

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

**ESTUDIO DE BACTERIAS LÁCTICAS
XILANOLÍTICAS AISLADAS DEL POZOL.
IDENTIFICACIÓN POR MEDIO DE ARDRA**

TESIS

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

PRESENTA

ALMA GENOVEVA FLORES GONZÁLEZ

México, D.F.

Agosto 2007



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: Dra. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA

Vocal: Dra. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

Secretario: Dra. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

1er Suplente: M. en C. MARTHA GILES GÓMEZ

2º Suplente: M. en C. ROSALBA ESQUIVEL COTE

Sitio donde se realizó el tema: Laboratorio 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México D.F.

ASESOR DEL TEMA

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

SUPERVISOR TÉCNICO

Biol. María Teresa Flores Espinosa

SUSTENTANTE

Alma Genoveva Flores González

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte por su confianza y paciencia, por los recursos y su invaluable ayuda. Gracias por su guía y ejemplo.

A la Dra. Dolores Reyes Duarte por su paciencia y consejos. Por ser un ejemplo como persona y profesionalista.

A la Biol. Ma. Teresa Flores, al Dr. Guillermo Aguilar Osorio, a la Dra. Gloria Ruíz Díaz y al Dr. León Martínez por su guía durante la elaboración del proyecto.

A la Dra. Irma Bernal Lugo y a la M. en C. Laurel Elidé Fabila por su ayuda con el manejo del equipo Fluor-S y el software Diversity Database.

A la UNAM por permitirme ser parte de esta maravillosa casa de estudios y apoyarme de todas las maneras posibles. Gracias por todas las experiencias.

DEDICATORIAS

Esta tesis no podría ser lo que es sin el apoyo invaluable de tantas y tantas personas. Dedicó esta tesis a ellas:

A mis papás y hermanos por permitirme volar y apoyarme en mi viaje. Por comprenderme y ayudarme a crecer. Muchas Gracias por creer en mí.

A mis abuelas y familia por darme alojamiento y guía. Por ayudarme a crecer.

A la Dra. Wachter por ayudarme a encontrar el equilibrio, por darme libertad y guía. Gracias Dra. aprendí muchísimo.

Al Dr. Rafael Almanza por poner a mi alcance recursos que me permitieron ser una buena estudiante. Por las amistades hechas. Gracias.

A la Fam. Martínez-Cienfuegos por apoyarme y ser como una familia para mí. Gracias

A Adriana Martínez por ser la mejor Liso-amiga del mundo. Gracias por estar allí cuando te necesitaba Liso.

Al Dr. Homero Hernández por ser mi guía y consejero. Muchas Gracias

Al Dr. Jorge Peón por su valiosa amistad, consejos y paciencia.

Al Dr. Fernández y José Luis por ayudarme en múltiples ocasiones.

A Paula y Alejandri por caminar juntos durante la carrera. Por el respeto y cariño que nos unió. Gracias.

A Lupita, Rocío, Dafne, Margarita por ayudarme a ser mejor persona y enseñarme a trabajar en el laboratorio. Por una bonita amistad. Gracias.

A Karen, Francisco, Ramón, Lalito y Mabel gracias por su tiempo y ayuda. Gracias por ayudarme a crecer y ser mejor persona. Gracias por las porras y por las sacudidas. Los quiero mucho.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ANTECEDENTES

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. EL POZOL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
A. GENERALIDADES:	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
B. PROCESO DE ELABORACIÓN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
i. Limpieza del maíz	Error! Bookmark not defined.
ii. Nixtamalización	Error! Bookmark not defined.
iii. Lavado del nixtamal	Error! Bookmark not defined.
iv. Segunda cocción o “reventado”	Error! Bookmark not defined.
v. Remojo	Error! Bookmark not defined.
vi. Molienda	Error! Bookmark not defined.
vii. Elaboración de la bola	Error! Bookmark not defined.
viii. Envoltura	Error! Bookmark not defined.
ix. Fermentación	Error! Bookmark not defined.
C. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
i. Contenido de fibras	Error! Bookmark not defined.
ii. Carbohidratos	Error! Bookmark not defined.
iii. Vitaminas	Error! Bookmark not defined.
iv. Variación del pH a lo largo de la fermentación	Error! Bookmark not defined.
D. COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
i. Fuentes de inóculo	Error! Bookmark not defined.
ii. Microbiota a lo largo del proceso de fermentación	Error! Bookmark not defined.
iii. Microorganismos encontrados en el pozol	Error! Bookmark not defined.
2. BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
A. GENERALIDADES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
B. METABOLISMO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
C. BAL EN EL POZOL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3. MÉTODOS DE ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
A. GENERALIDADES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
B. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN ALIMENTOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.	
C. MÉTODOS MOLECULARES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
i. Métodos de tipificación de microorganismos	Error! Bookmark not defined.
ii. Dendrogramas	Error! Bookmark not defined.
4. XILANO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
A. ESTRUCTURA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
B. XILANO DE FIBRA DE MAÍZ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5. ENZIMAS XILANOLÍTICAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
A. XILANASAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
B. B-XILOSIDASAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
C. AARABINOSIDASAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
D. A-GLUCURONIDASAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
E. ESTEARASAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

F. APLICACIONES

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

HIPÓTESIS

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

OBJETIVOS

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

MATERIALES Y MÉTODOS

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. MICROORGANISMO EMPLEADOS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - A. AISLAMIENTO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - B. HIDRÓLISIS DEL XILANO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2. TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL POZOL ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - A. COMPROBAR LA PUREZA DE LA CEPA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - i. Tinción de Gram Error! Bookmark not defined.
 - ii. Prueba de la catalasa Error! Bookmark not defined.
 - B. EXTRACCIÓN DE ADN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - C. COMPROBACIÓN DE LA CALIDAD DE EXTRACCIÓN DEL ADN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - D. CUANTIFICACIÓN DE ADN OBTENIDO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - E. UNIDADES DE ADN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - F. AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S POR LA PCR ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - G. DIGESTIÓN CON HAE III Y HINF I ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - H. DENDROGRAMAS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - I. SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3. FERMENTACIÓN EN MEDIO MRS- XILANO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - A. REACTIVACIÓN DE LA CEPA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - B. CONTEO EN PLACA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - C. FERMENTACIÓN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - D. MUESTREO Y-ANÁLISIS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - i. Peso seco Error! Bookmark not defined.
 - ii. pH Error! Bookmark not defined.
 - iii. Determinación de actividad enzimática Error! Bookmark not defined.
 - iv. Determinación de carbohidratos totales Error! Bookmark not defined.
 - v. Determinación de carbohidratos reductores Error! Bookmark not defined.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1. TIPIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS XILANOLÍTCAS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - A. EXTRACCIÓN DE ADN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - B. CUANTIFICACIÓN DE ADN OBTENIDO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - C. AMPLIFICACIÓN DEL GEN RRNA 16S MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - D. DIGESTIÓN CON HINF I Y HAE III ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - E. DENDROGRAMA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
 - i. Dendrograma hecho a partir de la matriz de distancias obtenidas por medio de la digestión de PCR con la enzima Hinf I Error! Bookmark not defined.

- ii. Dendrograma hecho a partir de la matriz de distancias obtenidas por medio de la digestión de PCR con la enzima Hae III Error! Bookmark not defined.
- G. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- 2. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LA TÉCNICA ARDRA VS. DGGE ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- 3. FERMENTACIÓN DE LA CEPA SNC 11 EN MEDIO MRS-X ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- A. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA SNC11 ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- B. CARACTERÍSTICAS DEL MEDIO CONTROL O BLANCO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- C. CONCENTRACIÓN DE BIOMASA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- D. PH ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- E. FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- F. PRUEBA DE ACTIVIDAD XILANOLÍTICA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

CONCLUSIONES ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ANEXOS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

- 1. MEDIOS DE CULTIVO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- A. AGAR MRS (OXOID) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- B. CALDO APT (DIFCO LABORATORIES) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- 2. REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
- 3. REACTIVOS PARA GEL DE AGAROSA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. BACTERIAS, HONGOS Y LEVADURAS AISLADOS DEL POZOL (6, 16-18) ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 2. PRINCIPALES ENZIMAS XILANOLÍTICAS ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 3 SECUENCIAS DE LOS PRIMERS USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL DE BACTERIAS. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 4. REACTIVOS PARA LA REACCIÓN DE PCR PARA AMPLIFICAR EL GEN RIBOSOMAL 16S DE BACTERIAS. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN USADAS ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 6. COMPOSICIÓN DEL MEDIO MRS-XILANO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 7. LISTADO DE LAS CEPAS DE POZOL PREVIAMENTE SECUENCIADAS (17, 44)
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLA 8. CEPAS IDENTIFICADAS POR MEDIO DEL DENDROGRAMA HECHO A PARTIR DE LA MATRIZ DE DISTANCIAS OBTENIDAS POR MEDIO DE LA DIGESTIÓN DE LA PCR CON LA ENZIMA HAE III ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DIAGRAMA DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL POZOL ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 2. EVALUACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS(23) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LOS ARABINOXILANOS (31) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL XILANO (32) ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 5. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 6. PROCEDIMIENTO PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CEPA SNC11 EN MEDIO MRS XILANO
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIG. 7. GEL DE AGAROSA AL 0.9 % EN EL QUE SE MUESTRA EL DNA EXTRAÍDO .
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIG. 8. GEL DE AGAROSA AL 1.8 % EN EL QUE SE MUESTRA EL DNA DEL GEN 16S AMPLIFICADO
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 9. GEL DE AGAROSA AL 1.8 % EN EL QUE SE MUESTRA EL PRODUCTO DE PCR, DIGERIDO POR LA ENZIMA HAE III
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 10 GEL DE AGAROSA AL 1.8 % EN EL QUE SE MUESTRA EL PRODUCTO DE PCR, DIGERIDO POR LA ENZIMA HINF I
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIG. 11. DENDROGRAMA RESULTADO DE LAS BANDAS DE DIGESTIÓN CON LA ENZIMA HINF I
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIG. 12. DENDROGRAMA RESULTADO DE LAS BANDAS DE DIGESTIÓN CON LA ENZIMA HAE III
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 13. CONCENTRACIÓN DE BIOMASA (PESO SECO) DE LA CEPA SNC11, DURANTE LA FERMENTACIÓN EN LOS MEDIOS MRS Y MRS XILANO. ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 14. MONITOREO DE PH DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA CEPA SNC 11 EN DIFERENTES MEDIOS.
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

FIGURA 15. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES Y REDUCTORES DURANTE LA FERMENTACIÓN POR LA CEPA SNC11 DEL MEDIO MRS-XILANO. ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.

INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida refrescante de origen maya, consumida por diversos grupos indígenas y mestizos del sur del país. Para la elaboración de este producto alimenticio se utiliza maíz (blanco, amarillo o negro), el cual es nixtamalizado, amasado, envuelto en hojas de plátano y, por último, fermentado.

La fermentación del pozol es natural, ya que no se añade intencionalmente un inóculo, y es llevada a cabo en estado semisólido con la intervención de una microbiota compleja que se incorpora al nixtamal durante su elaboración, principalmente durante la molienda. Esta microbiota está conformada por diferentes grupos de bacterias, hongos y levaduras. El presente trabajo se referirá solamente a las bacterias lácticas. Las bacterias lácticas predominan desde el inicio de la fermentación de las masas y son las encargadas de acidificar el producto.

Además del almidón, en la masa de maíz nixtamalizado se encuentra otro componente muy importante: la hemicelulosa, de la cual el xilano es el componente mayoritario. Flores (1996)(2) encontró que existen cepas del pozol que tienen la capacidad de ser xilanolíticas.

En el presente trabajo se propone emplear la técnica molecular ARDRA (análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado) para tener un conocimiento más amplio sobre la ecología microbiana de este alimento tradicional mexicano, específicamente de las bacterias lácticas xilanolíticas.

El objetivo de este estudio fue tipificar las bacterias lácticas por medio de la técnica molecular ARDRA, con dos diferentes enzimas de restricción, para posteriormente identificar una cepa de cada grupo.

Otro de los objetivos fue determinar si una bacteria xilanolítica seleccionada era capaz de crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono con el fin de determinar si este polímero es un sustrato importante en la fermentación del pozol.

ANTECEDENTES

1. El Pozol

a. Generalidades:

En la mayoría de los países tropicales donde los productos lácteos son difíciles de conservar, los alimentos con alto contenido de almidón son las bases de la dieta diaria. Para mejorar las posibilidades de almacenamiento de dichos alimentos, los procesos tradicionales que usan fermentaciones espontáneas han sido establecidos y mejorados a lo largo del tiempo.

En Guatemala y el sureste de México, principalmente en los estados de Tabasco, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Yucatán, Oaxaca y Veracruz (3), los indígenas y mestizos usan maíz como alimento de primera necesidad y con él preparan una bebida ácida, refrescante, no alcohólica llamada pozol (4)

El pozol es consumido desde tiempos prehispánicos y es componente importante de la dieta diaria de diferentes grupos étnicos. Además ha tenido gran importancia ceremonial, pues ya desde aquellos tiempos se usaba como ofrenda en las diversas festividades mayas relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz (4) Actualmente, entre la población indígena es consumida diariamente por adultos, niños e infantes (5)

Los indígenas elaboran el pozol principalmente para consumo familiar, aunque algunos lo producen en una escala ligeramente mayor para su venta, principalmente los mestizos o ladinos (6).

b. Proceso de elaboración

En general el pozol es elaborado cociendo el maíz en una solución alcalina de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) aproximadamente del 1% (w/v), posteriormente se lava y se muele para hacer una masa llamada *nixtamal*.

A dicha masa se le da forma de esfera y se la envuelve en hojas de plátano, o/y bolsas de plástico dejando que se fermente a temperatura ambiente de 0.5 a 4 días. La masa fermentada es suspendida en agua y posteriormente bebida (7) Al beber el pozol se le puede adicionar sal, azúcar, miel o chiles secos molidos (4) Existe una modalidad de este refresco llamado *chorote*, preparado en Chiapas fermentando una mezcla de nixtamal y cacao molido (4, 8)

Algunos componentes fibrosos no se solubilizan completamente en la nixtamalización, es por ello que al suspender la masa en el agua queda un sedimento no agradable, según la población mestiza. Aparentemente los mestizos han modificado el proceso tradicional de nixtamalización dando un segundo hervor, a los granos de nixtamal, en agua antes de molerlo y convertirlo en masa. De ese modo se reducen los sedimentos indeseables (7)

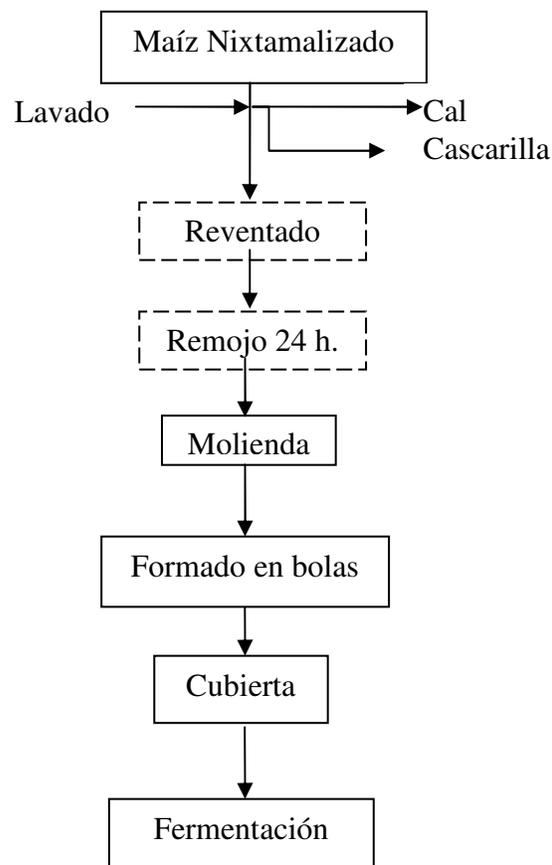


Figura 1. Diagrama del Proceso de elaboración del Pozol

A continuación se describen los pasos reportados por Cañas et. al. (9) involucrados en la obtención del pozol

i. Limpieza del maíz

El maíz se limpia para eliminar material extraño y granos podridos, comúnmente se agrega agua al maíz crudo de manera que lo cubra de 10 a 15 minutos. Se deja reposar unos minutos y se procede a retirar todo lo que flota (maíz picado, podrido o cascarillas)

Otro método tradicional consiste en vaciar maíz de un canasto sostenido a cierta altura a otro que se encuentre mas abajo. Mientras el maíz cae, se sopla (por ejemplo con un sombrero) y así se separa la cascarilla. Posteriormente es necesario separar los granos malos.

ii. Nixtamalización

Consiste en la cocción de los granos en agua con cal. Su objetivo es lograr la separación de la cascarilla del grano. Los productores comerciales la llevan a cabo en cubetas de metal y los familiares, en recipientes de peltre o de barro.

La cal, que se adquiere en el mercado local, se puede agregar directamente sobre el maíz seco, al que después se le adiciona el agua, o sobre la mezcla de maíz con agua. Algunos productores mestizos suspenden previamente la cal en agua, esperan a que se asiente y la agregan sin el sedimento, los indígenas la añaden directamente.

La cantidad de cal necesaria, la cual ha se ha determinado empíricamente, es muy importante, ya que si es insuficiente dará dureza al maíz dando lugar al “maíz para puercos”. Si la cantidad es mayor a la necesaria, es preciso lavar muy bien para eliminar el exceso y debe hacerse en un tiempo no mayor a 4 horas; de lo contrario el grano de maíz se impregna de cal y el color y sabor del pozol se alteran. Durante la nixtamalización el maíz adquiere un color amarillo, que se elimina con el lavado.

La cocción se lleva a cabo en hogueras y termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos. El tiempo oscila entre los 60 y los 120 minutos.

iii. Lavado del nixtamal

Se lleva a cabo con agua potable y tiene como fin la eliminación de la cascarilla. El maíz contenido en recipientes perforados se lava y se frota con las manos hasta que el agua residual sea transparente. Otra técnica consiste en agregar agua al nixtamal dentro de una cubeta, frotar los granos y transferirlos manualmente a otra cubeta con agua limpia, y repetir el procedimiento hasta que el agua de lavado quede libre de turbiedad.

iv. Segunda cocción o “reventado”

Esta operación representa la diferencia más importante entre pozol indígena y mestizo. Consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz “revienta” o “florece”. Esta operación sólo es hecha por productores mestizos. El tiempo de cocción varía de 3 a 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del Pozol. Esto en realidad permite la obtención de un producto más fino.

v. Remojo

Procede a la molienda y se lleva a cabo, en el caso del pozol indígena, incluyendo el agua del último lavado del nixtamal (en frío). El pozol mestizo se remoja con el agua de reventado (en caliente). Por lo general el remojo dura toda la noche y permite aumentar la retención de humedad, para evitar que el maíz se seque durante la molienda.

vi. Molienda

Se lleva a cabo el día siguiente a la nixtamalización o reventado, en un molino comercial, manual, o bien en un metate. Para llevarla a cabo se agrega un poco de agua. Algunos productores consideran que la calidad y características sensoriales del producto cambian de acuerdo con el molino empleado.

Resulta importante destacar que durante la molienda se observan focos potenciales de contaminación microbiana. Los molinos de mano jamás se desarmen para su limpieza. Es común desechar la primera tapa de masa que sale, ya que desprende un olor que es inaceptable en el producto. En el caso de molinos comerciales, se limpia una vez al día, al término de la

jornada, esta limpieza es un limpiado en seco, en donde se elimina la masa que queda adherida al molino. La piedra se enjuaga con agua después de su uso.

vii. Elaboración de la bola

La masa se amasa vigorosamente durante poco tiempo (40 a 80 seg.). Inmediatamente después se forman bolas con ambas manos, o sobre la mesa, la cual se enjuaga previamente con agua. Durante la formación de la bola, todos los indígenas y algunos mestizos, utilizan agua para hidratar la masa. Tanto la manipulación de la masa, como el agua agregada en esta etapa pueden ser, al igual que la molienda, fuentes importantes de inóculo para la fermentación.

