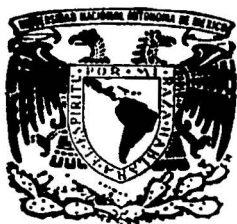


18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE ACIDO LACTICO A PARTIR DE UN
SUSTRATO AMILACEO UTILIZANDO UNA CEPA AISLADA DE
POZOL PROCEDENTE DE VILLAHERMOSA, TABASCO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ANA MARIA DEL CARMEN FLORES PEREZ



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
Secretario	Prof. Francisco Ruíz Terán
1er. Suplente	Prof. María del Carmen Wachter Rodarte
2do. Suplente	Prof. María del Rocío Santillana Hinojosa

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación
"Dr. Joaquín Cravioto", Instituto Nacional de Pediatría. Departamento de Alimentos y
Biotecnología, Laboratorio 312 Conjunto "E" Facultad de Química.

Asesor titular

Dr. Francisco Ruíz Terán

Supervisor técnico

Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez

Sustentante

Ana María del Carmen Flores Pérez

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la vida, por amarme y por guiarme en cada instante de mi vida. Gracias Dios por que sé que siempre estás conmigo y tu amor me fortalece.

A mis padres David y Lala, por todo su amor, todas sus preocupaciones y desvelos, toda su dedicación y apoyo incondicional. Su amor no tiene límites. Los quiero mucho.

A mi esposo Manuel, por tanto amor, por todo su apoyo y comprensión, por su dedicación, por compartir mis alegrías y tristezas y por consentirme tanto. Gracias por ser como eres conmigo, me haces muy feliz. Te amo muchísimo.

A mis hermanos Janet y Jorge, porque sé que siempre cuento con ustedes, son un ejemplo para mí, les agradezco sus consejos y preocupaciones. Los quiero mucho.

A mis amigos Vanessa, Aurora, Alexxx, Vero, Adrián por su apreciable amistad e incondicional apoyo. Disfruto muchísimo el tiempo que compartimos juntos.

A Hugo y Janet, por su apoyo para la realización de esta tesis. Gracias por confiar en mí y brindarme la oportunidad de lograr una de mis metas.

Al Dr. Francisco Ruiz, por su paciencia, apoyo y comprensión en todo momento. Gracias por confiar en mí.

Al Dr. Rafael Coria, por el apoyo que me brindó cuando más lo necesité, por su paciencia, por su confianza y por sus consejos. Gracias.

A la Dra. Amelia Farrés y la Maestra Idalia Flores por su apoyo incondicional, por confiar en mí y por hacerme sentir parte de su grupo. Mil gracias.

A la Maestra Francisca Iturbe y al Maestro Raúl Aguilar por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la Dra. Carmen Wachter y la Maestra Rocio Santillana por formar parte de mi preciado grupo de sinodales.

A Luz y Armando, por su ayuda en momentos importantes para el desarrollo del presente trabajo.

Al Instituto Nacional de Pediatría por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
1. Introducción	6
Planteamiento del problema	8
2. Antecedentes	
Importancia del ácido láctico	
Características del ácido láctico	9
Métodos de obtención	9
Usos	10
Importancia de las bacterias lácticas	
Bacterias lácticas	13
Fermentación ácido-láctica en los alimentos	15
El maíz	
Aplicaciones del maíz	16
Composición química de las partes del grano	16
Almidón	17
Modalidades de consumo del maíz fermentado.....	18
El pozol	20
3. Objetivos	22
4. Material y métodos	
Descripción de las muestras	23
Resiembra de bacterias lácticas	24
Selección de cepas productoras de ácido láctico	25
Identificación de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica	25
Determinación de la cuenta viable de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica	26
Determinación de pH	27
Determinación de acidez titulable	27

Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica	
Determinación de la actividad amilolítica extracelular	28
Determinación de la actividad amilolítica asociada a la célula ...	29
Curva patrón de azúcares reductores	29
Determinación de ácido L-láctico (L-lactato) producido por la cepa láctica con mayor actividad amilolítica	
Determinación de L-lactato en muestras del sobrenadante	30
Determinación de L-lactato en muestras del precipitado	30

5. Resultados y discusión

Selección de cepas productoras de ácido láctico	33
Identificación de la cepa láctica número 9	35
Determinación de la cuenta viable de la cepa <i>Streptococcus bovis II</i>	38
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre los valores de pH durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis II</i>	39
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de acidez durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis II</i>	41
Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula de la cepa <i>Streptococcus bovis II</i>	
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la actividad amilolítica específica extracelular durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis II</i>	44
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la actividad amilolítica específica asociada a la célula durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis II</i>	46

Determinación de ácido L-láctico (L-lactato) producido por la cepa <i>Streptococcus bovis</i> II	
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de L-lactato en el sobrenadante durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis</i> II	49
Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de L-lactato en el precipitado durante el crecimiento de la cepa <i>Strep. bovis</i> II	50
Relación entre el crecimiento y la producción de acidez total, actividad amilolítica y concentración de L-lactato de la cepa <i>Strep. bovis</i> II	
Producción de acidez total	53
Actividad amilolítica extracelular	54
Actividad amilolítica asociada a la célula	55
Concentración de L-lactato en muestras del sobrenadante	56
Concentración de L-lactato en muestras del precipitado	57
6. Conclusiones	59
7. Recomendaciones	60
8. Apéndices	
Apéndice 1. Composición del medio MRS almidón conteniendo 1% de almidón soluble de papa ..	61
Apéndice 2. Valores obtenidos de curva patrón de azúcares reductores para la determinación de la actividad amilolítica	62
9. Bibliografía	63

1. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida que se prepara a partir de masa de nixtamal fermentada en estado semisólido. Es de origen maya y se ha consumido en el sureste de México desde épocas prehispánicas. El proceso de fermentación es complejo, ya que al ocurrir en forma natural, sin inoculación, involucra una microbiota mixta como la mayoría de los alimentos de origen antiguo. Además, al fermentarse en forma semisólida, presenta heterogeneidad en cuanto al grado de aireación y a la composición química, lo cual posiblemente da lugar a la formación de microambientes (Wacher, 1995).

El pozol es un alimento resultado de la fermentación sucesiva de bacterias, levaduras y hongos de masa de maíz (*Zea mays L*) nixtamalizada. Sin embargo, no hay muchos estudios acerca de la distribución de los microorganismos en la bola de masa y el papel que desempeñan en dicho proceso, así como de las actividades enzimáticas presentes.

Steinkraus (en Ulloa y col., 1983) infirió que durante las primeras horas de fermentación predominan las bacterias lácticas y que quizá son las responsables de la producción de ácido láctico durante las primeras horas de fermentación, lo que fue confirmado posteriormente por varios autores (Silva-Villarreal, 1984; Ramírez, 1987; Nuraida, 1988; Escamilla-Hurtado y Mosqueda-González, 1992; Wacher, 1995; Ampe y col., 1999a; ben Omar y Ampe, 2000).

Se ha encontrado que hay un gran número de bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol (ben Omar y Ampe, 2000).

Asimismo, cabe señalar la importancia del ácido láctico el cual es ampliamente utilizado en la industria. El ácido láctico es producido tanto por síntesis química como por fermentación de carbohidratos; sin embargo, la síntesis química es muy cara, por lo que se requiere la búsqueda de bacterias lácticas fermentadoras de materiales a bajo costo como por ejemplo almidones de casava, sorgo, maíz y papa (Fausto, 1997; Vishnu y col., 2000).

El propósito de este estudio es avanzar en el conocimiento de la actividad amilolítica que presenta una cepa bacteriana aislada de pozol, por lo cual nuestro interés es saber si la cepa aislada es capaz de producir buenos rendimientos de ácido láctico bajo diferentes condiciones de fermentación, por lo tanto es necesario conocer el comportamiento de la cepa en cuanto a su crecimiento, producción de acidez (pH y acidez titulable), actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula y producción de ácido láctico.

Este trabajo de tesis se encuentra dentro del proyecto global "Determinación de la diversidad microbiana del pozol" coordinado por la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Planteamiento del problema

En nuestro país el ácido láctico tiene poca producción a nivel nacional, lo que origina la necesidad de importarlo en grandes volúmenes (Figura 1)**.

Los principales países de los que México importa ácido láctico son:

- 1) Estados Unidos (desde 31.8% en 1995 hasta un 57.7% en el 2000)
- 2) España (desde 35.5% en 1995 hasta un 15.5% en el 2000)
- 3) Bélgica (desde 8.8% en 1997 hasta un 21.8% en el 2000)

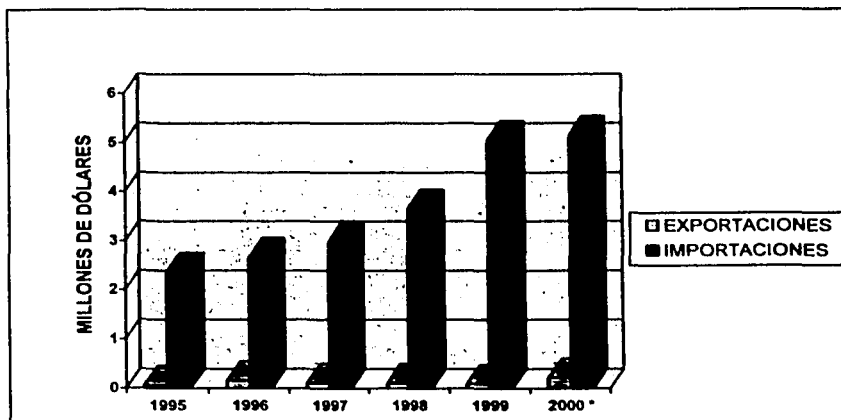


Figura 1. Valores de importaciones y exportaciones de ácido láctico en México desde 1995 hasta el 2000 (en millones de dólares).

* Son valores acumulados de enero a noviembre.

**Fuente: *Secretaría de Economía con datos del Banco de México.*

Asimismo se sabe que en México no hay reportes de producción de ácido láctico empleando cepas aisladas de sustratos amiláceos fermentados. Por lo cual el presente trabajo pretende determinar, bajo diferentes condiciones de fermentación, la cantidad de ácido láctico que produce una cepa bacteriana aislada de pozol.

2. ANTECEDENTES

Importancia del ácido láctico

Características del ácido láctico

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropiónico ($C_3H_6O_3$) es un líquido ligeramente viscoso, transparente, incoloro o débilmente amarillento, inodoro, muy higroscópico, soluble en agua, alcohol o éter en todas proporciones.

La molécula de ácido láctico tiene un carbono asimétrico, por lo cual se presentan dos isómeros ópticamente activos (Figura 3), sin embargo la mezcla racémica es ópticamente inactiva (Páez y Ramírez, 1988).

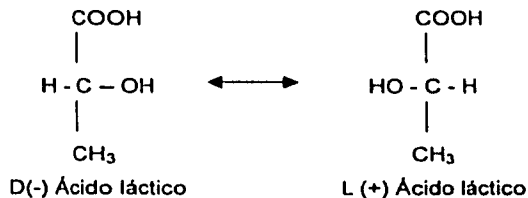


Figura 3. Isómeros de la molécula de ácido láctico.

Métodos de obtención

La producción de ácido láctico se realiza por métodos químicos y por métodos microbiológicos (Páez y Ramírez, 1988).

Métodos químicos

- Por reacción del acetaldehído con monóxido de carbono a 200°C y 900 atmósferas de presión.
- Por hidrólisis de cianhidrina de acetaldehído, preparada con etanaldehído y ácido cianhídrico.
- Por hidrólisis del ácido cloro-propiónico, obtenido por cloración del ácido propiónico.

d) Por la reacción de hidróxido de plata con ácido bromo propiónico.

Los métodos químicos son más caros que la fermentación de productos biológicos y por esta razón no se emplean mucho.

Métodos microbiológicos

Con bacterias lácticas, la producción industrial de ácido láctico se realiza por fermentación de glucosa refinada, almidones, suero de leche y melazas, desechos de licores sulfíticos, jugos de cítricos, hidrolizados ácidos de madera, aserrín, paja y mazorca de maíz. El rendimiento teórico producido es del 100% del peso de la hexosa fermentada, pero en la práctica no se obtiene este rendimiento, tomando en cuenta que los microorganismos utilizan carbohidratos como fuente de energía, industrialmente se considera óptimo un rendimiento del 85%.

Como la demanda de ácido láctico es mayor que su producción debido al incremento en su aplicación, es necesario emplear almidones baratos y abundantes para la gran escala de producción del ácido láctico (Vishnu y col., 2000). Entre varios almidones, la casava, el sorgo y el maíz son los más abundantes y relativamente baratos (Fausto, 1997).

Usos

El ácido láctico es utilizado ampliamente en industrias de alimentos, farmacia, peletería, textiles e industria química.

Los usos del ácido láctico pueden dividirse en dos categorías: comestibles e industriales (Páez y Ramírez, 1988) (Tabla 1).

Las propiedades del ácido láctico hacen que sea apropiado en gran variedad de productos alimenticios: 1) Sabor ácido suave que contrasta con el sabor picante de otros ácidos; 2) No oculta ni domina otros sabores; 3) En algunos productos alimenticios impide su alteración.

El ácido láctico crudo se usa en la industria de los cueros para desencalar las pieles y para remojar e hinchar el cuero para suelas.

Es la materia prima para preparar los lactatos de metilo, etilo y n-butilo que se usan como disolventes, esta calidad también se utiliza para tintura ácida de la lana y otros textiles.

También se usa en adhesivos, fórmulas para limpieza y pulimiento, en galvanoplastia y electropulimiento, en insecticidas, fungicidas y reveladores litográficos.

