aspects of cassava-starch fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* **12**:53-56.
- Sabioni J G , Park Y. K. (1992) Ciciodextrin glycosyltransferase production by alkalophilic *Bacillus lentus*. *Revista de Microbiología.* **23**(2) 128-132.
- Sainz, T. R. (1998). Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenas en el pozol. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM. Pags. 51
- Santillana, M. R. (1995). Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol. Tesis Maestría en Ciencias de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 87 pags.
- Steinkraus K. H. (1996) *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker N. York.
- Ulloa M., Herrera T. (1976-1982) Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología.* UNAM. México 47-53 Ser. Bot. 145-163.
- Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. (1983). Mexican pozol. En: *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* Pags. 226-237. (Ed) K. H. Steinkraus, Vol 9. Microbiology Series. Marcel Dekker, Inc. New York y Basilea.
- Vargas L. A., Casillas L. E (1984) La alimentación entre los mexicas. En: *Historia General de la Medicina en México* , Tomo I, México Antiguo. F. Martínez

Cortés (Ed. ) Academia Nacional de Medicina Y Facultad de Medicina, UNAM México, pags. 133-156

◦ Vihinen Mauno., Mäntsälä Pekka. (1989). *Microbial Amyolytic enzymes*. Vol 24 Issue 4 329-415.

◦ Wacher C., Cañas A., Cook P. E., Barzana E and Owens J. D. (1993), Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9:269-274

◦ Wacher C , Cañas A., Barzana E., Lappe P , Ulloa M. y Owens D. (2000) Microbiology of Indian and mestizo pozol fermentations *Food Microbiology* 17:251-256.

◦ Wijbenga D. J , Beldman G., Veen A., Binnema D. J. (1991). Production of native-starch-degrading enzymes by a *Bacillus firmus/lentus* strain *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(2):180-184.