La temperatura de las bolas de pozol varía de acuerdo con el tipo de proceso por el cual fueron obtenidas. Así, la temperatura interna de las bolas terminadas, oscila entre 20 y 27 °C y la externa de 20 a 24 °C. La forma y peso de las bolas también varía entre productores. La forma puede ser ovalada o redonda, mientras que el peso puede estar en el intervalo de 15 g a 1 Kg, siendo el pozol indígena el de mayor peso.

viii. Envoltura

Una vez amasado, el pozol se envuelve tradicionalmente en hojas de plátano, sin embargo actualmente es común envolverlo en bolsas de plástico. Algunos indígenas argumentan que la hoja retarda la acidificación del pozol. Sin embargo, actualmente la bolsa de plástico es preferida por ser más económica y por disminuir el peso y el volumen del producto.

ix. Fermentación

La mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco, es decir, el que se preparó el mismo día. Aunque no es muy ácido, ya presenta cierto grado de fermentación ya que el tiempo que transcurre entre su preparación (envoltura) y su consumo (aproximadamente 8 horas) es suficiente para que las Bacterias Lácticas (BAL) responsables de la acidificación alcancen su máximo desarrollo.

Entre los indígenas es mas frecuente el consumo de pozol maduro o agrio, sobre todo los hombres que realizan trabajo de campo, porque argumentan que les da energía para trabajar. La maduración, que consiste en dejar las bolas de Pozol en hojas de plátano a temperatura ambiente, tiene generalmente una duración máxima de 4 días, aunque algunas personas lo fermentan por más tiempo y lo consumen cuando ya presentan un notorio crecimiento superficial de mohos.

c. Composición Físico-Química

La transformación del maíz en masa requiere un proceso en el que se utiliza agua, calor e hidróxido de calcio. Estos tres elementos influyen en la composición química dando lugar a modificaciones en su contenido de nutrientes. Los cambios se deben a las pérdidas materiales de grano y a las pérdidas químicas, que pueden derivar de la destrucción de algunos elementos nutritivos y de la transformación química de otros.

i. Contenido de fibras

En la masa se encuentran en promedio 5.97 y 2.98 por ciento (peso seco) de fibra soluble en solución neutrodetergente y ácidodetergente, respectivamente. Con respecto a la hemicelulosa: la masa contiene un 3.18 por ciento (10)

Empleando el método de Asp et al. (11), Acevedo y Bressani (12) han hallado una disminución de fibra insoluble en la transformación del maíz crudo (13 por ciento) en masa (6 por ciento) La fibra soluble aumentó del 0.88 por ciento en el maíz crudo al 1.31 por ciento en la masa. La disminución debida a la transformación del maíz crudo en masa se debe a la pérdida de la cubierta seminal

ii. Carbohidratos

El maíz contiene aproximadamente 2% (w/w) de azúcares solubles (sobre todo sacarosa). Sin embargo, gran parte de esto es pérdida durante el cocido y los pasos de lavado, dando como resultado en un 0.7% a 0.1% (w/w) en peso seco de estos azúcares en la masa (13). También se han detectado pérdidas de almidón de aproximadamente el 5%. Con respecto

al contenido de glucosa libre se han reportado valores menores a 2g/L y el contenido de humedad en pozol oscila entre 58 a 71% (14)

Robles, Murray y Paredes-López (15) determinaron que la cocción en agua de cal y la maceración del maíz daban lugar a aumentos considerables de viscosidad y que el tiempo de cocción influía notablemente en las propiedades del empastado, aunque no se daba una gelatinización difundida del almidón. A mayor tiempo de cocción, mayor es la cantidad de almidón sensible a las enzimas.

iii. Vitaminas

Se han reportado pérdidas de tiamina, riboflavina, niacina y caroteno durante la transformación del maíz en tortillas por cocción en agua de cal. La vitamina que ha despertado la atención de diversos investigadores ha sido la niacina, por sus relaciones con la pelagra. Bressani, Gómez-Brenes y Scrimshaw (16) hallaron que la cantidad de niacina asimilable que contiene el maíz tratado en agua de cal es ligeramente superior a la del maíz en bruto.

iv. Variación del pH a lo largo de la fermentación

Durante la fermentación, el valor de pH de la masa disminuye de un valor inicial de aproximadamente 7 ó 7.5 a 5 ó 4 en 12 horas. Los valores de pH son de 4 a 4.7 después de, aproximadamente, medio día de fermentación. Durante 6 a 9 días de almacenamiento, el pH declina a valores aproximadamente de 3.6 a 3.9. En algunos casos se ha apreciado que en la superficie de la masa hay valores de pH de aproximadamente 4 a 4.4 (14)

Las concentraciones de acidez titulable (expresadas en por ciento de ácido láctico) se encuentran en valores entre 0.45% a 0.35% en pozol indígena y mestizo respectivamente, en este último se han encontrado valores de acidez un poco más altos (de 0.6% a 0.7%)

d. Composición microbiológica

i. Fuentes de inóculo

Como el pozol es un alimento fermentado naturalmente, es decir, no se le añade intencionalmente un inóculo, la microbiota existente en esa matriz es grande y diversa. En el proceso de manufactura del pozol hay varios puntos en los que los microorganismos podrían entrar en la matriz alimentaria. Nuriada, et al (1995)(14) encontró que el agua de remojo del nixtamal permite el crecimiento de diversos tipos de bacterias, incluyendo BAL, mesófilos aerobios y enterobacterias, las cuales constituyen la microbiota inicial del pozol.

Durante la molienda en molinos comerciales se contamina la masa con grandes cantidades de bacterias lácticas, mesófilos aerobios y adición de levaduras. Lo anterior debido a la masa fermentada retenida en los espacios muertos del molino. Otros pasos del proceso, incluyendo el contacto con las manos, tablas de madera, exposición al aire, etc. contribuyen solo en menor cantidad al inóculo de microorganismos en comparación con el remojo y la molienda (14)

ii. Microbiota a lo largo del proceso de fermentación

La evolución de la microbiota se divide en tres etapas. La primera etapa comienza con una alta cantidad de microbiota, la mayoría de la cual procede de la molienda (17). Esta microbiota inicial contiene aerobios estrictos, incluyendo *Exiguobacterium* y al menos dos estreptococos, miembros del género *Streptococcus* y *Enterococcus*, quienes reportaron ser una alta proporción de la microbiota a través del proceso (17).

Los aerobios estrictos están presentes en el pozol durante los primeros días de fermentación y consumen el oxígeno presente. Posteriormente disminuye su concentración hasta niveles indetectables.

Durante la segunda etapa (de 24 a 48 h) se desarrollaron BAL heterofermentativas, incluyendo a especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus fermentum*, alcanzan su nivel máximo

a las 48 h. La importancia de estos organismos heterofermentativos fue la producción de altos niveles de etanol, cuya concentración es similar a la de lactato (17).

La producción de ácido láctico por las BAL heterofermentativas resulta en un descenso de pH (a aproximadamente 4.2) el cual es probablemente responsable del desarrollo de levaduras y hongos que se desarrollan en la periferia de la bola de pozol. Finalmente el número de enterobacterias presentes en la fermentación decrece dentro de la bola, mas aumenta en la periferia.

La etapa final (48 a 96 h) de fermentación está caracterizada por un descenso en la concentración de BAL heterofermentativas y el aumento de BAL homofermentativas (parientes cercanos de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbrueckii*) y especies de *Bifidobacterium*, ninguna de las cuales han sido detectadas en previas etapas del proceso. Este desarrollo repercute en una baja posterior del pH, particularmente en el centro de la bola.

Las BAL homo fermentativas, más resistentes al pH bajo son capaces de desarrollarse, mientras que la concentración de ácido láctico es alto y el pH cercano o por debajo de 4. Ellas continúan con el proceso de acidificación. Por último, el desarrollo de *Bifidobacterium*, además de la producción de etanol (y no de acetato) por BAL heterolácticas, sugieren que las condiciones anaerobias prevalecen en el pozol.

Como se mencionó previamente, la microbiota dentro de las bolas del pozol varía. De esta manera, las poblaciones de levaduras, y hongos productores de exopolisacáridos, las bifidobacterias y las enterobacterias tienden a desarrollarse más en la periferia que en el centro de la bola. Sorprendentemente, los anaerobios estrictos y aerobios estrictos coexisten en la periferia de la bola, donde el oxígeno del aire debe estar disponible. Probablemente la gran cantidad de microorganismos que crecen en la superficie rápidamente utilizan dicho oxígeno de tal manera que la concentración aparente es cero. Por otra parte, la baja cantidad de bifidobacterias en las bolas de pozol sugieren que los nutrientes requeridos para su crecimiento no están disponibles en dicha matriz, pero que podrían ser producidos por los

organismo presentes en la periferia, como los hongos. Además, las levaduras que se desarrollan, sobre todo, en la periferia de la bola, tienden a limitar el descenso de pH durante la producción de ácido láctico (pH de 8.33) lo cual podría ayudar al desarrollo de las bifidobacterias, que son afectadas por bajo pH. Otros organismos, tales como *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus fermentum* han sido identificados en una distribución uniforme en las bolas de pozol (17).

iii. Microorganismos encontrados en el pozol

Durante el largo tiempo que se ha estudiado a este alimento, se han podido identificar a los siguientes microorganismos, gracias a diversas técnicas microbiológicas:

Tabla 1. Bacterias, hongos y levaduras aislados del Pozol (7, 17-19)

Bacterias	Mohos	Levaduras
<i>Bifidobacterium minimum</i>	<i>Cladosporium cladosporoides</i>	<i>Candida guilliermondii</i> var. <i>guilliermondii</i>
<i>Clostridium</i> sp.	<i>Penicillium fellutanum</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	<i>Phoma fimeti</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Enterococcus sulfureus</i>	<i>Phoma glomerata</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>		<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Lactobacillus alimentarium</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>		
<i>Lactobacillus fermentum</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactococcus lactis</i> sub. <i>Lactis</i>		
<i>Leuconostoc</i>		
<i>Oxalophagus oxalicus</i>		
<i>Pediococcus</i>		
<i>Sphingomonas</i> sp.		
<i>Streptococcus bovis</i>		
<i>Streptococcus macedonicus</i>		
<i>Streptococcus suis</i>		

2. Bacterias ácido lácticas (BAL)

a. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) comprenden un grupo de organismos en forma de bacilos o cocos, con baja proporciones de GC, son ácido tolerantes, no formadoras de esporas, catalasa negativo, gram positivo y se asocian de acuerdo con sus características metabólicas y fisiológicas.

Estas bacterias, que comúnmente se encuentran en plantas en descomposición y productos lácteos, producen ácido láctico como el producto final mayoritario del metabolismo de los carbohidratos. La característica anterior ha enlazado históricamente a las BAL con las fermentaciones alimentarias, puesto que la acidificación inhibe el crecimiento de agentes de putrefacción. Muchas BAL producen proteínas-bacteriocinas, lo cual provee una barrera para la descomposición o bien, hacia microorganismos patógenos. Aun más, el ácido láctico y otros metabolitos contribuyen al perfil organoléptico y de textura de un alimento(20).

La importancia industrial de las BAL es por su estatus de GRAS (Generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés). Los géneros que se encuentran reunidos bajo la clasificación de BAL son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* así como los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*; estos últimos pertenecientes a la orden de los *Lactobacilae*.

b. Metabolismo

Hay dos rutas principales de fermentación de hexosas, los cuales se usan para clasificar las BAL. Bajo condiciones de exceso de glucosa y oxígeno limitado, las BAL homolácticas catabolizan un mol de glucosa por la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) dando como producto dos moles de piruvato. El balance intracelular se mantiene a través de la oxidación de NADH a la par que se realiza la reducción de piruvato a ácido láctico. Este proceso genera dos moles de ATP por glucosa consumida.

Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas utilizan la ruta de las pentosas-fosfato (o ruta de las pentosas fosfocetolasas) En esta ruta, una mol de Glucosa-6P es inicialmente deshidrogenada a 6-fosfogluconato y subsecuentemente descarboxilada. La pentosa-5P se rompe en un mol de gliceraldehído-P y un mol de acetil-P. El gliceraldehído-P es posteriormente metabolizado a lactato como en una homofermentación, con el acetil fosfato reducido a etanol gracias a los intermediarios acetil-CoA y acetaldehído. Teóricamente, los productos finales (incluyendo ATP) son producidos en cantidades equimolares a partir del catabolismo de un mol de glucosa

c. BAL en el pozol

Las Bacterias Ácido-Lácticas son un grupo dominante durante todas las etapas de la fermentación del Pozol (7, 14, 19, 21)

Debido a la baja concentración de azúcares remanentes en el maíz, después de la nixtamalización (13), los polisacáridos deben ser el sustrato en mayor proporción. Entre los polisacáridos, el más importante en cantidad es el almidón. 40% de las BAL presentes en la masa inicial son amilolíticas, aunque la concentración de almidón va descendiendo hasta el 3% después de las 72 h de fermentación. (18). Lo anterior sugiere que el pH inicial (alrededor de 7.4) puede favorecer el crecimiento de bacterias con alta actividad amilolítica. En contraste, se observó una concentración relativamente alta de BAL no amilolíticas al final de la fermentación. Lo anterior podría ser por un uso eficiente de mono y disacáridos inicialmente presentes y de otros azúcares que hayan sido hechos disponibles por las BAL amilolíticas (18).

Flores (1996)(2) ha detectado actividad xilanolítica en la colección de BAL aisladas del pozol. Debido a la presencia de xilano en la hemicelulosa del maíz, estas bacterias podrían contribuir en la fermentación del pozol mediante el uso de este carbohidrato.

3. Métodos de estudio microbiológico

a. Generalidades

La microbiología de alimentos ha tendido a enfocarse en el estudio o detección de ciertos microorganismos. Sin embargo, se ha visto la necesidad de considerar el ecosistema completo, ya que el crecimiento, sobrevivencia y actividad de cualquier especie puede estar determinada por la presencia de otras especies.

Los conceptos ecológicos constituyen las bases tanto para el control de microorganismos indeseables como para el uso racional de microorganismos en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, así como para su uso como probióticos(22, 23).

b. Determinación de la estructura de comunidades microbianas en alimentos

Al ser los alimentos fermentados matrices complejas, el uso de los métodos convencionales para la identificación de cada uno de sus miembros resulta insuficiente. Una alternativa para determinar la estructura microbiana de estos alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos; otra es utilizar métodos que no dependan del cultivo, en los que se extraen ácidos nucleicos directamente del alimento (24) (Fig. 2).

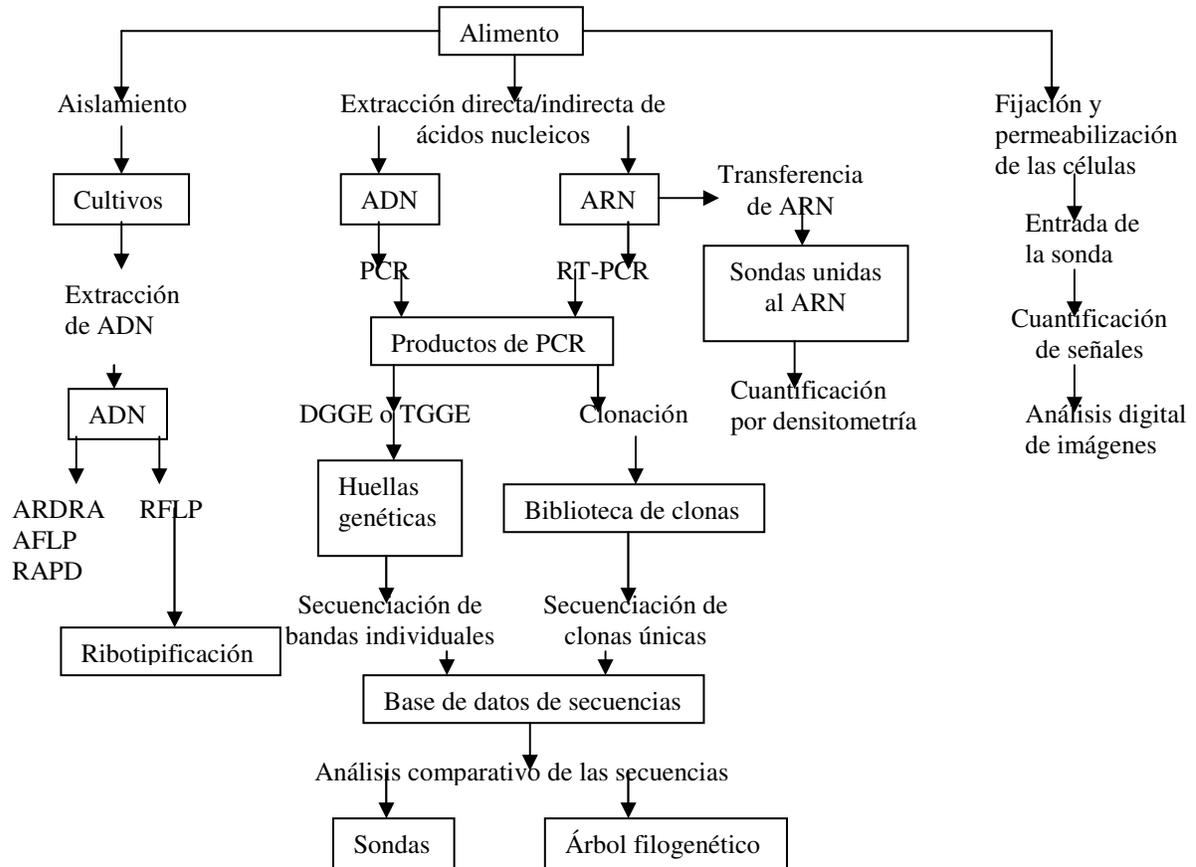


Figura 2. Evaluación de comunidades microbianas en alimentos fermentados(24)

Usando el enfoque ecológico sería posible recopilar:

- Datos confiables sobre la diversidad y la identificación taxonómica de los microorganismos que colonizan el alimento en cada etapa de su manejo
- Datos cuantitativos que describan cambios en las poblaciones durante la producción y cadena de distribución.
- Información sobre la distribución espacial de lo microorganismos en el producto
- Impacto de los factores intrínsecos y extrínsecos en el crecimiento, sobrevivencia y actividad bioquímica de los microorganismos
- Correlaciones entre el crecimiento y la actividad de los organismos individuales y la calidad y seguridad del producto (24).

c. Métodos Moleculares

Las relaciones entre los organismos constituyen la base más natural para clasificar a microorganismos (25, 26). Idealmente las relaciones entre microorganismos podrían ser establecidas comparando las secuencias nucleotídicas de sus genomas; sin embargo el análisis a esta escala es impráctico, pero puede ser inferido con tan solo la secuencia de genes individuales. Se utilizan entonces ciertas macromoléculas que funcionan como cronómetros evolutivos. Gracias a estas moléculas se puede medir la distancia evolutiva por diferencias en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos.

Las macromoléculas a utilizar deben estar distribuidas universalmente en el grupo a estudiar y deben ser funcionalmente homólogas en cada organismo. También es requisito que contengan regiones con similitud significativa y a la vez regiones que difieran para poder comparar sus secuencias. Las regiones variables deben de cambiar a una velocidad proporcional a la de la distancia evolutiva medida. En el caso de células procariontes, el ADN_r 16S (aproximadamente 1600 nucleótidos) es el más utilizado (27).

i. Métodos de tipificación de microorganismos

Los siguientes métodos agrupan microorganismos, lo cual nos permite distinguirlos más allá de la especie. Son muy útiles para agrupar microorganismos antes de la identificación(24).