El ácido láctico es fuente del ácido poliláctico, un polímero usado especialmente en Medicina y en plásticos biodegradables, que sustituyen a plásticos sintéticos hechos de derivados del petróleo (Vickroy, 1985; Datta y col., 1996; Litchfield, 1996).

Tabla 1. Usos del ácido láctico

USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO			
<i>Grado crudo</i> 22%	<i>Grado comestible</i> 44% y 50%	<i>Grado plástico</i> 50%	<i>Grado USP</i> 85%
Teñido de sedas y lanas	Acidulante	Industria de plásticos	Farmacia
Preparación de cueros	Confitería		Comestibles
Desecado de pieles	Inhibidor de bacterias en la fermentación		Plastificante
Encurtido de vegetales	Manufactura de cerveza		Catalizador de resinas aldehído-fenólicas
Fuente en pastas de soldar	Fabricación de levadura		
Adhesivos	Ajustar pH en aguas duras		
Limpiadores y pulidores	Saborizante		
Reveladores litográficos	Productos de panadería		
Tintas especiales	Fabricación de bebidas efervescentes		
Disolventes (ésteres de metil, etil, n-butil-lactato)	Preservador (sopas, frutas, dulces, quesos, carnes)		

Derivados del ácido láctico:

Lactato de calcio en calcioterapia; lactato de hierro en tratamiento de anemias; lactato de antimonio en tintorerías; lactato de sodio en plastificantes y humectantes; lactato de etilo en lubricantes y disolventes.

Importancia de las bacterias lácticas

Bacterias lácticas

Se ha demostrado que las bacterias lácticas son las responsables más importantes de la fermentación ácido-láctica en los alimentos. Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, microaerófilas y por obtener al lactato como producto principal de su metabolismo fermentativo a partir de carbohidratos (Kandler, 1983). Son mesófilas, pero pueden crecer en un intervalo de 5 a 45°C, su pH óptimo es de 4-4.5, aunque se han encontrado cepas que crecen a pH de 3.2 y 9.6, poseen poca actividad proteolítica y lipolítica, requieren de aminoácidos preformados, bases púricas y pirimídicas y vitamina B para crecer (Jay, 1996).

Las bacterias lácticas que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos fermentados son (Stiles y Holzapfel, 1997):

- Homofermentadoras: *Lb. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. amyiophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *bulgaricus* y *lactis*, *Pediococcus spp*, *Streptococcus spp* y *Lactococcus spp*.
- Heterofermentadoras facultativas: *Lb. casei*, *Lb. arabinosis*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Leuconostoc spp*.
- Heterofermentadoras obligadas: *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *P. pentosaceus*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri*, *Weisella*.

Bajo condiciones normales de fermentación, el producto del metabolismo homofermentativo (ej. *Lb. plantarum*) obtenido en mayores cantidades es el ácido láctico, pero también se forman otros productos como el ácido acético, acetaldehído, etanol y diacetilo (en lácteos), todos ellos contribuyen con el sabor característico del producto fermentado (Figura 2).

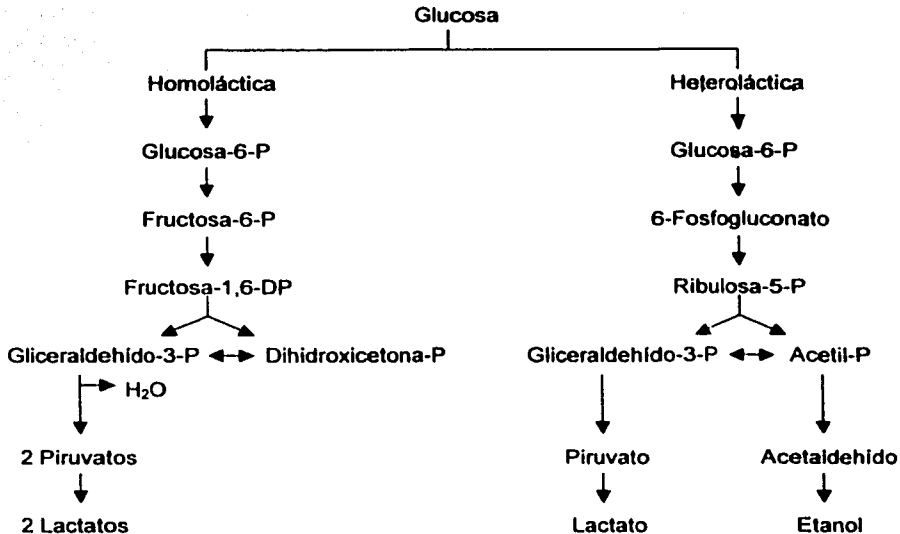


Figura 2. Esquema general de la fermentación de glucosa en las bacterias lácticas (Caplice y Fitzgerald, 1999).

La principal función de este metabolismo de azúcares es generar la energía necesaria para lograr un rápido crecimiento y mantenimiento del pH intracelular durante la acidificación del medio ambiente. Este metabolismo se caracteriza por elevadas velocidades metabólicas y no por una eficiencia máxima de conservación de energía. La reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa protege a las células de la acumulación de equivalentes reductores (NADH) que se forman durante la glicólisis y pueden causar inhibición directa en varios sitios de control metabólicos.

El resultado de estas actividades tan elevadas es el dominio de la población en ambientes con muchos nutrientes debido a la enorme ventaja competitiva sobre otros microorganismos que también utilizan azúcares, y por otra parte, la rápida acidificación que inactiva a diversos microorganismos.

Se sabe que bajo condiciones inusuales, en especial bajo condiciones de baja concentración de azúcares y/o elevada aireación, se pueden formar otros metabolitos como el ácido acético, fórmico, acetoina y acetaldehído como resultado de la fermentación por bacterias lácticas (Hugenholtz y Kleerebezem, 1999).

Fermentación ácido-láctica en los alimentos

En la mayoría de los países tropicales donde los productos perecederos son difíciles de almacenar, alimentos con gran cantidad de almidón (casava, maíz, sorgo, etc.) son la base de la dieta. Para mejorar las posibilidades de almacenamiento se han desarrollado procesos tradicionales usando fermentaciones espontáneas (ben Omar y Ampe, 2000). Los alimentos fermentados tradicionales procedentes de distintas regiones del mundo pueden ser clasificados en las siguientes categorías: fermentaciones por hongos, fermentaciones ácido-lácticas seguidas de fermentación por hongos, producción de masas fermentadas, fermentaciones alcohólicas e ingredientes de alimentos fermentados (Paredes y Harry, 1988).

La conservación de alimentos mediante la fermentación es una práctica muy antigua. La fermentación no sólo incrementa la vida de anaquel y seguridad microbiológica de los alimentos sino que también puede hacer algunos alimentos más digeribles. Muchas fermentaciones tradicionalmente dependen de una inoculación de cultivos iniciadores que son requeridos para muchos procesos comerciales (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Las fermentaciones ácido lácticas cumplen un papel importante en la alimentación mundial y conforme va creciendo la población es de esperar que este tipo de fermentaciones tengan una mayor importancia en la preservación de vegetales frescos, frutas, cereales y leguminosas para la alimentación humana.

Generalmente las fermentaciones ácido-lácticas son de bajo costo y a veces se requiere poco o nada de calor en su preparación.

Las bacterias lácticas están involucradas en la fabricación de alimentos fermentados de materiales crudos como leche, carne, vegetales y cereales. Estos alimentos son preparados usando cepas seleccionadas que tienen la habilidad de elaborar productos deseados o cambios eficientemente (McKay y Baldwin, 1990).

Las bacterias lácticas son microorganismos seguros que son usados principalmente para la preparación de alimentos fermentados y para aplicaciones probióticas (Geoffroy y col., 2000).

En productos fermentados, la sucesión microbiana indica una selección de la microflora la cual es, por lo general, dominada por bacterias lácticas (Halm y col., 1993).

El maíz

El maíz (*Zea mays L*) es originario del continente americano y es el cereal de mayor consumo en México.

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible.

Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. (FAO,1993).

Aplicaciones del maíz

El maíz tiene tres aplicaciones posibles: como alimento, forraje y materia prima para la industria.

En el caso de la industria, el aumento de los precios del petróleo ha impulsado la intensificación de las investigaciones sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos. Con maíz fermentado se elaboran muchos alimentos tradicionales y también algunas bebidas alcohólicas (FAO,1993).

Composición química de las partes del grano

Como se muestra en la Tabla 2, las partes principales del grano de maíz difieren

considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%) (Burge y Duensing, 1989). El endospermo en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo.

Tabla 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)*.

<i>Componente químico</i>	<i>Pericarpio</i>	<i>Endospermo</i>	<i>Germen</i>
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

*Fuente: Watson, 1987.

Almidón

Los carbohidratos del maíz están distribuidos entre muchos tejidos del grano. El carbohidrato más abundante del grano de maíz es el almidón y constituye entre el 61-78% de su peso seco. El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida por cadenas largas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón de daltones unidas por enlaces α -(1,4) glucosídicos. La amilopectina tiene un peso molecular muy alto, ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones, las cuales se encuentran unidas por enlaces α -(1,4) y α -(1,6) glucosídicos. Las variedades habituales de maíz en el comercio tienen un máximo del 65% de amilosa. Las moléculas de amilosa, son lineales y menos voluminosas que las ramificadas de amilopectina, pueden, en la fase inicial del proceso de gelatinización difundir hacia y a través de la membrana superficial y pasar así a la solución extragranular (Fenemma,

1993).

El almidón se utiliza industrialmente como tal y también para producir alcohol y edulcorantes alimentarios, ya sea por hidrólisis ácida o enzimática. Esta última se realiza mediante α -amilasa, glucoamilasas, β -amilasa y pululanasa de bacterias o de hongos. Se liberan los sacáridos de diversos pesos moleculares produciendo edulcorantes con propiedades funcionales diferentes: dextrosa líquida o cristalina, jarabes de maíz con una proporción elevada de fructosa, jarabes ordinarios de maíz y maltodextrinas, los que tienen aplicaciones múltiples en la elaboración de alimentos (FAO, 1993).

Modalidades de consumo del maíz fermentado

El maíz se consume en muchas formas distintas. El grano se fermenta para elaborar *ogi* en Nigeria (Oke, 1967) y otros países de África (Hesseltine, 1979) y se descascara, desgermina y precuece para elaborar *arepas* en Colombia y Venezuela (Instituto de Investigaciones Tecnológicas, 1971; Rodríguez, 1972).

En Egipto es muy común la elaboración de *aish merahra*, un pan plano de maíz que se sazona con alholva y se fermenta mediante una levadura de masa agria. La harina fina de maíz se emplea para hacer una masa blanda, a la que se mezcla un cinco por ciento de semillas de alholva molidas, pues se cree que la hierba aumenta el contenido de proteínas, mejora la digestibilidad y alarga el periodo de almacenamiento posible del pan. La fermentación se inicia con masa agria y dura toda la noche. Por la mañana, se fabrican con la masa una especie de panecillos blandos y redondos que se dejan durante 30 minutos a «prueba». Antes de meterlos en el horno, se convierten los panes en discos grandes y planos. El *aish merahra* se mantiene fresco de siete a diez días si se guarda en recipientes herméticos. En el Líbano se consume un producto similar llamado *markouk*.

En el *kenkey*, alimento fermentado de maíz originario de Ghana, cada etapa de procesamiento tiene su propio microambiente con una fuerte actividad antimicrobiana. Cerca de la mitad de los *Lactobacillus plantarum* y prácticamente todos los *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus reuteri* investigados demostraron inhibir otras bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo cual explica la eliminación de estos

microorganismos durante las etapas iniciales. El efecto antimicrobiano fue explicado por el efecto combinado de ácidos, compuestos sensibles a enzimas proteolíticas y otros compuestos con actividad antimicrobiana, siendo la producción de acidez el factor más importante (Olsen y col., 1995).

El maíz también se utiliza para fabricar cerveza. En Benín, por ejemplo, se obtiene malta germinando el grano durante unos cinco días. A continuación, se expone la malta al sol para interrumpir la germinación. Los granos se aplastan ligeramente en un mortero o en una piedra de amolar; se cuece la malta, se cuela el extracto, se enfría y se deja reposar. Al cabo de tres días de fermentación ya se ha convertido en cerveza (FAO, 1993).

El proceso de cocción del maíz en agua de cal es propio de México y América Central (Bressani, 1990), aunque actualmente se ha exportado la tecnología a otros países como los Estados Unidos. A partir del maíz cocido en agua de cal, se prepara una masa que es el ingrediente principal de muchos platos populares como el *atole*, una bebida con gran variedad de sabores y los *tamales*, que requieren una preparación más compleja por el número de ingredientes que contiene, la mayor parte de las veces carne de pollo o de cerdo añadida a la masa, se confeccionan envolviendo la masa en hojas de maíz y cociéndola al vapor durante 20 a 30 minutos, para gelatinizar el almidón. También se utiliza como base de las *enchiladas* y los *facos* (tortillas plegadas rellenas de carne, etc.). Cuando la masa se frie y condimenta, da alimentos como *hojuelas de maíz* y *chilaquiles*.

El *ogi* se denomina con otros nombres, como *akamu* o *ekogbona*, *agidi* y *eko tutú*. Todos éstos, junto con el *uji* keniano y el *koko* de Ghana, son esencialmente la misma preparación, con cambios en el grano utilizado o alguna pequeña modificación del método básico. En cuanto al *pozol* mexicano, el maíz se procesa con cal, igual que las tortillas: el nixtamal o maíz cocido sin la envoltura seminal, se tritura para formar una masa basta con la que se hacen manualmente unas pequeñas pelotas que se envuelven luego en hojas de plátano para evitar que se sequen y se dejan fermentar por dos o tres días, o más si es necesario. En este procedimiento intervienen múltiples microorganismos.

