



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

HEMICELULOSA COMO SUSTRATO PARA LA FERMENTACIÓN LÁCTICA
DEL NIXTAMAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. BARBARA LESLIE COOPER BRIBIESCA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA
Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Mayo 2019



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.

Reconocimientos

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ma del Carmen Wacher Rodarte y con el apoyo técnico de la Dra. Gloria Díaz Ruíz

El comité que asesoró y evaluó el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Ma del Carmen Wacher Rodarte Facultad de Química- UNAM

Dra. Romina Rodríguez Sanoja Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Arturo Navarro Ocaña Facultad de Química-UNAM

Agradecemos al proyecto PAPIIT /UNAM: IN223917, a CONACyT por la beca del Programa Nacional de Posgrado: 203632, proyecto CONACyT Ciencia Básica: CB-2013-131615 y al Programa de apoyo a los Estudios de posgrado (asistencia a congreso nacional e internacional).

Agradecemos por su colaboración al Dr. Alberto Tecante C. y Dr. Guillermo Aguilar O. por su apoyo en la escritura del artículo, así como a Biol. Ma. Teresa Flores Espinoza y Dra. Hilda Calderón por el apoyo técnico brindado durante la realización de esta tesis.

El jurado asignado:

Presidente : Dr. Eduardo Bárzana G. Facultad de Química-UNAM

Vocal : Dra. María de los Dolores Reyes D. UAM Cuajimalpa

Vocal: Dr. José Guillermo Aguilar O., Facultad de Química-UNAM

Vocal: Dr. Alberto Tecante C., Facultad de Química-UNAM

Secretario: Dra. Maricarmen Quirasco B., Facultad de Química-UNAM

Contenido

Resumen	7
Antecedentes	8
1.1. Maíz	8
1.2 Estructura del grano de maíz	9
1.3. Composición química del maíz	10
1.3.1 Polisacáridos no amiláceos.....	12
1.3.2 Xilano.....	13
1.4 Proceso de Nixtamalización	15
1.4.1 Cambios generados en el maíz por la nixtamalización.....	16
1.5 Fermentación del maíz	19
1.6 El pozol	20
1.6.1 Preparación.....	21
1.6.2 Microbiota del pozol.....	22
1.6.3 Modificación de la microbiota durante la fermentación del pozol.....	24
1.6.4 <i>Streptococcus infantarius</i> sbsp <i>infantarius</i>	25
1.6.5 Cambios en la composición del maíz debidos a la fermentación láctica.....	26
1.6.5 Actividad metabólica de la microbiota del pozol.....	26
1.7 Glucosilhidrolasas	27
1.7.1 Xilanasas.....	28
1.7.2 Uso comercial de las xilanasas.....	31
1.7.3 Celulasas.....	31
1.7.4 Uso comercial de celulasas.....	32
1.7.5 Detección de actividad enzimática.....	32
1.7.6 Genómica de glucosilhidrolasas.....	33
2. Hipótesis	36
3. Objetivos	36
Metodología	37
4. Determinación de actividad xilanolítica y celulolítica	37
4.1 Cepas. Reactivación de las cepas	37
4.2 Actividad xilanolítica y celulolítica	37
4.2.1 Determinación semicuantitativa de actividad celulolítica.....	38
4.2.2 Determinación semicuantitativa de actividad xilanolítica.....	39
4.3 Evaluación del crecimiento en medio líquido	39
4.3.1 Preinóculo y cultivo en medios líquidos con celulosa o xilano como fuente de carbohidratos.....	39
4.3.2 Cinética de crecimiento en medio líquido.....	39
4.3.3 Fermentaciones usando medio definido HSH.....	39
4.3.4 Azúcares reductores.....	40
4.3.5 Azúcares totales.....	40
4.3.6 Técnicas de Análisis de productos de fermentación y azúcares.....	41
4.3.6.1 HPLC.....	41
4.3.6.2 Cromatografía de capa fina (TLC).....	41