1. RFLP.- (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
Esta técnica fue la primera en ser utilizada. Se extrae el ADN (el genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se separan y visualizan por electroforesis en geles de agarosa. Se obtienen patrones de bandas con buena reproducibilidad pero pro lo general son muy complejos. La forma como más se ha estudiado el RFLP es estudiando el polimorfismo de regiones particulares. Para hacer una ribotipificación se transfieren los fragmentos a una membrana, se hibridan con una sonda de ARN_r marcada y se visualizan únicamente los fragmentos hibridados, los cuales pueden ser comparados con cepas de referencia.

2. RAPD.- (Análisis del DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) Conocido también como **AP-PCR** (PCR cebado arbitrariamente) Consiste en amplificar al azar regiones de ADN extraído de microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. El problema de esta técnica es su sensibilidad a las condiciones de la reacción, por lo que es difícil en ocasiones obtener una reproducibilidad inter-laboratorios adecuada.

3. AFLP.- (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) Es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de DNA genómico. Se realiza en tres etapas:

a. Restricción del ADN y ligamento de los adaptadores: Se realiza la restricción con dos enzimas que producen fragmentos de ADN con dos tipos diferentes de extremos cohesivos. A estos se ligan adaptadores, que son oligonucleótidos cortos que funcionarán como los sitios de alineamiento de los cebadores.

b. Amplificación selectiva de algunos fragmentos de restricción: Se usan dos cebadores diferentes conteniendo la misma secuencia que los adaptadores más varias bases contiguas al sitio de restricción. Se utilizan condiciones estrictas, de manera que se amplifican únicamente los fragmentos en las que las extensiones del cebador coincidan exactamente con los nucleótidos adyacentes al sitio de restricción

c. Separación de fragmentos por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (geles de secuenciación): Generalmente se obtienen patrones de 50 a 100 fragmentos, con mucha reproducibilidad debido a las condiciones estrictas del alineamiento.

Esta y otras técnicas basadas en el PCR han sido automatizadas mediante el uso de cebadores marcados con fluorescencia. Otros métodos se basan en la comparación de DNA ribosomal.

4. ARDRA.- Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado. Se basa en la comparación de ADN ribosomal, para lo cual se obtiene el ADN_r mediante amplificación por PCR usando cebadores universales. El producto es luego digerido con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa.

Con todas estas metodologías se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” de cada microorganismo. Se determinan las diferencias entre éstos y se construyen matrices de distancias de los cuales se obtienen dendrogramas.

Para identificar los microorganismos clasificados, es común incluir en el análisis cepas de referencia o identificar cepas representativas de cada grupo mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S.

Estas metodologías son muy convenientes para clasificar e identificar rápidamente colecciones de microorganismos, sin embargo requieren del aislamiento y cultivo de los microorganismos (18)

ii. Dendrogramas

Los dendrogramas son diagramas, con forma de árbol, que se utilizan para representar las relaciones entre organismos. La longitud de sus ramas es proporcional al grado de semejanza entre los microorganismos(28).

Para formar los árboles es necesario formar una matriz de distancias con datos fenotípicos o genotípicos, posteriormente se realiza un agrupamiento. Los agrupamientos más comunes son el UPGMA (Agrupamiento por pares sin pesos usando medias aritméticas) y el neighbor joining. El de UPGMA se usa más debido a su simplicidad y aplicabilidad universal(29, 30).

4. Xilano

El xilano es el mayor componente de la hemicelulosa de las plantas después de la celulosa(31) El xilano y la celulosa son los polisacáridos hemicelulósicos predominantes que se encuentran en las paredes celulares de las plantas terrestres. En ellas pueden constituir más del 30% de peso seco (31)

a. Estructura

La estructura de los xilanos es variable, pues va de cadenas β -1,4 polixilosa a cadenas altamente ramificadas de heteropolisacáridos (Figura 3).

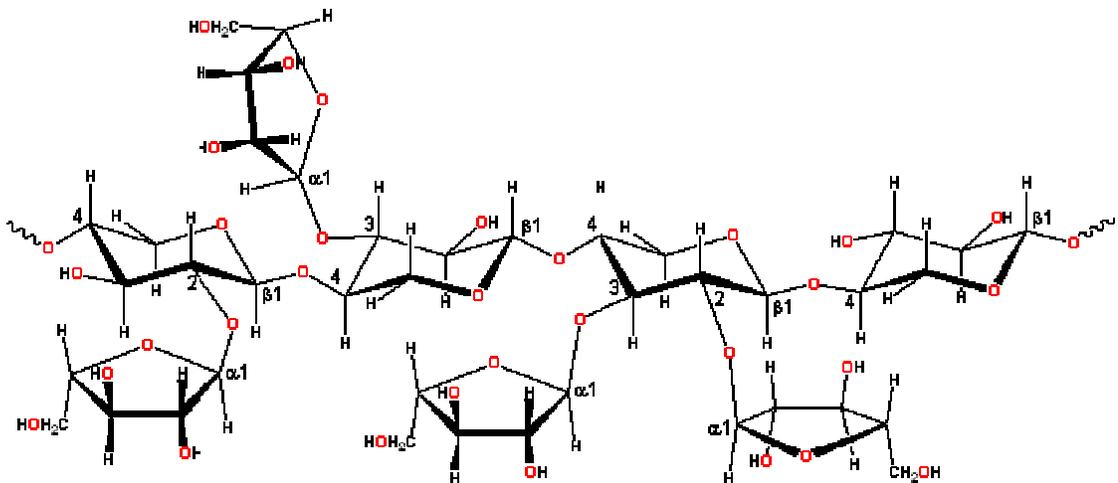


Figura 3. Estructura de los arabinoxilanos (32)

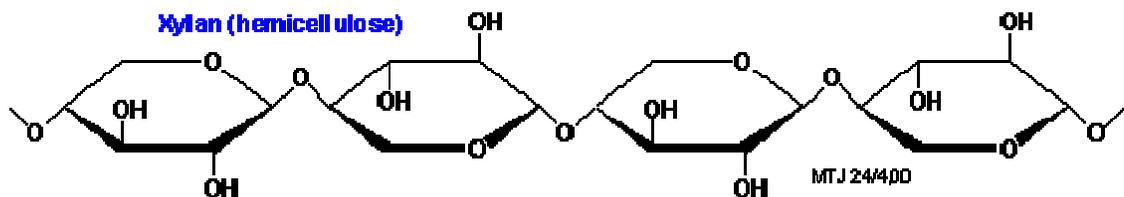


Figura 4. Estructura del xilano (33)

La cadena principal del xilano es análoga a la de celulosa pero compuesta de D-xilosa en vez de D-glucosa. Las ramas consisten en L-arabinofuranosa ligada a las posiciones O-3 de los residuos de D-xilosa. También pueden ser de ácido D-glucorónico o de ácido 4-O- metil-D-glucorónico ligado a las posición O-2. Ambas cadenas laterales están ligadas α -

glicosídicamente. La cantidad de ramas y su composición varia dependiendo da la fuente de procedencia.

Los xilanos son usualmente constituyentes primarios de la pared celular de semillas y bulbos de ciertas plantas, en ellas su papel es el de carbohidrato de reserva. En cualquier parte de la planta, los xilanos interactúan con otros componentes estructurales con los que puedan hacer puentes de hidrógeno, en particular con las microfibrillas de celulosa, o bien con la lignina. Los xilanos son solubles en soluciones alcalinas.

b. Xilano de fibra de maíz

La fibra de maíz es la fuente de una hemicelulosa. Puede ser obtenido por extracción con agua alcalinizada (solución diluida de hidróxido de calcio) de la fibra de maíz. Es usado como espesante y/o como estabilizador de emulsiones y agente extensor. Esta fibra consiste en una cadena con enlaces (1→4) unidades de β-D-xilanopiranosil altamente ramificada (23%).

La hemicelulosa de pericarpio de trigo es similar a la fibra de maíz en estructura y composición (34).

5. Enzimas Xilanolíticas

Tabla 2. Principales enzimas xilanolíticas

Enzima	Número de clasificación
Endo β-1,4-xilanasa	EC 3.2.1.8
endo β-1,4-mananasa	EC 3.2.1.78
β-1,4-D-xilosidasa	EC 3.2.1.37
acetil-xilan-esterasa	EC 3.1.1.6
α-arabinofuranodasa	EC 3.2.1.55
α-glucoronidasa	EC 3.2.1

Debido a la compleja estructura de los xilanos, diversas enzimas son requeridas para su degradación y modificación.

Las principales glicanasas que depolimerizan la columna de la hemicelulosa son la endo β -1,4-xilanasa y la endo β -1,4-mananasa. Los oligosacáridos pequeños son posteriormente hidrolizados por la β -1,4-D-xilosidasa, β -1,4-D-manosidasa, y la β -1,4-glucosidasa. Los grupos laterales esterificados son liberados por la acetil-xilan-esterasa y la acetil-galactoglucomanan-estearasa.

a. Xilanasas

Históricamente, la división funcional de las xilanasas ha estado relacionada a la capacidad de ciertas xilanasas para liberar sustituyentes arabinosil del arabinoxilano. Hay algunas que son cooperativas y otras que no así como existen endo y exo xilanasas. La xilotriosa es el oligómero más pequeño hidrolizado por las xilanasas caracterizadas y reportadas(35)

b. β -XILOSIDASAS

Las 1,4- β -D-xilosidasas hidrolizan los xilooligosacáridos y la xilobiosa a xilosa al remover sucesivamente residuos de D-xilosa del extremo no reductor. Estas enzimas son parte de la mayoría de los sistemas xilanólíticos microbianos, sin embargo los niveles de producción extracelular más grandes han sido reportados en hongos.

Las β -xilosidasas son enzimas grandes, con pesos excediendo a los 100 kDa y con frecuencia se componen de dos o más subunidades(35). La mayoría de estas enzimas purificadas muestran alta actividad hacia la xilobiosa y no muestran actividad hacia el xilano. La actividad hacia los xilo-oligosacáridos generalmente decrece rápidamente con el incremento de la cadena(35).

Además de la formación de xilosa, muchas β -xilosidasas también pueden tener actividad de β -glucosidasa. Estas enzimas son inhibidas por la xilosa.

c. α Arabinosidasas

Las α -L-arabinofuranosidasas hidrolizan los grupos α -L-arabinofuranosil no reductores de los arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos. La producción de arabinosidasas en los

microorganismos es frecuentemente asociado con la producción de enzimas pectinolíticas o hemicelulósicas.

d. α -Glucuronidasas

Para realizar la hidrólisis de los enlaces α -1,2-glicosídicos entre la xilosa y el ácido D-glucurónico o su 4-O-metil éter, se necesitan las α -glucuronidasas. Solamente unas cuantas α -glucuronidasas han sido purificadas o caracterizadas totalmente (35).

e. Esterasas

Aunado a las enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos de los xilanos, se requieren esterasas para liberar los ácidos esterificados de los xilanos.

Los xilanos son frecuentemente aislados por extracción alcalina, en la cual los grupos éster están saponificados. Algunas de las enzimas accesorias son capaces de liberar sustituyentes del xilano polimérico y por lo tanto podrían ser utilizadas para cambiar la viscosidad y solubilidad de xilanos.

En la naturaleza, todas estas enzimas están presentes, usualmente, en mezclas con otras enzimas degradadoras de biomasa y actúan sinérgicamente con ellas para romper las paredes celulares. El sinergismo entre las α -arabinosidasas, xilanasas y las β -xilodisadas ha sido demostrado en la hidrólisis de arabinoxilano de salvado de trigo con enzimas purificadas de *T. reesei* (35).

Debido al alto grado de acetilación, las xilanasas tienen solo acceso limitado a la columna polimérica en la ausencia de esterasas. Sin embargo, la desacetilación por acetil-xilan-esterasas previas a la acción de xilanasas, resultan en un rendimiento menor que cuando actúan simultáneamente la xilanasas, la β -xilodisasa y las esterasas (35).

f. Aplicaciones

Las aplicaciones biotecnológicas potenciales de las enzimas xilanolíticas han sido descritas ampliamente, aquí presentamos un resumen de ellas (35):

- Preblanqueado de pulpa kraft

Las enzimas xilanolíticas requieren de una baja inversión, no complican el proceso, reducen significativamente el uso de blanqueadores y reducen la contaminación.

- Decortezado.

Ayudan a deshacer más eficientemente la capa de células entre la madera y la corteza, reducen las pérdidas en el proceso e impiden que queden residuos de corteza que podrían oscurecer el papel.

- Modificación de fibras
- Producción de fibras disolventes

Estas fibras se utilizan para producir materiales celulósicos como acetatos, celofanes y rayones. Las enzimas xilanolíticas ayudan a que estos materiales estén lo más puro posible, ayudan a quitar color y a utilizar menos químicos, lo cual reduce costos y contaminación al ambiente.

- Remoción de fragmentos

Aumentan la calidad de la pulpa al eliminar los fragmentos de fibras que quedaron sin separar durante el proceso, además eliminan color.

- Podredumbre controlada de fibras de lino y cáñamo
- Clarificación d vinos y jugos
- Extracción de café, aceite de plantas y almidón
- Maceración de plantas con paredes celulares
- Aumentar las propiedades nutricionales de los piensos
- Producción de espesantes
- Modificador de textura de productos de la panificación.

En resumen, se ha demostrado que las BAL son importantes en la fermentación del pozol, pues ellas son las encargadas de acidificar la masa(17). Debido a la baja concentración de azúcares remanentes en el maíz, después de la nixtamalización (13), los polisacáridos deben ser el sustrato en mayor proporción para estas bacterias. Entre los polisacáridos, el más importante, en cantidad, es el almidón y se ha encontrado que 40% de las BAL presentes en la masa inicial son amilolíticas, observando que la concentración de almidón va descendiendo

hasta el 3% después de las 72 h de fermentación. (18). En contraste, se ha observado una concentración relativamente alta de BAL no amilolíticas al final de la fermentación.

Además del almidón, en la masa de maíz nixtamalizado se encuentra otro componente muy importante: la hemicelulosa, de la cual el xilano es el componente mayoritario. En el pozol, de las 94 cepas de BAL aisladas 88% son xilanolíticas (2). El xilano es el componente mayoritario de las hemicelulosas (más del 30%), y la masa contiene un 3.18% de estos polisacáridos. Se ha observado que 64% de las BAL aisladas del pozol, son alta o medianamente xilanolíticas por lo que deseamos saber si una de estas bacterias puede crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono. Finalmente tipificar las cepas e identificarlas nos ayudará para saber más sobre la relación entre este polímero y las BAL aisladas del pozol.

HIPÓTESIS

Si las bacterias lácticas xilanolíticas pueden desarrollarse en el pozol y existe una gran variedad de éstas en el pozol, entonces esta actividad enzimática debe ser importante durante la fermentación de este alimento.

OBJETIVOS

Identificar y tipificar bacterias lácticas aisladas del pozol, con el fin de determinar si, en un dendrograma, las bacterias xilanolíticas constituyen un solo grupo, así como si son capaces de desarrollarse en medios con xilano como fuente de carbono.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Tipificar y clasificar las bacterias lácticas aisladas del pozol mediante la técnica ARDRA (Análisis de Restricción del ADN ribosomal Amplificado)

* Identificar bacterias seleccionadas de cada uno de los grupos obtenidos en el punto anterior.

* Determinar si una bacteria xilanolítica es capaz de desarrollarse en un medio con xilano como única fuente de carbono con el fin de determinar si este polímero es un sustrato importante en la fermentación del pozol.

MATERIALES Y MÉTODOS

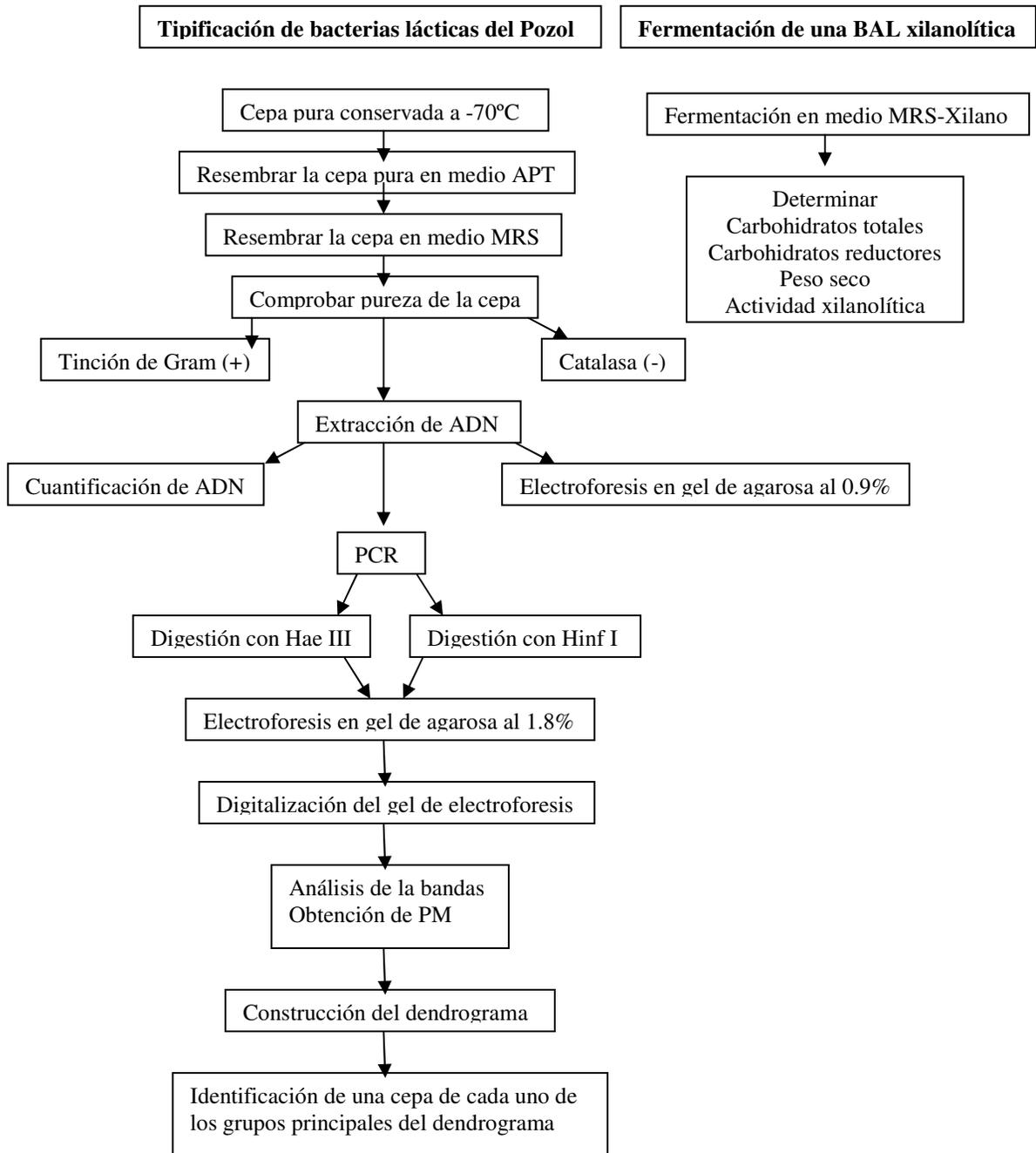


Figura 5. Diagrama general de la metodología de la investigación

1. Microorganismo empleados

a. Aislamiento

Se trabajó con una colección de 94 cepas de bacterias lácticas aisladas de diferentes muestras de pozol elaboradas en Tapachula y San Cristóbal de las Casas por un productor local. Las cepas fueron aisladas por Nuraida (1988) (2, 36) y Cañas (1991) (37). Para ello se tomó muestras de las bolas de pozol de la superficie y del interior, empleando una espátula estéril. Se suspendieron las muestras (10 g) en 90 mL de agua peptonada al 0.1%, se hicieron diluciones y se sembraron alícuotas de 0.1 en placas con medio de cultivo (Agar MRS), posteriormente se incubaron 4 días y se contaron todas las colonias catalasa negativo. Para el aislamiento de las cepas de bacterias lácticas se transfirieron colonias representativas en placas con medio de la misma composición y se resembraron por estrías. Las colonias puras resultantes se inocularon en medio semisólido de APT adicionado con 0.2% de agar con un punta de espátula de CaCO₃ por tubo(2).

