



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE AMILASAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS  
LÁCTICAS AMIOLÍTICAS AISLADAS DE POZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A:  
GABRIEL BALDEMAR SORIANO RODRÍGUEZ



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F.

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:**

<b>Presidente</b>	Prof. Aguilar Caballero Raúl.
<b>Vocal</b>	Prof. Wachter Rodarte María Del Carmen.
<b>Secretario</b>	Prof. Ruíz Terán Francisco.
<b>1er. Suplente</b>	Prof. Baez Fernández Marcos Francisco.
<b>2do. Suplente</b>	Prof. Salazar Zazueta Alfredo.

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio 321 del edificio "E" del Depto. de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del tema:** Dr. Ruíz Terán Francisco



**Sustentante:** Soriano Rodríguez Gabriel  
Baldemar



## **AGRADECIMIENTOS:**

**Agradezco especial y profundamente al Dr. Francisco Ruíz Terán por la oportunidad que me brindó al participar con él, por su total apoyo para la realización de este trabajo y por su amistad y enseñanzas que valoraré por siempre.**

**A la Dra. Carmen Wachter, por su interés y ayuda tan importantes brindados para la realización de este trabajo. Gracias**

**También agradezco sinceramente la colaboración de todas aquellas personas que estuvieron involucradas para la realización de este trabajo: Gloria Díaz, Julieta Guillen, Rocío Santillán, Sandra Pérez, Idalia Flores y Juan Guzmán. Gracias a todos.**

**A mis padres:**

Gabriel y Sotera

A ti, papá, por brindarme tu apoyo y cariño incondicionales, por tus buenos consejos, por tantos momentos que has hecho divertidos y por permitirme compartir este momento tan importante contigo del cual tienes mucho que ver para su realización.

A ti, mamá, porque con amor y esmero te has preocupado en todo momento por el bienestar de tus hijos, enseñándonos a diferenciar entre lo bueno y lo malo, dándonos siempre lo mejor de tu vida.

Los amo.

**A mi hermano:**

Angel, gracias por tu cariño, tu apoyo, tus ejemplos de superación y sobre todo por hacer más fácil el mantener unida nuestra familia. Te quiero.

**A Edith:**

Gracias por confiar en mi, por los momentos inolvidables que hemos compartido y por permitir este sentimiento que nos une. Te adoro. *amor de mi vida*

**A mis primos:**

Mario y Cristian, por tantos recuerdos de juegos, risas y travesuras, gracias por haber compartido su infancia con la mía y porque sé que siempre podré contar con ustedes; los quiero.

**A mis amigos:**

Jasso, Enrique, Pepe, Edel, Abigail, Pablo, Selene, Ivonne  Lucero, Julio, Leticia, Aliesha y a todos mis compañeros y amigos de generación por su amistad y apoyo durante esta etapa importante de nuestras vidas que juntos compartimos.

A mis compañeros de laboratorio: Abigail, Isabel, Nelly, Juan, Gabriel, Erika, Lucía y Tere por su amistad e ilimitada ayuda.

# ÍNDICE

CONTENIDO	Página
INTRODUCCIÓN .....	1
GENERALIDADES	
<b>Características generales del almidón .....</b>	<b>3</b>
Descripción .....	3
Amilosa .....	3
Amilopectina .....	4
<b>Amilasas .....</b>	<b>4</b>
Tipos de amilasas y modos de acción .....	4
Amilasas mas estudiadas .....	6
Medición de la actividad .....	7
<b>Alimentos fermentados .....</b>	<b>8</b>
Ventajas de los alimentos fermentados .....	9
<b>Bacterias ácido lácticas .....</b>	<b>10</b>
Bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados .....	12
Pozol .....	13
OBJETIVOS	
<b>Objetivo general .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>14</b>

## MATERIALES Y METODOS

<b>Microorganismos</b> .....	15
<b>Bacterias ácido lácticas amilolíticas</b> .....	15
<b>Fermentación</b> .....	16
<b>Desarrollo de las bacterias lácticas amilolíticas</b> .....	16
<b>Lavado de las células</b> .....	17
<b>Inoculación de medios de cultivo para la fermentación</b> .....	17
<b>Medición de la actividad amilolítica</b> .....	17
<b>Mezcla de reacción</b> .....	17
<b>Determinación de la concentración de proteína</b> .....	18
<b>Definición de unidades de actividad amilolítica</b> .....	19
<b>Purificación de la enzima</b> .....	19
<b>Precipitación con sulfato de amonio</b> .....	19
<b>Diálisis</b> .....	19
<b>Determinación de constantes cinéticas</b> .....	20
<b>Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad enzimática</b> .....	20

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

**Fermentación .....21**

**Concentración de la enzima .....30**

**Determinación de constantes cinéticas .....33**

**Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad enzimática .....41**

**CONCLUSIONES .....49**

**APÉNDICE .....50**

**BIBLIOGRAFIA ..... 52**

## I. INTRODUCCIÓN

La microflora láctica juega un papel muy importante en la preparación de alimentos fermentados tradicionales en todo el mundo. Los beneficios que estos microorganismos aportan son la conservación de los alimentos debido a la producción de ácido láctico y la consecuente disminución del pH así como el mejoramiento de las características organolépticas de los mismos. Aunque las bacterias lácticas más estudiadas se han aislado de productos de origen lácteo; hay también aislamientos de alimentos cuya composición principal es almidón. Los alimentos fermentados tradicionales en México se elaboran con base en maíz donde la cantidad de almidón es alta. De los alimentos fermentados tradicionales destaca el pozol, el cual es una bebida fermentada tradicional basada en maíz, de donde se han aislado bacterias lácticas amilolíticas y, recientemente, se ha estudiado la participación de éstas en el proceso de la fermentación y degradación del almidón del maíz. (Wacher 1993; Flores 1996). El estudio de las amilasas que producen las bacterias lácticas será importante ya que si se conocen factores, como pH y temperatura óptimos de actividad enzimática, estos microorganismos podrían ser utilizados en otros alimentos fermentados donde el sustrato principal sea amiláceo, dándoles a la vez las ventajas que el ácido láctico proporciona a estos alimentos como preservación y características organolépticas agradables.

La primera ocasión que se reportó la capacidad de las bacterias lácticas para fermentar el almidón fue en 1937 por Sherman dando a conocer que algunas cepas de *Streptococcus* que fueron aisladas del tracto digestivo de rumiantes tenían la habilidad para producir ácido láctico en sustratos amiláceos. Desde entonces se han aislado bacterias lácticas amilolíticas de diversos hábitats y regiones del planeta. En Nigeria y el Congo se aislaron de yuca fermentada cepas de *Lactobacillus plantarum* (Giraud y col., 1991); del tracto digestivo de animales en Francia se aislaron cepas de *Lactobacillus* (Champ y col., 1983); en Estados

Unidos se aislaron cepas de *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* a partir de ensilados de maíz (Nakamura y Crowell, 1979, Nakamura, 1981); de un alimento fermentado de arroz y pescado en Japón se aisló *Lactobacillus plantarum* (Olympia y col., 1995); de pescado fermentado en Suecia se aislaron cepas de *Leuconostoc* (Lindgren y Refai, 1984); de masas fermentadas de maíz en Benin se aisló *Lactobacillus fermentum*, (Agati y col., 1998) y de harina fermentada de "cassava" en Colombia se aisló *Lactobacillus manihotivorans*, (Morlon-Guyot J. y col., 1998). Como estos reportes hay otros más, sin embargo son pocos los estudios que han profundizado en el conocimiento de las enzimas amilolíticas que producen estas bacterias lácticas y existe poca información al respecto. Hoy en día se han caracterizado amilasas del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Leuconostoc*, éstos estudios han dado a conocer que la mayoría de las amilasas caracterizadas son  $\alpha$ -amilasas producidas extracelularmente y en menor número como en el caso de *Leuconostoc* y *Streptococcus bovis* la producen intracelularmente. Otros estudios han revelado que las amilasas producidas por *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, (Castillo y col., 1993), *Lactobacillus plantarum* A6 y *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, tienen similitudes en características tales como, pH (5.5) y temperatura óptimos de actividad (55°C), su alto peso molecular (100-150 KDa).

Estudios de comparación de propiedades cinéticas y moleculares entre amilasas producidas por bacterias lácticas aisladas de diferentes hábitats y regiones permitirá saber si las similitudes y diferencias encontradas entre ellas podrían significar una ventaja en la hidrólisis de sustratos amiláceos evidentemente abundantes en diversos alimentos distribuidos en todo el mundo, y nuestro país no es la excepción.