El pozol

El pozol (del náhuatl *pozolli*: espumoso) es una masa de maíz nixtamalizada y fermentada. La masa es suspendida en agua y es consumida como bebida ceremonial y alimento básico por poblaciones indígenas del sureste de México. La población mestiza de la misma región la consume como bebida refrescante (Ulloa y Herrera, 1976-1982, Escamilla-Hurtado y Mosqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Ampe y col., 1999a y 1999b).

Han sido aislados del pozol una gran variedad de microorganismos, estos microorganismos incluyen hongos, levaduras, bacterias lácticas y bacterias no lácticas (Ulloa, 1974; Nuraida y col., 1995; Wachter, 1995).

Las bacterias lácticas son los microorganismos predominantes en la fermentación del pozol (Ampe y col., 1999a y 1999b; ben Omar y Ampe, 2000) y se sabe que dichas bacterias son capaces de degradar el almidón y la actividad amilolítica se ve favorecida en presencia de calcio (Nakamura, 1981; Sen y Chakrabarty, 1984; Pompeyo y col., 1993; Flores, 1996; ben Omar y Ampe, 2000).

- Ampe y col. (1999a) encontraron que miembros del género *Streptococcus sp.* representan el 25-50 % del total de la flora activa en el pozol; asimismo miembros del género *Lactobacillus* representan el 50% de la flora activa. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus pentosus* se consideran especies importantes en el proceso fermentativo.

En las primeras horas de fermentación *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser los géneros dominantes. Por el contrario, éstos representan los géneros menores al final de la fermentación cuando *Lactobacillus* domina el proceso (Ampe y col., 1999a). Otros estudios han reportado que *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* están presentes en el pozol (Nuraida y col., 1995; Escalante y col., 2001).

La masa de pozol se moldea en forma de bolas, por lo que existe la posibilidad de la formación de microambientes en el centro y en la periferia de la masa (zonas microaerobia y aerobia, respectivamente), lo que da origen a una heterogeneidad en cuanto al grado de aireación y a la composición química (Wachter, 1995 ; Ampe y col.,

1999a; ben Omar y Ampe,2000). En la periferia de la bola de pozol, donde el oxígeno no es una limitante, se ha encontrado la mayor población microbiana y actividad metabólica en comparación con el centro de la bola. Miembros del género *Leuconostoc* parecen ser predominantes en la periferia en tanto que los del género *Lactobacillus* predominan en el centro. En el pozol se encuentran presentes bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Ampe y col., 1999a).

En ausencia de oxígeno (centro de la bola), las bacterias lácticas heterofermentativas producen lactato y etanol, mientras que en presencia de oxígeno, estos organismos regeneran algunos cofactores a través de NADH oxidasa, que les permite obtener la energía a través de la producción de acetato (Adler-Nissen, 1994). Las bacterias lácticas homofermentativas producen formato cuando la fuente de azúcar es limitada, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Tseng y Montville, 1993); la actividad de estos organismos en el pozol fue revelada por la presencia de cantidades significantes de formato junto con muy bajas concentraciones de azúcares libres en toda la bola (Ampe y col., 1999a).

El almidón es el carbohidrato principal del maíz y al inicio de la fermentación hay grandes cantidades de almidón soluble que están disponibles para ser utilizadas como sustrato por los microorganismos. En el pozol se encontraron bacterias lácticas amilolíticas. Ciertas cepas aisladas de *Lactobacillus fermentum* resultaron ser eficientes para degradar el almidón soluble; en contraste, ningún hongo y levadura fueron capaces de degradar el almidón soluble, estos resultados sugieren que las bacterias lácticas amilolíticas juegan un papel importante al hacer disponible al carbono proveniente del almidón. La actividad absoluta de las bacterias lácticas es mayor en la periferia que en el centro. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos hasta el momento se recomiendan más estudios acerca de la actividad amilolítica *in situ* de estos microorganismos (Ampe y col., 1999a).

3. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Caracterizar la cepa láctica aislada de pozol que tenga la mayor actividad amilolítica y cuantificar la concentración de ácido láctico que produce a partir de un sustrato amiláceo.

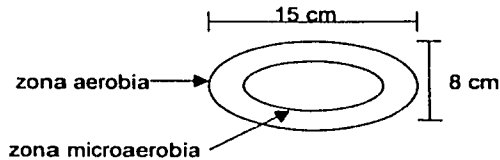
- **Objetivos particulares:**

1. Determinar el crecimiento (cuenta viable del microorganismo) de la cepa láctica con la mayor actividad amilolítica bajo dos condiciones de temperatura (37°C y 45°C) y dos concentraciones de carbonato de calcio (2% y 5%), utilizando como sustrato amiláceo almidón soluble de papa.
2. Determinar la actividad amilolítica de la cepa láctica con la mayor actividad amilolítica en las diferentes condiciones de fermentación.
3. Determinar la cantidad de ácido láctico producido por la cepa láctica con la mayor actividad amilolítica en las diferentes condiciones de fermentación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de las muestras

Se recolectaron bolas de masa de dos pozolerías (una localizada en un mercado y otra ubicada fuera del mercado) de la Ciudad de Villahermosa, Tabasco inmediatamente después de terminada la molienda y formada la bola. Las muestras, que se encontraban envueltas en bolsas de plástico, se depositaron en hieleras térmicas. Las bolas de masa pesaron aproximadamente 500 gramos en promedio y tenían las siguientes dimensiones:



La fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente (35°C) en las bolsas plásticas abiertas en las que fueron adquiridas las muestras. Los muestreos se realizaron a las 2, 8, 11, 26, 50, y 74 h de fermentación de la masa y se utilizó una bola de masa por cada muestreo.

Para la obtención de las muestras de las zonas aerobia y microaerobia de la masa se realizó el siguiente procedimiento:

Zona aerobia. Se separó la masa de la superficie de la bola (0.5 cm de profundidad como máximo) con guantes y espátula estériles y se homogeneizó mezclando manualmente.

Zona microaerobia. De la misma bola de masa se abrió por la mitad separando con ambas manos, con guantes estériles se tomó la porción central de la bola y se homogeneizó manualmente.

Se llevó a cabo el muestreo de ambas zonas y se realizó lo siguiente:

Preparación de la muestras

Se tomaron muestras homogéneas de las zonas aerobia y microaerobia de cada bola de masa, se pesó sobre papel aluminio estéril 1g de muestra en una balanza analítica y se disolvió en 9 ml de peptona estéril al 0.1% contenidos en un tubo de ensaye con tapa de rosca con capacidad para 20 ml; se homogeneizó en vórtex durante 5 minutos. Se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente estéril.

Cultivo de bacterias lácticas

Se depositaron por duplicado 0.1 ml de las diluciones apropiadas de las muestras en placas con agar de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Oxoid CM361B) (de Man y col.,1960) y se cubrieron con una capa del mismo medio estéril. Se incubaron aeróbicamente a 35°C durante 12 h. Al término de este periodo las placas se guardaron cuidadosamente en hielo para su transporte a la Ciudad de México.

Resiembra de bacterias lácticas

La resiembra de las cepas lácticas se hizo en placas con medio MRS almidón (ver composición en el apéndice 1) a partir de muestras con 8 y 74h de fermentación; se eligieron estos tiempos de fermentación debido a que las bacterias lácticas del pozol se encuentran en las primeras horas de fermentación asimismo son el género predominante al final del proceso fermentativo (Steinkraus ,1983; Silva-Villarreal, 1984; Ramírez, 1987; Nuraida, 1988; Escamilla-Hurtado y Mosqueda-González, 1992; Wachter, 1995; Ampe y col.,1999a; ben Omar y Ampe,2000). Las muestras se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 horas.

Se eligieron al azar cinco cepas de cada muestra, es decir, cinco cepas provenían de la zona aerobia (ZA) y cinco cepas de la zona microaerobia (ZM) de la bola de masa de una pozolería del mercado (MDO) con 8 horas de fermentación y lo mismo se hizo en muestras con 74 horas de fermentación. Se utilizó el mismo criterio para las muestras provenientes de la pozolería ubicada fuera del mercado (FMDO) con 8 y 74 horas de

fermentación.

En total se conservaron 40 cepas en glicerol (Sigma G5516) al 30% a -70°C en un ultracongelador (Revco Inc.).

Selección de cepas productoras de ácido láctico

La siembra de las 40 cepas lácticas se hizo por estría cruzada en placas MRS almidón al 1% que contenían púrpura de bromocresol (Merck 3025) al 0.05% como indicador de pH. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C de 24-48 horas. Las morfologías coloniales se observaron en un microscopio estereoscópico, se tomó una colonia de cada cepa, las colonias se eligieron con base en la presencia de halo de hidrólisis alrededor de la colonia, el cual contrastaba con el color opaco del medio de cultivo, y por el vire del indicador de pH a ácido (cuyo vire se observó de color amarillo). Las colonias seleccionadas se sembraron en placas MRS almidón al 1% y se incubaron a 37°C de 24-48 horas. Se verificó la pureza de las cepas observando la morfología colonial.

Se realizó la tinción de Gram y la prueba de catalasa para comprobar la pureza de las cepas y comprobar si efectivamente eran bacterias lácticas, las cuales se caracterizan por ser Gram (+) y catalasa (-). Las cepas puras se conservaron en glicerol al 30% y -70°C .

Identificación de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica

Para realizar la identificación de la cepa láctica con la mayor actividad amilolítica se utilizaron: el API 50 CH que se basa en la fermentación de carbohidratos y se utiliza para la identificación de bacilos, el API 20 Strep que se basa en pruebas enzimáticas y fermentación de carbohidratos para la identificación de *Streptococcus ssp.* y el software APILAB versión 4.0 y APILAB plus (BioMérieux).

Determinación de la cuenta viable de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica

Para llevar a cabo la cuenta viable se utilizaron 250 ml de caldo MRS almidón (almidón soluble de papa al 1%), se consideraron dos temperaturas de fermentación (37°C y 45°C), dos concentraciones de carbonato de calcio (2% y 5%) y una concentración de inóculo del 5%.

Se eligieron estas condiciones de fermentación porque generalmente las fermentaciones se llevan a cabo a 37°C y a nivel industrial es común emplear la temperatura de 45°C. Páez y González (1988) reportaron que volúmenes de inóculo mayores del 5% no benefician los rendimientos de ácido láctico obtenido a partir de un hidrolizado enzimático de papa. Generalmente se emplean concentraciones de almidón soluble de 1% a 2% para estudios de cepas lácticas amilolíticas. Hay reportes donde se emplea el carbonato de calcio en concentración de 1% y 4% para el crecimiento y la producción de amilasas de bacterias lácticas aisladas de pozol (Nakamura, 1981; Pompeyo y col., 1993, respectivamente), en el presente trabajo se probó con 2% y 5% de carbonato de calcio para observar el crecimiento y producción de amilasa de la cepa láctica con la mayor actividad amilolítica.

Los tiempos de muestreo fueron: 0,3,6,9,12,26,50 y 74 horas de fermentación.

Se hicieron las diluciones decimales de las muestras y se sembraron 0.1 ml de cada una (por duplicado) en tubos con agar blando (MRS almidón) al 0.75% previamente calentados en baño maría y enfriados de tal modo que el agar permaneciera fundido, los tubos se homogeneizaron en vórtex y se vaciaron en placas con agar MRS almidón (agar al 1.5%), se incubaron aeróbicamente a 37°C y 45°C durante 24 horas. Después de este tiempo se procedió al conteo de las colonias y se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml de muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml de muestra}} = \frac{(\text{no. colonias}) (\text{inverso de la dilución})}{0.1 \text{ ml}}$$

De manera simultánea, se tomaron alícuotas del caldo de fermentación para las determinaciones de pH, acidez titulable, actividad amilolítica y ácido L-láctico (L-lactato).

Las determinaciones de pH y acidez titulable se hicieron inmediatamente después de sembrar las muestras en las placas con agar MRS almidón utilizadas para la cuenta viable.

Las muestras para las determinaciones de actividad amilolítica y ácido L-láctico se congelaron inmediatamente a -20°C .

Determinación de pH

A cada hora de muestreo se tomaron 3 ml del caldo de fermentación y se pusieron en viales. La muestra se homogeneizó manualmente y se determinó el pH con un potenciómetro (Corning mod.7, con electrodo de vidrio).

Determinación de la acidez titulable

Se utilizó la misma suspensión a la cual se le determinó el pH, se le añadieron 3 gotas de una solución de fenolftaleína (J.T. Baker 2870) al 0.1%, se titularon con hidróxido de sodio 0.1 N (Merck 204102R) hasta un vire de color rosa pálido. Se calculó la acidez titulable como el porcentaje de ácido láctico en la muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Ácido láctico} = \frac{(\text{ml de NaOH gastados})(0.1 \text{ meq/ml NaOH})(0.9008 \text{ meq de ácido láctico})}{\text{ml de muestra}} \times 100 \text{ ml}$$

Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula de la cepa láctica con mayor actividad amilolítica

La determinación de la actividad amilolítica (Giraud y col., 1991) se basa en la relación que hay entre la enzima (amilasa) y su sustrato (almidón) y posteriormente en la formación de un complejo colorido medido espectrofotométricamente. La amilasa hidroliza el almidón generándose azúcares con extremos reductores los cuales reaccionan con un compuesto que es capaz de formar un complejo color naranja que se puede medir en un espectrofotómetro a 540 nm (Miller, 1959), finalmente el resultado se interpola en una curva patrón de azúcares reductores.