Las perlas fueron cultivadas por el método de ultracongelación en perlas de vidrio perforadas con glicerol (Technical Service Consultants, Ltd.) a -70°C

b. Hidrólisis del xilano

Flores (1996)(2) caracterizó la actividad xilanolítica de la colección de BAL aisladas del pozol de la siguiente manera:

Se sembraron los microorganismos por picadura en el centro de una caja petri con agar-APT, en el cual se sustituyó la glucosa por RBB-Xilano (Azul de Ramazolio Brillante unido a Xilana (SIGMA M 5019)) al 1% como fuente de carbono y se incubaron a 29°C durante 168 h. El sustrato al ser hidrolizado se decolora en aquellas zonas en donde está presente la actividad enzimática y los halos de hidrólisis se observaron como zonas claras que contrastaban con el color azul del resto del sustrato que no fue hidrolizado.

La actividad xilanolítica se definió como de acuerdo al tamaño del diámetro de los halos (medidos en centímetros). De esta manera los halos de 0 a 1 cm se clasificaron como

actividad débil, los halos de 0.1 a 2 cm como actividad media y los halos de 2.1 a 3cm como actividad fuerte.

2. Tipificación de bacterias lácticas aisladas del pozol

a. Comprobar la pureza de la cepa

Para asegurar la pureza de las cepas aisladas se realizaron observaciones coloniales y microscópicas. Se determinó el gram y se realizó la prueba de la catalasa, para eliminar las que no pertenecieran al grupo de bacterias lácticas.

i. Tinción de Gram

Debido a que la morfología del gram puede cambiar con el tiempo y medio de cultivo, se cuidaron estos parámetros, siendo para todas las cepas el medio de resiembra APT por 24 horas a 30°C, con posterior plaqueo en medio MRS agar incubado en las mismas condiciones. La tinción de gram para las BAL se realizó de acuerdo al método descrito por Harrigan y McCance (38).

ii. Prueba de la catalasa

Para esta prueba, sobre un portaobjeto limpio, se colocó una gota agua, sobre ella una asada del cultivo a probar. Finalmente se agregaron 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Esta prueba se toma como positiva con la efervescencia del peróxido de hidrógeno (39).

b. Extracción de ADN

Para extraer ADN a partir de cepas puras se empleó el procedimiento modificado de Lawson et al. (1989)(40) La metodología se describe brevemente a continuación:

- Colocar 500 µL de buffer TES en microtubos de 1.5 mL estériles. Con asa estéril tomar y resuspender una muestra de biomasa bacteriana de los cultivos en placa de MRS del tamaño de un grano de arroz aproximadamente.

- Adicionar 20µL de lisozima (20µg/µL), agitar con la mano. Incubar en un baño a 37°C de 15 a 60 min. Se deberá ver cómo la viscosidad aumenta. Este paso ayuda a romper la pared celular

- Adicionar 8µL de pronasa (20µg/µL) para que degrade proteínas, y 8 µL de ARNasa (20µg/µL), la cual degrada el ARN. Se agita con la mano y se incuba en baño a 65°C por 1 h.

- Adicionar 120 µL de SDS (10%), agitar en un vortex por 5 s. e incubar en baño de agua a 65°C por 1 h. Este tratamiento contribuye a romper células y la temperatura alta evita la acción de las dnasas.

- Dejar enfriar y adicionar 600 µL de fenol-cloroformo (Sigma-Aldrich, 25:24) Agitar vigorosamente con la mano hasta formar una emulsión blanca y centrifugar 10 min. en microcentrífuga (Hermle) a 14,000 rpm

- Extraer la fase superior y colocarla en un microtubo de 1.5 mL nuevo, adicionar etanol absoluto frío en un volumen similar al extraído y mezclar suavemente.

- Centrifugar 10 min a 10,000 rpm

- Retirar el sobrenadante con cuidado y dejar secar

- Resuspender el pellet en 50µL de agua desionizada estéril, dejar hidratar y almacenar a 20°C

c. Comprobación de la calidad de extracción del ADN

Para dicha comprobación se hizo una electroforesis convencional en geles de agarosa (Agarosa ultrapura Invitrogen™ Life Technologies) a una concentración de 0.9% w/v

Se corrieron las muestras en un equipo de electroforesis convencional, de campo constante (Fuente de poder: BIO RAD Power Pac 300, BIORAD, EUA. Cámara de electroforesis: Pharmacia Biotech, GNA 011, Ámsterdam Biosciences AB, Suecia) Los amortiguadores usados fueron TAE 2X con azul de bromofenol, como amortiguador de carga y como amortiguador de la cámara TBE 1x.

Las condiciones para la electroforesis fueron 55 V por 120 min. Al término de la misma se tiñó el gel en solución de bromuro de etidio (0.5 µL/mL) (BIO-RAD) y se digitalizó la

imagen en un Fluor-S Multimager (Bio-Rad, Richmondon, California, EUA). El ADN debe aparecer como una banda definida de alto peso molecular

d. Cuantificación de ADN obtenido

Con el fin de determinar el grado de pureza de la extracción, así como para tener condiciones semejantes en la concentración de ADN que se va a amplificar por la PCR (una unidad, es decir, 50ng/μL), se cuantificó el ADN por el método descrito por Sambrook et al. (41). Para ello se midió la absorbancia de la solución de ADN en el espectrofotómetro (UV-visible Agilent 8453E) a dos longitudes de onda 260 y 280 nm.

La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ADN o ARN en la muestra, la lectura a 280 nm está asociada a la cantidad de proteína presente en la muestra y por lo tanto la pureza del producto. La relación entre ambas lecturas 260/280 estima la pureza del ácidos nucleicos; si la relación es de 1.8 a 2.0 se dice que el ADN está puro.

e. Unidades de ADN

Una unidad de ADN es igual a 50ng/μL. Para conocer la concentración de ADN es necesario multiplicar la absorbancia a 260 nm por el factor de dilución por 50 ng/μL

f. Amplificación del gen 16S por la PCR

Se realizó la amplificación del gen 16S ribosomal con ayuda de los primers pA y anti pA (Tabla 3)

Tabla 3 Secuencias de los primers usados para la amplificación del gen ribosomal de bacterias.

Primer	Secuencia (5'→ 3')	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reverse
*pA	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1540-1521	Foward

El PCR se llevó a cabo en un termociclador (BIOMETRA, T-PERSONAL) Los reactivos y su concentración utilizados para amplificar el gen ribosomal se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos para la reacción de PCR para amplificar el gen ribosomal 16S de bacterias.

Reactivos	Volumen (μl)	Concentración en la reacción
ADN (50 ng/ml)	5	250 ng de ADN
Taq ADN polimerasa recombinante (1U/μl) ¹	1	1.25 U
Buffer (10x)		
MgCl ₂ (25mM)	5	1x
dNTP's (10mM) ²	5	2.5 mM
Primer pA (200 ng/μl) ³	1	0.2 mM
Primer pH (200ng/μl) ³	0.5	(20 ng/μl)
Agua desionizada, filtrada y estéril	0.5	(20 ng/μl)
	cbp 50	---

Se usó el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 seg, anillamiento a 56°C por 30 s y un tiempo de elongación de 60 s a 72°C, con 1 ciclo final de elongación de 5 minutos a 72°C.

Para comprobar la eficacia de este paso se hizo uso del gel de agarosa al 1.8 % cuyas características ya fueron abordadas. Para revelarlo se utiliza el mismo procedimiento que en el caso del gel de agarosa para ADN.

g. Digestión con Hae III y Hinf I

Estas enzimas tienen una secuencia de corte de 4 a 6 pb, el tiempo óptimo de corte fue de 6.5 h a 37°C, se utilizaron 7.5 μL de producto de PCR para digerir por 5 U de enzima.

Tabla 5. Características de las enzimas de restricción usadas

Enzima	Marca	Secuencia del sitio de corte	Unidades por microlitro
Hae III	Invitrogen	GGCC	10u/μL
Hinf I	Invitrogen	GANTC	10u/μL

Se separaron los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1.8% en buffer TBE 1x, usando una cámara de electroforesis de campo constante a 55volts, durante 120 min, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio (0.5µl/ml) durante 10 min.

h. Dendrogramas

Una vez digitalizados los geles de agarosa en el Fluor S-Multimager, se analizaron los mismos en el programa Diversity Database (Richmonton, California, EUA, BIO-RAD), de esa manera se analizaron de manera eficiente las bandas existentes y se determinó su peso molecular.

Con los pesos moleculares se realizó una base de datos y se construyó una matriz basada en la presencia o ausencia de bandas para cierta cepa. Esos datos se introdujeron en el programa Treecon para Windows (Yves Van de Peer, Departamento de Biología, Universidad de Konstanz) el cual, por el método UPGMA, estimando distancias por el modelo matemático de Nei y Li (42), construyó un dendrograma para cada enzima de restricción utilizada.

i. Secuenciación del gen 16S

En esta investigación no hubo necesidad de secuenciar ninguna de las cepas, debido a que la mayoría entran en los grandes grupos en los cuales ya hay cepas que fueron identificadas en investigaciones anteriores.

3. Fermentación en medio MRS- Xilano

Se eligió una cepa de alta actividad xilanolítica (2) y nula actividad amilolítica para saber si era capaz de crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono. La cepa en cuestión está clasificada en la colección de bacterias lácticas aisladas del pozol como SnC11 (aislamiento hecho en San Cristóbal de las Casas)

Al tratarse de una bacteria láctica, que presenta muchos requerimientos nutrimentales se utilizó el medio MRS- Xilano cuya composición se muestra a continuación:

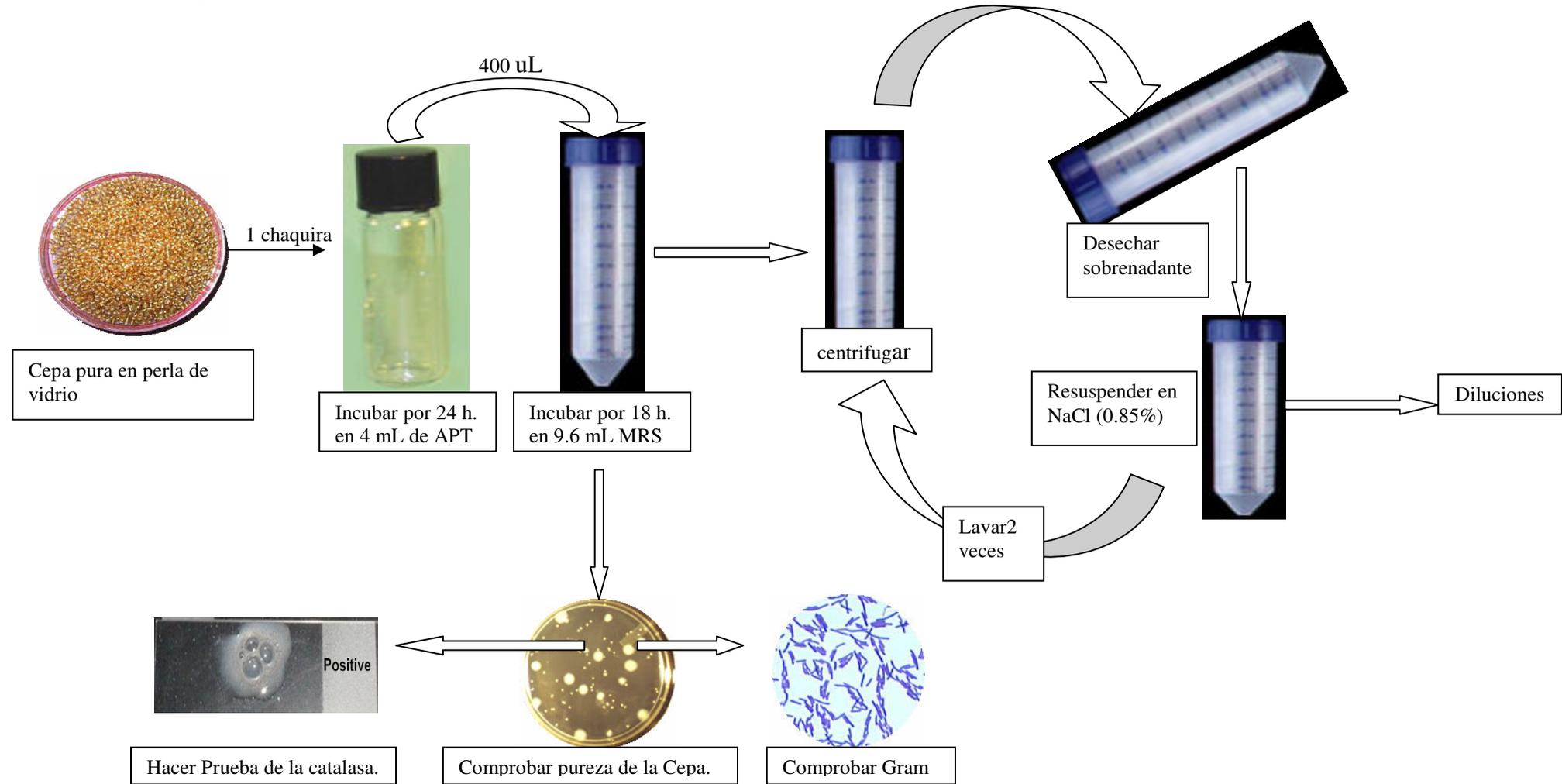
Tabla 6. Composición del medio MRS-Xilano

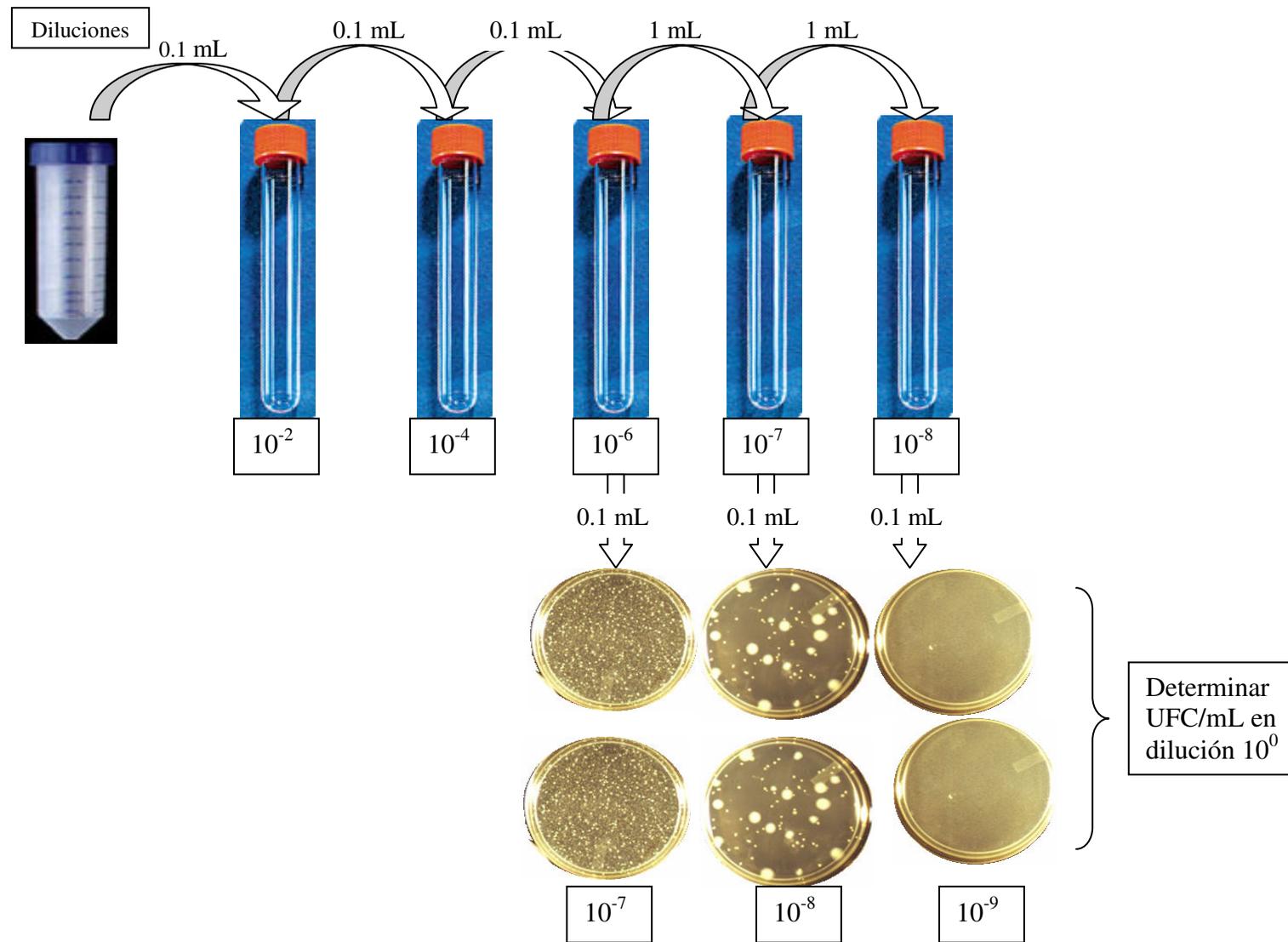
CALDO MRS-XILANO	
Medio no selectivo para crecimiento abundante de bacterias ácido-lácticas	
FÓRMULA	
	Para 1L de medio
Ingredientes	g/L
Peptona	10
Polvo "Lab-Lemco"	8
Extracto de levadura	4
Xilano	20
Monoleato de Sorbitán	1
Fosfato dibásico de potasio	2
Acetato de sodio*3H₂O	5
Citrato de triamonio	2
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de Manganeso*4H₂O	0.05
pH	6.2±0.2

El xilano utilizado fue “xilano de abedul” (Biochemika, Fluka, 95588), debido a su alta solubilidad y nula fracción amilolítica.