## GENERALIDADES

### Características generales del almidón

#### Descripción

Después de la celulosa, el almidón es el principal carbohidrato de reserva que se produce a través de la fotosíntesis en las plantas. Este polisacárido es asimilado sin complicaciones por el sistema digestivo del hombre y es por eso que forma parte de su dieta; de hecho un gran porcentaje de la energía que proporcionan los diferentes alimentos energéticos está dada por el almidón. Las más importantes fuentes de almidón son los cereales (40 a 90 % de su peso seco) y tubérculos (65 a 85 %) (Guilbot 1985). La producción total mundial es extraída principalmente de maíz y papa, el resto de trigo y sorgo.

El almidón está formado por dos fracciones: amilosa y amilopectina, las cuales difieren entre sí en el tamaño y los tipos de enlaces presentes en cada una.

#### Amilosa

La amilosa es una cadena lineal formada por monómeros de glucosa unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos; presenta en su molécula un enrollado helicoidal teniéndose una vuelta completa cada seis moléculas de glucosa. Esta fracción es la responsable de la coloración azul que presenta el almidón con el yodo ya que esto se debe a que la molécula de amilosa hidratada atrapa a las moléculas de yodo.

## **Amilopectina.**

Es la parte ramificada del almidón formada por aproximadamente 100,000 monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos en las partes lineales y  $\alpha$ -1,6 glucosídicos en las partes ramificadas. Presenta cadenas laterales con 25 unidades de glucosa. La amilopectina presenta color café frente a una solución de yodo.

## **Amilasas**

Las amilasas actúan sobre almidón, glucógeno y derivados de polisacáridos hidrolizando los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6. Las amilasas se clasifican de diversas formas dependiendo de: a) modo de hidrólisis, endo o exo; b) retención o inversión de la configuración; c) hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 y d) por el tipo de la reacción, de hidrólisis o de transferencia.

### **Tipos de amilasas y modos de acción**

Son esencialmente cinco grupos de enzimas las que están involucradas en la hidrólisis del almidón. Las endo y exo amilasas actúan principalmente sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4 (Fullbrook 1984; MacKallister 1979) mientras que las enzimas desramificantes actúan exclusivamente sobre los enlaces  $\alpha$ -1,6. Finalmente las ciclodextrinas glicosiltransferasas degradan el almidón por ciclización catalítica y reacciones desproporcionadas (Nielsen 1991).

### **Endo-amilasas.**

Estas enzimas actúan sobre los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos en amilosa, amilopectina y carbohidratos relacionados pero no sobre los enlaces  $\alpha$ -1,6 de amilopectina (Norman 1982). Los productos de hidrólisis son oligosacáridos de tamaño variado y tienen una configuración  $\alpha$  en el C<sub>1</sub> de la unidad de glucosa producida. Estas enzimas actúan en las regiones interiores del sustrato lo que causa un rápido decremento en la viscosidad de los almidones gelatinizados.

Hay dos variedades de endo-amilasas, las termoestables y las termolábiles. Por lo general las endo-amilasas de origen bacteriano son termoestables (Guzmán y Paredes 1995).

### **Exo-amilasas.**

Estas enzimas actúan en algunos sustratos como endo-amilasas pero por un camino diferente. Algunas de ellas son capaces de cortar sobre los enlaces  $\alpha$ -1,6 pero la reacción es lenta comparada con la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4. Las exo-amilasas actúan externamente sobre los sustratos a partir de la terminación no reductora de la cadena produciendo moléculas de bajo peso. Dos tipos de exo-enzimas son importantes en la hidrólisis del almidón: las exo-amilasas glucogénicas y las exo-amilasas maltogénicas (Whitaker 1994).

### **Enzimas desramificantes.**

También llamadas enzimas  $\alpha$ -1,6 tales como la pululanasa y la isoamilasa tienen su sitio de acción únicamente sobre los enlaces  $\alpha$ -1,6.

### **Ciclodextrinas glucosiltransferasas.**

La ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa; E.C.2.4.1.19) es una enzima capaz de hidrolizar el almidón a ciclomaltooligosacáridos no reductores conocidos como ciclodextrinas, las cuáles contienen seis, siete u ocho residuos de D-glucopiranosil.

### **Amilasas más estudiadas.**

Existen muchos tipos de amilasas pero por su especial importancia y ser más comunes las  $\alpha$ -amilasas, las  $\beta$ -amilasas, las glucoamilasas y las pululanasas son las que se han estudiado más en detalle.

$\alpha$ -Amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) actúa sin un orden determinado sobre las uniones  $\alpha$ -1,4glucosídicas produciendo dextrinas de bajo peso molecular. Las dextrinas pueden ser lineales si proceden de amilosa o ramificadas si es que proceden de glucógeno o amilopectina. Se produce después una sacarificación de las dextrinas obteniéndose oligosacáridos como maltohexosa, maltopentosa, maltotetrosa o maltotriosa, según el tipo de actividad de la enzima sobre el sustrato. Siendo los productos finales de la hidrólisis maltosa y glucosa (en pequeña cantidad) la cual procede de la acción de la  $\alpha$ -amilasa sobre la maltotriosa.

**$\beta$ -Amilasa** (1,4- $\alpha$ -D-glucán glucohidrolasa, EC 3.2.1.2) es una exoamilasa y rompe el sustrato a partir de la terminación no reductora de la cadena, su acción se localiza en los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos alternados, con formación de maltosa como producto principal, la cuál es removida para que la enzima prosiga su ataque al sustrato, la acción de la enzima es bloqueada cuando las cadenas libres han sido hidrolizadas a 2 o 3 unidades de glucosa del punto ramificado (uniones  $\alpha$ -1,6 de la amilopeptina y glucógeno), formándose la dextrina limitante. Con oligosacáridos de menor peso molecular la acción termina hasta la completa conversión a maltosa.

**Glucamilasa** (1,4- $\alpha$ -D-glucán glucohidrolasa, EC 3.2.1.3 ; nombre recomendado, glucan 1,4  $\alpha$ -glucosidasa) es una exoamilasa y remueve unidades sucesivas de glucosa del extremo no reductor de las cadenas del sustrato. La acción de la enzima sobre la cadena del sustrato decrece cuando se encuentra un enlace  $\alpha$ -1,6, como en amilopeptina y glucógeno, pero el enlace  $\alpha$ -1,6 es hidrolizado.

**Pululanasa** ( $\alpha$ -dextrin 6-glucanohidrolasa , EC 3.2.1.41) es una endoamilasa , hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 de las pululanas y de las dextrinas limitantes de amilopeptina y glucógeno.

#### **Medición de la actividad amilolítica.**

Se usan cuatro procedimientos por lo general para el estudio de la acción de las amilasas sobre el almidón aprovechando que durante la hidrólisis ocurre que : a) hay un decrecimiento en la viscosidad ; b) hay una pérdida de habilidad para formar un color azul con el yodo ; c) una aparición de grupos reductores ; y d) hay un incremento en maltosa, glucosa, o dextrinas .

## **Alimentos fermentados**

Cuando se habla de alimentos fermentados se piensa en queso y pan o en productos exóticos como el miso hecho Japón; sin embargo, en algunas partes del mundo importantes cantidades de alimentos fermentados son producidos y usados en la dieta diaria de la gente y son parte importante de su nutrición.

Existe una gran variedad de alimentos fermentados en todo el mundo pero éstos muestran algunas similitudes tales como:

- la mayoría de los alimentos fermentados son hechos con base en cereales y leguminosas;
- son suplementados con una fuente de proteína ya sea de origen animal o vegetal ;
- la mayoría de los alimentos provienen de una fermentación en un medio líquido aunque los hay donde el sustrato es sólido ;
- los productos son por lo general ácidos;
- las levaduras y bacterias (en su mayoría bacterias ácido lácticas) son los únicos organismos responsables de la fermentación;
- el tiempo de fermentación es corto, es decir, no se lleva semanas o meses;
- excepto por causas muy contadas ninguno de estos alimentos fermentados han sido estudiados científicamente a fondo.