4.3.7 Actividad enzimática. Endo-xilanasa.....	42
4.3.8 Actividad enzimática. β -xilosidasa.....	42
4.3.9 Actividad enzimática. Enzimas complementarias.....	43
4.4 Extracción de Arabinoxilano de nejayote (AX).....	43
4.4.1 Verificación de la identidad del compuesto extraído del nejayote.....	44
Resultados y Discusión.....	44
5.1. Determinación de actividad xilanolítica/ celulolítica de cepas de la colección.....	44
5.1.1 Descripción de las cepas de trabajo.....	44
5.1.2 Evaluación de actividad celulolítica por ensayo de aclarado de zona.....	45
5.1.3 Evaluación de actividad xilanolítica por técnica de inundado de placa.....	46
5.1.4 Evaluación del medio de cultivo.....	48
5.1.5 Crecimiento de <i>S. infantarius</i> 25124 en medio líquido HSH.....	48
5.1.6 Discusión de Etapa experimental 1.....	49
5.2 Crecimiento en medio líquido.....	50
5.2.1 Crecimiento en medio líquido con celulosa.....	50
5.2.1.1 Cinética de crecimiento y análisis de carbohidratos de <i>Lactococcus lactis</i> Lilis 36 en HSH-C.....	50
5.2.1.2 Análisis de azúcares y ácidos por HPLC.....	51
5.2.1.3 Cinética de Crecimiento y análisis de carbohidratos de la cepa 10P en HSH-C	52
5.2.1.4 Análisis de azúcares y ácidos por HPLC.....	52
5.2.1.5 Discusión sobre el uso de celulosa por las cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol.....	53
5.2.2 Crecimiento en medio líquido con xilano.....	53
5.2.2.1 Crecimiento de <i>Weissella confusa</i> Lilis 9 en HSH-X.....	53
5.2.2.2. Crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> 25124 en HSH-X.....	54
5.2.2.3 Discusión de la fermentación en medio con xilano de abedul.....	56
5.3 Extracción y caracterización de arabinosilano de maíz.....	57
5.3.1 Extracción de AX de maíz del nejayote.....	57
5.3.2. Caracterización del AX aislado de maíz por FT-IR.....	57
5.3.3 Discusión de caracterización de arabinosilano de maíz.....	60
5.4 Evaluación del crecimiento en medio líquido con arabinosilano de maíz.....	60
5.4.1.1. Crecimiento en Arabinoxilano de maíz al 1%.....	61
5.4.1.2. Crecimiento en Arabinoxilano de maíz al 2%.....	62
5.4.1.3 Discusión y comparación del crecimiento de <i>S. infantarius</i> 25124 entre medios de cultivo con xilano de abedul y arabinosilano de maíz.....	63
5.4.2.1 Análisis de azúcares por TLC.....	65
5.4.2.2 Análisis de Compuestos fenólicos por TLC.....	67
5.4.2.3 DiscusiónTLC.....	69
5.4.3 Análisis de productos de fermentación.....	69
5.4.3.1 Análisis de productos de la fermentación por HPLC.....	69
5.4.3.2 Análisis de azúcares por HPLC.....	73
5.4.3.3 Discusión de productos de fermentación y azúcares por HPLC.....	73
5.4.4 Actividad enzimática.....	74
5.4.4.1 Endo-Xilanasa.....	74
5.4.4.2 Discusión de actividad Endoxilanasa.....	75
5.4.4.3 β -xilosidasa.....	76

5.4.4.4 Actividades enzimáticas complementarias.....	77
5.4.4.5 Discusión Actividades enzimáticas complementarias y β -xilosidasa.....	79
5.4.4.6 Conclusiones actividad enzimática.....	81
6. Conclusiones sobre la fermentación de arabinxilano de maíz por <i>S. infantarius</i> 25124.....	81
7. Conclusiones generales.....	82
8. Perspectivas.....	84
9. Referencias.....	85
10. Anexo 1. Preparación de medio HSH.....	90
11. Anexo 2. Artículo publicado	

Tablas

Tabla 1. Composición proximal de maíces mexicanos (B.H.).....	10
Tabla 2. Composición química de las partes anatómicas del grano de maíz en g/ 100g B.S.....	11
Tabla 3. Composición de goma de maíz (MBG).....	14
Tabla 4. Enzimas degradadoras de hemicelulosa.....	29.
Tabla 5. Genes secuenciados para enzimas degradadoras de xilano y celulosa de LAB.....	35
Tabla 6. Cepas de trabajo.....	37
Tabla 7. Características de las cepas de trabajo	45
Tabla 8. Diámetro de los halos medidos en MRS-C con 6 días de incubación	46
Tabla 9. Diámetro promedio en cm. de los halos observados en MRS-X	47
Tabla 10. Crecimiento de diferentes cepas de la colección en medio HSH	48
Tabla 11. Interpretación de las señales del espectro FIT-IR del xilano de maíz extraído de nejayote.....	59
Tabla 12. Actividades enzimáticas complementarias máximas detectadas en <i>S. infantarius</i> 25124 para diferentes fuentes de xilano	77

Figuras

1. Algunas razas de Maíz originarias de México.....	9
2. Partes que componen el grano de maíz.....	10
3. Estructura de la celulosa	13
4. Estructura química general de los arabinosilanos.....	14
5. Enzimas xilanolíticas involucradas en la degradación de xilanos típicos.	30
6. Halos formados por actividad celulolítica de LAB del pozol.....	46
7. Halos de actividad xilanolítica de LAB del pozol.....	47.
8. Crecimiento de <i>S. infantarius</i> en diferentes medios de cultivo: HSH glucosa, HSH xilano y HSH sin fuente de carbono	49
9. Gráfica de cinética de crecimiento y azúcares reductores de <i>Lactococcus lactis</i> en HSH-C	51
10. Cromatograma de fermentación de L36 en HSH-C.....	52
11. Cinética de crecimiento y azúcares reductores de 10P en HSH-C.....	52
12. Cinética de crecimiento y azúcares reductores de <i>Weissella confusa</i> en HSH-X.....	54
13. Cinética de crecimiento de <i>S. infantarius</i> en HSH-X.....	55