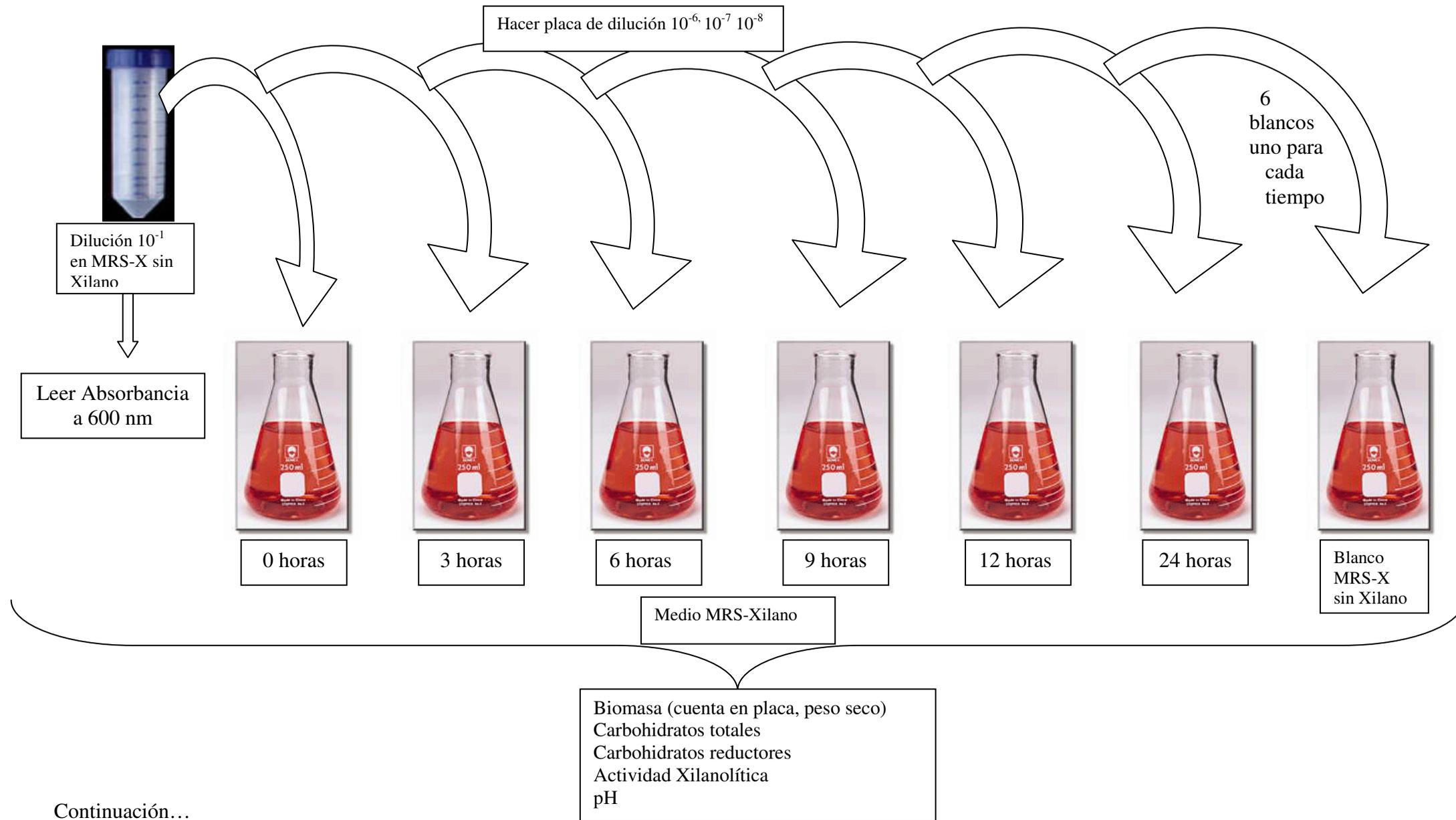
El procedimiento de la fermentación se muestra en la Figura 6. **Todas las pruebas se hicieron por triplicado.**

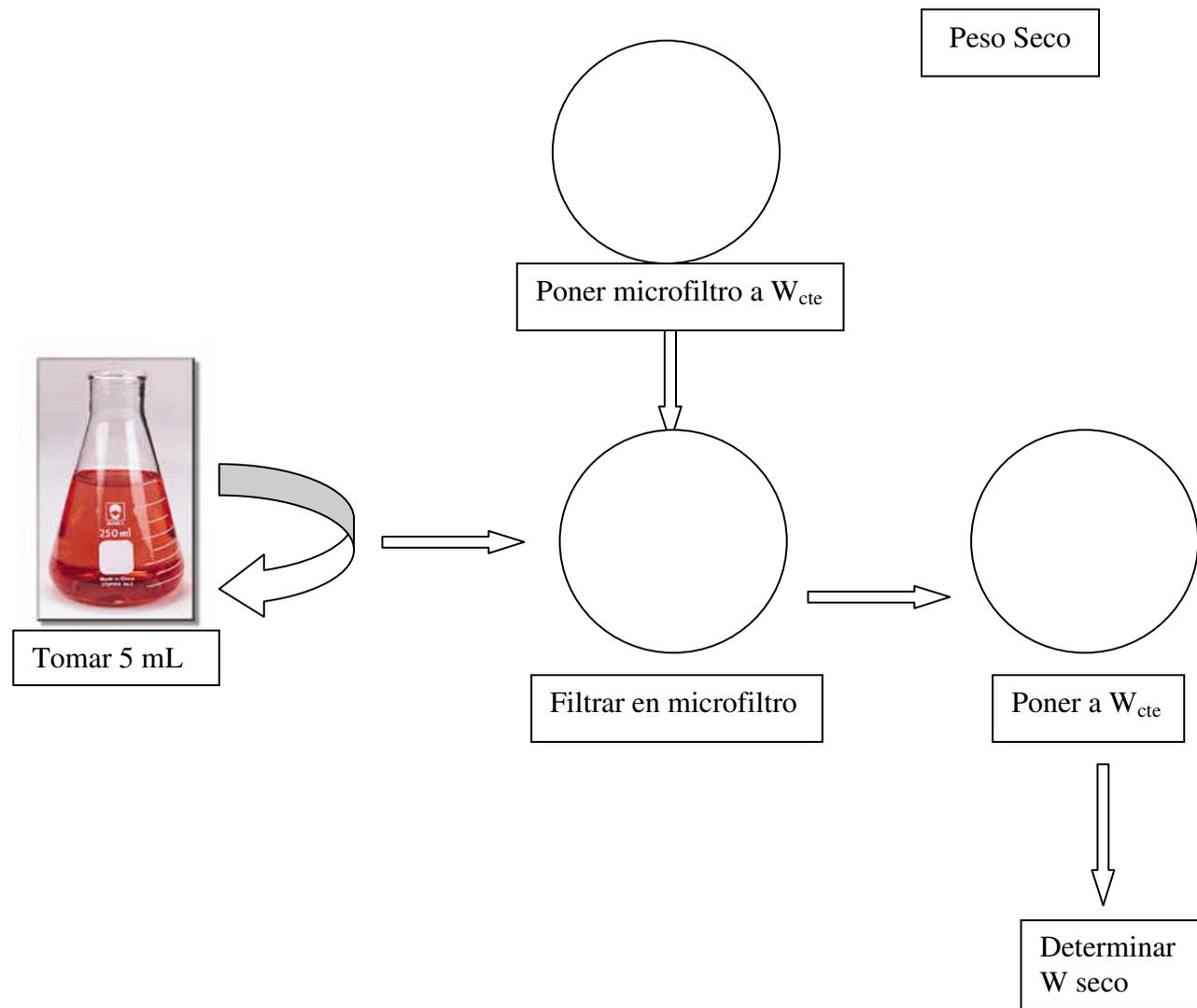
Figura 6. Procedimiento para la fermentación de la cepa SnC11 en medio MRS xilano





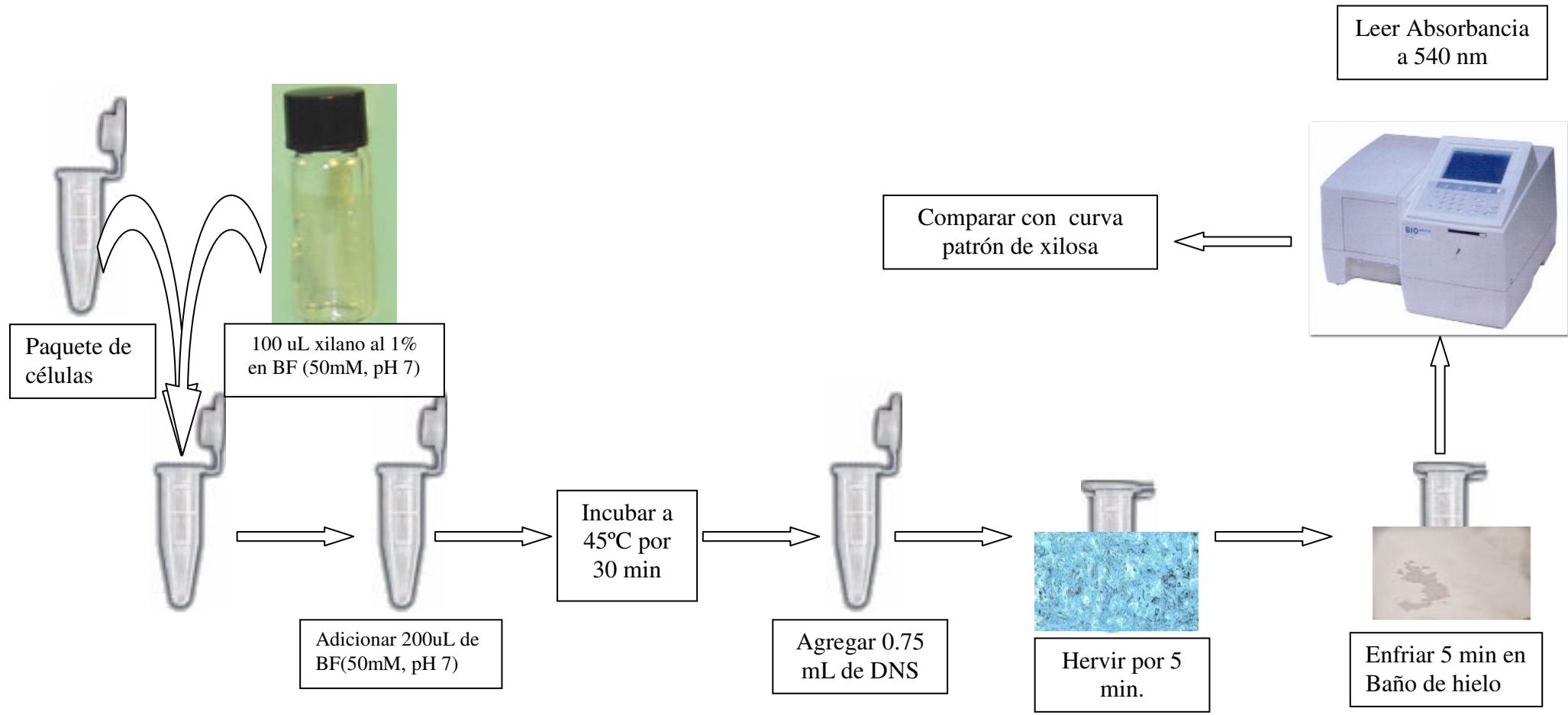
Continuación...





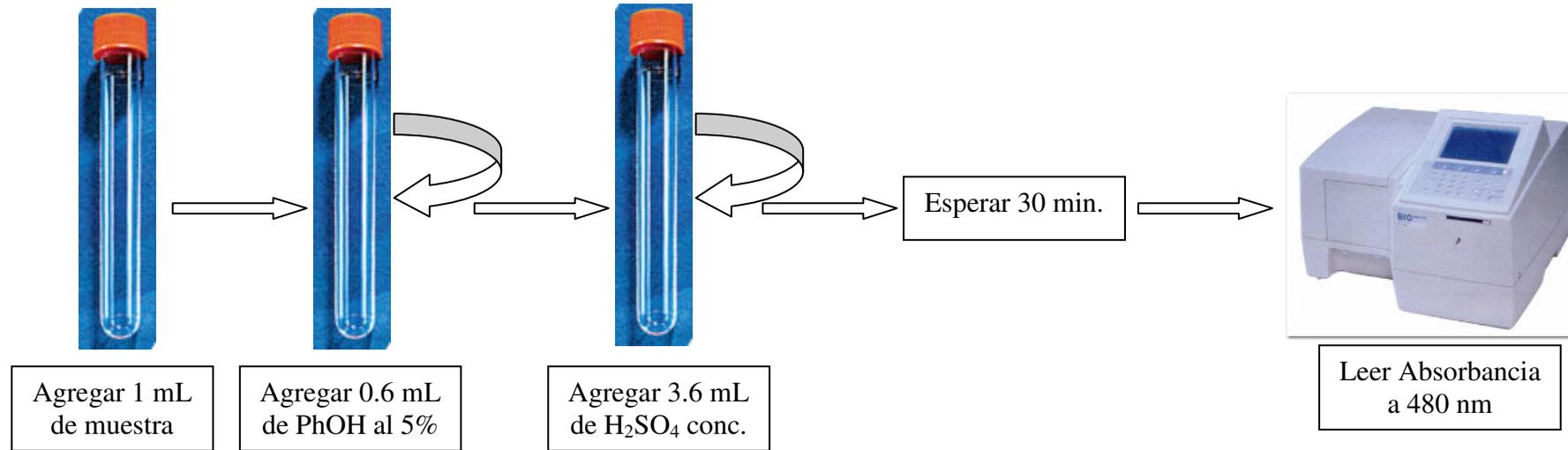
Continuación...

Determinación de actividad enzimática de paquete celular y sobrenadante(1)

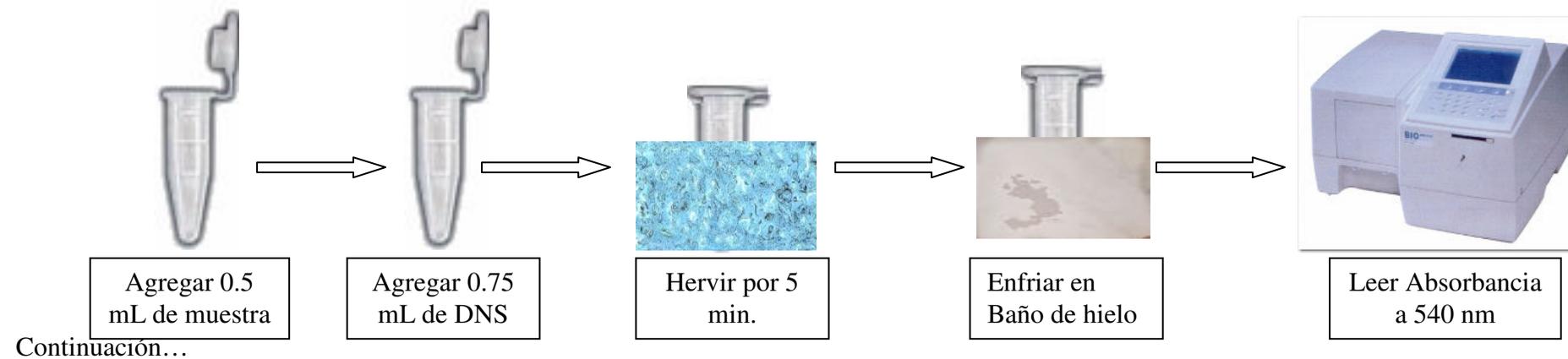


Continuación...

Carbohidratos totales



Carbohidratos reductores(1)



Continuación...

a. Reactivación de la cepa

De la colección de BAL aisladas del pozol, se obtuvo una perla de vidrio, la cual se introdujo en 4 mL de medio APT estéril (Difco-Laboratories) el cual se incubó durante 24 h a 30°C. Al término de ese tiempo se tomaron 400 µL del medio y se inocularon en 9.6 mL de medio MRS (Oxoid) esta preparación se incubó durante 18 h a 30°C en un tubo de centrifuga. Posteriormente se tomó una asada de este último cultivo y se sembró en medio MRS agar (Oxoid) por la técnica de estriado para verificar la pureza de la cepa como se ha explicado anteriormente.

b. Conteo en placa

Se realizaron diluciones del cultivo de 18 h en solución salina al 0.85% para conocer la cuenta en placa de la cepa a las 18 h. de incubación.

c. Fermentación

Una vez conocida la cuenta en placa se repitió la reactivación de la cepa. Concluidas las 18 h. en medio MRS se centrifugó a 8000 g por 7 min (43), se desechó el sobrenadante y se lavó con solución de cloruro de sodio al 0.85% 3 veces para eliminar el medio MRS. Al finalizar el último lavado se resuspendió la pastilla de células en 10 mL de medio MRS sin glucosa. De esa suspensión se tomó una muestra a la cual se le midió la densidad óptica a 600 nm. para estandarizar la concentración del inóculo en posteriores fermentaciones.

Se prepararon 6 matraces Erlenmeyer de 100 mL con 49.5 mL de medio MRS-Xilano y 6 matraces con medio MRS sin glucosa (los cuales sirvieron de blanco). Cada matraz se inoculó con 500 µL de la dilución 10^{-1} se homogeneizó e incubó a 30°C durante 0, 3,6,9,12 y 24 horas.

d.

Muestreo y-Análisis

En cada tiempo de muestreo se retiró el matraz correspondiente y se le hicieron determinaciones tales como: peso seco, pH, actividad enzimática, carbohidratos totales y carbohidratos reductores. Dichos análisis permiten conocer la evolución del microorganismo en el medio en el cual el xilano es el principal carbohidrato a fermentar.

i.

Peso seco

Se pusieron los filtros (tamaño de poro: 0.22 μm , Millipore) a peso constante en estufa a 90°C. Se tomaron 5 mL de muestra y se filtraron en un equipo Millipore. Los filtros se pusieron nuevamente a peso constante y finalmente se determinó la cantidad de biomasa por diferencia de pesos.

ii.

pH

Se determinó el valor de pH a las muestras tomadas de los matraces en el potenciómetro (Jenway 3020)

iii.

Determinación de actividad enzimática

Se tomaron 25 mL de muestra homogeneizada y se centrifugaron a 8000 g por 7 min se separó el sobrenadante y el paquete de células se depositó en un eppendorf de 1.5 mL.

Al paquete celular se le centrifugó a 8000 g por 7 min, se lavó con buffer de fosfatos (50mM, pH 7) 2 veces. Posteriormente se le adicionó 100 μL de xilano al 1% en buffer de fosfatos (50mM, pH 7) y 200 μL de buffer de fosfatos (50mM, pH7). Se incubó a 45°C por 30 minutos. Pasado ese tiempo se determinaron los carbohidratos reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) contrastando con una curva patrón de xilosa (Biochemia, Fluka, 95731).

iv.

Determinación de carbohidratos totales

En tubo de ensaye perfectamente etiquetados, se colocaron un mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra.

Para cada tubo se adicionaron 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. mezclando perfectamente e inmediatamente después se adicionaron cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclando. Se realizó todo el procedimiento para un tubo antes de seguir con otra muestra.

Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min) y se determinó la intensidad del color naranja obtenida en un colorímetro a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua.

Se calculó la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con glucosa (10 ug/mL a 100 ug/mL), tratada de la misma manera que el problema.

v. Determinación de carbohidratos reductores

Se tomaron 0.5 mL de la solución acuosa de la muestra, se adicionaron 0.75 mL del reactivo de DNS y se calentó por 5 min en un baño de agua hirviente, se enfrió en baño de hielo y se leyó la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra.

Se cuantificaron los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con glucosa (0.2 mg/mL a 2 mg/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Tipificación e identificación de bacterias lácticas xilanolíticas

Se cuenta con una colección de bacterias lácticas aisladas de diversas muestras de pozol del Estado de Chiapas y caracterizadas mediante el sistema API 50CH (2) Algunas de éstas fueron identificadas mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S en investigaciones anteriores. (44)

Antes de proceder a la extracción de ADN se hizo tinción de gram, observación al microscopio y prueba de la catalasa resultando todas las muestras como cepas puras Gram positivo, catalasa negativo. Lo cual ratifica que las bacterias son BAL, y están puras.

a. Extracción de ADN

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de los resultados de extracción de ADN.

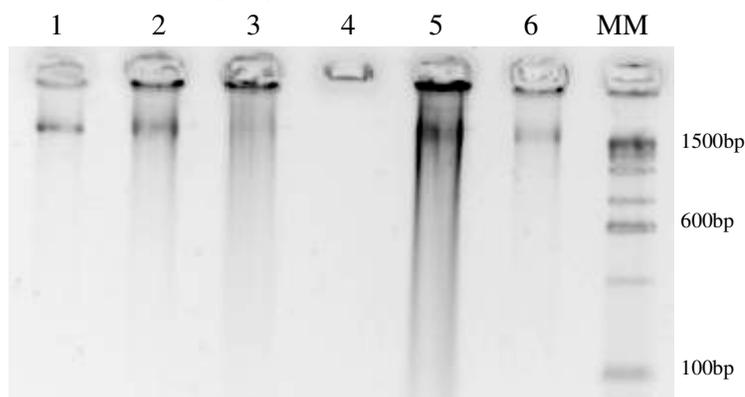


Fig. 7. Gel de agarosa al 0.9 % en el que se muestra el DNA extraído de las primeras 6 cepas de bacterias lácticas Carril 1:Lil2, Carril 2: Lil 6, Carril 3: SnC37, Carril 4: SnC44, Carril 5: SnC45, Carril 6: SnC49. MM = marcador de peso molecular λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL). Se cargaron 2 μ l en cada pozo. Se corrió la electroforesis a 50 v por 120 min.