## **Ventajas de los alimentos fermentados**

Las fermentaciones alimentarias son cambios microbiológicos enzimáticos en los sustratos. es decir. se refiere al metabolismo de compuestos orgánicos mediante procesos de óxido-reducción por diversos microorganismos (Voet. 1995) que generan sabores, aromas y texturas aceptables para los consumidores. Estos alimentos ofrecen al ser fermentados ventajas como las siguientes:

- conservación de los productos fermentados debido a los ácidos orgánicos que se producen; estos productos ácidos en algunas ocasiones son secos lo que hace que se conserven por largos periodos de tiempo;
- son altos en contenido de fibra;
- debido a que algunos son secos pueden ser transportados fácilmente de un lugar a otro;
- pueden llegar a adquirir un valor agregado nutricional debido a las vitaminas formadas durante la fermentación;
- son alimentos consumidos desde hace cientos de años y por consiguiente son culturalmente aceptados;
- pueden considerarse cien por ciento naturales (C. W. Hesseltine, 1979).

## **Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias lácticas son un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladas catalasa negativas, carentes de citocromos, de hábitos no aerobios pero aerotolerantes, de elevados requerimientos nutricionales, ácido tolerantes y fermentativos estrictos con ácido láctico como el mayor producto final durante la fermentación de azúcares (Axelsson 1994).

Los alimentos asociados con bacterias ácido lácticas (BAL) son leche y productos lácteos (queso cottage otros quesos mantequilla y yogurt); carnes crudas semiconservadas y fermentadas y vegetales fermentados (Stiles, 1996).

Actualmente en la industria lechera las bacterias lácticas son muy utilizadas como cultivos iniciadores y por consiguiente la optimización de condiciones para su desarrollo es esencial para ser aplicadas con éxito dentro de otros campos de la industria (Bibal, 1988).

Las bacterias ácido lácticas tienen un gran potencial como bioconservadores porque su consumo no implica riesgos para el humano, éstas tienen status GRAS para su uso en alimentos, tales como la producción de alimentos fermentados (Marrug, 1991; Stiles, 1996). Las bacterias ácido lácticas producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados. La capacidad de las bacterias ácido lácticas para producir ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso del pH, es el principal factor de inhibición en los productos fermentados (Tagg et al., 1976).

Aunque no es una propiedad común se han reportado cepas de bacterias lácticas amilolíticas en diferentes sustratos. En fermentaciones de desperdicios de maíz se aisló e

identificó una cepa como *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). Otra cepa bacteriana láctica amilolítica identificada como *Lactobacillus plantarum* fue aislada y se demostró que era la responsable de acidificar el sustrato a partir del almidón después de agotar los azúcares simples. Se reportó también que la enzima amilolítica producida por este microorganismo es extracelular y que es una  $\alpha$ -amilasa teniendo un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de actividad de 55 °C (Giraud et al., 1991).

Se encontraron diferencias (Castillo et al., 1989) entre las propiedades amilolíticas de *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylophilus*. Según estos estudios *L. Amylovorus* resultó ser mas adecuado para ser utilizado en alimentos fermentados con sustratos amiláceos.

Se reportó que la degradación del almidón por *L. plantarum* en un medio en el que el pH se ajustó a un valor de 6.0 había una alta excreción y actividad de  $\alpha$ -amilasa, en cambio cuando el pH no se regulaba la producción y actividad de la enzima era baja (Giraud et al., 1994).

## **Bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados**

Bacterias ácido lácticas han sido aisladas de diversos productos fermentados (Tanasupawat and Daengsubha, 1983; Tanasupawat et al., 1992).

Se han encontrado cepas homofermentativas y heterofermentativas son encontradas en una gran variedad de alimentos fermentados en todo el mundo siendo principalmente lactobacilos los mas comunes (Okada, 1992; Tanasupawat et al., 1993).

Las bacterias lácticas no cuentan comúnmente con la capacidad de hidrolizar el almidón; sin embargo su existencia esta bien documentada como se refirió anteriormente.

El crecimiento y actividad de los microorganismos juegan un papel importante en el control del medio ambiente y ecosistemas. El tipo de flora bacteriana que se desarrolla en cada alimento fermentado depende de la actividad acuosa, pH, concentración salina, temperatura y la composición del alimento. Las bacterias ácido lácticas son tal vez los microorganismos en mayor cantidad y deseables en las fermentaciones alimentarias. Pueden convertir los carbohidratos mas disponibles en ácido láctico con pequeñas cantidades de ácido acético resultando en un decremento del pH. Si la fermentación es prolongada, el medio será cambiado y llegar a ser mas propicio para el desarrollo de levaduras (Campbell-Platt, 1987).

## Pozol

En México los alimentos fermentados indígenas han jugado un papel importante en la historia del desarrollo de sus habitantes, tal es el caso del pozol (Wacher, 1993).

El pozol (del náhuatl *pozolli*: espumoso) es una masa fermentada de maíz previamente tratado con agua y cal: que suspendida en agua es consumida como bebida ceremonial y alimento básico por poblaciones indígenas del sureste de México, como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país.

Además de su consumo como bebida refrescante tiene un uso empírico para combatir ciertos trastornos gastrointestinales y algunas infecciones de la piel o heridas: existen también algunos reportes de que el pozol ha sido utilizado por los mayas desde tiempos prehispánicos con propósitos similares (Herrera y Ulloa, 1975).

Este alimento es resultado de la fermentación sucesiva de bacterias y hongos. Las bacterias del pozol han sido poco estudiadas pero se ha inferido que durante el inicio de la fermentación predominan las bacterias lácticas, responsables de la producción del ácido láctico durante estas primeras horas de fermentación (Flores, 1996).

Es importante mencionar que a pesar de tratarse de un alimento constituido principalmente por almidón, solo un bajo porcentaje del total de las cepas aisladas han mostrado una actividad amilolítica considerable. De estas se han identificado las siguientes especies: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus pemosus*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis*, *L. coprophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *L. Plantarum*. (Nuraida, 1995).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar las condiciones de producción de amilasas de tres cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de pozol.

### **Objetivos particulares**

- Determinar la cinética de crecimiento de las 3 bacterias en el medio MRS-almidón
- Concentrar las amilasas utilizando los métodos de precipitación con sulfato de amonio y diálisis
- Describir las características de las enzimas amilolíticas y observar sus similitudes o diferencias entre ellas

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

#### Bacterias ácido lácticas amilolíticas

De una colección de BLA aisladas a partir de pozol del estado de Tabasco conservadas en perlas de vidrio a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio APT (Difco, 0655-1777-9) y 10 % de glicerol, se seleccionaron tres cepas: 15109, A57203 y A57206 las cuales mostraban mayor actividad amilolítica en agar MRS almidón.

#### Selección de bacterias lácticas con alta actividad amilolítica.

La actividad amilolítica de las bacterias lácticas aisladas fue observada en el medio MRSA, este medio contiene en ( $\text{g/L}$ ): 10.0 peptona (Bioxon, 152); 8.0 polvo "lab-lemco" (Oxoid, L-29); 4.0 extracto de levadura (Oxoid, L-21); 10.0 almidón (J.T. Baker, 4006-01); 1 mL "tween 80" (Sigma, P-1754); 0.05 glucosa (Merck, 15866); 2.0 fosfato dipotásico (Baker, 3252-20); 5.0 acetato sódico (Merck, 6267); 2.0 citrato triamónico (Mallinckrodt, 0644); 0.2 sulfato magnésico (Sigma); 0.005 sulfato de manganeso (Sigma); 10.0 agar (Bioxon, 150-1). La selección de las colonias más amilolíticas se realizó utilizando una solución de yodo-yoduro la cual se preparó disolviendo KI (15g) con  $\text{I}_2$  (1.5g) en 500 mL de agua destilada; esta solución se diluía al 4% en el momento en que se utilizaba. Para observar los halos de hidrólisis de almidón en las placas se cubría ésta con un poco de la solución, después de 5 minutos se lavaba con agua destilada y se observaban los halos sobre un fondo obscuro.