14. Azúcares totales y reductores de la fermentación de <i>S. infantarius</i> en HSHSX.....	55
15. Comparación de crecimiento de L9 y <i>S. infantarius</i> 25124 en HSH-X.....	56
16. Pasos de la obtención de arabinoxilano a partir de nejayote.....	57
17. Espectro FT-IR del Arabinoxilano de maíz extraído de nejayote.....	58
18. Espectro FT-IR del olote.....	60
19. Cinética de crecimiento de <i>S. infantarius</i> en medio con arabinoxilano de maíz(1%)...61	61
20. Azúcares totales y reductores en HSH- Arabinoxilano de maíz (1%).....	62.
21. Cinética de crecimiento de <i>S. infantarius</i> en medio con arabinoxilano de maíz (2%)...62.	62.
22. Azúcares reductores y totales en HSH Arabinoxilano de maíz 2%.....	63
23. Gráfica comparativa de crecimiento de <i>Str infantarius</i> en diferentes xilanos.....	64
24. Gráfica comparativa de azúcares reductores en diferentes xilanos.....	65
25. Azúcares por TLC. Cromato placa No. 1.	66.
26. Azúcares por TLC .Cromato placa No 2.....	67
27. Ácidos fenólicos por TLC. Cromatoplaça No.3.....	68
28. Ácidos fenólicos por TLC.CromatoplaçaNo. 4	68
29. Perfil de HPLC de <i>S. infantarius</i> 25124 en HSHX maíz	70
30. Perfil de HPLC de <i>S. infantarius</i> 25124 en HSHX abedul.....	71.
31. Productos de fermentación de <i>S. infantarius</i> 25124 en HSHX Maíz.....	72
32. Productos de fermentación de <i>S. infantarius</i> 25124 en HSHX Abedul	72
33. Actividad enzimática específica de Endoxilanasas de <i>S. infantarius</i> 25124 durante crecimiento en HSH con xilano y arabinoxilano	75
34. Actividad enzimática de Beta xilobiosidasa de <i>S infantarius</i> 25124 en HSH con xilano de abedul o arabinoxilano de nejayote	77
35. Actividad enzimática de A) Acetil xilan esterasa, B) Alfa arabinosidasa, C) Beta glucosidasa, D) beta galactosidasa a lo largo de la fermentación en arabinoxilano de maíz y xilano de abedul de <i>S. infantarius</i> 25124	78

Aportación

Con este estudio se plantea avanzar en el conocimiento sobre el uso de sustratos por las bacterias lácticas para fermentar masas de nixtamal orientado a la elaboración de pozol; El principal objetivo es comprender mejor la naturaleza microbiana en ambientes complejos y contar con información para proponer cultivos iniciadores para la fermentación controlada de pozol. Además, tener un mejor conocimiento de la microbiota del pozol y la posible detección de enzimas con potencial comercial como xilanasas o esterases de ácido ferúlico.

Resumen

Streptococcus infantarius ssp. *infantarius* 25124 (*S. infantarius* -25124) es una bacteria ácido láctica (BAL) aislada del pozol, una bebida refrescante preparada con masa nixtamalizada suspendida en agua. En productos de cereales fermentados como las masas ácidas consumidas en Europa y de maíz no nixtamalizado como el ogi en África predominan cepas de *Lactobacillus*, sin embargo la microbiota del pozol es marcadamente diferente y se han identificado diversos géneros como *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Weissella*. Esto podría deberse a la nixtamalización que es un proceso térmico- alcalino que le confiere propiedades diferentes a la masa de maíz.

S. infantarius -25124 ha sido previamente identificada como la principal cepa ácido láctica amilolítica en el pozol, el almidón es la fuente primaria de azúcares en el nixtamal, ya que monosacáridos y disacáridos libres del maíz se pierden durante la nixtamalización pero se hacen más disponibles otros componentes como la hemicelulosa. Durante la fermentación natural del pozol se contabiliza una mayor cantidad de microorganismos no amilolíticos después de 24 h, lo que sugiere que estos se nutren de una fuente diferente de carbono. La hemicelulosa en cereales como el maíz está conformada principalmente de arabinosilano que puede ser metabolizado por las BAL.

El objetivo de este trabajo fue determinar si algunas de las cepas encontradas con mayor frecuencia en el pozol poseían la capacidad de utilizar otras fuentes de carbono distintas al almidón como celulosa y arabinosilano presentes en la masa de nixtamal. Además evaluar si *S. infantarius* 25124, una cepa predominante del pozol, tiene la capacidad de crecer utilizando arabinosilano de maíz como única fuente de carbono y comparar su comportamiento con el silano de abedul.