Las 94 cepas tuvieron una extracción de ADN exitosa. Se puede observar que el ADN extraído tuvo un peso mayor que 1500 pares de bases. Se descartaron aquellos ADN que en el gel aparecían degradados, como el ejemplo del carril 3 o el 5.

b. Cuantificación de ADN obtenido

Se obtuvieron valores DO_{260}/DO_{280} aproximadamente de 1.8 de absorbancia, por lo que la pureza del DNA obtenido fue adecuada. Con base en estos resultados de DO_{260} se hicieron diluciones para obtener 1 unidad de ADN ($50\text{ng}/\mu\text{L}$) para que pudiesen ser amplificados por la PCR y de esta manera tener concentraciones similares del gen 16S en todas las digestiones. Sin embargo no todas las diluciones de 1 unidad de ADN amplificaron, por lo que fue necesario calcular la concentración de ADN a partir de la intensidad de la banda en la imagen del gel de ADN.

En esta técnica, de la imagen de ADN se tomó como referencia una muestra cuya amplificación haya sido exitosa en la PCR y se reportó la dilución realizada para llegar a 1 unidad de ADN. Posteriormente se tomó la imagen de las otras muestras de ADN y de acuerdo a la intensidad de la banda se tomó la decisión de diluirla cierto número de veces teniendo en cuenta la referencia antes mencionada.

c. Amplificación del gen rRNA 16S mediante la técnica de PCR

En la Figura 8 se muestra un ejemplo de los resultados de PCR.

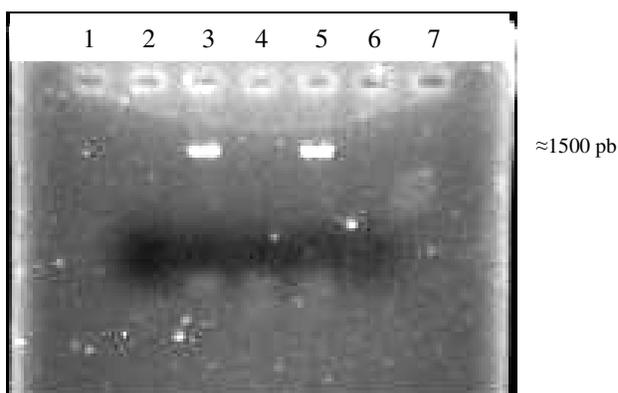


Fig. 8. Gel de agarosa al 1.8 % en el que se muestra el DNA del gen 16s amplificado extraído de las cepas SnC 22 (Carril 3) y SnC 28(Carril 5) de bacterias lácticas. Se cargaron $2\mu\text{l}$ en cada pozo de las muestras. Se corrió la electroforesis a 50 v por 120 min.

Para las 94 cepas se obtuvieron exitosamente amplicones con un peso aproximado de 1500 pares de bases, lo cual coincide con el peso reportado para el gen 16S de 1542 pares de bases (45).

d. Digestión con Hinf I y Hae III

Se sometió a las 94 cepas a digestión con las enzimas Hinf I y Hae III. A excepción de la cepa SnC 05, todas las cepas mostraron al menos dos bandas de ADN producto de la digestión del gen 16S.

La Figura 9 muestra un ejemplo de los resultados de digestiones con Hae III y en la Figura 10 podrá observar resultados con Hinf I

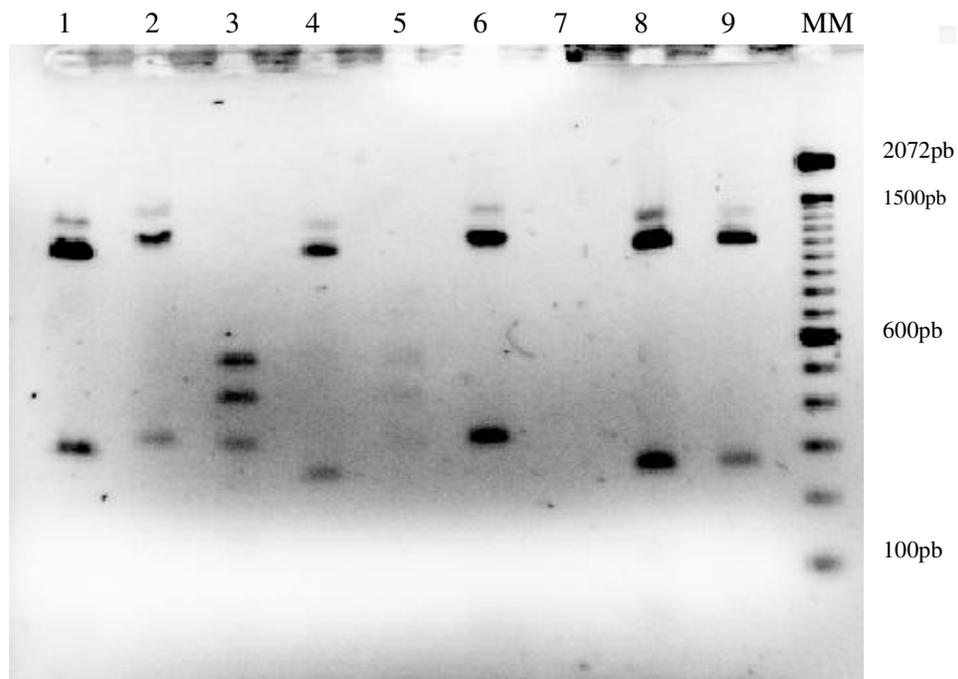


Figura 9. Gel de agarosa al 1.8 % en el que se muestra el producto de PCR, digerido por la enzima Hae III, de las cepas SnC21(Carril 1), SnC45(Carril 2), SnC46(Carril 3), SnC49(Carril 4), Lil6(Carril 5), Lil9(Carril 6), Lil19(Carril 7), Lil23(Carril 8), Lil26(Carril 9) de bacterias lácticas. MM = marcador de peso molecular λ DNA (100bp DNA Ladder, Gibco BRL, Carril 10). Se cargaron 7 μ l en cada pozo de las muestras. Se corrió la electroforesis a 55 v por 120 min.

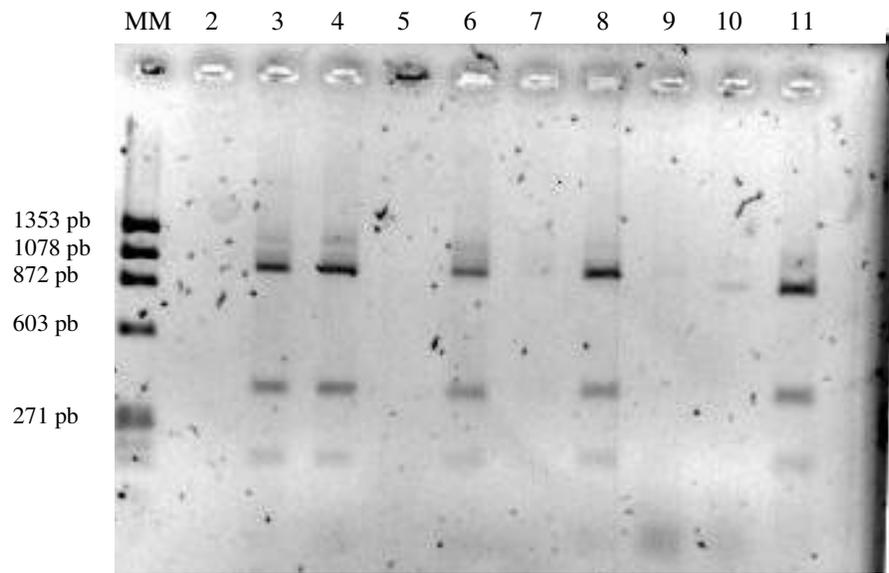


Figura 10 Gel de agarosa al 1.8 % en el que se muestra el producto de PCR, digerido por la enzima Hinf I, de las cepas Lil1(Carril 1), Lil2(Carril2), Lil3(Carril 3), Lil5(Carril 4), Lil6(Carril 5), Lil7(Carril 6), Lil9(Carril 7), Lil10(Carril 8),Lil11(Carril 9) de bacterias lácticas. MM = marcador de peso molecular Hae fragments (Gibco BRL Carril 10). Se cargaron 7 μ l en cada pozo de las muestras del producto de PCR de las cepas. Se corrió la electroforesis a 55 v por 120 min.

Se puede observar en las Figuras 9 y 10 que existen algunas bandas demasiado gruesas que podrían confundirse como una cuando podrían ser 2 o más de dos, o bien, que existen bandas muy tenues que podrían mezclarse con manchas en la impresión. Entonces, con el fin de dar mayor soporte a los resultados de la presente investigación se utilizó el programa Diversity Database (BioRad, Richmond, California, EUA) en el cual se analiza digitalmente el gel eliminando el “ruido” y tomando en cuenta la densidad de la banda, además el programa es capaz de discriminar si se trata de una, dos o más bandas. Para esto se asignó un valor de “shoulder sensitivity” de 4 y un “rolling disk” con valor de 2.

El “shoulder sensitivity” determina, según la gráfica de densidad de la banda, si un multiplete está representando a una sola banda o a varias. El “rolling disk” se refiere a un disco hipotético que sigue el contorno de la línea de densidad trazada, removiendo a su paso

intensidades de color que considera ruido. Un disco pequeño sigue la línea con mayor cercanía, identificando mayor ruido.

Se analizaron las bandas de 94 cepas, la matriz de distancias se realizó con base en los pesos moleculares de las bandas, de este modo, se obtuvieron 276 tipos diferentes de ellas.

e. Dendrograma

A partir del programa Treecon ver. 1.3 para Windows se realizaron los dendrogramas con las matrices de Nei y Li (1979) y el método de clustering UPGMA para cada enzima. Las figuras resultantes se muestran en las Figuras 11 y 12.

i. Dendrograma hecho a partir de la matriz de distancias obtenidas por medio de la digestión de PCR con la enzima Hinf I

En la Figura 11 podemos observar 3 grupos bien diferenciados y algunas cepas que no tienen un parentesco cercano con ninguna otra analizada. Sin embargo, dentro de los grupos no existe un agrupamiento que reúna géneros y/o actividades xilanolíticas similares.

i. Dendrograma hecho a partir de la matriz de distancias obtenidas por medio de la digestión de PCR con la enzima Hae III

En la Figura 12 se pueden observar 12 grupos bien diferenciados y otras cepas cuyo parentesco parece ser diferente que las demás analizadas.

Este dendrograma sí muestra una ligera asociación de actividades xilanolíticas (medidas en agar-APT-RBB-xilano) dentro de los grupos. Además, se observa una asociación de géneros y especies que solo es rota por agrupamientos entre *Weissella confusa* y *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc argentum*, y *Lactobacillus plantarum*. Lo anterior, como se explicará más adelante, puede deberse al estrecho parentesco entre el grupo *Weissella spp.* y los grupos de *Lactobacillus spp.* y *Lactococcus spp.* (46)

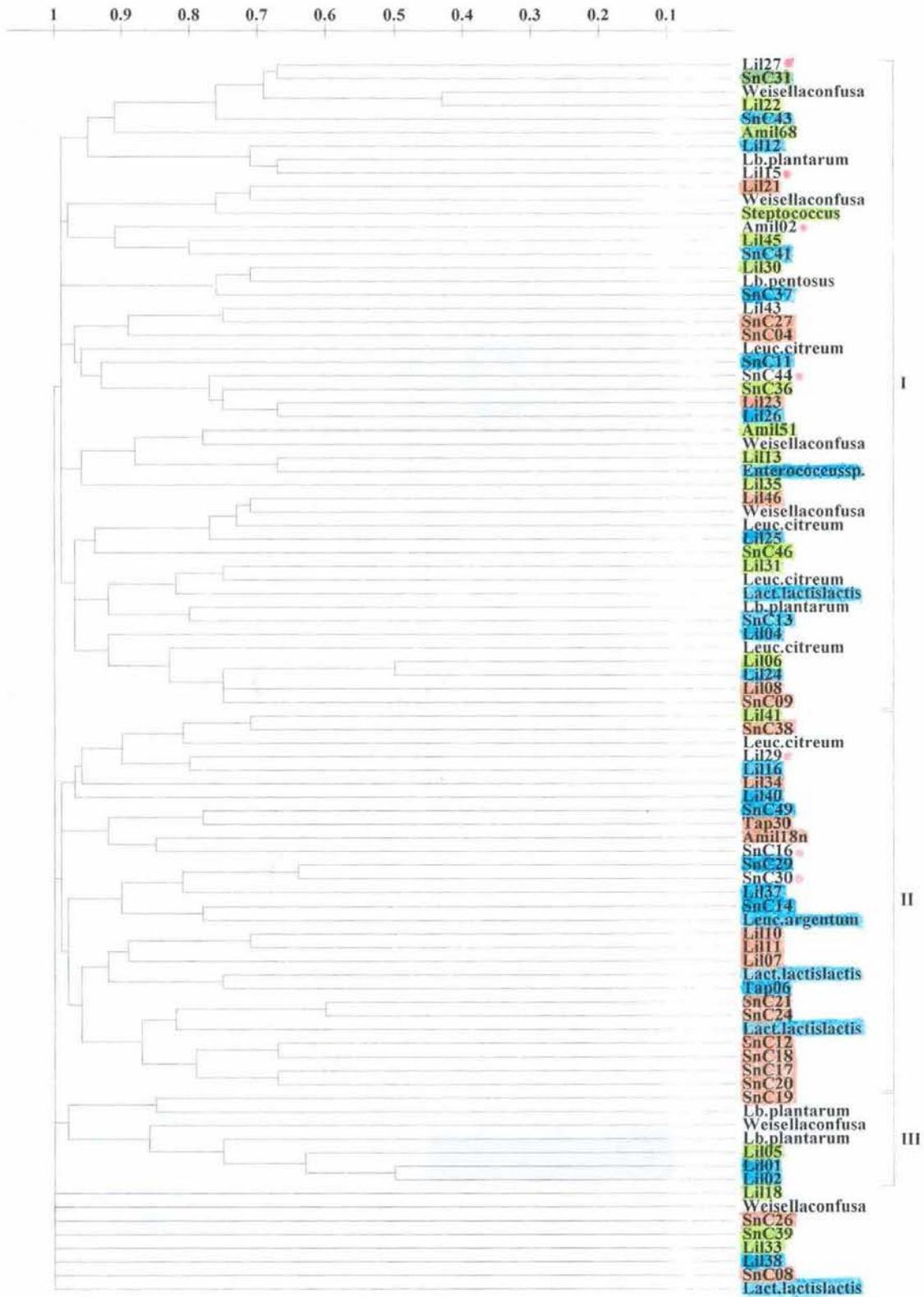


Fig. 11. Dendrograma resultado de las bandas de digestión con la enzima Hinf I, Los recuadros de colores indican la actividad xilanólítica en agar-APT-RBB-xilano, verde=débil o nula, café=media y azul=alta, punto rojo=actividad nula. Los microorganismos cuyo nombre aparece en una rama son aquéllos que ya han sido secuenciados e identificados.

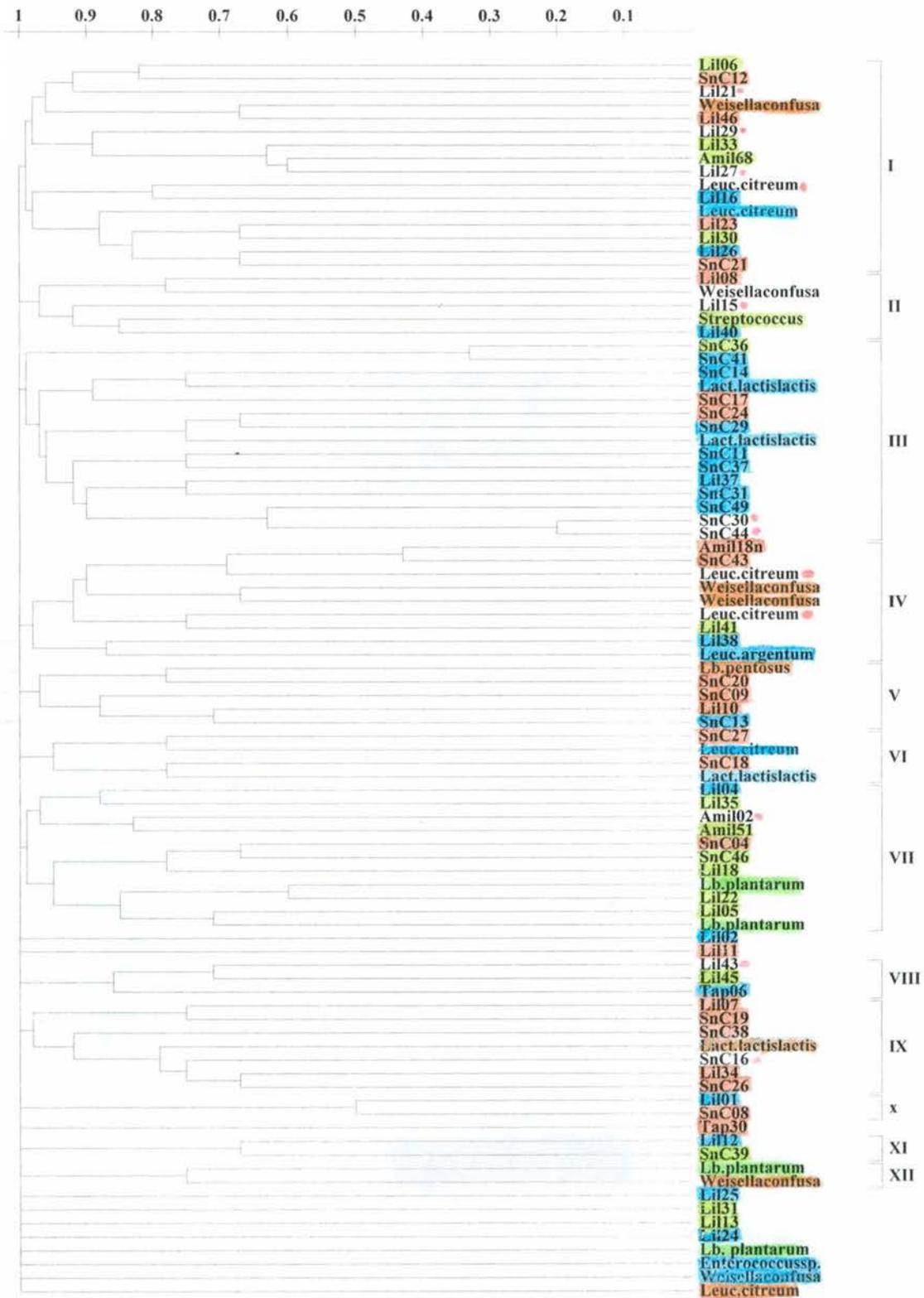


Fig. 12. Dendrograma resultado de las bandas de digestión con la enzima Hae III, Los recuadros de colores indican la actividad xilanólítica en agar-APT-RBB-xilano, verde=débil o nula, café=media y azul=alta, punto rojo=actividad nula. Los microorganismos cuyo nombre aparece en una rama son aquellos que ya han sido secuenciados e identificados.

En general, el dendrograma realizado con la matriz de distancias proveniente de la digestión con Hae III agrupa mejor las especies secuenciadas que el árbol proveniente de la digestión con Hinf I. Debido a lo anterior, se decidió realizar los análisis de resultados con el dendrograma obtenido a partir de la digestión de los productos de PCR con la enzima Hae III.