## **Fermentación**

### **Desarrollo del inóculo de las bacterias lácticas amilolíticas**

Para la producción del inóculo las bacterias lácticas fueron desarrolladas colocando una perla de vidrio (de los tubos guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$ ), en 10 mL de medio APT y posteriormente fueron incubados durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . El medio APT (Difco, 0655-17-9) utilizado contiene en (g/L): extracto de levadura, 7.5; triptona, 12.5; dextrosa, 10.0; citrato de sodio, 5.0; hidrocloreuro de tiamina, 0.001; cloruro de sodio, 5.0; fosfato dipotásico, 5.0; cloruro de manganeso, 0.14; sulfato de magnesio, 0.8; sulfato ferroso, 0.04; sorbitan monoleato, 0.2. pH final =  $6.7 \pm$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Después de desarrolladas las células bacterianas se procedió a lavarlas de la siguiente manera: el crecimiento celular, 10 mL, se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos en tubos estériles de centrifugación de 45 mL. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de agua destilada estéril. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones a fin de eliminar el exceso de medio de cultivo. El paquete celular al final del lavado se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril del cuál se tomaron 0.1 mL como inóculo para la fermentación.

## **Inoculación de medios de cultivo para la fermentación.**

La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C durante dos días en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio líquido MRS-almidón-glucosa con una composición de (g/L): 10.0 peptona (Bioxon, cat. 152); 8.0 polvo "lab-leenco" (Oxoid, code L-29); 4.0 extracto de levadura (Oxoid code L-21); 10.0 almidón (J.T. Baker, 4006-01) 1 mL "tween 80" (Sigma, P-1754); 0.05 glucosa (Merck, art. 15866); 2.0 fosfato dipotásico (Baker, 3252-20); 5.0 acetato sódico (Merck, art. 6267); 2.0 citrato triamónico (Mallinckrodt, 0644); 0.2 sulfato magnésico (Sigma, M-7506); 0.005 sulfato de manganeso (Sigma, M-6528).

Al final de la fermentación las células se removieron por centrifugación ( 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C ) y el sobrenadante libre de células se almacenó en refrigeración para la determinación de actividad enzimática.

## **Medición de la actividad amilolítica.**

### **Mezcla de reacción**

La actividad amilolítica fue medida utilizando el método de cuantificación de azúcares reductores. Se hizo una mezcla de reacción que consistió de 0.8 mL de una suspensión al 1.2% (p/v) de almidón soluble de papa (J.T. Baker, 4006-01) en un buffer de fosfatos 0.1M, pH= 6, a la cual se le añadió 0.1 mL de sobrenadante y se incubó a 30 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 0.1 mL de hidróxido de sodio 5 M. Los azúcares reductores liberados fueron determinados por el método de DNS (Miller, 1959), utilizando maltosa como estándar (apéndice 1). Se agregó, en tubos de ensayo, 0.5 mL de muestra de

reacción y 0.5 mL de reactivo DNS, los tubos se taparon con canicas para colocarlos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos; posteriormente los tubos se colocaron inmediatamente en baño de agua fría y se les agregó 5 mL de agua destilada. Finalmente se les midió la absorbancia a 540 nm contra un blanco de agua y reactivos.

#### **Determinación de la concentración de proteína**

La determinación de la concentración de proteína soluble se realizó con el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Se preparó una solución de 0.5 mg/mL de BSA, 0.15M de NaCl y una solución de azul de coomassie brillante (G 250) que se preparó disolviendo 50 mg de azul de coomassie brillante G-250 en 25 mL de etanol al 95%, a los cuales se les adicionó 50 mL de ácido fosfórico al 85% y se aforó a 0.5 L con agua destilada, posteriormente se filtró en un papel filtro Whatman no. 1.

La curva estándar se preparó en 8 tubos eppendorff a los cuales se les agregó alícuotas de 0.5 mg/mL de BSA (5, 10, 15 y 20  $\mu$ L) y con NaCl 0.15 M se llevó a un volumen final de 100  $\mu$ L. En otros 2 tubos eppendorff se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl 0.15 M que sirvieron como blancos. A todos los tubos se adicionó 1 mL de azul de coomassie en solución y de inmediato fueron agitados con ayuda de un vortex. Posteriormente se reposaron por dos minutos a temperatura ambiente y una vez concluido este tiempo se midió la absorbancia a 595 nm en celdas de 1 mL. Con los diferentes valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de proteína se realizó la gráfica de  $A_{595}$  vs concentración de proteína (apéndice 2). Por último se determinó la absorbancia en las muestras enzimáticas en que se desconocía la concentración de proteína las cuales se obtuvieron utilizando la curva estándar.

### **Definición de unidades de actividad amilolítica**

Una unidad de actividad (U.I.) se definió como la cantidad de enzima que produce un miligramo de maltosa por minuto bajo las condiciones de 30 °C de temperatura y pH= 6.1 en un buffer de fosfatos.

### **Purificación de la enzima.**

#### **Precipitación amonio**

El sobrenadante se saturó al 80% (p/v) con sulfato de amonio, el cual fue agregado lentamente con agitación a 4 °C. Una vez precipitada la proteína se centrifugó a 15 000 r.p.m. durante 15 min. a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1M y posteriormente fué dializado.

#### **Diálisis**

La diálisis se realizó con la finalidad de disminuir el exceso de sales y otras impurezas. Se dializó contra un buffer de TRIS 50 mM con pH=6.5 durante toda la noche con dos cambios de buffer usando una membrana de diálisis (Spectra/por MWCO :50 000).

### **Determinación de constantes cinéticas ( $K_m$ y $V_{max}$ )**

Para determinar  $K_m$  y  $V_{max}$  se realizó lo siguiente: a soluciones de 0.2–5.0% de almidón soluble de papa (sustrato) se agregaron 0.5 mL de sustrato enzimático y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se determinó la actividad enzimática para cada una de las muestras por el método ya descrito anteriormente.

Se determinaron  $K_m$  y  $V_{max}$  por el método de Lineweaver y Burk (Lineweaver, H. y Burk, D., 1934).

### **Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad enzimática.**

El efecto del pH sobre la actividad de la amilasa fue determinado en un intervalo que fue desde un valor de pH=3 hasta un pH=9 después de 30 minutos de reacción enzimática a 37 °C. El pH de la solución de reacción se ajustó con los siguientes buffers: pH= 3–7 con ácido cítrico/ fosfato dibásico 0.1 M y pH= 8–9 con Tris/ HCl 0.1 M.

El perfil de la actividad enzimática de acuerdo con la temperatura fue determinado en un intervalo de 5 a 80 °C a pH= 6.0 usando un buffer de citrato/ fosfato 0.1 M.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fermentación

Se llevaron a cabo fermentaciones para obtener cantidad suficiente de enzima para el estudio correspondiente. En las figuras 4.1 y 4.2 se observan los promedios (de dos repeticiones) de los parámetros determinados: proteína, actividad amilolítica específica y biomasa para la cepa 15109.

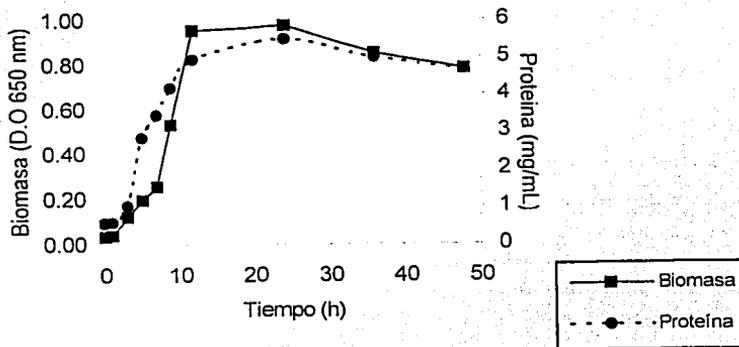


Fig. 4.1 Producción de proteína extracelular y biomasa durante la fermentación de la cepa 15109; medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C.

En la curva de crecimiento casi no se observa fase de adaptación, lo que indica que el microorganismo se acostumbró rápidamente a las condiciones del medio

La producción de la enzima fue monitoreada por actividad amilolítica y proteína soluble. Se observa que no hubo actividad amilolítica sino hasta aproximadamente las 10 horas de iniciada la fermentación. El medio (MRS almidón) contiene glucosa y pequeñas concentraciones de algunos otros azúcares de bajo peso molecular suficientes para satisfacer las necesidades del microorganismo en las primeras horas de la fermentación. A esto se atribuye el crecimiento del microorganismo antes de producir la amilasa. La presencia de estos azúcares puede ser también la explicación por la cual la cepa presenta una rápida adaptación al medio MRS-almidón.