La actividad de xilanasas de *S. infantarius* 25124 en presencia de arabinosilano de maíz (135.8 ± 48.7 UI/mg proteína) fue mayor que en silano de abedul (62.5 ± 19.8 UI/mg proteína). También fueron detectadas y cuantificadas otras actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de

los arabinosilanos como la arabinofuranosidasa y acetilesterasa y se observó crecimiento y consumo de azúcares sugiriendo la adaptación de la cepa a los sustratos presentes en la masa de nixtamal. Se concluyó que *Streptococcus infantarius* 25124 aislado del pozol es capaz de consumir el arabinosilano en la masa de maíz nixtamalizado sin depender exclusivamente para su crecimiento de azúcares libres o del almidón.

1. Antecedentes

1.1. Maíz

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas, es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal, es una planta anual que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (mazorca) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. El maíz es uno de los cereales más importantes en el mundo y es parte fundamental de la alimentación de grandes sectores de la población de varios países de Latinoamérica. Tiene tres aplicaciones posibles: alimento, materia prima para la industria ya que con él se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios e incluso bioetanol y forraje o para elaborar piensos y alimentos para aves de corral, cerdos y rumiantes (FAO, 1993, Agama et al., 2004). Es la base de nuestra alimentación y por lo tanto es consumido en una variedad de productos regionales característicos de nuestro país.

México es el sexto productor de maíz a nivel internacional (24, 320,100 T/año) siendo los Estados Unidos el primero con cerca del 45% de la producción total mundial (307, 142, 010 T/año) (Faostat, 2011).

La molienda húmeda se utiliza fundamentalmente en el procesamiento industrial del maíz porque de ella se obtiene almidón y subproductos como el germen para producir aceite y harina de germen que se utiliza como pienso: El procedimiento de cocción en solución alcalina (nixtamalización) es una variante de la molienda húmeda en la que se elimina el pericarpio y se generan cambios fisicoquímicos que permiten la elaboración de masa a partir de la cual se producen una gran variedad de alimentos (Bressani, et al., 1990).



Figura 1. Algunas razas de Maíz originarias de México (2012, CONABIO)

Las variedades cultivadas para alimentación comprenden el maíz dulce, el reventador, dentado, amiláceo o harinoso y el cristalino que también se utiliza para pienso (Figura 1) entre muchas otras razas disponibles en México (CONABIO , 2012). El maíz harinoso es un grano con endospermo blando que es utilizado como alimento en México, Guatemala y los países andinos. El maíz dentado tiene un endospermo calloso y vítreo a los lados y en la parte posterior del grano, en tanto que el núcleo central es blando. El maíz de tipo cristalino posee un endospermo grueso, duro y vítreo, que encierra un centro pequeño, granuloso y amiláceo (FAO, 1993). En áreas rurales de México y Centroamérica el consumo de maíz representa alrededor del 70% de las calorías totales y cerca de la mitad de las proteínas ingeridas de la dieta diaria (Paredes y Saharopolus, 1982).

1.2 Estructura del grano de maíz

El maíz es una planta monoica, capaz de reproducirse por sí sola; la inflorescencia femenina denominada espiga puede contener de 300 a 1000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca. La masa del grano puede variar de aproximadamente 19 a 30 g por cada 100 granos.

El grano del maíz consta de varias partes anatómicas (Figura 2), la cubierta externa compuesta por pericarpio (cáscara o salvado) y aleurona, el endospermo que abarca la mayor fracción del grano y el germen, compuesto por embrión y escutelo, y la pilorriza o pedicelo que es la estructura de unión entre el grano y el olote o mazorca (Katz et al., 1974). La **aleurona** es rica en proteínas y minerales; forma una cubierta que encapsula al germen y al endospermo, de manera que funge como capa semipermeable.

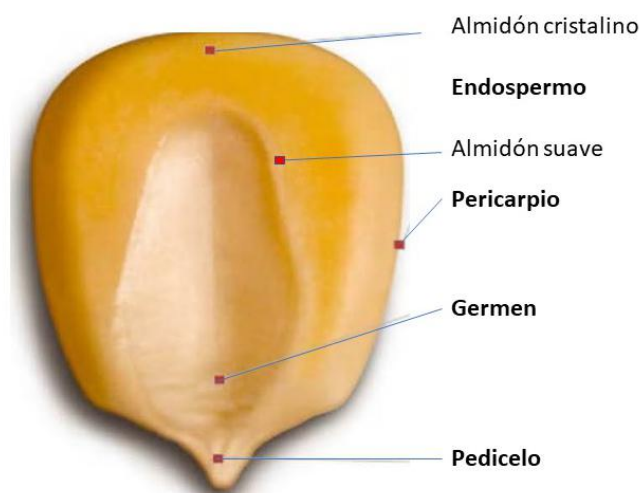


Figura 2. Partes que componen el grano de maíz (maize.agron.iastate.edu).