Tomando en cuenta la actividad xilanolítica en agar-APT-RBB-xilano, notamos que las bacterias con mayor actividad xilanolítica no se agrupan en un solo cúmulo, como se esperaba, sino que forman parte de varios. Sin embargo, sí existe un buen grado de diferenciación entre grupos de bacterias lácticas xilanolíticas contra varios de baja actividad xilanolíticas. De este modo, identificamos a los grupos II y VII como mayoritariamente con baja actividad xilanolítica, los grupos V, IX y X con mediana actividad xilanolítica y el grupo III con un alta actividad xilanolítica

El hecho de que la mayoría de los géneros y especies aislados fermenten el xilano indica que esta actividad debe ser importante durante la fermentación. Se propone hacer un dendrograma con los datos de ambas matrices y observar si se puede lograr una mejor diferenciación entre bacterias xilanolíticas y no xilanolíticas.

En la bibliografía se encontraron referencias que muestran que *Lactococcus lactis* variedad *lactis* tiene potencial xilanolítico alto, aunque aún en investigación (1), mientras que *Lactobacillus plantarum* tiene un bajo potencial xilanolítico (47) lo que coincide con nuestro resultados.

b. Identificación de cepas

Se había propuesto seleccionar una cepa de cada grupo del dendrograma para identificarla mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S; sin embargo, en vista que en cada grupo formado ya existe al menos una cepa identificada se decidió no enviar a secuenciar otras cepas. En la Tabla 7 se muestran las cepas ya secuenciadas así como su porcentaje de identificación con base en la comparación de secuencias del GenBank.

Tabla 7. Listado de las cepas de pozol previamente secuenciadas (18, 44)

Clave de identificación	Microorganismo identificado	Porcentaje de identificación (%)
Amil 30	<i>Leuconostoc citreum</i>	99
Amil 47	<i>Streptococcus</i>	93
Lil 3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
Lil 9	<i>Weisella confusa</i>	99
Lilis 14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
Lilis 17	<i>Weisella confusa</i>	100
Lilis 19	<i>Weisella confusa</i>	99
Lilis 20	<i>Weisella confusa</i>	99
Lilis 28	<i>Leuconostoc citreum</i>	100
Lilis 36	<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>lactis</i>	100
Lilis 39	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.65
Lilis 42	<i>Leuconostoc citreum</i>	99
Lilis 44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
SnC 15	<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>lactis</i>	100
SnC 22	<i>Leuconostoc citreum</i>	99.63
SnC 23	<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>lactis</i>	99
SnC 28	<i>Leuconostoc citreum</i>	100
SnC 40	<i>Weisella confusa</i>	100
SnC 45	<i>Weisella confusa</i>	99.35
SnC 47	<i>Leuconostoc citreum</i>	99
SnC 5	<i>Enterococcus</i> sp.	92
SnC25	<i>Lactococcus lactis</i> var. <i>lactis</i>	99
Tap 05	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
Tap 50	<i>Leuconostoc argentum</i>	99

El porcentaje de identificación de las cepas fue mayor a 97%, a excepción de *Enterococcus* y *Streptococcus* sp., por lo que se considera que la misma fue exitosa.

Los microorganismos identificados sirvieron para que se pudiesen identificar aquellas BAL que tuvieran un mayor parentesco en el dendrograma. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Cepas identificadas por medio del dendrograma hecho a partir de la matriz de distancias obtenidas por medio de la digestión de la PCR con la enzima Hae III

Grupo	Cepa tipo	Cepa identificada	Actividad xilanolítica en agar-APT-RBB-xilano
III	<i>Lactococcus lactis var lactis</i>	SnC36 SnC41 SnC14 SnC17 SnC24 SnC29 SnC11 SnC37 Lil37 SnC31 SnC49 SnC30 SnC44	Alta
V	<i>Lactobacillus pentosus</i>	SnC20 SnC09 Lil10 SnC13	Media
VII	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lil04 Lil35 Amil02 Amil51 SnC04 SnC46 Lil18 Lil22 Lil05	Baja
IX	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Lil07 SnC19 SnC38 SnC16 Lil34 SnC26	Media

2. Comparación de resultados de la técnica ARDRA vs. DGGE

En estudios recientes se menciona que al utilizar técnicas moleculares muy sensibles, tales como el DGGE o el TGGE, se puede observar que es posible que en una sola banda de ADN_r 16S haya más de dos especies bacterianas (48, 49) Lo anterior se atribuye principalmente a una microvariación producto de la incorporación de artefactos. Esto puede ocurrir por una variabilidad natural, por una introducción artificial proveniente de la amplificación por la PCR o por la presencia de copias de los genes que tienen pequeñas diferencias en sus secuencias.

Este fenómeno está asociado con la heterogeneidad intraespecífica, que es el resultado de las múltiples copias de los genes del ARN_r que involucran diferencias en su secuencia (cistrones que codifican al ARN_r 16S con diferentes secuencia en un solo genoma) (50) Existen reportes que señalan que el número de operones de ARN_r por genoma de bacteria puede variar de 1 a 15 copias. (44, 51)

Bolaños (2004) (44) ha encontrado este tipo de heterogeneidad en las cepas puras de pozol al hacer la separación de amplicones en DGGE. Considerando que las enzimas degradaron todo el ARN_r sin importar el número de copias o microvariaciones podemos suponer que las asociaciones del grupo II podrían explicarse.

Debido a esta misma heterogeneidad, Bolaños (44) observó que entre las cepas puras de pozol había algunas que compartían bandas en el gel de DGGE. Los microorganismo que comparten bandas son: *Weisella confusa* con *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc argentum* con *Leuconostoc citreum*, y *Lactobacillus pentosus* con *Weisella confusa* y *Streptococcus sp.* Lo anterior ayudaría a explicar las asociaciones de los grupos I, IV, II respectivamente.

3. Fermentación de la cepa SnC 11 en medio MRS-X

Se realizó la fermentación de una cepa xilanólica para observar si se podía desarrollar en medio MRS-Xilano con el fin de determinar si este polímero es un sustrato importante en la fermentación del pozol.

a. Características de la cepa SnC11

Se escogió a la cepa SnC 11 para ser fermentada en un medio con xilano como única fuente de carbono, debido a su alto potencial fermentador en Agar-APT-RBB-xilano (2). Esta cepa (SnC11) está identificada, según el dendrograma Hae III como *Lactococcus lactis lactis*.

b. Características del medio control o blanco

El medio blanco (caldo MRS sin glucosa) contiene pequeñas cantidades (<0.5 g/L) de glucosa, maltosa y maltooligosacáridos (maltotriosa, maltopentosa, maltohexosa, maltotetrosa y maltoheptosa) (18). El medio MRS-X contiene además xilano en una concentración final de 1%.

c. Concentración de biomasa

Los resultados de la concentración de biomasa por el método de peso seco se presentan en la Figura 13. En dicha figura se observa un incremento en la concentración de biomasa, hasta las 6 h de fermentación con el medio MRS- xilano (Figura 13), de 0.0055 g/ml. Después de este tiempo la concentración disminuye hasta 0.0018 g/ml y se mantiene en ese valor hasta el final de la fermentación. Sin embargo, visualmente se percibe que hay una sobrestimación de la biomasa debido a una fuerte interacción entre las células y el xilano, pues al realizar la separación de fracciones celulares (para determinar actividad xilanolítica) claramente se puede ver en los centrifugados y lavados de células que hay una fracción café, de xilano, y una fracción blanca, de células, que no pueden separarse. Este fenómeno también ha sido reportado por Pason (43).

Pason (43), mediante un estudio de microscopía electrónica de barrido, encontró que el xilano se une a las células bacterianas de *Paenibacillus curdolanolyticus*. Esto pudo haber ocurrido en el caso de la fermentación estudiada, por lo que sería importante probar esta posibilidad. Además, en dicha investigación, Pason reporta una curva de crecimiento de *P. curdolanolyticus* similar a la que mostró *Lactococcus lactis var. lactis* (SnC11), es decir, se observa un incremento en la biomasa el cual disminuye posteriormente debido a una menor adherencia del xilano a la bacteria xilanolítica.

Fermentación de la cepa SnC 11

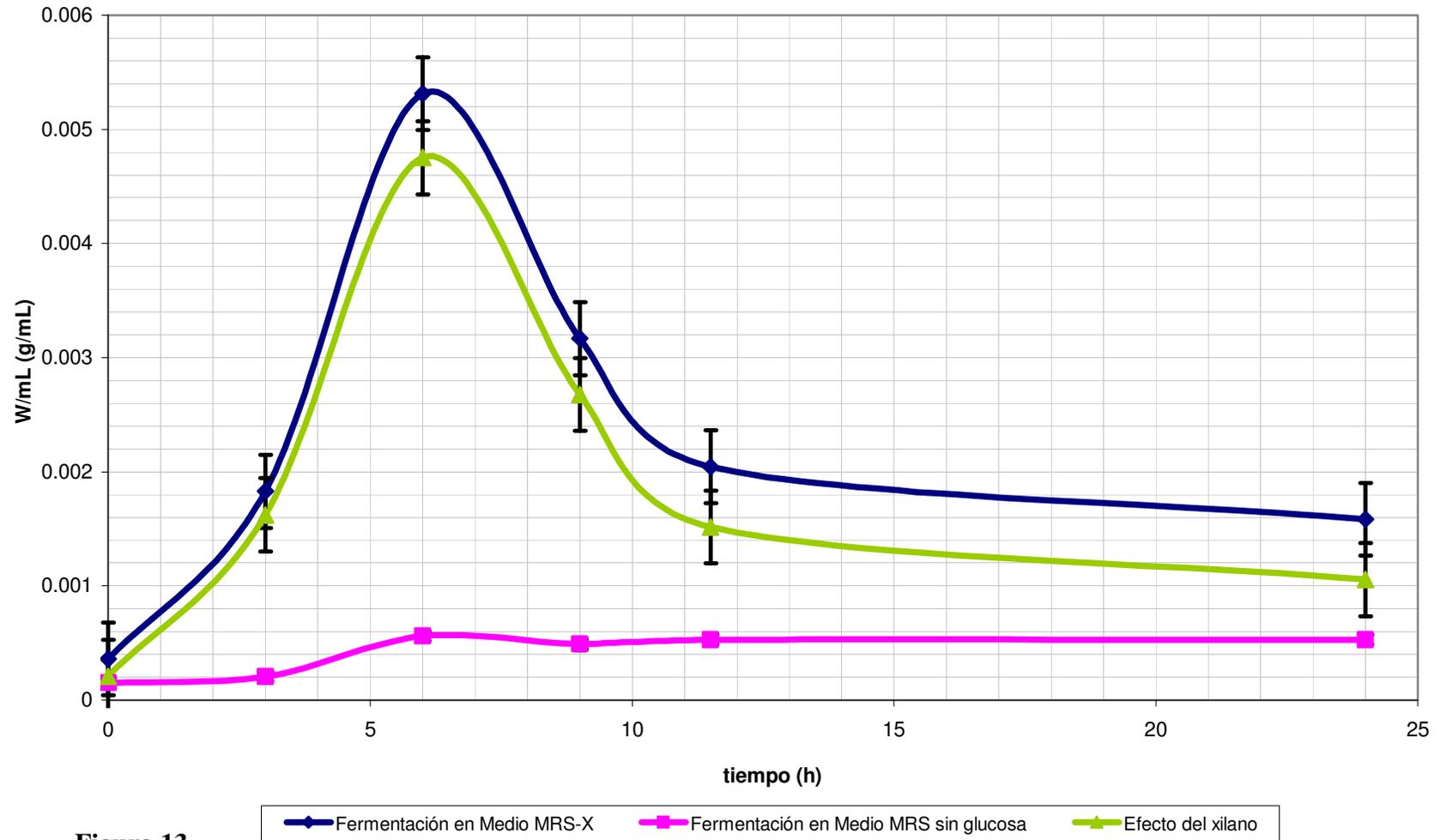


Figura 13.

Concentración de biomasa (peso seco) de la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC11), durante la fermentación en los medios MRS y MRS xilano. Promedio de 3 repeticiones

De ser cierta la suposición acerca de la adherencia del xilano a *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC11) y por lo tanto la sobrestimación de peso, nos topáramos con que el crecimiento en medio MRS-Xilano no presenta diferencias significativas, en un análisis de varianza ($\alpha=0.05$), con respecto al crecimiento en el medio blanco (MRS sin glucosa) y que el crecimiento no presenta diferencias significativas (según análisis de varianza, $\alpha=0.05$, a lo largo del crecimiento) lo cual indica que las células de esta cepa no crecen favorablemente en medio MRS-xilano.

d. pH

Se monitoreó el pH durante las 24 horas de fermentación. Los resultados se condensan en la Figura 14, donde se observa que la fermentación del xilano por la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC 11) es mínima (el valor de pH varía de 6.68 a 6.64) en comparación con la fermentación de glucosa en medio MRS (pH de 5.98 a 4.43). En un análisis de varianza ($\alpha=0.05$) a lo largo de la fermentación se encontró que no hay cambios estadísticamente significativos en este parámetro. Lo anterior confirma la idea del bajo crecimiento de la cepa en medio con xilano como única fuente de carbono.

Se propone utilizar en futuras investigaciones la técnica de HPLC para ir monitoreando la fermentación y observar qué ácidos se producen y en qué cantidad para de esa manera saber más acerca del metabolismo de xilano en las bacterias xilanolíticas aisladas del pozol.

e. Fermentación de carbohidratos

En esta parte se esperaba una reducción en los carbohidratos totales debido a la hidrólisis del xilano y consumo de los monómeros resultantes por la célula. Sin embargo, se observó un aumento de carbohidratos debido solamente al xilano (Figura 15), de 9.77 mg/mL a 12.17 mg/mL) el cual no es estadísticamente significativo, según un análisis de varianza ($\alpha=0.05$) A la vez, disminuye la concentración de carbohidratos reductores (de 0.03 a <0.02 mg/mL). Estos resultados sugieren que, el bajo crecimiento de la cepa se debe a que solo se alimentó de los carbohidratos reductores presentes en el medio.

Fermentación de la cepa SnC11. Curva de pH

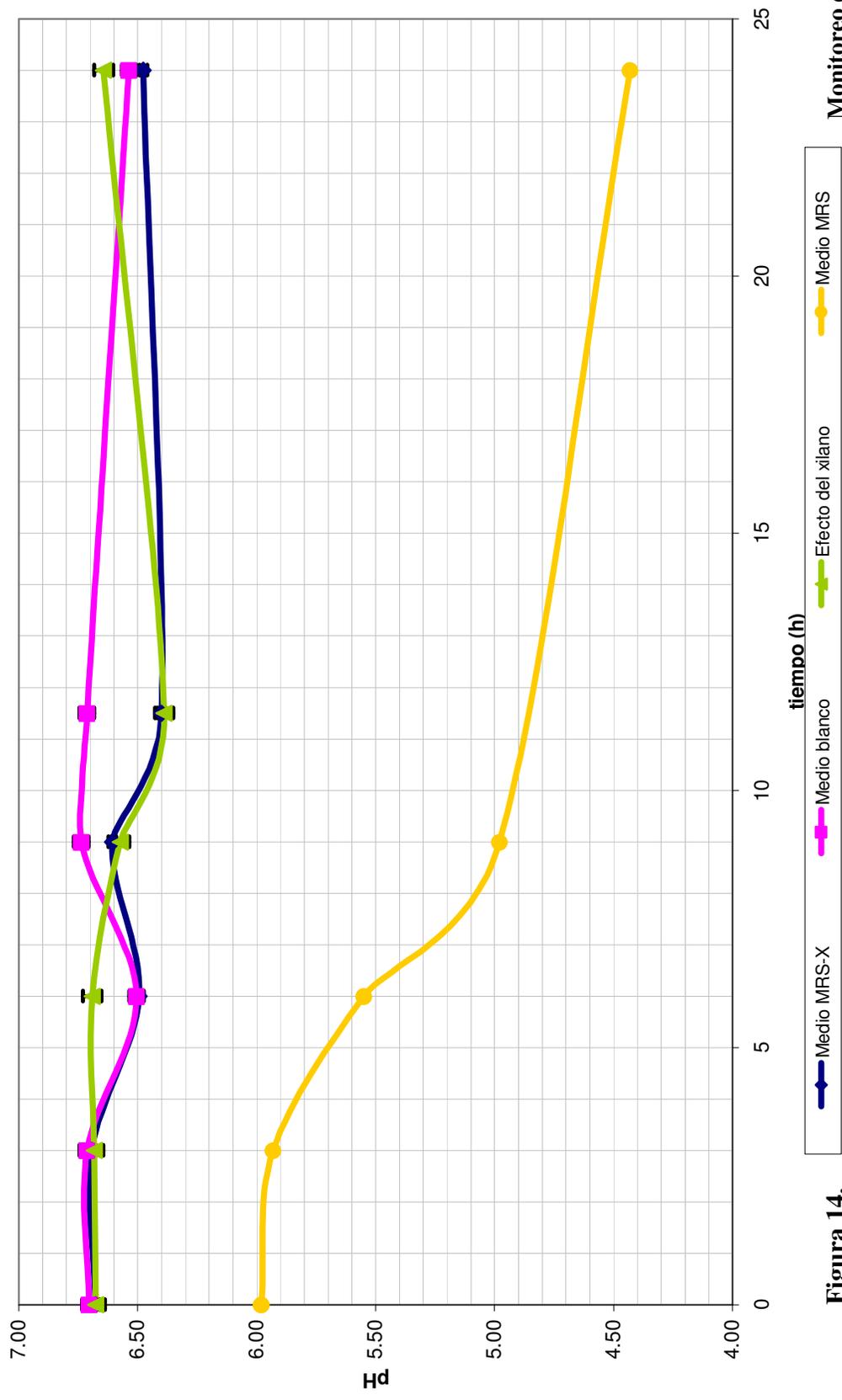


Figura 14.

pH durante la fermentación de la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC 11) en diferentes medios. Promedio de 3 repeticiones.