En la fig. 4.2 se observa que el aumento en la concentración de proteína coincide con el crecimiento acelerado de la cepa lo que lo relaciona directamente con la producción de la amilasa pues es cuando la actividad específica se incrementa rápidamente. También se observa que la mayor actividad amilolítica se presentó entre las 24 y 26 horas de fermentación, por lo que es recomendable detener ésta entre esos tiempos. A tiempos posteriores se ve un decremento en las curvas de actividad, proteína y biomasa. Probablemente este decremento se deba a factores que afecten directa o indirectamente a la enzima o al microorganismo como puede ser el decremento del pH que ocurre en la fermentación y que influye directamente sobre la amilasa. Otra posibilidad es la producción de proteasas las cuáles actúan sobre la amilasa degradándola, provocando que la cepa no tenga otra alternativa de seguir utilizando el almidón como fuente de carbono.

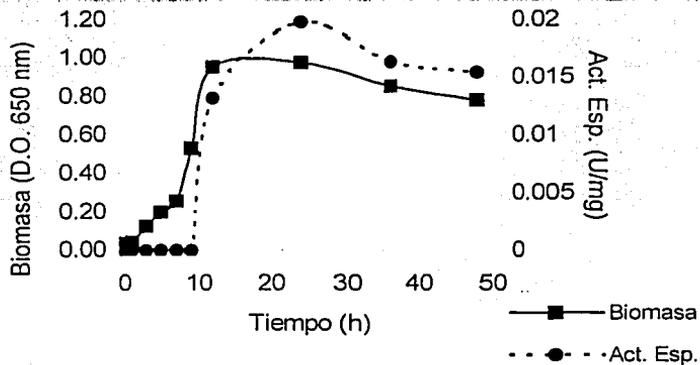


Fig. 4.2 Biomasa y actividad amilolítica durante la fermentación de 15109; medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C. La actividad específica reportada se define como mg de maltosa producida por mg de proteína por minuto.

En la fermentación correspondiente a la cepa A57203 mostrada en las figuras.4.3 y 4.4 puede observarse que tampoco hay etapa de adaptación.

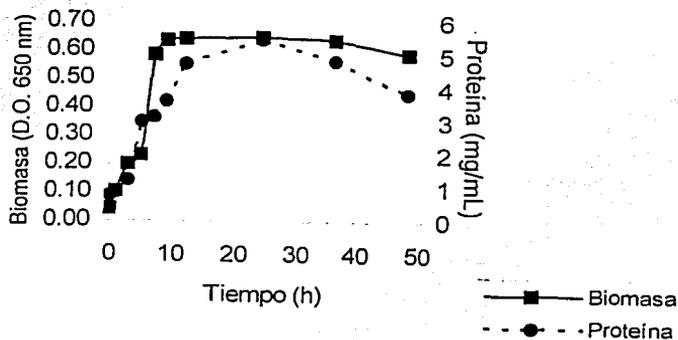


Fig. 4.3 Producción de proteína extracelular y biomasa durante la fermentación de A57203; medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C.

Se observa que esta cepa no produjo la enzima sino hasta aproximadamente 8 horas después de iniciada la fermentación, pues es cuando se observa actividad amilolítica ya que antes de este tiempo probablemente no necesitaba la amilasa por la posibilidad de que en el medio existiera en pequeñas cantidades fuente de carbono como oligosacáridos de bajo peso molecular. En las figuras 4.3 y 4.4 se puede observar que hay relación entre la concentración de proteína y el crecimiento de la cepa, sobre todo cuando este crecimiento se encontraba en su fase acelerada. Esta cepa presenta la mayor actividad amilolítica alrededor de las 24 horas de fermentación por lo que se recomienda detenerla en este tiempo ya que posterior a él decrece la biomasa y la actividad amilolítica. Una diferencia entre esta cepa (A57203) y la cepa anterior (15109) es que aún y cuando el crecimiento de la 15109 se mantuvo estable la actividad amilolítica se incrementó y en la cepa A57203 cuando el crecimiento de la cepa llegó a la estabilidad la actividad enzimática también se mantuvo constante como se muestra en la fig. 4.4

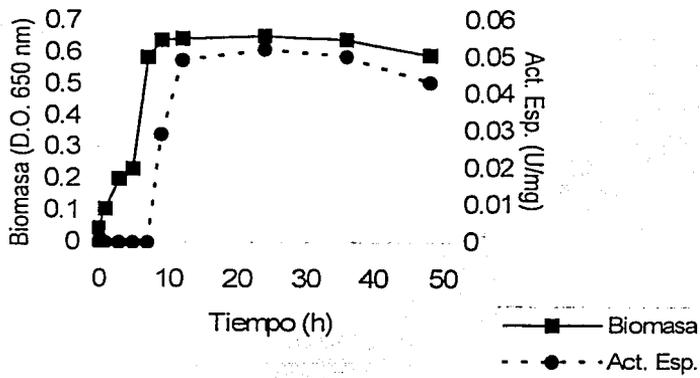


Fig. 4.4 Biomasa y actividad amilolítica durante la fermentación de A57203: medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C. La actividad específica reportada se define como mg de maltosa producida por mg de proteína por minuto.

La fermentación de la cepa A57206 se ve representada en las figuras 4.5 y 4.6 donde se observa que también se adaptó rápidamente a las condiciones del medio.

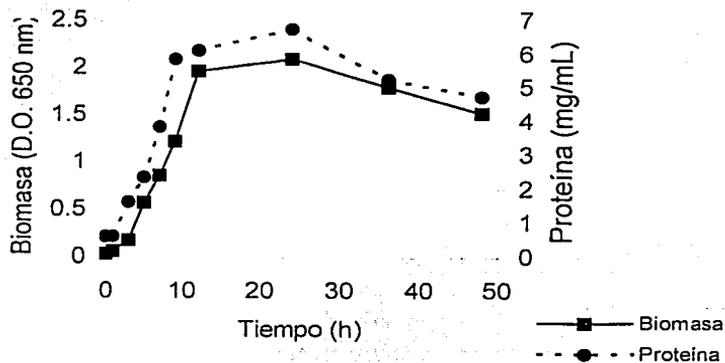


Fig. 4.5 Producción de proteína extracelular y biomasa durante la fermentación de A57206: medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C.

La producción de la enzima, monitoreada por actividad amilolítica y proteína soluble, se asocia al crecimiento de la cepa a partir de las 8 horas aproximadamente de fermentación, por lo que su comportamiento es similar a la de las dos cepas anteriores y probablemente el hecho de que esta producción de enzima no se asocie al crecimiento en las primeras horas de fermentación tenga la misma explicación que se dio anteriormente.

Se observa que tanto la actividad amilolítica como la biomasa y la concentración de proteína decrecen después de 36 horas de fermentación diferenciándolo de las dos fermentaciones anteriores pero también se observa que bien puede ser detenida ésta a las 24 horas pues la actividad no incrementó mucho después de este tiempo.

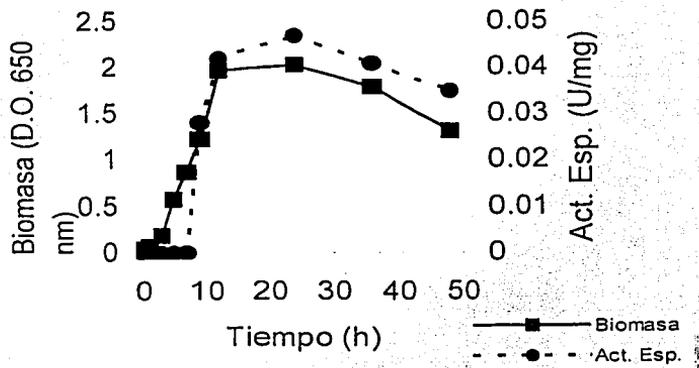


Fig. 4.6 Biomasa y actividad amilolítica durante la fermentación de A57206; medio de cultivo MRS-almidón pH 6.0 y 40°C. La actividad específica reportada se define como mg de maltosa producida por mg de proteína por minuto

### Concentración de la enzima

Con el fin de caracterizar a las enzimas producidas por las tres cepas, se realizó una concentración basada en los métodos de precipitación con sulfato de amonio seguida de una diálisis. En la tabla 4.1 se muestran los resultados para la enzima de la cepa 15109, donde se puede observar que la actividad amilolítica específica aumentó 53 veces después del tratamiento de concentración. Aún con el aumento esta actividad es baja comparada con otros estudios (Giraud y col., 1993) donde el valor de la actividad específica para la amilasa de *Lactobacillus plantarum* fue de  $425 \text{ U mg}^{-1}$  en el sobrenadante; lo cual puede ser debido a que la amilasa secretada por esta cepa (15109) este muy diluida en el medio y necesite concentrarse aún mas con un método más efectivo, sin olvidar que en este estudio no se realizó una purificación completa.