El **germen** abarca 10-14% de la masa de la cariósida, está compuesto principalmente de lípidos y proteínas, azúcares, almidón y cenizas. De sus proteínas el 60% son partes iguales de albúminas y globulinas; la mayor parte del germen es retenido durante la elaboración de tortillas a diferencia de la aleurona que se pierde durante la nixtamalización.

El **endospermo** abarca alrededor del 80-84% de la masa de la cariósida o grano, está compuesto principalmente de almidón y gluten y la proporción de endospermo cristalino a amiláceo es de 2:1. Los gránulos de almidón no cristalino están empacados menos densamente, pero tienen formas más esféricas (Paredes y Saharopulos,1982).

1.3. Composición química del maíz

El grano seco de maíz presenta variaciones en su composición de acuerdo con las condiciones de siembra y especie, en general (Ver Tabla 1) está compuesto de 6.8-12% de proteína, 73-74.5% almidón, 12% humedad, 3.4% lípidos y 1% de cenizas y 12% fibra cruda (Katz et al., 1974).

Tabla 1. Composición proximal de maíces mexicanos (% B.H.).

	Maíz amarillo	Maíz Blanco
Carbohidratos	69.6	73
Humedad	13.8	10.6
Proteína	8.3	7.9
Fibra	12.2	12.2
Grasa	4.8	4.7

Tablas de composición de alimentos del INNSZ (1996).

El pericarpio se caracteriza por contener un porcentaje elevado de fibra cruda, que a su vez está formada principalmente por hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0.1%). El endospermo contiene un nivel elevado de almidón y grasas crudas relativamente bajas, mientras que el germen tiene un alto contenido de lípidos y un nivel relativamente alto de proteínas y minerales (Tabla 2).

Desde el punto de vista nutricional, los carbohidratos pueden clasificarse en simples y complejos, los cuales a su vez pueden clasificarse como de tipo amiláceo y no amiláceo (NSP). Los NSP conforman la fibra dietética y pueden ser medidos con mayor precisión que la fibra dietética total, incluyen celulosa, pectinas, glucanos, gomas, mucílagos, hemicelulosas, inulina y quitina (se excluye la lignina).

Tabla 2. Composición química de las partes anatómicas del grano de maíz en g/ 100g B.S.

Fracción	Grano seco	Almidón	Lípidos	Proteínas	Cenizas	Azúcares	E.L.N.
Endospermo	82.9	87.6	0.8	8	0.3	0.6	2.7
Germen	11.1	8.3	33.2	18.4	10.5	10.8	8.8
Pericarpio	5.2	7.3	1	3.7	0.8	0.3	86.7
Pedicelo	0.8	5.3	3.8	9.2	1.6	1.6	78.6
Grano entero	100	73.4	4.4	9.1	1.4	1.9	9.8

Watson (1987), E.L.N. extracto libre de nitrógeno (no incluye carbohidratos) obtenido de la diferencia de 100-suma total de componentes.

Se ha propuesto que ninguno de los polisacáridos no amiláceos (NSP) es hidrolizado en el intestino delgado humano y no causan respuesta glicémica; los NSP comprenden aproximadamente el 90% de las paredes celulares de las plantas y son en gran medida responsables de la estructura física de las plantas comestibles. Englyst (1996) desarrolló un procedimiento para la cuantificación de NSP, el cual implica una hidrólisis enzimática del almidón, separación por precipitación de los NSP con etanol, su hidrólisis ácida e identificación de los azúcares constituyentes por GLC, HPLC o calorimetría; ésta técnica se complementa con la medición de ácidos urónicos por colorimetría (Englyst y Hudson, 1996).

En un estudio del INNSZ, Sánchez-Castillo et al., 1999 determinaron el contenido de polisacáridos no amiláceos de la pared celular (NSP) en alimentos mexicanos elaborados con maíz y encontraron que el procesamiento del cereal disminuye hasta cinco veces el contenido de NSP.

Los alimentos a base de cereal entero tienen altos niveles de NSP insoluble en forma de celulosa y arabinosilanos, mientras que en los cereales refinados los NSP son principalmente solubles.

Por ejemplo la harina nixtamalizada entera es una buena fuente de fibra dietética, alrededor del 80% de sus NSP son insolubles, mientras que la harina refinada tipo Maizena © está compuesta principalmente de almidón y contiene pocos NSP de los cuales la mayoría son solubles.

De acuerdo con este estudio, la tortilla contiene 3.9% de NSP totales, la harina nixtamalizada 6%, 4.8 % insoluble (celulosa) y el resto es soluble (arabinosilanos) (Sánchez- Castillo et al., 1999).

1.3.1 Polisacáridos no amiláceos

Los carbohidratos representan la principal fracción en los cereales, el contenido de carbohidratos solubles respecto a los complejos es mínimo, por ejemplo, la harina de trigo contiene 1.55–1.85% de carbohidratos solubles. Los granos de maíz contienen carbohidratos complejos que tienen función estructural; éstos se clasifican como sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosa. Se ha determinado que algunas especies de maíz contienen 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina. Algunos de los carbohidratos solubles identificados en el maíz son los monosacáridos glucosa y fructosa y el disacárido sacarosa en cantidades que varían del 1 al 3 por ciento de la masa del grano (Corsetti y Settanni, 2007).