Determinación de la actividad amilolítica extracelular

Las muestras (alícuotas del caldo de fermentación conservadas a -70°C) se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugó 1.5 ml de cada una a 15,000 rpm durante 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf. Se separó el sobrenadante y se procedió a lo siguiente:

La reacción se llevó a cabo en tubos que contenían 2.4 ml de una solución de almidón soluble de papa (J.T. Baker 400604) al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 6. Se adicionaron alícuotas de 0.3 ml de sobrenadante (por triplicado), una cuarta alícuota de sobrenadante se adicionó a un tubo que además de las soluciones antes mencionadas contenía 2 ml de solución de DNS (Blanco). La adición del sobrenadante fue precisa, pues se hizo dejando un lapso de 30 segundos entre cada tubo, tiempo en el cual se pudieron agitar los tubos en vórtex para facilitar el contacto entre enzima y sustrato.

El tiempo de incubación se empezó a contar al momento de la adición de las muestras. La incubación de los tubos se hizo en un baño de agua a temperatura constante a 37°C y 45°C durante 1 hora. Después de este tiempo se detuvo la reacción con 0.3 ml de una solución de hidróxido de sodio 5M.

Se adicionaron 2 ml de solución de DNS a todos los tubos excepto al blanco. Los tubos se pusieron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos y luego se enfriaron al chorro del agua. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Unicam mod.

helios-alfa) a 540 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en la curva patrón de glucosa .

Determinación de la actividad amilolítica asociada a la célula

El paquete celular previamente se lavó dos veces con 1 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH = 6. Para el lavado se requirió que los tubos se agitaran con vórtex y luego se centrifugaron a 15,000 rpm durante 5 minutos. Después se resuspendieron las células en 1.5 ml del buffer y se procedió a romper las células en un sonicador (Branson 5200) durante 15 minutos.

La reacción se llevó a cabo en tubos que contenían 2.4 ml de una solución de almidón soluble de papa (J.T. Baker 400604) al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 6. Se adicionaron alícuotas de 0.3 ml del paquete celular (por triplicado), una cuarta alícuota de precipitado se adicionó a un tubo que además de las soluciones antes mencionadas contenía 2 ml de solución de DNS (Blanco).

Las actividades enzimáticas se llevaron a cabo de la misma forma que con las muestras del sobrenadante.

Se calculó la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula como la cantidad de azúcares reductores producidos por Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la siguiente manera:

$$\frac{\mu\text{g de azúcares reductores}}{\text{ml de muestra}} = \frac{(\text{valor interpolado en } \mu\text{g}) (\text{inverso de la dilución})}{0.3 \text{ ml}}$$
$$\frac{\mu\text{g de azúcares reductores}}{\text{UFC}} = \frac{(\mu\text{g de azúcares reductores}) (\text{ml de muestra})}{\text{ml de muestra} \quad \text{UFC}}$$

Curva patrón de azúcares reductores

Se preparó una curva patrón de glucosa partiendo de una solución stock de concentración 0.5 mg/ml, para la cual se pesaron 0.0500 g de glucosa (Sigma G8270),

se disolvieron y se aforaron con agua destilada en un matraz aforado a 100 ml.

También se preparó una solución de DNS, la cual contenía hidróxido de sodio al 1.4% (Merck 6498), ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (J.T.Baker K43105), tartrato de sodio y potasio al 21.6% (Sigma S6170), fenol al 0.56% (J.T. Baker 285804) y metabisulfito de sodio al 0.59% (Sigma S1516). Todos los reactivos se disolvieron en agua destilada.

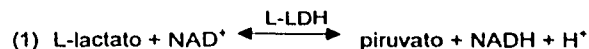
Se hicieron las diluciones correspondientes al intervalo de concentración de 0 a 166.6 µg de glucosa/ml; se realizó la reacción como se explica posteriormente y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Unicam mod. helios-alfa). Los valores de la curva patrón y la ecuación de la recta se muestran en el apéndice 2.

Determinación de ácido L-láctico (L-lactato) producido por la cepa láctica con mayor actividad amilolítica

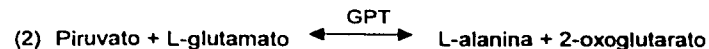
Para realizar la determinación del ácido L-láctico se empleó la técnica sugerida por Roche Diagnostics (Kit no. 139084).

Fundamento de la técnica

El ácido L-láctico (L-lactato) es oxidado por la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) en presencia de la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) a piruvato (1).



El equilibrio de esta reacción se desplaza casi por completo del lado del L-lactato. Sin embargo, atrapando al piruvato en una subsecuente reacción catalizada por la enzima glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en presencia de L-glutamato, el equilibrio puede ser desplazado en favor del piruvato y NADH (2).



La cantidad de NADH formado en la reacción de arriba es estequiométrica a la cantidad

de L-lactato. El incremento en NADH es determinado por su absorbancia a la luz a 340 nm.

Preparación de las muestras

Se trabajaron las muestras correspondientes a las 0,3,9 y 12 horas de fermentación. La determinación del L-lactato se hizo tanto en el sobrenadante como en el precipitado. El precipitado se considera importante porque la mayor cantidad del lactato de calcio se encuentra formando parte del precipitado.

Las muestras (alícuotas del caldo de fermentación conservadas a -70°C) se descongelaron a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) y se centrifugó 1 ml de cada muestra a 15,000 rpm durante 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf. Se separó el sobrenadante de cada muestra y se puso en un baño de hielo. Por otro lado, al precipitado de cada muestra se le agregó 1 ml de ácido sulfúrico 0.1 M y se disolvió en un sonicador (Branson 5200) durante 10 minutos, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos en la microcentrifuga, se procedió a separar el sobrenadante y se puso en un baño de hielo.

Para la determinación se utilizó 1 ml de sobrenadante y se le agregó 500 μl de ácido perclórico frío 0.6 M para deproteinizar las muestras, luego se colocaron en baño de hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 10 minutos en la microcentrifuga; el sobrenadante se ajustó a $\text{pH} = 8$ con una solución de hidróxido de sodio 3 M, se tomó 1 ml de las muestras y se pusieron en un baño de hielo durante 15 minutos. Las muestras se filtraron a través de una membrana de filtración con un poro de 0.45 μm de diámetro (Millipore) y el filtrado se utilizó para realizar las determinaciones del L-lactato.

El procedimiento para la determinación de L-lactato en las muestras se llevó a cabo como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinación de ácido L-láctico en muestras obtenidas de la fermentación de un medio de cultivo.

Celda	Blanco (μ l)	Muestra (μ l)
Solución 1	223	223
Solución 2	44.6	44.6
Suspensión 3	4.5	4.5
Solución muestra	-	23
Agua bidestilada	223	200
Mezclar la solución en la celda previamente tapada con un parafilm.		
Leer absorbancia a 340 nm de las soluciones (A_1) después de 5 minutos.		
Solución 4	4.5	4.5
Mezclar, esperar 20 minutos para completar la reacción.		
Leer absorbancia de blanco y muestras (A_2) inmediatamente una tras otra.		

- Solución 1: Ácido L-glutámico (440 mg) en 30 ml de buffer de glicilglicina a pH = 10 .
- Solución 2: NAD liofilizado (210 mg) en 6 ml de agua bidestilada.
- Suspensión 3: Suspensión de enzima glutamato-piruvato transaminasa (0.7 ml) de 1100 U.
- Solución 4: Solución de enzima L-lactato deshidrogenasa (0.7 ml) de 3800 U.

Para realizar los cálculos de la concentración de ácido L-láctico en las muestras se utilizaron las siguientes fórmulas:

(1) Fórmula para determinar la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) para el blanco y la muestra:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

(2) Fórmula general para calcular la concentración:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/L]}$$

Donde:

V = volumen final (ml)

v = volumen de muestra (ml)

MW = peso molecular de la sustancia ensayada (g/mol)

d = longitud de la celda (cm)

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm = 6.3 (Lx mmol⁻¹ x cm⁻¹)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de cepas productoras de ácido láctico

La medición del halo de hidrólisis de almidón y el vire del indicador de pH fue un criterio rápido y sencillo para detectar las cepas que presentaron la mayor actividad amilolítica y producción de acidez.

De las 40 cepas que se aislaron se obtuvieron los siguientes resultados:

16 cepas no presentaron halo de hidrólisis de almidón ni vire del indicador de pH a color amarillo en cajas con medio MRS almidón al 1%, incubadas a 37°C durante 72 horas (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las cepas no amilolíticas

No. de cepa	Procedencia de la muestra		
	Muestra	Zona de la masa	Tiempo de fermentación (h)
11	MDO	ZM	8
21-25	FMDO	ZM	74
26-30	FMDO	ZA	74
32	MDO	ZM	74
36-39	MDO	ZA	74

MDO = Muestra tomada de una pozolería del mercado.

FMDO = Muestra tomada de una pozolería fuera del mercado.

ZM = Zona microaerófila de la bola de pozol.

ZA = Zona aerófila de la bola de pozol.

24 cepas presentaron halo de hidrólisis de almidón y vire del indicador de pH a color amarillo (indicador de producción de acidez en el medio de cultivo) en cajas con agar MRS almidón al 1% , incubadas a 37°C durante 48 horas (Tabla 5).

Las características morfológicas que presentaron las 24 cepas fueron, en general, las siguientes: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas y brillantes.

En las pruebas de Gram y catalasa, se observó que las colonias fueron cocobacilos Gram (+) y catalasa (-).

Tabla 5. Características de las cepas lácticas amilolíticas

No. de cepa	Procedencia de la muestra			Tamaño del halo de hidrólisis (cm)
	Muestra	Zona de la masa	Tiempo de fermentación (h)	
1,2	FMDO	ZM	8	0.05
3,4,5	FMDO	ZM	8	0.10
6,7,8	FMDO	ZA	8	0.10
9	FMDO	ZA	8	0.50
10	FMDO	ZA	8	0.40
12,13	MDO	ZM	8	0.10
14	MDO	ZM	8	0.05
15	MDO	ZM	8	0.05
16,17,18	MDO	ZA	8	0.05
19	MDO	ZA	8	0.10
20	MDO	ZA	8	0.20
31,33	MDO	ZM	74	0.05
34	MDO	ZM	74	0.10
35	MDO	ZM	74	0.05
40	MDO	ZA	74	0.05

Las cepas fueron numeradas del 1 al 40, por lo que cada cepa se identificó de esta manera. Las cepas que presentaron mayor tamaño de halo de hidrólisis de almidón fueron las cepas 9, 10 y 20 (tamaño de halo en negritas). Se observó que a las 8 horas de fermentación tanto fuera del mercado (FMDO) como en el mercado (MDO), y principalmente en la zona aerobia de la masa (ZA), se presentaron halos de hidrólisis

de almidón de mayor tamaño lo que indica una mayor actividad amilolítica en esta zona. Por el contrario, las cepas aisladas a las 74 horas de fermentación no presentaron halos de hidrólisis de almidón grandes a excepción de la cepa 34, la cual provino de la zona microaerobia de la masa. Sin embargo, la actividad en la zona microaerobia fue menor que en la zona aerobia de la masa de pozol.

Al comparar los valores de tamaño de halo de hidrólisis de almidón que presentaron las 24 cepas amilolíticas, la cepa con la mayor actividad amilolítica y producción de acidez fue la *cepa número 9*, ya que fue la cepa que presentó el mayor tamaño de halo de hidrólisis de almidón (ver Tabla 5).

Estos resultados indican que la actividad amilolítica y la producción de acidez de las bacterias lácticas se vio favorecida en la zona aerobia de la masa de pozol, lo que coincide con los resultados reportados por Ampe y col. (1999a) en donde se menciona que la actividad amilolítica absoluta de las bacterias lácticas es mayor en la periferia que en el centro de la bola de masa del pozol.

Identificación de la cepa láctica número 9

Se utilizó el API 50 CH para identificación de bacilos, el cual contiene un control y 49 carbohidratos diferentes. La determinación se hizo por duplicado. Se observó el crecimiento de la cepa láctica amilolítica (cepa núm. 9) cada 24 horas hasta completar 72 horas con una temperatura de incubación de 37°C. La cepa fue capaz de fermentar los siguientes carbohidratos que se indican en la Tabla 6:

Tabla 6. Carbohidratos fermentados por la cepa láctica número 9 tras 72 horas de crecimiento a 37°C utilizando el API 50 CH.

Carbohidrato	Respuesta		
	24 horas	48 horas	72 horas
Galactosa*	±	±	±
D-Glucosa	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+
D-Manosa	+	+	+
Manitol	-	+	+
N-Acetil glucosamina	+	+	+
Arbutina*	±	±	±
Salicina	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Trehalosa	+	+	+
D-Rafinosa	+	+	+
Almidón	+	+	+
Glicógeno	+	+	+
D-Turanosa	±	±	±

* La respuesta ± significa fermentación variable, es decir, no hubo una fermentación completa del carbohidrato.

Estos resultados se procesaron en el Software APILAB versión 4.0 de BioMérieux y se obtuvo un porcentaje de confiabilidad del 38.1% para *Lactobacillus acidophilus* y 32.9% para *Aerococcus viridans* en ambos ensayos. Sin embargo *Aerococcus viridans* utiliza 100% de galactosa y en el ensayo la fermentación de galactosa fue variable, además el porcentaje de confiabilidad que se obtuvo es bajo ya que en este tipo de ensayos se espera un porcentaje de confiabilidad mínimo del 98%.

Además se hizo la prueba de producción de gas (por triplicado) empleando campanas de Durham en el medio de cultivo (caldo MRS) y resultó que la cepa no produjo gas, asimismo en el API 50 CH se observó que no fermentó azúcares que son exclusivos para identificar heterofermentadores (gluconato y 2 ceto-gluconato), por lo tanto

la cepa 9 es homofermentadora.

Debido a que el porcentaje de confiabilidad en el API 50 CH resultó bajo, la siguiente opción fue emplear un API para *Streptococcus*, por lo que se procedió a utilizar el API 20 Strep, el cual contenía una sección para pruebas enzimáticas y otra sección para fermentación de carbohidratos. Lo que se observaba era la presencia o ausencia de enzima y la acidificación mediante la fermentación de carbohidratos. En la Tabla 7 se muestran los resultados que tuvieron una respuesta positiva hasta las 72 horas de incubación a 37°C:

Tabla 7. Resultados de la cepa láctica número 9 tras 72 horas de crecimiento a 37°C utilizando el API 20 Strep.