Tabla 4.1 Concentración de la enzima de la cepa 15109.

Materiales	Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Act esp ( $\text{U mg}^{-1}$ )	Rendimiento %	F.P.
Filtrado del cultivo	183.0	1,004.12	19.01	0.019	100.0	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%)	10.0	18.8	18.93	1.007	99.57	53.2

F:P. factor de purificación.

Los resultados para la enzima de la cepa A57203 se muestran en la tabla 4.2, como se puede ver el factor de purificación fue menor en comparación a la enzima de la cepa 15109 pues fue de 25 aunque la actividad específica fue ligeramente mayor.

Tabla 4.2 Concentración de la enzima de la cepa A57203.

Materiales	Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Act esp (U mg <sup>-1</sup> )	Rendimiento %	F.P.
Filtrado del cultivo	160.0	880.0	49.1	0.056	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (80%)	10.0	27.0	37.9	1.404	77.2	25.16

F.P. factor de purificación.

En lo que se refiere a los resultados de concentración de la cepa A57206 son mostrados en la tabla 4.3. donde se observa que se logró purificar 45 veces la actividad amilolítica específica, y fue esta enzima la que mayor actividad específica mostró.

Tabla 4.3 Concentración de la enzima de la cepa A57206.

Materiales	Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad (U)	Act esp (U mg <sup>-1</sup> )	Rendimiento %	F.P.
Filtrado del cultivo	180.0	1,237.0	54.4	0.044	100.0	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (80%)	10.0	24.3	48.37	1.99	88.9	45.24

F.P. factor de purificación

### **Determinación de constantes cinéticas**

Para calcular  $K_m$  y  $V_{max}$  por el método de Lineweaver-Burk se realizó la cinética de Michaelis-Menten que consistió en determinar velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato para cada una de las enzimas de las tres cepas.

Para la enzima de la cepa 15109 la cinética se presenta en la fig. 4.7. En la gráfica se observa que la preparación alcanzó la saturación aproximadamente al 1.5% de almidón, un valor de  $K_m$  de 5.14 mg/mL y un valor de  $V_{max}$  de 21.79  $\mu$ moles maltosa/min mg Pr. En la fig. 4.8 se muestra la gráfica del método de Lineweaver-Burk para esta enzima.

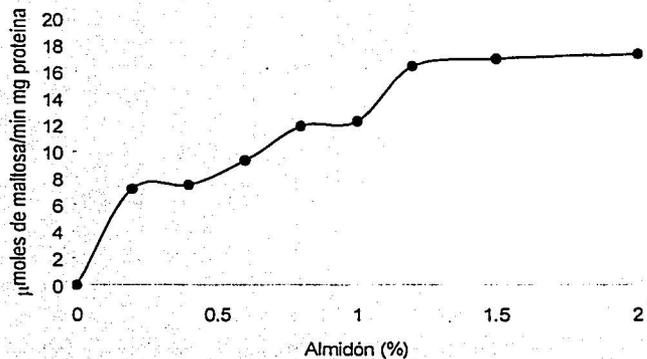


Fig. 4.7 Cinética de Michaelis-Menten para la enzima de 15109 a 40 °C

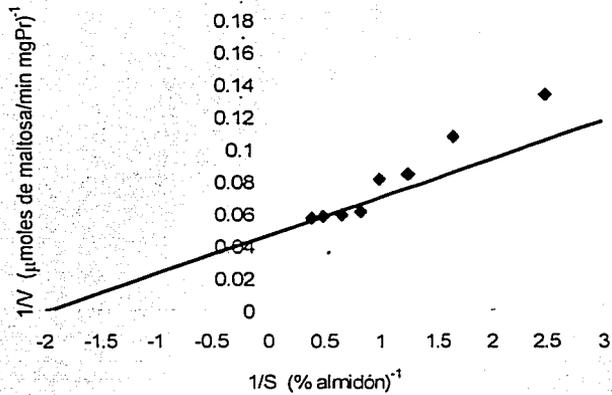


Fig. 4.8 Determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  por el método de Lineweaver-Burk para la enzima de 15109

La fig. 4.9 muestra la gráfica de la cinética de Michaelis-Menten para la enzima de la cepa A57203 y ésta alcanzó la saturación cerca del 2.0% de almidón. En la fig. 4.10 se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk, método que se utilizó para encontrar la  $K_m$  y  $V_{max}$ , cuyos valores obtenidos fueron 6.21 mg/mL y 92.1  $\mu$ moles maltosa/min mg respectivamente.

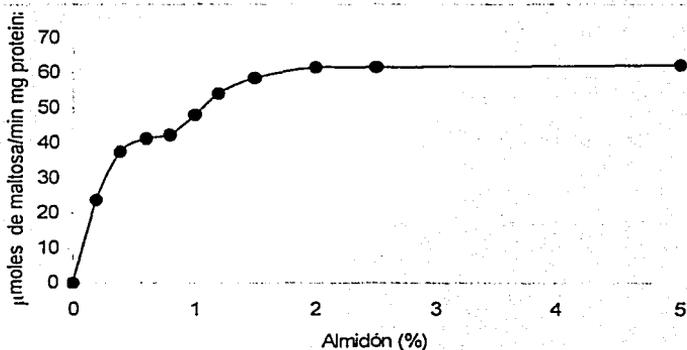


Fig. 4.9 Cinética de Michaelis-Menten para la enzima de A57203 a 40 °C y pH 6.0

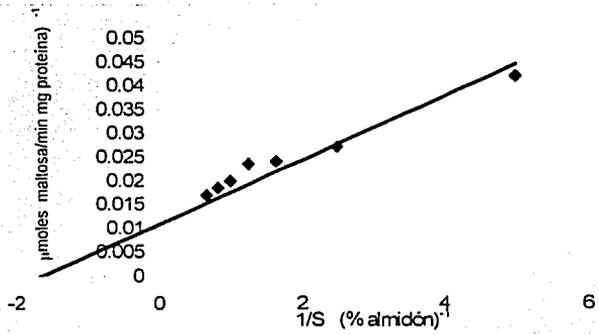
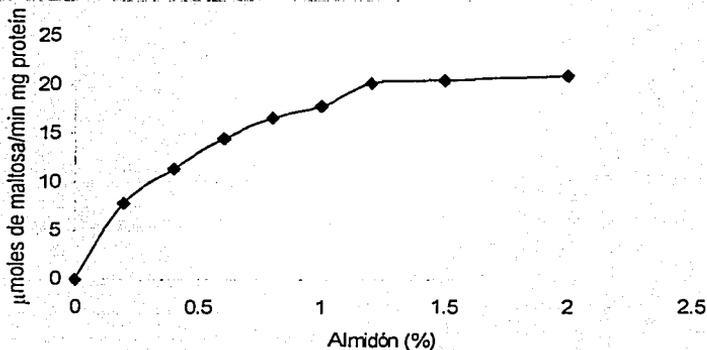
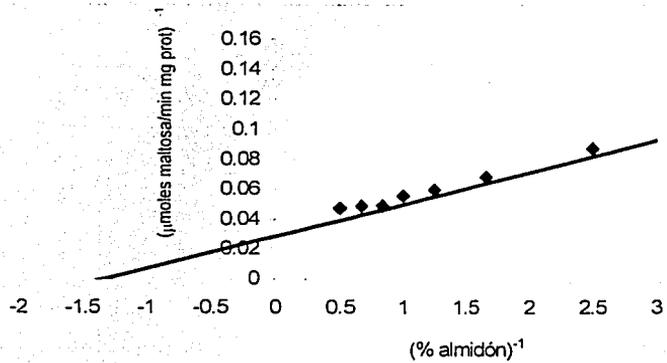


Fig. 4.10 Determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  por el método de Lineweaver-Burk para la enzima de A57203

La enzima producida por la cepa A57206 se saturó aproximadamente al 1.5% de almidón como se muestra en la fig. 4.11 donde se observa la cinética y la fig. 4.12 muestra el método de Lineweaver-Burk para esta enzima, de la que se obtuvo un valor de  $K_m$  de 7.45 mg/mL y un valor de  $V_{max}$  de 34.75  $\mu$ moles maltosa/min mg.