Los carbohidratos complejos que componen al grano de maíz se encuentran en el pericarpio, paredes celulares del endospermo y en menor medida en germen (Bressani et al., 2001). Las paredes celulares están formadas principalmente de celulosa y otros polisacáridos asociados a ella compuestos por glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ramnosa y manosa (Boyer y Shannon, 1987, Corsetti y Settanni, 2007). La fibra de maíz contiene heterosilanos (aprox. 50%), celulosa (aprox. 20%), ácidos fenólicos (aprox. 4%, principalmente ferúlico y diferúlico), almidón (9–23%), proteínas (10–13%), lípidos (2–3%) y cenizas (2%) (Hespell, 1998). Algunos de los carbohidratos complejos que se han estudiado en el maíz se encuentran descritos a continuación.

La **celulosa**. Es un homopolímero lineal de unidades de D-glucosa con enlaces β 1-4 (Figura 3), de masa molar variable. La molécula extendida forma un listón plano que se vuelve rígido por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que producen un arreglo cristalino regular que hacen que la molécula tenga baja solubilidad. El pericarpio del maíz contiene alrededor del 23% de celulosa (Aman y Westerlung, 1996).

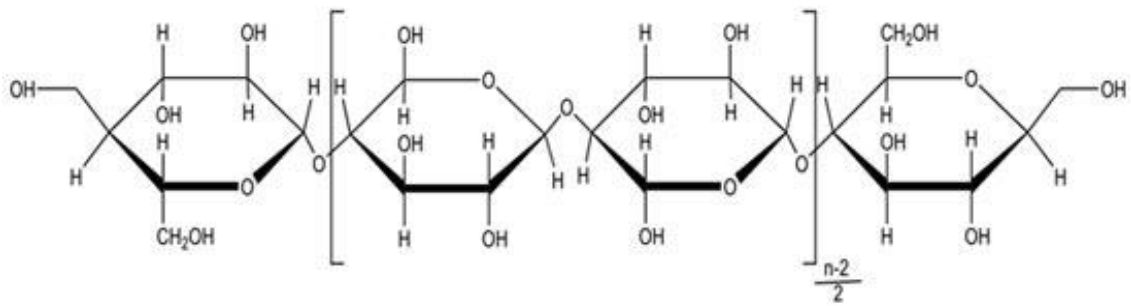


Figura 3. Estructura química general de la celulosa (<http://www.adabi.org.mx/content/Notas.jsfx?id=309>)

La **hemicelulosa** está compuesta por heteroglucanos con 2 a 4 residuos de azúcares, ya sean hexosas, pentosas o sus ácidos urónicos y en el caso del pericarpio de maíz, éste se compone de pentosanos (heteroxilanas). Los **pentosanos** son polímeros de pentanos como arabinosa y xilosa que constituyen la pared celular. Se ha reportado que la fibra o goma del maíz (CFG) extraído del mismo con peróxido de hidrógeno alcalino es un arabinoxilano, muy ramificado (Francesch, 1996).

1.3.2 Xilano

Los xilanos están constituidos por una cadena principal de β -(1-4)-xilopiranososa (xilosa); el arabinoxilano tiene residuos de α -l-arabinofuranosa (L-arabinosa) y de ácido glucurónico en posición C(O)-2 y/o C(O)-3 sobre la estructura del xilano aunque también puede estar sustituido con glucosa o galactosa y estar esterificados con ácidos ferúlicos, diferúlicos y p-cumáricos en posición C(O)-5 de la arabinosa (Dornez et al., 2009). La solubilidad de este polisacárido depende de su grado de sustitución o ramificaciones.

El arabinoxilano representa hasta 90-95% de la hemicelulosa en la semilla de maíz, Carvajal et al. (2007) caracterizaron la goma de la fibra del maíz (MBG) obtenida del proceso de molienda seca la cual se ha reportado que contiene D-xilosa (48-54%), L-arabinosa (33-35%), galactosa (5-11%) y ácido D-glucurónico (3-6%). La lignina puede formar enlaces resistentes con la hemicelulosa, que pueden ser rotos por los tratamientos alcalinos y térmicos como la nixtamalización (Boyer y Shannon, 1987, Madhav et al., 2009).

Existen dos tipos principales de arabinoxilano en el maíz; el que se encuentra en el endospermo y el que está en otros tejidos en ambos tipos la L-arabinosa está unida directamente a la cadena de xilosa, normalmente en la posición 3, aunque también se puede encontrar en posición 2 y siempre está unida en forma de furanósido. El arabinoxilano que no proviene del endospermo contiene además ácido glucurónico y/o 4-O- metil-D-glucurónico, acetilo y galactosa como sustituyentes, enlazados en posición 2 o 3 de la xilosa.