Pruebas enzimáticas	
<i>Sustrato</i>	<i>Respuesta</i>
Piruvato	+
Esculina	+ (β -glucosidasa)
6-Bromo-2 nftil- α -D-galactopiranosida	+ (α -galactosidasa)
L-leucina-2-naftilamida	+ (Leucina arilamidasa)
Fermentación de carbohidratos	
<i>Carbohidrato</i>	<i>Respuesta</i>
Trehalosa	+
Rafinosa	+
Almidón	+
Glicógeno	+

Estos resultados se procesaron en el Software APILAB plus de BioMérieux y se obtuvo un porcentaje de confiabilidad del 98.5% para *Streptococcus bovis II* con una *t* de student de 0.82. Como el porcentaje de confiabilidad obtenido en el ensayo es alto, entonces es posible decir que la cepa láctica con mayor actividad amilolítica se identificó como *Streptococcus bovis II*.

Cabe mencionar que las pruebas bioquímicas revelan el tipo de microorganismo que se está estudiando, sin embargo es necesario confirmar la identificación del microorganismo mediante técnicas de secuenciación de DNA.

Determinación de la cuenta viable de la cepa *Streptococcus bovis II*

Se realizó la cuenta viable de la cepa *Streptococcus bovis II* bajo diferentes condiciones de fermentación para observar la influencia de la temperatura y de la concentración de carbonato de calcio en el crecimiento de la cepa. Los resultados se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8. Valores de cuenta viable de la cepa *Streptococcus bovis II* durante la fermentación de un sustrato amiláceo.

Tiempo (h)	Condición 2% CaCO ₃ /37°C [log UFC/ml de muestra]	Condición 2% CaCO ₃ /45°C [log UFC/ml de muestra]	Condición 5% CaCO ₃ /37°C [log UFC/ml de muestra]	Condición 5% CaCO ₃ /45°C [log UFC/ml de muestra]
0	7.39	7.3	7.31	7.35
3	6.61	6.63	6.42	6.35
6	7.31	8.42	7.35	7.41
9	9.06	9.04	9.0	8.6
12	10.49	10.51	10.6	10.49
26	10.40	10.51	10.5	10.40
50	8.62	8.56	8.58	8.56
74	8.59	7.48	8.54	7.48

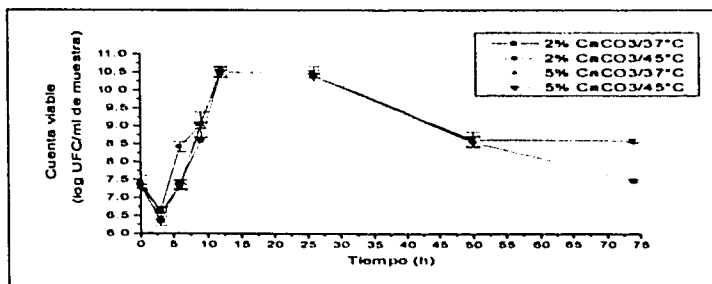


Figura 4. Cuenta viable de la cepa *Strep. bovis II* durante la fermentación de un sustrato amiláceo a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del duplicado del ensayo.

En la Figura 4 se aprecia que en todas las condiciones de fermentación la fase exponencial de crecimiento de la cepa se presentó entre las 3 y las 12 horas; la fase estacionaria se observó entre las 12 y las 26 horas; a partir de las 26 horas comienza la etapa de muerte celular y se observa que al final de la fermentación, el descenso del número de células es mayor a la temperatura de 45 °C.

El mayor crecimiento de la cepa *Streptococcus. bovis II* se presentó a las 12 horas de fermentación (Tabla 8) y se pudo observar que no hay diferencia en el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* en ninguna de las condiciones de fermentación, lo que significa que la cepa fue capaz de crecer de igual manera en ambas concentraciones de carbonato de calcio (2% y 5%) y ambas temperaturas de fermentación (37°C y 45°C). Por lo tanto, el crecimiento no se vio influenciado por la diferencia de concentraciones de carbonato de calcio ni por la temperatura de fermentación.

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre los valores de pH obtenidos durante el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis II*

Se hizo la determinación de pH durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* a las diferentes condiciones de fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9. Valores de pH obtenidos durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II*.

Tiempo (h)	Condición 2% CaCO ₃ /37°C [pH]	Condición 2% CaCO ₃ /45°C [pH]	Condición 5% CaCO ₃ /37°C [pH]	Condición 5% CaCO ₃ /45°C [pH]
0	6.9	6.9	6.9	6.9
3	6.4	6.6	6.4	6.6
6	5.2	6.1	5.2	6.4
9	5.3	5.3	5.3	5.7
12	5.35	5.45	5.4	5.4
26	5.3	5.4	5.4	5.4
50	5.45	5.5	5.5	5.4
74	5.5	5.5	5.55	5.5

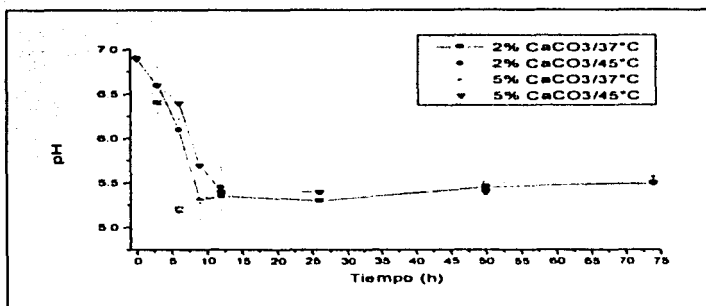


Figura 5. Variación del pH durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del ensayo.

En el ensayo se esperaba probablemente que a una mayor concentración de carbonato de calcio el valor de pH se mantuviera más o menos constante por más tiempo debido al efecto amortiguador del carbonato de calcio en el medio de cultivo. Asimismo se esperaba que las temperaturas de fermentación del ensayo no variaran el valor de pH de manera significativa.

En la Tabla 9 se observa que a la concentración de 2% de carbonato de calcio, hubo una disminución notable en el valor de pH a partir de las 6 horas de fermentación a 37°C y a partir de las 9 horas a 45°C, después de este tiempo el valor de pH tiende a incrementarse ligeramente. A 45°C la acción amortiguadora del carbonato de calcio se favorece por más tiempo. El carbonato de calcio presente en el medio reacciona con los ácidos producidos durante la fermentación dando lugar a la formación de lactatos o acetatos de calcio que permiten mantener constante el pH en el medio de cultivo. El mismo comportamiento se repite a la concentración de 5% de carbonato de calcio, ya que también hubo una disminución apreciable a las 6 horas a 37°C y a las 9 horas a 45°C. Sin embargo, después de este tiempo el valor de pH tiende a disminuir a la temperatura de 45°C.

Por otra parte, si se comparan los valores de pH a la temperatura de 37°C (Tabla 9), se puede apreciar que presentaron los mismos valores en ambas concentraciones de

carbonato de calcio hasta las 9 horas de fermentación, incluso la tendencia en los valores fue la misma (Figura 5). Al comparar los valores de pH a la temperatura de 45°C, se aprecia que los valores de pH son similares a pesar de que la tendencia en los valores no fue la misma ya que a una mayor concentración de carbonato el pH tiende a disminuir hasta el final de la fermentación.

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de acidez durante el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis* II

Tabla 10. Valores de acidez titulable (% ácido láctico) durante el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis* II.

Tiempo (h)	Condición 2% CaCO ₃ /37°C [ml ácido láctico/100 ml de muestra]	Condición 2% CaCO ₃ /45°C [ml ácido láctico/100 ml de muestra]	Condición 5% CaCO ₃ /37°C [ml ácido láctico/100 ml de muestra]	Condición 5% CaCO ₃ /45°C [ml ácido láctico/100 ml de muestra]
0	3.6	3.06	2.93	3.6
3	3.96	3.3	3.96	3.6
6	6.0	4.2	5.7	3.9
9	6.0	4.8	6.0	4.8
12	6.0	5.66	5.15	6.3
26	6.0	5.6	5.15	6.2
50	4.86	6.0	5.4	6.3
74	5.7	4.32	5.04	5.04

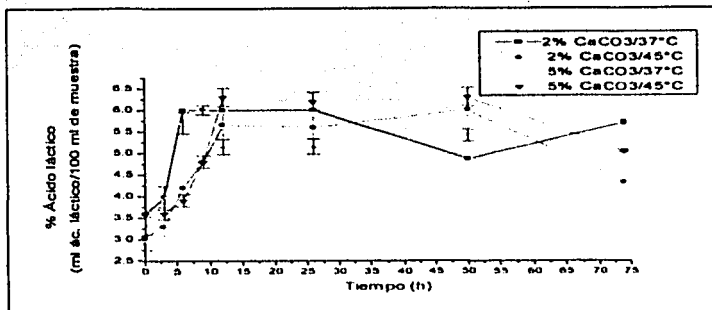


Figura 6. Variación de la acidez titulable durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del ensayo.

En el ensayo se esperaría quizá que a una menor concentración de carbonato de calcio el valor de la acidez fuera mayor durante la fermentación debido a que habría un menor efecto amortiguador del carbonato de calcio en el medio de cultivo.

Como se observa en la Tabla 10, en la concentración de 2% de carbonato de calcio, los valores de acidez titulable fueron mayores a la temperatura de 37°C en comparación a la de 45°C hasta las 12 horas de fermentación, por lo que podría decirse que la cepa presentó una mayor producción de acidez durante su crecimiento a 37°C. De hecho, se aprecia que a partir de las 6 horas de fermentación, la cepa alcanzó una producción máxima de acidez, la cual mantuvo con un valor constante hasta las 12 horas que es la hora de máximo crecimiento celular.

En la concentración de 5% de carbonato de calcio (Figura 6), a la temperatura de 37°C se alcanzó una producción de acidez máxima a las 9 horas de iniciado el proceso fermentativo, después de este tiempo la producción disminuyó. En tanto que, a la temperatura de 45°C la producción de acidez alcanza un valor máximo al momento en el cual se presentó el crecimiento máximo de la cepa (12 horas); cabe mencionar que a 45°C la cepa fue capaz de alcanzar el valor más alto de acidez en comparación con las otras condiciones de fermentación, el cual mantuvo constante hasta las 50 horas de fermentación.

Por otro lado, si se compara la producción de acidez a 37°C (Tabla 10), la producción fue mayor a 2% de carbonato de calcio. A la concentración de 5% de carbonato se alcanzó un valor similar de acidez máxima a las 9 horas de fermentación ; sin embargo, el valor disminuye a la hora de máximo crecimiento celular. A la temperatura de 45°C, existe una mejor producción de acidez a la concentración de 5% de carbonato de calcio donde el valor máximo se presenta junto con el crecimiento máximo de la cepa.

Para realizar un análisis de lo que sucedió durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* mediante el monitoreo de la acidez y pH a lo largo del proceso fermentativo, se presenta una comparación de los valores de crecimiento máximo de la cepa con sus correspondientes valores de pH y acidez durante la fermentación de un sustrato amiláceo a diferentes condiciones de fermentación (Tabla 10).

Tabla 11. Comparación de los valores de pH y acidez en el crecimiento máximo de la cepa *Streptococcus bovis II*.

Condición de fermentación		Tiempo de crecimiento máximo (h)	Tiempo de producción de acidez máxima (h)	Crecimiento máximo (log UFC/ml de muestra)	pH al crecimiento máximo	Acidez al crecimiento máximo (% ácido láctico)
CaCO ₃ (%)	Temperatura (°C)					
2	37	12	6-12	10.49	5.35	6
2	45	12	50	10.51	5.45	5.66
5	37	12	9	10.60	5.40	5.15
5	45	12	12	10.49	5.40	6.3

El tiempo en que se observa el máximo crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* fue a las 12 horas en todas las condiciones de fermentación (Tabla 11). Los valores de crecimiento máximo no difieren mucho entre sí en las cuatro condiciones; sin embargo, las condiciones que presentaron los valores más bajos de crecimiento máximo fueron las que a su vez presentaron los valores más altos de producción de acidez, sobre todo en la condición de 5% de carbonato de calcio y 45 °C, en la cual se presentó el mayor valor de acidez en comparación con las otras condiciones de trabajo. Estos resultados sugieren que la producción de acidez no siempre está asociada al crecimiento.

Asimismo, el aumento de la acidez no se refleja en los valores de pH (Tabla 11), lo que podría deberse al efecto amortiguador del carbonato de calcio.

Con base en lo anterior, se puede decir que la cepa *Streptococcus bovis II* presentó una mayor asimilación del sustrato amiláceo a una mayor concentración de carbonato de calcio (5%) y una mayor temperatura de fermentación (45°C), lo que dio como resultado una mayor producción de acidez.

El carbonato de calcio funcionó como un buffer al adicionarlo al medio de cultivo debido a que neutralizó los ácidos generados durante la fermentación, permitiendo así que la amilasa siguiera degradando al almidón por más tiempo. Asimismo, teniendo el antecedente de que el calcio favorece la actividad amilolítica (Flores,1996), se esperaba que a una mayor concentración de carbonato de calcio se favoreciera la actividad amilolítica de la cepa y aumentara la producción de acidez como resultado de dicha actividad.

Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula de la cepa *Streptococcus bovis II*

La cepa presentó actividad amilolítica como se observó en los ensayos de crecimiento. La actividad específica extracelular y asociada a la célula de la cepa *Streptococcus bovis II* se determinó en función de la cantidad de azúcares reductores obtenidos del almidón por Unidades Formadoras de Colonias (UFC)(Figuras 7 y 8).