4.11 Cinética de Michaelis-Menten para la enzima A57206 a 40°C y pH=6.0



#### 4.12 Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ por el método de Lineweaver-Burk para la enzima A57206

En la tabla 4.4 Se muestran los valores encontrados de Km y Vmax para las enzimas de las 3 cepas. Se observa que la enzima de la cepa 15109 es la que tiene un valor de Km menor lo que significa que tiene una mayor afinidad por el almidón en comparación con las otras dos enzimas, aunque no es muy significativa esta diferencia. Se observa también que la enzima de A57203 fue mas activa que las otras dos esto dicho con base a la velocidad máxima alcanzada.

Tabla 4.4 Valores de Km y Vmax para las enzimas de las cepas 15109, A57203 y A57206 (almidón como sustrato).

Enzima	Km (mg/mL alm)	Vmax ( $\mu$ moles maltosa/min mg Pr)
15109	5.14	21.79
A57203	6.21	92.1
A57206	7.45	34.75

### **Determinación de pH y temperatura óptimos de actividad enzimática**

La enzima producida por la cepa 15109 actuó preferentemente en un valor de  $\text{pH}=7$  como puede observarse en la fig. 4.13 La actividad se pierde rápidamente hacia valores de pH ácidos siendo prácticamente cero en un valor de 4 y hacia valores de pH alcalinos se pierde pero no tan rápidamente, siendo la actividad casi cero en un valor de 10.

El efecto de la temperatura para esta amilasa producida por 15109 es mostrado en la fig. 4.14 donde se observa que la temperatura óptima fue de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

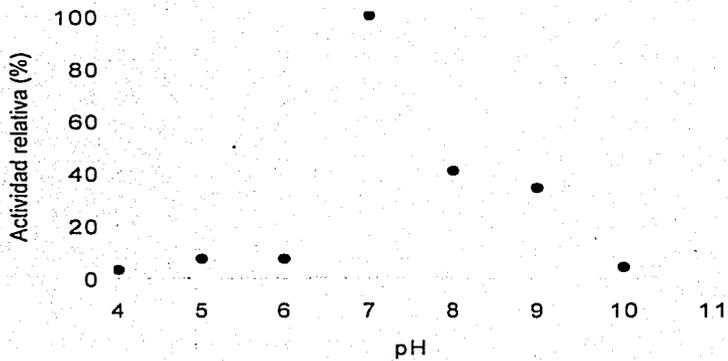


Fig. 4.13 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima de 15109 a 55 °C

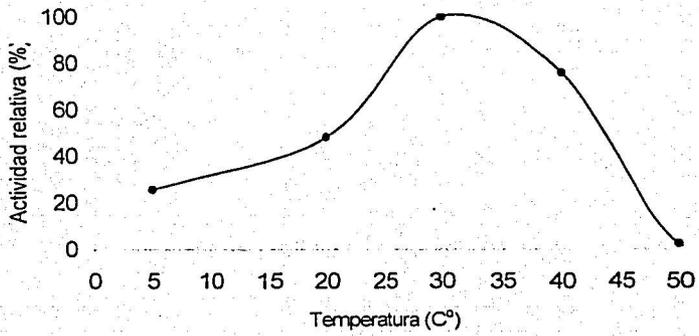


Fig. 4.14 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima de 15109 a pH 5.5

El pH óptimo para la enzima de A57203 fue de 8.0 actuando preferentemente en valores de pH básicos y en la fig. 4.15 se observa que la actividad decae rápidamente hacia la neutralidad y más aún en valores de pH ácidos

La temperatura óptima de actividad para esta enzima producida por A57203 fue de 50 °C como lo muestra la fig. 4.16 siendo la más alta de las tres en estudio en este trabajo

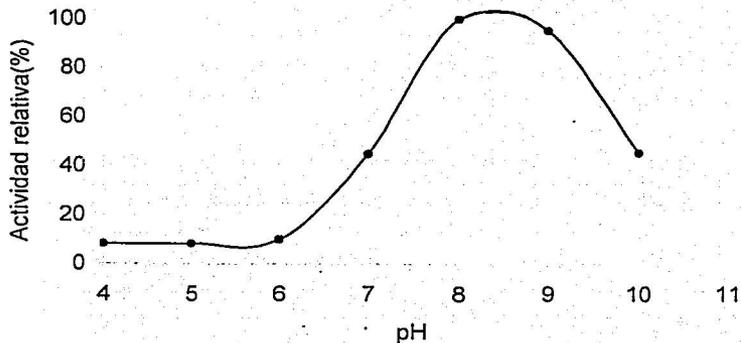


Fig. 4.15. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima de A57203 a 55 °C

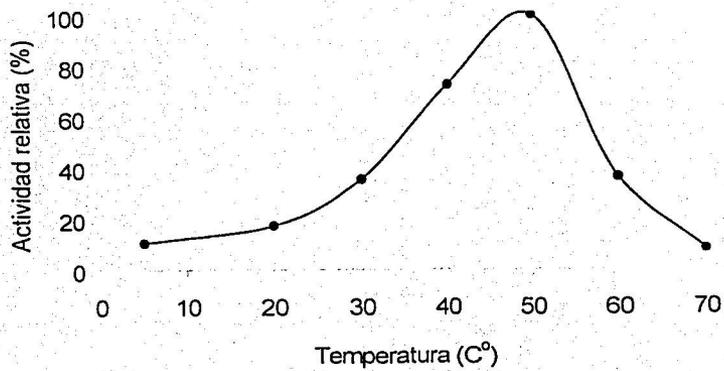


Fig. 4.16 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima de A57203 a pH 5.5

El pH óptimo para la enzima de A57206 fue de 9.0 siendo alcalino el pH que prefiere esta enzima como puede observarse en la fig. 4.17 pero que decae muy rápidamente cuando el pH = 10 o mayor.

La temperatura óptima de actividad para esta enzima fue de 40 °C fig. 4.18

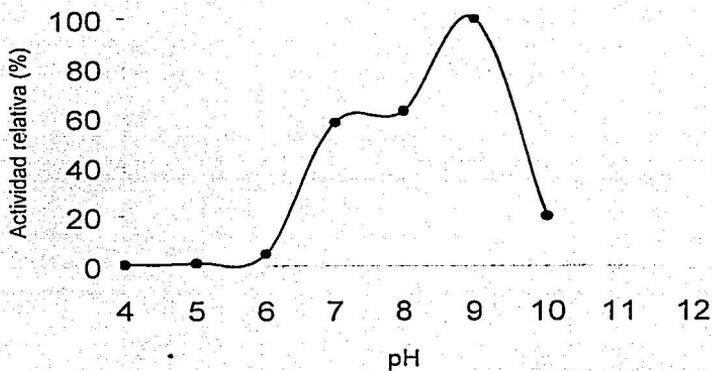


Fig 4.17 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima de A57206 a 55 °C

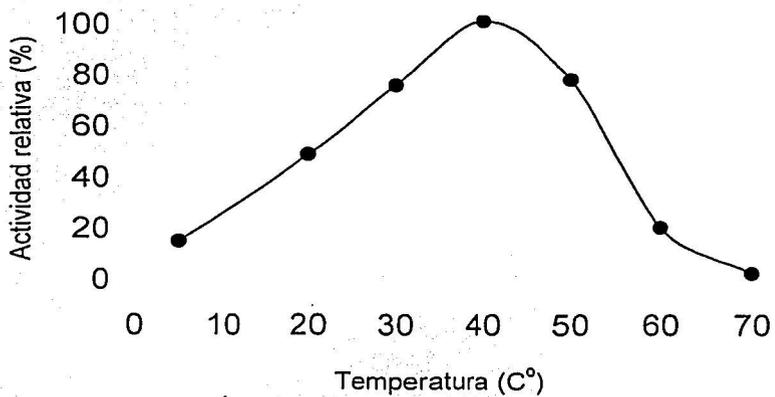


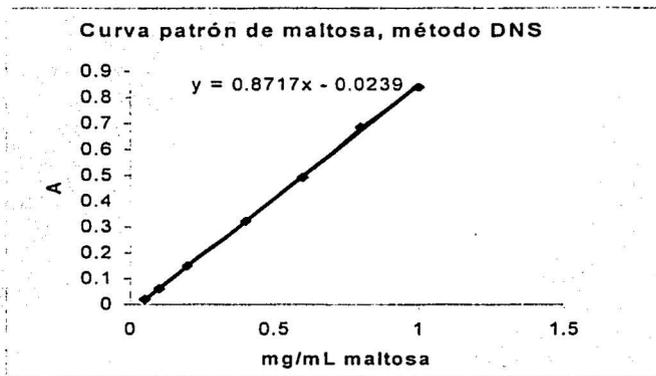
Fig. 4.18 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima de A57206