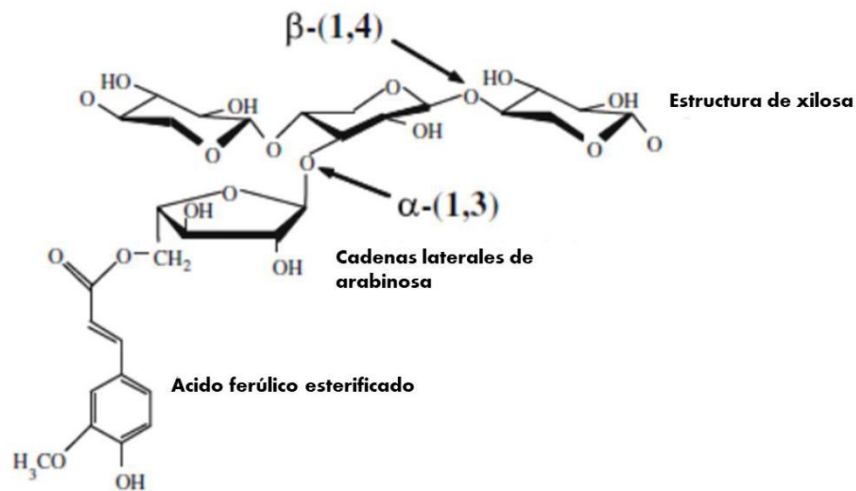


Figura 4. Estructura química general de los arabinoxilanos (Niño et al., 2009).

Los xilanos endospermicos de los cereales son altamente sustituidos e incluso pueden estar doblemente sustituidos en un mismo residuo de xilosa en sus posiciones 2 y 3. Raramente se ha observado la sustitución con ácidos urónicos en el arabinoxilano endospermico. Ambos tipos de xilano pueden contener ácido ferúlico y p-cumárico unidos a la estructura del arabinoxilano (Tabla 3). La complejidad de la molécula puede incrementar ya que las cadenas de xilano pueden intercruzarse unas con otras por medio de los residuos diesterificados de ácido ferúlico (Paloheimo et al., 2010).

Tabla 3. Composición de la goma de maíz (MBG) (Carvajal, et al. 2007).

Componente	g/100 g MBG	Componente	$\mu\text{g}/\text{mg}$ MBG
Arabinosa	34.00 ± 0.90		
Xilosa	40.00 ± 1.60		
Glucosa	5.10 ± 0.20	Ácido Ferúlico	0.34 ± 0.01
Galactosa	3.20 ± 0.10	Ácidos Diferúlicos	0.77 ± 0.01
Manosa	0.40 ± 0.02	Ácido Triferúlico	0.39 ± 0.01
Proteína	2.50 ± 0.10		
Cenizas	4.10 ± 0.11		

MBG = Maize Bran Gum

La lignina presente también en el pericarpio interfiere con la extracción de hemicelulosa en álcali porque retarda la disolución completa y se disuelve en el mismo extracto. Una vez que se ha eliminado la lignina con los tratamientos térmicos alcalinos se obtiene holocelulosa y su extracción con álcali y posterior acidificación genera hemicelulosa A y se puede separar posteriormente de la hemicelulosa B (de estructura más ramificada), cuyos componentes son, en el pericarpio de maíz, la xilosa (54-83%), arabinosa (33%), galactosa (11%) glucosa y ácidos urónicos (Donnelly et al., 1973, Boyer y Shannon, 1987, Southgate ,1991).

Gaspar et al. (2005), demostraron que en el maíz molido, tras un tratamiento alcalino severo con peróxido alcalino, se obtienen mayores rendimientos de extracción de hemicelulosa, una vez que el producto ha sido desalmidonado enzimáticamente y deslignificado.

1.4 Proceso de nixtamalización

La **nixtamalización** es un tratamiento alcalino basado en técnicas prehispánicas para cocer el grano de maíz y obtener una masa apta para la elaboración de tortillas y otros productos mexicanos tradicionales (López y Segurajáuregui ,1986).

La nixtamalización consiste en mezclar una parte de maíz con dos partes de una solución de cal de aproximadamente 1 g / 100 g. La mezcla se calienta a temperatura cercana a la ebullición o en ebullición durante un lapso de 20 a 45 min.y luego se deja reposar toda la noche. Al día siguiente, se decanta el líquido de cocimiento (nejayote) y el maíz, denominado entonces nixtamal, se lava dos o tres veces con agua para eliminar el exceso de cal, partes sueltas del pericarpio y las impurezas del grano. En el caso de la molienda tradicional, se muele el nixtamal en metate y se seca, obteniéndose partículas de diversos tamaños (Sahai et al.,2001).