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la actividad amilolítica específica extracelular durante el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis II*

En la Figura 7 se aprecia que la actividad amilolítica extracelular de la bacteria se vio ligeramente afectada tanto por la temperatura como por la concentración de carbonato de calcio contenido en el medio de cultivo. En todas las condiciones se presentó la actividad máxima a las 3 horas de fermentación, después de esta hora la actividad disminuyó.

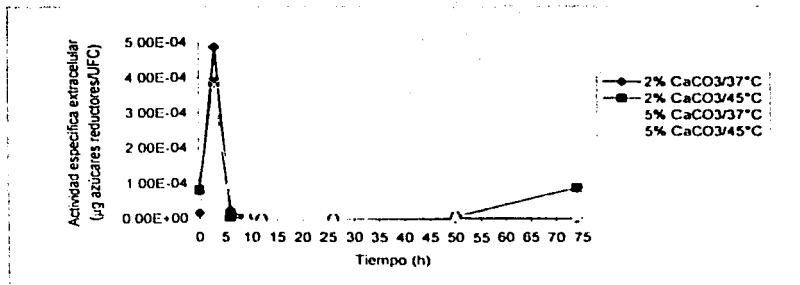


Figura 7. Actividad amilolítica específica extracelular. Variación de la actividad amilolítica extracelular durante el crecimiento de la cepa *Strop. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del ensayo.

La actividad amilolítica extracelular se vio favorecida en la condición de 2% de carbonato de calcio y 37°C (Figura 7), por lo que en esta condición, fue donde se presentó la mayor actividad de la amilasa en comparación con las demás condiciones de fermentación. En cambio, a la concentración de 5% de carbonato de calcio la actividad máxima de la cepa fue mejor a 45°C.

Por lo tanto, podemos decir que la mayor actividad amilolítica extracelular de la cepa se presentó a las 3 horas de fermentación para todas las condiciones, viéndose favorecida a la condición de 2% de carbonato de calcio y 37°C.

La actividad amilolítica extracelular máxima de la cepa se presentó al inicio de la fase exponencial de crecimiento (3 horas), después la actividad disminuyó o se inhibió, esto probablemente se debió a la presencia de proteasas que el mismo microorganismo generó para su crecimiento o bien por la presencia de ácidos (láctico, acético y fórmico) generados durante el metabolismo de carbohidratos.

Dicho comportamiento corresponde a que el microorganismo generó amilasas capaces de hidrolizar el almidón soluble en el medio y los productos de hidrólisis constituyeron la fuente de carbono que el microorganismo utilizó para crecer y por esa razón la actividad máxima de la amilasa se presentó al inicio de la fase exponencial de crecimiento de la cepa.

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la actividad amilolítica específica asociada a la célula durante el crecimiento de la cepa *S. bovis II*

En la Figura 8 se observa que la actividad amilolítica asociada a la célula se vio afectada tanto por la temperatura como por la concentración de carbonato de calcio contenido en el medio de cultivo. En todas las condiciones se presentó la actividad máxima a las 3 horas de fermentación, después de esta hora la actividad disminuye.

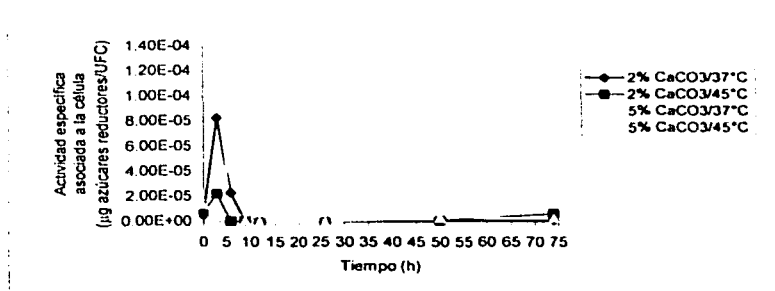


Figura 8. Actividad amilolítica específica asociada a la célula. Variación de la actividad específica asociada a la célula durante el crecimiento de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del ensayo.

A la concentración de 2% de carbonato de calcio (Figura 8), la actividad máxima se vio favorecida a la temperatura de 37°C; sin embargo no es el valor más grande de actividad que presentó la cepa. En cambio a la concentración de 5% de carbonato de calcio, la temperatura de 45°C favoreció la actividad de la amilasa y fue la condición a la que se presentó la mayor actividad amilolítica asociada a la célula en comparación con las demás condiciones de fermentación; asimismo a las 6 horas de fermentación la actividad amilolítica no disminuye de igual manera al compararse con la actividad amilolítica extracelular. Cabe señalar que el valor de la actividad a las 6 horas fue superior incluso al valor máximo de actividad que presentaron las demás condiciones de fermentación.

Por lo tanto, se puede decir que la actividad amilolítica asociada a la célula se presentó a las 3 horas de fermentación para todas las condiciones y se vio favorecida a la concentración de 5% de carbonato de calcio a la temperatura de 45°C.

En la Tabla 12 se pueden apreciar los valores de actividad amilolítica máxima extracelular y asociada a la célula.

Tabla 12. Valores máximos de actividad amilolítica específica (AAE) de la cepa *Streptococcus bovis II*.

Condición de fermentación		Tiempo de actividad máxima (h)	AAE extracelular (μg de azúcares reductores/ UFC) ($\times 10^4$)	AAE asociada a la célula (μg de azúcares reductores/ UFC) ($\times 10^4$)
CaCO ₃ (%)	Temperatura (°C)			
2	37	3	4.88	0.83
2	45	3	3.87	0.23
5	37	3	3.11	0.99
5	45	3	3.81	1.34

En lo que respecta a la actividad máxima extracelular, en general, la mayor actividad amilolítica se presentó a las 3 horas de fermentación; la mayor actividad se presentó a la concentración de 2% de carbonato de calcio a la temperatura de 37°C (Tabla 12). Como se ha mencionado con anterioridad, el carbonato de calcio funciona como un buffer al adicionarlo al medio de cultivo debido a que neutraliza los ácidos que se van generando durante el proceso fermentativo, permitiendo así que la enzima siga degradando el almidón por más tiempo.

Se sabe que el calcio favorece la actividad amilolítica (Nakamura, 1981; Sen y Chakrabarty, 1984; Pompeyo et al, 1993; Flores, 1996; ben Omar y Ampe, 2000); sin embargo en este caso se vio favorecida a la concentración de 2% de carbonato de calcio, probablemente a una mayor concentración de carbonato la actividad extracelular se ve un poco inhibida.

La temperatura mostró una influencia importante, pues la actividad extracelular se vio favorecida a 37°C a la menor concentración de carbonato de calcio, es decir que la

amilasa excretada al medio de cultivo no requirió de una mayor temperatura y una mayor concentración de carbonato de calcio para llevar a cabo la hidrólisis del almidón.

En lo que se refiere a la actividad máxima asociada a la célula, la actividad se vio favorecida a las 3 horas de fermentación a la concentración de 5% de carbonato de calcio a una temperatura de 45°C (Tabla 12). Por lo que se podría decir que a una mayor concentración de carbonato de calcio, la amilasa requiere de una mayor temperatura para poder llevar a cabo la hidrólisis del almidón.

La función amortiguadora del carbonato de calcio en el medio de cultivo favoreció a la actividad amilolítica que presentó la bacteria, y en este caso, la actividad asociada a la célula fue mayor a una mayor concentración del buffer y a una mayor temperatura de fermentación, todo lo contrario a lo que se obtuvo en la actividad extracelular de la amilasa.

Los valores de actividad extracelular son superiores a los obtenidos en la actividad asociada a la célula probablemente porque la bacteria primero produce la amilasa y luego la excreta al medio donde se encuentra soluble el sustrato, los productos de hidrólisis de almidón generados por la actividad de la enzima son aprovechados por la bacteria e introducidos a la célula donde también hay amilasas que actúan sobre dichos productos de hidrólisis de almidón los cuales son utilizados como fuente de energía para el crecimiento de la bacteria.

Determinación de ácido L-láctico (L-lactato) producido por la cepa *Streptococcus bovis* II

La determinación de L-lactato se hizo tanto al sobrenadante como al precipitado de las muestras obtenidas durante el crecimiento (fase exponencial de crecimiento) de la cepa de *Streptococcus bovis* II a diferentes condiciones de fermentación.

Los valores obtenidos del ácido L-láctico, el cual más bien se encuentra en forma de L-lactato en las muestras, se expresaron en μg de L-lactato/L de muestra (Figuras 9 y 10).

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de L-lactato en el sobrenadante durante el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis* II

En la Figura 9 se nota que tanto la temperatura como la concentración de carbonato de calcio tuvieron influencia en la producción de L-lactato en el sobrenadante durante el crecimiento de la cepa.

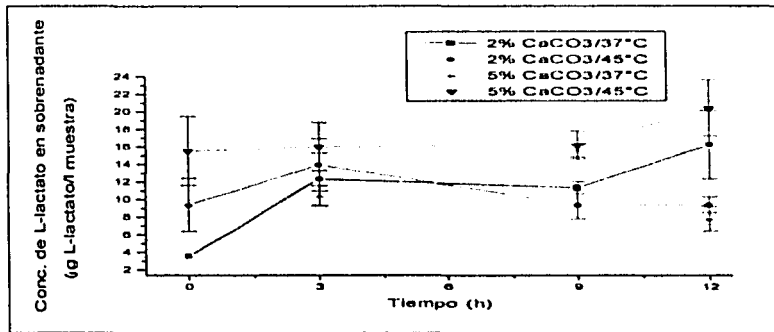


Figura 9. Muestras del sobrenadante. Variación de la concentración de L-lactato en muestras del sobrenadante obtenidas durante el crecimiento de la cepa de *Strep. bovis* II a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del análisis de las muestras.

A la concentración de 2% de carbonato de calcio (Figura 9), a la temperatura de 37°C la producción máxima de L-lactato se alcanzó en el tiempo de crecimiento máximo de la cepa (12 horas) y dicho valor fue superior comparado con el valor máximo de producción del lactato a la temperatura de 45°C. En cambio, a 45 °C el valor máximo se obtuvo a las 3 horas de fermentación lo que coincide con el tiempo de actividad

máxima de la amilasa. A 37°C (Figura 9), se aprecia que la tendencia en los valores fue aumentar conforme al crecimiento de la bacteria. A 45 °C, se presentaron valores constantes de L-lactato durante la fase de crecimiento excepto a las 3 horas, tiempo en el cual se alcanzó el valor máximo de producción del lactato.

En la concentración de 5% de carbonato de calcio (Figura 9), los valores máximos de producción de L-lactato durante el crecimiento de *Strep. bovis II* se obtuvieron a la temperatura de 45°C (Figura 9). A las 3 horas, cuando se presentó la actividad máxima de la amilasa, la producción de L-lactato fue mayor a 45°C, mientras que a 37°C se presentó el menor valor de producción en comparación con las demás condiciones de fermentación. A las 12 horas, que es el tiempo de crecimiento máximo de la bacteria, se presentó la misma tendencia, es decir, a 45°C se obtuvo el valor máximo de concentración de L-lactato y a 37°C el valor mínimo de concentración de L-lactato.

La producción a 45°C presentó valores ascendentes desde el inicio del crecimiento y hasta el final del mismo, es decir, que en esta condición de fermentación, la producción de L-lactato aumenta conforme al crecimiento de la cepa.

Al comparar la producción de L-lactato a 37°C, se observa (Figura 9) que a las 3 horas, donde se presenta la actividad máxima de la amilasa, la producción de L-lactato es mejor a 2% de carbonato de calcio, y lo mismo sucede a las 12 horas cuando se presenta el crecimiento máximo.

Influencia de la temperatura y del carbonato de calcio sobre la producción de L -lactato en el precipitado durante el crecimiento de la cepa Streptococcus bovis II

En la Figura 10 se ve que tanto la temperatura como la concentración de carbonato de calcio influyeron en la producción de L-lactato. A las 3 horas (actividad máxima de la amilasa), la mayor producción de L-lactato se obtuvo en la condición de mayor concentración de carbonato y 37°C de temperatura de fermentación. Sin embargo, a las 12 horas (crecimiento máximo de la cepa) la producción se favoreció a una menor concentración de carbonato de calcio a la misma temperatura de fermentación.

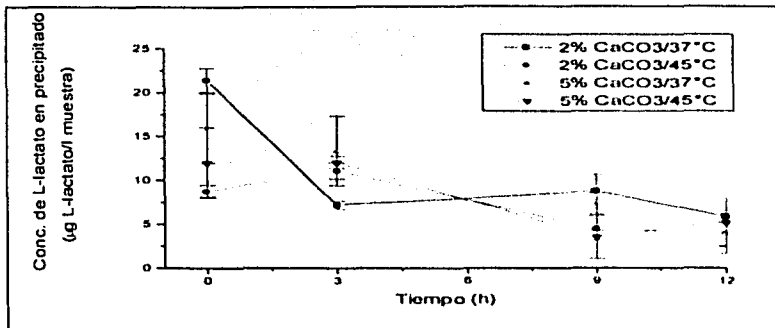


Figura 10. Muestras del precipitado. Variación de la concentración de L-lactato en muestras del precipitado obtenidas durante el crecimiento de la cepa de *Strop. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación. Los valores graficados son el promedio del triplicado del análisis de las muestras.

A una concentración de 2% de carbonato de calcio, la producción se vio favorecida a 45 °C al tiempo de máxima actividad amilolítica de la cepa (3 horas); después de este momento el valor disminuye en ambas temperaturas, es decir, que en el tiempo de crecimiento máximo de la cepa (12 horas) la cantidad de L-lactato presentó el valor más bajo. La producción de L-lactato no estuvo relacionada con el crecimiento de la bacteria.