Estos resultados de pH y temperaturas óptimos de actividad para estas tres cepas comparados con los pocos estudios que hay sobre las amilasas de otras bacterias lácticas resultan ser similares en cuanto a la temperatura óptima, sin embargo los pH óptimos para estas amilasas en estudio resultaron ser de pH neutro hacia valores de pH alcalinos a diferencia por ejemplo de *Lactobacillus plantarum* donde su pH óptimo fue de 5.5 (E. Giraud y col., 1993); *Lactobacillus manihotivorus* con valores temperatura y pH óptimos de 55 y 5.5 respectivamente (Aguilar, G. et al., 1999; Guyot, J.P. et al. 2000); *Lactobacillus amilovorius* y *Lactobacillus amylophilus*, con valores de pH óptimos de actividad entre 5 y 6 para ambas amilasas de estas dos bacterias (Castillo, P.C. et al., 1993) y *L. fermentum* con valor de pH óptimo de 5.0 (Agati, V. et al., 1998). Como lo muestran otros estudios, mientras todas las amilasas de estas bacterias lácticas presentan mayor actividad en un valor de pH 5.0 en promedio, las amilasas de las tres cepas que se estudian en este trabajo a este valor su actividad es muy baja y a valores mayores incrementa. Lo anterior podría sugerir que en el pozol estas tres cepas y sus correspondientes enzimas actuaran con mayor participación en el inicio del proceso de elaboración de este alimento disminuyendo conforme disminuye también el pH, considerando que en la fermentación del pozol al iniciar el valor de pH es prácticamente neutro, terminando el proceso fermentativo con valores menores a 4 (Nuraida y col. 1995).

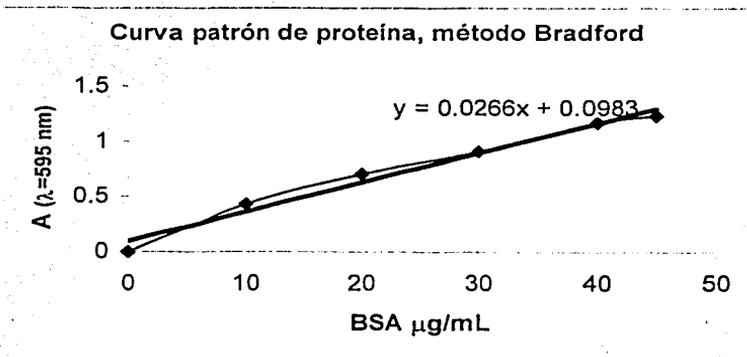
## Conclusiones

- El tiempo más adecuado de fermentación para la producción de enzima de las cepas 15109, A57203 y A57206 es de 20 a 24 horas bajo las condiciones empleadas en este estudio.
- La aparición de carbohidratos reductores, la cantidad de amilasa y por lo tanto la actividad amilolítica de las tres cepas están asociadas al crecimiento celular.
- Las temperaturas óptimas de actividad para las respectivas amilasas de las tres cepas son similares a las obtenidas para amilasas de bacterias lácticas de otros estudios y que se encuentran entre los 30 y 60°C, sin embargo los valores de pH óptimos de actividad enzimática para las enzimas de estas tres cepas tienen la característica de ser mayores a los valores reportados en otros estudios en donde las amilasas de otras BLA actúan más eficientemente en un medio ácido, mientras que las cepas 15109, A57203 y A57206 lo hacen en un medio neutro hacia la alcalinidad.
- La amilasa de la cepa 15109 es la que tiene mayor afinidad hacia el almidón que las amilasas de las cepas A57203 y A57206 de acuerdo a los valores de Km obtenidos, y la más activa fue la amilasa de la cepa A57203 dicho con base en la velocidad máxima que alcanzó.

## APENDICE



Appl. Curva patrón de maltosa A ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ )



App.2. Curva patrón de proteína (BSA), utilizando el método Bradford

## BIBLIOGRAFIA.

1. Agati V., Guyot J.P., Morlon-Guyot., Talamond P. y D. J. Hounhouigan. (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85, 512-520.
2. Aguilar, G., Morlon-Guyot, J. Trejo-Aguilar, B. y Guyot, J.P. (1999). Purification and characterization of an extra-cellular  $\alpha$ -amilase produced by *Lactobacillus manihottivorans* LMG 18010, an amylolytic lactic acid bacterium.
3. Axelsson, L.T. (1994). Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. En : *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S. y Von Wright A. (Ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-63
4. Bibal B, Goma G, Vayssier Y, Pareilleux A. (1988). Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28, 340-344
5. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
6. Calderon, M., Loiseau, G. and Guyot, J.P. (2001). Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 508-516.

7. Carasik, W. And Carroll, J. O. (1983). Development of inmovilized enzymes for production of high-fructose corn syrup, *Food Technol.*, 37(10), 85
8. Castillo C, Suárez M, Gasparian S, Morton-Guyot J. (1993). Comparison of amylolytic properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. *Applied Microbiology. and Biotechnology*.40, 53-60.
9. Champ M., Szyllit O., Raibaud P. (1983). Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 487-493.
10. Flores, M.T. (1996). Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis de licenciatura (Biologa). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
11. Fullbrook, P. D., (1984). The enzymatic production of glucose syrupus, in Glucose Syrups. *Science and Technology*, Dziedzic, S.Z. and Kearsley, M. W., Eds., London, 65.
12. Giraud E, Brauman A, Keleke S, Lelong B and Raimbaut M. (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36, 379-383.
13. Giraud E., Gosselin L., Marin B., Parada J.L. and Raimbaut. (1993). Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *J. of Applied Bacteriol.* 75, 276-282.
14. Giraud E, Champailier A, Raimbaut M. (1994). Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 4319-4323.
15. Guilbot, A and Mercier, Ch., (1985). Starch, in The Polysaccharides . *Academic Press, New York*. 209.

16. Guyot, J.P., Calderon, M. y Morlon-Guyot, J. (2000). Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 176-182.
17. Guzmán-Maldonado, H. and Paredes-López O. (1995). Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch : A Review.. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35(5), 373-403.
18. Hesselstine C.W. (1979). Some Important Fermented Food of Mid-Aia, the Middle East, and Africa. *J. Am. Oil. Chemists Soc.* Vol. 56.
19. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
20. Lindgren S. y Refai O. (1984). Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57, 221-228.
21. MacKallister, R. V., (1979). Nutritive sweeteners made from starch . *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36, 15.
22. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
23. Morlon-Guyot J., Guyot J. P., Pot B., Jacobe de Haut Y. y M. Raimbault. (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Bacterial Systematics*. 48, 1101-1109.
24. Nakamura L.K. and Crowell C.D. (1979). *Lactobacillus amyphilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentations. *Dev. Ind. Microbiol.* 20, 531-540.

25. Nakamura L.K. (1981). *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31(1), 56-63.
26. Nielsen, H.K. (1991). Novel bacteriolitic enzymes and cyclodextrin glycosyltransferase for the food industry. *Food Technol.*, 45(1), 88.
27. Norman, B. E., (1982). The use of debranching enzymes in dextrose syrup production, in Maize: Recent Progress in Chemistry and Technology, *Ingllett, G. E., Ed. New York*. 157.
28. Nuraida L., Wachter M.C. and Owens J.D. (1995). Microbiology of *pozol*, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11, 567-571.
29. Olympia M., Fukuda H., Ono H., Kaneko Y. and Tacano M. (1995). Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food. "Burong Isda" and its amylolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (2), 124-130.
30. Ostergaard A., Embarek P.K.B., Wedell-Neergaard C., Huss H.H. and Gram L. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiology*. 15, 223-233.
31. Paludan-Müller C., Henrik H and Gram L. (1998). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 000-000.
32. Priece N.C. y Stevens L.(1993) Fundamentals of Enzymology. *Oxford Science Publications*. 17-52.
33. Tanasupawat S. and K. Komagata. (1995). Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. *World Journal of Microbiology*. 11, 253-256.

34. Wachter C., Lappe P. (1993). *Alimentos fermentados Indigenas de México*. Ed. UNAM. México.
35. Whitaker, J.R (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, 2 nd. Ed. New York, p. 400