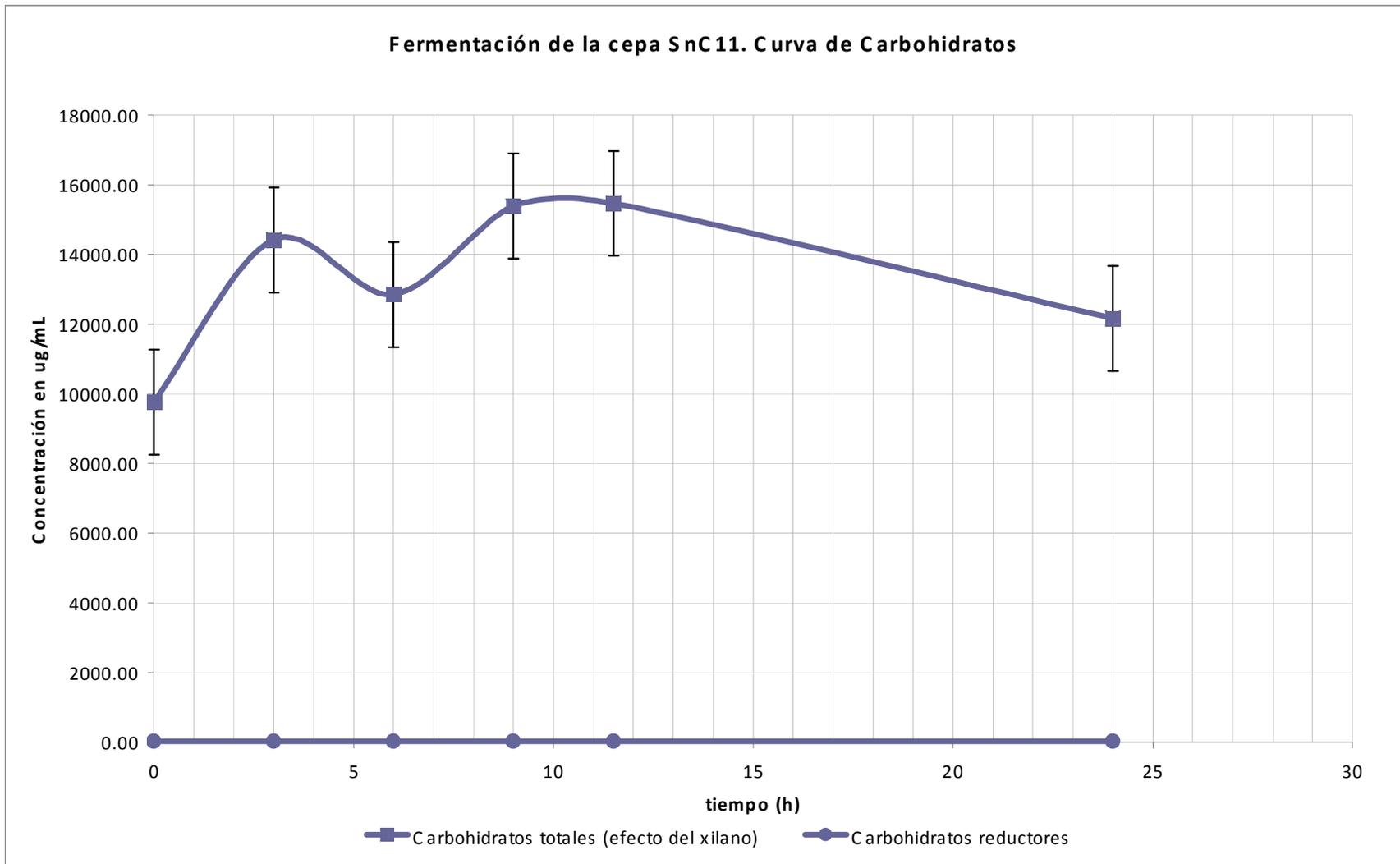


Figura 15. Concentración de Carbohidratos totales y reductores durante la fermentación por la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC11) del medio MRS-xilano. Promedio de 3 repeticiones

f. Prueba de actividad xilanolítica

Se monitoreó la capacidad xilanolítica asociada a la célula y en el sobrenadante siguiendo el método propuesto por Erlandson et al. (2001) (1); sin embargo la actividad presente en las células y el sobrenadante fue tan baja que no pudo ser detectada por la reacción de DNS, lo cual indica una actividad menor a 150 μ moles/mL. Se propone entonces utilizar, en futuras investigaciones, otro método de determinación de la actividad, como la técnica de HPLC para monitorear la aparición de los carbohidratos productos de la hidrólisis del xilano.

La baja actividad xilanolítica en la fermentación se ve respaldada por Erlandson et al. (1) quien investigó acerca de la ruta metabólica del xilano en varias cepas de *Lactococcus lactis* var. *lactis*. Allí, encontró que al concentrar las células y sobrenadantes de 100 mL de fermentación de varias cepas de este microorganismo se obtenía una actividad baja (de 1×10^3 u/mg de proteína y 6×10^{-4} u/mg de proteína respectivamente). Tomando en cuenta que en el caso de la cepa *Lactococcus lactis* var. *Lactis* (SnC11) solamente fueron concentrados 25 mL de medio de fermentación es lógico que no podamos observar la actividad xilanolítica de esta cepa.

Al haber observado una actividad xilanolítica baja en el medio especial MRS-xilano, nos lleva a pensar que el medio no es el óptimo para el crecimiento de esta cepa, ya que puede faltarle algún activador, algún nutriente, o bien, puede estar presente algún inhibidor de esta actividad.

Otra posibilidad es que la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC11) necesite interactuar con otra(s) cepa(s) para poder expresar su actividad xilanolítica. Un ejemplo de lo anterior fue investigado por Kato et. al. (2004)(52) con relación a bacterias celulolíticas. En dicha investigación, el microorganismo *Clostridium straminisolvens* presentaba una actividad celulolítica menor en un cultivo puro, pues para poder expresar la actividad se requería de la presencia de otros microorganismos que consumieran ciertos metabolitos que la inhibían. Sería importante determinar si en cultivo mixto con cepas xilanolíticas y no xilanolíticas, de la colección de BAL aisladas del pozol, la expresión de la actividad xilanolítica mejora.

Las hipótesis de una mejor expresión de actividad xilanolítica en cultivo mixto se afianzan con el estudio de Erlandson et. al. (2001) (1) En dicha investigación, Erlandson descubrió que varias cepas de *Lactococcus lactis* var. *lactis* tenían una ruta deficiente para la degradación del xilano pues el operón de xilano-xilosa estaba incompleto. Por ello, en el caso de la cepa *Lactococcus lactis* var. *lactis* (SnC11) podría ser necesaria la presencia de otro microorganismo del pozol que le ayudase a completar la expresión de dicha actividad.

Por otra parte, según Bajpai (1997) (35), el xilano es soluble en álcalis y es posible que durante la nixtamalización del maíz aumente la disponibilidad de este polímero y que en esas condiciones la cepa sea capaz de fermentarlo.

Existen también inhibidores de la actividad xilanolítica, Goesaert et. al. (2004) (53) han reportado proteínas tipo inhibidoras de xilanasas en el maíz que podrían estar presentes durante la fermentación del pozol.

Debido a todo lo anterior es importante estudiar más a fondo la actividad xilanolítica de estas BAL aisladas del pozol. Sus interacciones, inhibidores, y condiciones óptimas de crecimiento y de expresión de xilanasas.

CONCLUSIONES

Este trabajo constituye una primera aproximación al estudio de las bacterias lácticas xilanolíticas en el pozol.

1. Se caracterizaron las BAL xilanolíticas usando un enfoque polifásico
 - a. Con la enzima de restricción Hae III se obtuvo un dendrograma cuya distribución fue más definida y lógica que el dendrograma obtenido con Hinf I.
 - b. Las BAL xilanolíticas se agruparon en 12 conjuntos en los cuales había una acumulación de cepas con actividades xilanolíticas (en agar-APT-RBB-xilano) similares.
 - c. Se lograron identificar las bacterias lácticas de los grupos III como *Lactococcus lactis* var. *lactis*, V como *Lactobacillus pentosus*, VII como *Lactobacillus plantarum*, y IX como *Lactococcus lactis* var. *lactis* por comparación con cepas previamente identificadas.
 - d. 64% de las BAL del pozol son mediana o altamente xilanolíticas

2. Se realizó la fermentación de una cepa que había mostrado ser altamente xilanolítica en medio RBB xilano en medio MRS-Xilano
 - a. La cepa se identificó como *Lactococcus lactis lactis*.
 - b. La cepa no se desarrolló en medio MRS-xilano, en el que no se presentaron incrementos significativos ($\alpha=0.05$) de biomasa ni de actividad xilanolítica, ni decrementos en el valor de pH ni en la concentración de carbohidratos.

Sin duda la actividad xilanolítica constituye un punto importante en la fermentación del pozol debido a la gran cantidad de bacterias lácticas xilanolíticas presentes. Sin embargo deben realizarse más estudios con ellas para conocer a fondo su implicación en este proceso.

ANEXOS

1. Lista de Cepas utilizadas

Nombre de clasificación	Origen	Actividad xilanolítica en agar-APT-RBB-xilano
SnC 4	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 5	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 8	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 9	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 11	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 12	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 13	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 14	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 15	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 16	San Cristobal de las Casas	-
SnC 17	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 18	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 19	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 20	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 21	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 22	San Cristobal de las Casas	-
SnC 23	San Cristobal de las Casas	-
SnC 24	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 25	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 26	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 27	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 28	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 29	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 30	San Cristobal de las Casas	-
SnC 31	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 36	San Cristobal de las Casas	Débil
SnC 37	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 38	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 39	San Cristobal de las Casas	Débil
SnC 40	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 41	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 43	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 44	San Cristobal de las Casas	-
SnC 45	San Cristobal de las Casas	Fuerte
SnC 46	San Cristobal de las Casas	Débil
SnC 47	San Cristobal de las Casas	Media
SnC 49	San Cristobal de las Casas	Fuerte
Amil 2	Tapachula	-
Amil 18n	Tapachula	Media
Amil 30	Tapachula	Fuerte
Amil 68	Tapachula	Débil
Amil 47	Tapachula	Débil

Amil	51	Tapachula	Débil
Tap	5	Tapachula	Débil
Tap	6	Tapachula	Fuerte
Tap	30	Tapachula	Media
Tap	50	Tapachula	Fuerte
Lil	1	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	2	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	3	Altos de Chiapas	Débil
Lil	4	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	5	Altos de Chiapas	Débil
Lil	6	Altos de Chiapas	Débil
Lil	7	Altos de Chiapas	Media
Lil	8	Altos de Chiapas	Media
Lil	9	Altos de Chiapas	Media
Lil	10	Altos de Chiapas	Media
Lil	11	Altos de Chiapas	Media
Lil	12	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	13	Altos de Chiapas	Débil
Lil	14	Altos de Chiapas	Débil
Lil	15	Altos de Chiapas	-
Lil	16	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	17	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	18	Altos de Chiapas	Débil
Lil	19	Altos de Chiapas	Media
Lil	20	Altos de Chiapas	Media
Lil	21	Altos de Chiapas	-
Lil	22	Altos de Chiapas	Débil
Lil	23	Altos de Chiapas	Media
Lil	24	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	25	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	26	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	27	Altos de Chiapas	-
Lil	28	Altos de Chiapas	-
Lil	29	Altos de Chiapas	-
Lil	30	Altos de Chiapas	Débil
Lil	31	Altos de Chiapas	Débil
Lil	32	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	33	Altos de Chiapas	Débil
Lil	34	Altos de Chiapas	Media
Lil	35	Altos de Chiapas	Débil
Lil	36	Altos de Chiapas	Media
Lil	37	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	38	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	39	Altos de Chiapas	Media
Lil	40	Altos de Chiapas	Fuerte
Lil	41	Altos de Chiapas	Débil
Lil	42	Altos de Chiapas	-
Lil	43	Altos de Chiapas	-
Lil	44	Altos de Chiapas	Débil

Lil	45	Altos de Chiapas	Débil
Lil	46	Altos de Chiapas	Media

La actividad xilanolítica se definió de acuerdo al tamaño de los halos (medidos en cm) en agar-APT-RBB-xilano

- ausencia de actividad xilanolítica

De 0.1 a 1 cm. Actividad débil

De 1.1 a 2.0 actividad media

De 2.1 a 3.0 actividad fuerte

2. Medios de cultivo

a. Agar MRS (OXOID)

Versión sólida del caldo MRS para el cultivo de Bacterias ácido lácticas.

Fórmula	g/l
Peptona	10.0
`Lab-Lemco' polvo	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitan	1ml
Fosfato ácido de potasio	2.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	5.0
Citrato de triamonio	2.0
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05
Agar	10.0
pH 6.2 ± 0.2	

Indicaciones:

Suspender 62 g en 1 litro de agua destilada. Hervir hasta disolución del medio. Vertir en tubos, matraces o frascos y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

b. Caldo APT (Difco Laboratories)

Fórmula típica (g/L)

Fórmula	g
Extracto de levadura bacteriológica	7.5
Triptona bacteriológica	12.5
Dextrosa bacteriológica	10
Citrato de sodio	5
Tiamina hidrociorada	0.001
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	5
Cloruro de Manganeso	0.14
Sulfato de Magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Monoleato de sorbitán	0.2
pH final 6.7 ± 0.2 a 25°C	

Indicaciones:

Suspender 46.2g del medio de cultivo para 1 L de agua destilada, mezclar, calentar con agitación constante y hervir 1 min para disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 min.

3. Reactivos para la extracción de ADN

Liozima (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$): diolver 0.2 g de liozima en 10 mL de agua desionizada, esteril y filtrada

Pronasa (20mg/mL): diolver 0.2 g de pronasa en 10 mL de Tris-HCl 10 mM , incubar 1 h a 37°C y almacenar a -20°C

Tris-HCl (10 mM): A un matraz aforado de 250 mL adicionar 1.25 mL de NaCl 2M y 0.3025g de Tris, el pH debe ser de 7.5.

RNasa (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$): Disolver 0.2 g de la enzima en 10 mL de agua desionizada, esteril y filtrada.

Amortiguador TES: Tris 0.605 g, EDTA(0.5M) 1 mL, NaCl 0.2922g, pH=8. Aforar a 100 mL

SDS (10%): Disolver 10 g de SDS en 100 mL de agua desionizada, estéril y filtrada

EDTA 0.5 M: Disolver 93.06 g en 500 mL de agua destilada, ajustando a pH=8 con NaOH

4. Reactivos para gel de agarosa

Amortiguador TBE 10X: Tris 34g, Ácido bórico 27.7g, EDTA(0.5M) 20 mL, llevar a pH 8 y aforar a 500 mL

Amortiguador TBE 1x: Disolver 100 mL de TBE 10X en 900 mL de agua destilada

Amortiguador de carga (1mL): 500µL Glicerol al 50%, 40µL amortiguador TAE 2x, 0.0025 de azul de bromofenol. Aforar a 1 mL con agua destilada

Amortiguador TAE 50x: Tris (2M) 242mL, ácido acético (1M) 57.1 mL, EDTA (0.5M, pH=8) 100mL, agua destilada (c.b.p. 1L)

Agarosa ultra pura Invitrogen™ Life Technologies

Disolver la cantidad de agarosa, que corresponda con el gel a realizar(ADN al 0.9%, PCR al 1.8%), en amortiguador TBE 1x. Calentar por aprox. 45s en horno de microondas a m'axima potencia hasta disolución completa . Enfriar a 50°C y verter en el molde de acrílico con el peine correspondiente. Esperar a su solidificación

Una vez solidificado quitar el peine y en cada pocillo colocar una mezcla compuesta por: 2µL de amortiguador TBE1x, 2µL de amortiguador de carga, 2µL de la muestra (en el caso de gel de digestión son 8 µL)

Referencias

1. Erlandson KA, Delamarre SC, Batt CA. Genetic evidence for a defective xylan degradation pathway in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(4):1445-52.
2. Flores Espinosa MT. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. México, D.F.: UNAM; 1996.
3. Ulloa M. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Sociedad Mexicana de Micología* 1974;8:17-48.
4. Ulloa M, Herrera T, Lappe P. Pozol. In: Indigenista IN, editor. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. México: Instituto Nacional Indigenista; 1987. p. 13-20.
5. Ulloa M, Herrera T. Fermented corn products of Mexico. In: Hesseltine, editor. *Indigenous Fermented Food of Non-Western Origin*. Berlin: C.W. and Wang; 1986. p. 151-167.
6. Wachter C, Cañas A, Cook PE, Barzana E, Owens JD. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of microbiology* 1993;9:269-74.
7. Wachter C, Cañas A, Barzana E, Lappe P, Ulloa M, Owens JD. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 2000;17:251-6.
8. García, Quintero, López-Mungia. Alimentos y Bebidas fermentados tradicionales. In: Limusa, editor. *Biología Alimentaria*. 1a ed. México: Limusa; 1999. p. 313-45.
9. Cañas A, Barzana E, Owens JD, Wachter C. La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia* 1993;44:219-29.
10. Saldaña G, Brown HE. Nutritional composition of corn and flour tortillas. *Food Science* 1984;49:1202-3.
11. Asp NG, Johansson CG, Hallmer H, Siljeström M. Rapid Enzymatic Assay of Insoluble and Soluble Dietary Fiber. *Agriculture and Food Chemistry* 1983;31:476-482.
12. Acevedo E, Bressani R. Contenido de fibra dietética de alimentos centroamericanos. In: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Guatemala; 1990. p. 439-451.
13. Santillana R. Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol [Maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1995.
14. Nuraida L, Wachter C, Owens JD. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of microbiology and biotechnology* 1995;11:567-571.

15. Robles RR, Murray ED, Paredes-López O. Physico-chemical changes of maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *Food Science Technology* 1988;23:91-98.
16. Bressani R, Paz y Paz R, Scrimshaw NS. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *Food Chemistry* 1958;6:770-774.
17. ben Omar N, Ampe F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(9):3664-73.
18. Diaz-Ruiz G, Guyot JP, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C. Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(8):4367-74.
19. Escalante A, Wachter C, Farres A. Lactic acid bacterial diversity in the traditional mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 2001;64(1-2):21-31.
20. de Roissart H, Luquet FM. *Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. 1 ed: Loriga; 194.
21. Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(12):5464-73.
22. Fleet GH. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 1999;50:101-117.
23. Giraffa G, Neviani E. DNA-based, culture independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 2001;67:19-24.
24. Díaz-Ruiz G, Wachter C. Método para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoam Microbiol* 2003;45:30-40.
25. Pace NR. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *Features* 1996;62:463-470.
26. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Bacteriology* 1998;180:4765-4774.
27. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, *Biology of microorganisms*. 9th ed. U.S.A.: Prentice Hall International; 2000.
28. Rodríguez-Rotllant. *Taxonomía y filogenia*. In; 2007.

29. Salemi M, Vandamme AM. **The phylogenetic handbook, a practical approach to DNA and protein phylogeny.** Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
30. Stackebrandt. **Molecular identification, systematics and population structure of prokaryotes.** Alemania: Springer-Verlag; 2006.
31. Joseleau JP, Comtat J, Ruel K. **Xylans and Xylanases.** In: Voragen AGJ, editor. **Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls;** 1992 diciembre 1991; Wageningen, Países Bajos: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 1-15.
32. Chaplin M. **Arabinoxylan.** In. London South Bank University ed: Martin, C.; 2007.
33. Biosite. **Xylan.** In: Biosite; 2002.
34. Whistler RL, BeMiller JN. **Hemicelluloses.** In: Library TUoR, editor. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists.** St. Paul, Minnesota: eagan press; 1997. p. 165-169.
35. Bajpai P. **Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications.** *Advances in Applied Microbiology* 1997;43:141-194.
36. Nuraida L. **Studies on microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough.** Reading: University of Reading; 1988.
37. Cañas A. **Variaciones microbiológicas asociadas al método de elaboración de pozol en la zona Altos de Chiapas [Maestría].** Guaymas: ITESM; 1991.
38. Harrigan WF, McCance M. **Laboratory methods in food and dairy microbiology.** Londres: Academy Press; 1998.
39. Capuchino JG. **Microbiology a laboratory manual.** Nueva York: Addison-Wesley Publishing Company; 1983.
40. Lawson PA, Llop-Perez M, Hutson RA, Hippe H, Collins MD. **Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S ARNr sequences.** In: *FEMS. Microbiology Letters*; 1989. p. 87-92.
41. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. **Molecular Cloning a Laboratory Manual.** 2a ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
42. Nei M, Li W. **Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979;76(10):5269-5273.
43. Pason P, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. **Paenibacillus curdlanolyticus strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides.** *Appl Environ Microbiol* 2006;72(4):2483-90.
44. Bolaños Nuñez S. **Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinadas mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) [Maestría].** México: UNAM; 2004.

45. Lewin B. *Genes VII*. Madrid: Marban; 2001.
46. Bjorkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, et al. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52(Pt 1):141-8.
47. Inglis GD, Yanke LJ, Kawchuk LM, McAllister TA. The influence of bacterial inoculants on the microbial ecology of aerobic spoilage of barley silage. *Can J Microbiol* 1999;45(1):77-87.
48. van Hannen EJ, Mooij W, van Agterveld MP, Gons HJ, Laanbroek HJ. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6):2478-84.
49. Sekiguchi K, Sato H, Kasai K. Mitochondrial DNA heteroplasmy among hairs from single individuals. *J Forensic Sci* 2004;49(5):986-91.
50. Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(8):3376-80.
51. Cilia V, Lafay B, Christen R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol* 1996;13(3):451-61.
52. Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;51(1):133-42.
53. Goesaert H, Gebruers K, Courtin CM, Delcour JA. Purification and characterization of a XIP-type endoxylanase inhibitor from rice (*Oryza sativa*). *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005;20(1):95-101.