A 5% de carbonato de calcio, a las 3 horas de fermentación, la producción de L-lactato se vio favorecida a 37°C. De igual manera, la concentración de L-lactato disminuye conforme la bacteria crece.

Asimismo, si se compara la producción de L-lactato a 37°C, a las 3 horas de fermentación la producción se mejora a la concentración de 5% de carbonato de calcio, no obstante, en el tiempo de crecimiento máximo los valores de L-lactato son los más bajos en ambas concentraciones de carbonato. La producción de L-lactato a 45°C, fue mejor a 5% de carbonato de calcio en comparación con la concentración de 2% tanto a las 3 horas como a las 12 horas de fermentación.

Con lo anterior se puede decir que en las muestras del sobrenadante se aprecia que a las condiciones de 2% de carbonato de calcio y 37°C y 5% de carbonato de calcio y 45°C, los valores máximos de concentración de L-lactato lo alcanzan a la hora de crecimiento máximo, sobretodo en la condición de 5% de carbonato de calcio y 45°C. Por otro lado, en muestras del precipitado los valores de concentración máxima de L-lactato se presentan en el tiempo de actividad máxima de la amilasa en las condiciones de mayor concentración de carbonato, sobretodo a la temperatura de 37°C. Por lo tanto, esto sugiere que la producción de L-lactato no está relacionada con el crecimiento de la bacteria, pero sí está relacionada con la actividad máxima de la amilasa.

Los valores de las muestras del precipitado fueron menores en comparación a los del sobrenadante, esto probablemente se deba a que con la técnica sugerida en el kit no fue posible dar un tratamiento adecuado a este tipo de muestras para cuantificar al ión L-lactato y por eso se obtuvieron valores bajos en el precipitado. Por lo tanto sería conveniente probar otras técnicas para llevar a cabo la determinación del L-lactato en el precipitado para este tipo de muestras, como por ejemplo, probar hacer modificaciones a la técnica que se utilizó en este trabajo y que fue sugerida por laboratorios Roche diagnostics en el kit no. 139084, o bien validar una técnica por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Relación entre el crecimiento y la producción de acidez total, actividad amilolítica y concentración de L-lactato de la cepa *Streptococcus bovis* II

En las Figuras 11-15 se muestra la relación que existe entre el crecimiento y cada uno de los parámetros de estudio como son la acidez total, actividad amilolítica y concentración de L-lactato a las diferentes condiciones de fermentación.

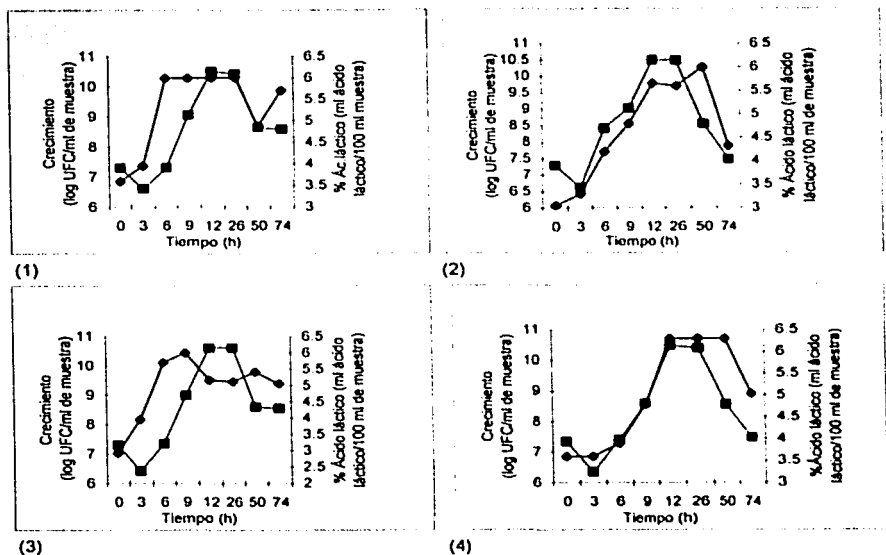


Figura 11. Producción de acidez total. Relación entre el crecimiento y la producción de acidez (% ácido láctico) de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación: (1) 2%CaCO₃/37°C; (2) 2%CaCO₃/45°C; (3) 5%CaCO₃/37°C; (4) 5%CaCO₃/45°C. ■ Crecimiento, ● Acidez titulable.

Se aprecia que existe una relación en la producción de acidez total y el crecimiento de la cepa. En particular, si se observa el comportamiento de la acidez durante el crecimiento, se puede decir que existe una relación más estrecha en la condición de mayor concentración de carbonato de calcio y una mayor temperatura de fermentación, donde se alcanza el valor mayor tanto del crecimiento como de la acidez. Lo que se observa es que conforme la bacteria crece se van generando metabolitos como los ácidos orgánicos los cuales son los responsables de la acidez del medio de cultivo. Por lo tanto, la producción de acidez de la cepa *Strep. bovis II* resultó óptima, en comparación a las otras condiciones de fermentación, en la condición de 5% de carbonato de calcio y 45°C de temperatura.

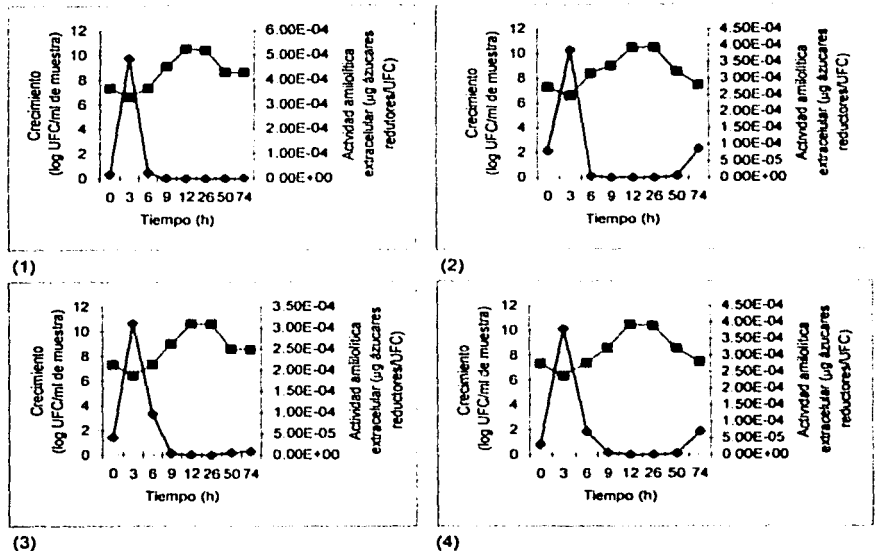


Figura 12. Actividad amilolítica extracelular. Relación entre el crecimiento y la actividad amilolítica extracelular de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación: (1) 2%CaCO₃/37°C; (2) 2%CaCO₃/45°C; (3) 5%CaCO₃/37°C; (4) 5%CaCO₃/45°C. ■ Crecimiento, ● Actividad amilolítica extracelular.

El comportamiento de la actividad a lo largo de la fermentación es el mismo en todas las condiciones de trabajo. Sin embargo, sí se aprecia que a una mayor concentración de carbonato de calcio la actividad no disminuye de igual manera a las 6 horas de fermentación. Se ve que la actividad no está en función del crecimiento, lo importante de esto es que la actividad se da en el tiempo en que la bacteria comienza su crecimiento, esto resulta lógico ya que la bacteria para poder crecer necesita producir amilasas que le permitan asimilar el almidón del medio y así poder llevar a cabo los procesos vitales para su crecimiento.

Al momento del crecimiento máximo de la bacteria casi no se aprecia actividad de la amilasa y esto es porque en este momento la acidez en el medio es grande,

provocando que la actividad de la amilasa se inhiba. El hecho de que a una mayor concentración de carbonato de calcio la actividad a las 6 horas es mayor que a una menor concentración de carbonato, se debe a que a una mayor concentración de carbonato se neutraliza una mayor cantidad de ácidos por lo que la actividad se ve favorecida por más tiempo. Por lo tanto puede decirse que el efecto de adicionar una mayor concentración de buffer (carbonato de calcio) al caldo de fermentación favoreció la actividad amilolítica de la cepa *Strep. bovis II*.

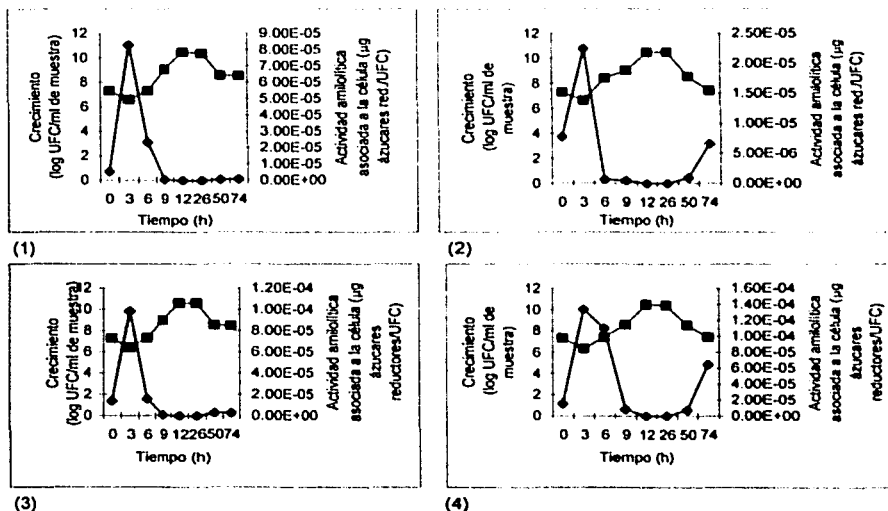


Figura 13. Actividad amilolítica asociada a la célula. Relación entre el crecimiento y la actividad amilolítica asociada a la célula de la cepa *Strep. bovis II* a diferentes condiciones de fermentación: (1) 2%CaCO₃/37°C; (2) 2%CaCO₃/45°C; (3) 5%CaCO₃/37°C; (4) 5%CaCO₃/45°C. ■Crecimiento, ♦ Actividad amilolítica asociada a la célula.

Existe una ligera diferencia en el comportamiento de la actividad, pues a pesar de que el comportamiento es el mismo comparado con el de la actividad extracelular, difiere en que a las 6 horas la actividad no disminuye tanto en todas las condiciones de

fermentación, excepto en la condición de 2% de carbonato de calcio y 37° C, sin embargo, en general los valores de actividad siguen siendo inferiores en comparación con la actividad extracelular; no obstante, cabe mencionar que la condición que presenta los mejores valores de actividad asociada a la célula es la condición de 5% de carbonato de calcio y 45° C.

Esto sugiere que una mayor concentración del carbonato propicia una mejor actividad amilolítica tanto extracelular como asociada a la célula y en especial a una mayor temperatura de fermentación.

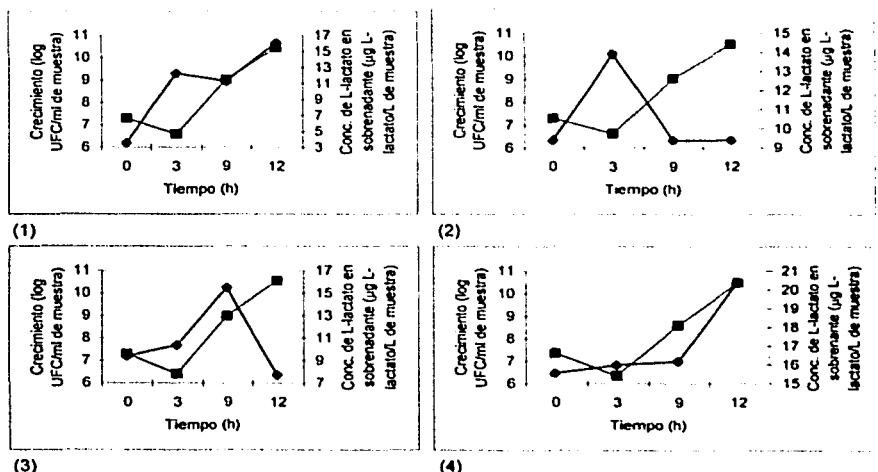


Figura 14. Concentración de L-lactato en muestras del sobrenadante. Relación entre el crecimiento y la concentración de L-lactato en muestras del sobrenadante de la cepa *Strep. bovis* // a diferentes condiciones de fermentación: (1) 2%CaCO₃/37°C; (2) 2%CaCO₃/45°C; (3) 5%CaCO₃/37°C; (4) 5%CaCO₃/45°C. ■ Crecimiento, ● Concentración de L-lactato.

En general, se puede decir que hay una relación con el crecimiento en las condiciones de menor concentración de carbonato de calcio y una menor temperatura de fermentación o bien una mayor concentración de carbonato y una mayor temperatura de fermentación. En especial a la condición de 5% de carbonato de calcio y 45° C, la

correlación que existe es mayor y es la condición a la cual se alcanzan los valores más altos de concentración de L-lactato desde la hora en que inicia el crecimiento celular llegando a un máximo a la hora de crecimiento máximo. Estos datos coinciden con los resultados de correlación del crecimiento con la producción de acidez total expresada como porcentaje de ácido láctico. Esto quiere decir que la bacteria crece bien y presenta valores máximos de actividad amilolítica, acidez y concentración de L-lactato a una mayor concentración de carbonato de calcio y una mayor temperatura de fermentación.

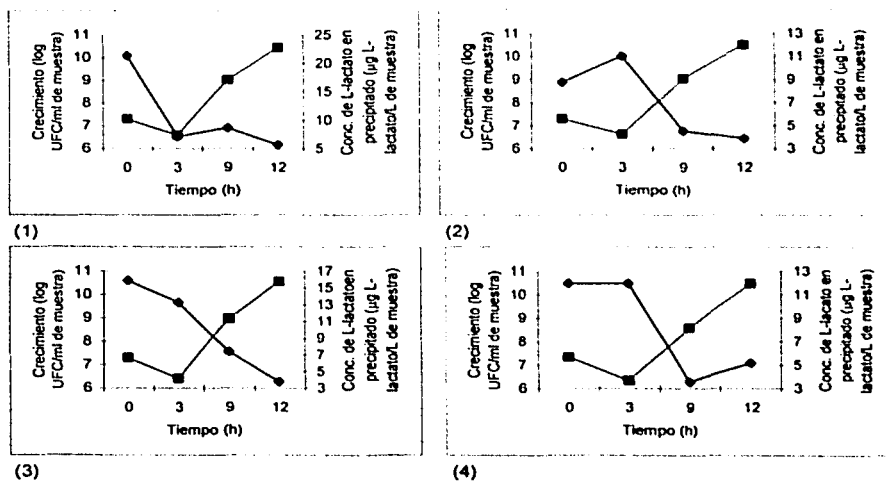


Figura 15. Concentración de L-lactato en muestras del precipitado. Relación entre el crecimiento y la concentración de L-lactato en muestras del precipitado de la cepa *Strep. bovis* // a diferentes condiciones de fermentación: (1) 2%CaCO₃/37°C; (2) 2%CaCO₃/45°C; (3) 5%CaCO₃/37°C; (4) 5%CaCO₃/45°C.

■ Crecimiento, ◆ Concentración de L-lactato.

En general, la concentración de L-lactato en el precipitado fue menor que en el sobrenadante, en este caso en particular, los resultados no son los esperados, pues se esperaría que en el precipitado gran parte del ácido se encontrara como lactato de calcio debido a la gran cantidad de carbonato de calcio presente en el medio; sin

embargo, es probable que no se haya podido separar adecuadamente el lactato mediante la técnica seguida en el presente estudio y por lo tanto las cantidades resultantes de L-lactato están subestimadas en comparación con lo que se esperaría tener en este tipo de muestras. Pareciera que la concentración de L-lactato disminuye conforme aumenta el crecimiento de la cepa, en las gráficas se observa que a la temperatura de 45° C tanto a 2% como a 5% de carbonato de calcio el valor máximo de L-lactato se presenta a las 3 horas de fermentación donde se da la mayor actividad amilolítica.

Los valores de concentración de L-lactato tienden a disminuir conforme van aumentando los valores de crecimiento, no obstante se da una excepción en la condición de 5% de carbonato y 45° C donde el valor de concentración del lactato aumenta en el tiempo de mayor crecimiento de la bacteria.

Como se dijo anteriormente, es muy probable que no se haya separado adecuadamente el lactato y por lo tanto los valores obtenidos en la cuantificación estén subestimados, por lo tanto resulta necesario hacer una modificación al método utilizado para cuantificar de manera adecuada al L-lactato en muestras de sistemas complejos como los que se trataron en el presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas (API 50 CH y API 20 Strep) la cepa láctica con mayor actividad amilolítica fue identificada como *Streptococcus bovis II*, la cual fue aislada de pozol proveniente de Villahermosa, Tabasco.

Se determinó el crecimiento de la cepa *Streptococcus bovis II* a dos concentraciones de carbonato de calcio y a dos temperaturas de fermentación. La cepa fue capaz de crecer de igual manera en todas las condiciones a las que se llevó a cabo la fermentación.

Se determinó la actividad amilolítica extracelular y asociada a la célula de la cepa *Streptococcus bovis II* a las diferentes condiciones de fermentación. La condición de fermentación de 5% de carbonato de calcio y 45°C fue la más favorable para ambas actividades amilolíticas.

Se cuantificó la producción de ácido láctico (L-lactato) a partir de un sustrato amiláceo utilizando la cepa *Streptococcus bovis II* en muestras de sobrenadante obtenidas durante el crecimiento de la cepa a las diferentes condiciones de fermentación. La producción de L-lactato se vio favorecida en la condición de fermentación de 5% de carbonato de calcio y 45°C.

La condición de fermentación de 5% de carbonato de calcio y 45°C de temperatura utilizando la cepa aislada de pozol *Streptococcus bovis II* resultó la más favorable para: el crecimiento, la producción de acidez, la actividad amilolítica y la producción de ácido láctico (L-lactato) a partir de un sustrato amiláceo (almidón de papa al 1%).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. RECOMENDACIONES

Se requiere la modificación de técnicas para la determinación de ácido láctico en sistemas complejos que involucran la fermentación de un sustrato amiláceo.

Continuar el estudio de la caracterización de amilasas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales, en especial de la amilasa de *Streptococcus bovis II*, ya que por sus aplicaciones constituye una alternativa para la obtención de productos deseables, como el ácido láctico, que pueden ser utilizados por la industria alimentaria en nuestro país.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Composición del medio MRS almidón (de Man, Rogosa, Sharpe) conteniendo 1% de almidón soluble de papa:

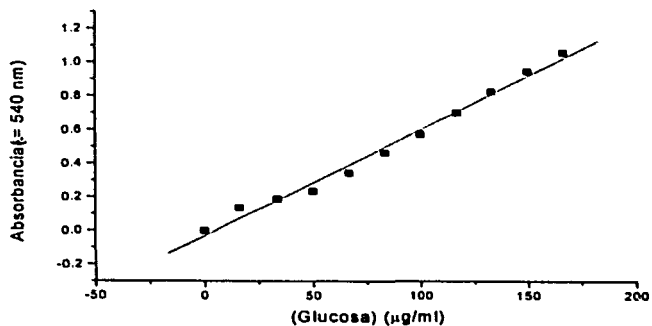
<i>Fórmula</i>	<i>g/L</i>
Peptona bacteriológica (Oxoid L37)	10.0
Polvo Lab-Lemco (Oxoid L29)	8.0
Extracto de levadura (Bioxon 155-3)	4.0
Almidón soluble de papa (J.T. Baker 0430)	10.0
Sorbitán monooleato (Tween 80) (Sigma 559)	1 ml
Fosfato de potasio dibásico (Técnica Química 1260)	2.0
Acetato de sodio trihidratado (J.T. Baker 3460-01)	5.0
Citrato de amonio dibásico (J. T. Baker 0682)	2.0
Sulfato de magnesio heptahidrato (J.T. Baker 2500-01)	0.2
Sulfato de manganeso monohidrato (J.T. Baker 0550-20)	0.05
Agar bacteriológico (Bioxon 150-1)	10.0

pH 6.2 ± 0.2

Apéndice 2. Valores obtenidos de curva patrón de azúcares reductores para la determinación de la actividad amilolítica:

Agua destilada (ml)	Solución stock de glucosa 0.5 mg/ml (ml)	Concentración de glucosa ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia ($\lambda = 540 \text{ nm}$)
3.0	0.0	0.0	0.000
2.9	0.1	16.6	0.136
2.8	0.2	33.3	0.187
2.7	0.3	50.0	0.234
2.6	0.4	66.6	0.343
2.5	0.5	83.3	0.460
2.4	0.6	100.0	0.572
2.3	0.7	116.6	0.701
2.2	0.8	133.3	0.827
2.1	0.9	150.0	0.947

Curva patrón de azúcares reductores



Datos de regresión lineal: $y = 6.34E-3x - 0.0313$ $r^2 = 0.994$

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler-Nissen J, Demain AL. 1994. Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations. *J. Ind. Microbiol.* 13:335-43.
2. Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP. 1999a. Polyphasic study of spatial distribution of microorganism in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Enviromental Microbiology.* 65 (12): 5464-73.
3. Ampe F, ben Omar N, Guyot JP. 1999b. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a mexican lactic acid fermented maize dough. *J Appl Microbiol.* 87(1): 131-40.
4. ben Omar N, Ampe F. 2000. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Enviromental Microbiology.* 66 (9):3664-73.
5. Bressani R.1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev. Int.* 6: 225-64.
6. Burge RM, Duensing WJ. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Food World.* 34: 535-38.
7. Cabra LV. 2000. Estudio cinético comparativo de la fermentación de masa de pozol elaborada en dos condiciones higiénicas distintas. *Tesis de Licenciatura.* Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 90 pp.
8. Caplice E, Fitzgerald GF. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 50 (1-2): 131-49.
9. Datta R, Tsai SP, Patrick B, Moon SH, Frank JR. 1993. Technological and economic potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *In: International Congress on Chemicals from Biotechnology, Hannover, Germany.* p. 1-18.
10. de Man J, Rogosa N and Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 23:130-5.

11. Escalante A, Wachter-Rodarte C, Farrés A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol.* **64** (1-2): 21-31.
12. Escamilla-Hurtado ML, Mozqueda-González, E. 1992. Fermentación láctica en pozol, una bebida mexicana de maíz. *Tecnol. Aliment (Méx).* **27** (1-3): 37-41.
13. FAO 1993. El maíz en la nutrición humana. En: *Colección FAO: Alimentación y nutrición*, no. 25. Roma, Italia.
14. Fausto F, Dias D. 1997. Starch and starch derivatives in India. *Starch/Starke.* **49** (9): 338-40.
15. Fenema, OR. 1993. Química de los Alimentos. *Ed. Acribia*, Zaragoza, España, p.65-9,130-4.
16. Flores T. 1996. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas de pozol. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F., 88 pp.
17. Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M, Mercenier A. 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol.* **66** (1): 383-91.
18. Giraud E, Brauman A, Keleke S, Lelong B, Raimbault M. 1991. Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **36**: 379-83.
19. Halm M, Lillie A, Sorensen AK, Jakobsen M. 1993. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int J Food Microbiol.* **19** (2): 135-43.
20. Hesseltine CW. 1979 Some important fermented food of mid-Asia, the middle East and Africa. *J Am Oil Chem Soc.* **56**: 367-74.
21. Herrera T, Ulloa M. 1970. General aspects of the microbiology of pozol. *Rev Latinoam Microbiol.* **12**(2): 103-8.
22. Hugenholtz J, Kleerebezem M. 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr Op Biotech.* **10**(5): 492-7.

23. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. 1971. Harinas precocidas de cereales. Primera fase. *Informe preparado para la OEA*. Bogotá, Colombia, pp. 27-39.
24. Jay JM. 1996. Modern food microbiology. 5th Edition, *Ed. Chapman and Hall*, New York.
25. Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49: 209-24.
26. Litchfield, JH. 1996. Microbial production of lactic acid. *Adv Appl Microbiol*. 42: 45-95.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-75.
28. Miller, GL. 1959. Use of 3,5-Dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 31: 426-28.
29. McKay LL, Baldwin KA. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 7 (1-2): 3-14.
30. Nakamura LK. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31(1): 56-63.
31. Nuraida L. 1988. Studies on microorganisms isolated from pozol, a mexican fermented maize dough. *MSc thesis*. Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, UK, 237 pp.
32. Nuraida L, Wacher C, Owens JD. 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World J Microbiol Biotechnol*. 11: 567-71.
33. Oke OL. 1967. Chemical studies on the Nigerian foodstuff *ogi*. *Food Technol*. 21: 202-4.
34. Olsen A, Halm M, Jakobsen M. 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J Appl Bacteriol*. 79(5): 506-12.
35. Páez GS, Ramírez OJG. 1988. Producción de ácido láctico a partir de un hidrolizado enzimático de papa. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 72 pp.

36. Paredes O, Harry GI. 1988. Food biotechnology review: traditional solid-state fermentations of plants raw materials—application, nutritional significance and future prospects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 27(3): 159-87.
37. Pompeyo C, Suárez M, Gasparian S, Morlon-Guyot J. 1993. Comparison of amyolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* an of *Lactobacillus amylophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40: 266-9.
38. Ramírez JF. 1987. Biochemical studies on a mexican fermented corn food-pozol. *PhD thesis*. Faculty of the Graduate School, Cornell University, NY, 176 pp.
39. Rodríguez OF. 1972. Producción industrial, mercadeo y distribución de masa de maíz para la preparación de arepas en Venezuela. En: R. Bressani JE, Baham y M Behar, Eds. *Mejoramiento nutricional del maíz*. Pub. INCAP L-3, p. 109-14, Guatemala, INCAP.
40. Secretaría de Economía. Importaciones y exportaciones de ácido láctico en México de 1995 a 2000. México, D.F.
41. Sen S, Chackavarty SL. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J Ferment Technol.* 62 (5): 407-13.
42. Silva-Villareal EC. 1984. Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol en Tapachula Chiapas. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, 44 pp.
43. Steinkraus KH. 1983. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49 (3): 337-48.
44. Stiles ME, Holzapfel WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36(1): 1-29.
45. Tseng CP, Montville TJ. 1993. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol Prog.* 9:113-21.
46. Ulloa M. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Bol Soc Mex Mycol.* 8:17-48.
47. Ulloa M, Herrera T. 1976-1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pukue, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología, UNAM. Serie botánica.* 47-53:145-63.

48. Ulloa M, Herrera T, Taboada J. 1983. Mexican pozol. En: **Handbook of indigenous fermented foods**. KH Steinkraus. Ed. Marcel Dekker, NY, pp 226-33.
49. Vickroy TB. 1985. Lactic acid. **In: Moo-Young (Ed) Comprehensive Biotechnology**. 3:761-76.
50. Vishnu C, Seenaya G, Reddy G. 2000. Direct conversion of starch to L(+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. **Bioprocess Engineering**. 23:155-58.
51. Wachter C. 1995. Estudios sobre la microbiología del pozol. **Tesis de Doctorado**. UNAM, México D.F., 173 pp.
52. Watson SA. 1987. Structure and composition of corn. **In: SA Watson and PE Ramstad. Eds. Corn: Chemistry and Technology. Am Assoc Cereal Chem.**, p. 53-82.