La consecuencia más evidente de la adición de cal es que facilita la separación de la cubierta seminal durante la cocción y la maceración. El pH alcalino es necesario para separar las hemicelulosas y facilitar la remoción del pericarpio. La absorción de calcio durante la cocción en agua de cal depende de las características físicas y químicas del maíz.Además con la nixtamalización hay pérdida de materia seca, cambios de color, aroma y sabor, así como un retraso en la aparición de acidez, lo que aumenta su tiempo de conservación.

Existen diferencias significativas en cuanto a contenido de proteína y lípidos en diferentes tamaños de partícula de una masa, los que además dan ciertas características organolépticas especiales a la masa y los productos elaborados a partir de ella (López y Segurajáuregui ,1986; Sahai et al.,2001).

1.4.1 Cambios generados en el maíz por la nixtamalización

Cambios químicos

Agua, calor e hidróxido de calcio influyen en la composición química del maíz nixtamalizado, dando lugar a modificaciones en el contenido de nutrimentos. Los cambios se deben a las pérdidas materiales del grano y a las modificaciones químicas, que pueden derivar en la destrucción de algunos elementos nutritivos y de la transformación química de otros, incluso modificando su biodisponibilidad.

Existen cambios estructurales evidentes en el arreglo del almidón y la estructura de las proteínas presentes después de la nixtamalización, en parte por su desnaturalización, la pérdida de puentes disulfuro y no covalentes y en parte por la formación de nuevos enlaces hidrofóbicos. El tratamiento alcalino modifica el endospermo cristalino y almidonoso, ya que modifica el arreglo uniforme de los gránulos de almidón del endospermo duro y la microestructura del endospermo suave a un arreglo irregular (Paredes y Saharopulos, 1982).

Pérdida de materia seca

Las pérdidas de materia seca dependen de diversas variables, como el tipo de maíz (endospermo duro o blando), la integridad del grano (granos enteros o quebrados), el método de cocción (tradicional, al vapor, bajo presión o comercial), la cantidad de cal empleada, el tiempo de cocción y el tiempo de remojo, así como otras operaciones, como el tratamiento para eliminar la cubierta seminal durante el lavado de los granos.

Según algunos investigadores, como Khan et al. (1991), las pérdidas de materia seca aumentan en proporción al aumento del tiempo de cocción. De igual modo, la integridad del grano de maíz influye en las pérdidas, mayores en los granos quebrados (10.8 a 12.1 por ciento) que en los enteros (6.3 a 8.9 por ciento) (FAO, 1993).

El contenido de materia seca ha sido analizado por Pflugfelder, et al. (1988a), quienes hallaron un 64 g / 100 g de polisacáridos no amiláceos (fibra), 20 g / 100 g de almidón y 1.4 g/ 100 g de proteínas y determinaron que hay mayor pérdida durante el remojo, principalmente de pericarpio.

Contenido de fibras

El contenido de fibra cruda disminuye cuando se transforma el grano en tortillas.

Acevedo y Bressani (1990) reportan una disminución de fibra insoluble en la transformación del maíz crudo (13 g/ 100 g), en masa (6 g/ 100 g) y un aumento en la transformación de masa en tortillas (7 g/ 100 g), la disminución debida a la transformación del maíz crudo en masa se debe a la pérdida de la cubierta seminal.

Durante el proceso de transformación del maíz crudo en masa hay una disminución del contenido de fibra insoluble debida a la pérdida del pericarpio, mientras que la fibra soluble aumenta de 0.88 a 1.31 g/ 100 g por la diferencia de masa debida a la pérdida de otros componentes (Saldaña et al., 1984). A pesar de las pérdidas de fibra durante el procesamiento, Bressani et al. (2001) determinaron en muestras de harina comercial que el contenido promedio de fibra total es de 10.2 ± 1.2 g/ 100 g y 8.1 ± 1.5 g/ 100 g es fibra soluble.

Algunos componentes fibrosos no se solubilizan completamente durante la nixtamalización, provocando que, al dispersar la masa de nixtamal fermentada en agua para elaborar pozol, se genere un sedimento no agradable que puede disminuir si se le da un segundo hervor al nixtamal antes de molerlo y preparar la masa. Este procedimiento fue instaurado por la población mestiza en Los Altos de Chiapas (Wacher et al., 2000).

Si bien se realiza extracción efectiva de hemicelulosas utilizando medios alcalinos, esto debe ocurrir en concentraciones de 4 a 10% o mayores de sosa o potasa (Bastawde, 1992). Durante la nixtamalización no se utilizan concentraciones tan altas, lo que explicaría la pérdida incompleta del pericarpio en el nejayote (Billeb y Bressani, 2001) y la conservación de fracciones con hemicelulosa en el nixtamal, además de que, por la ruptura de enlaces hidrofóbicos con la lignina, se facilita su exposición ante el ataque enzimático de los microorganismos durante la fermentación del pozol.

Grasas y ácidos grasos

Se produce una pérdida mínima de lípidos que puede atribuirse parcialmente a la pérdida del pericarpio, la capa de aleurona, la piloriza y el germen, partes del grano que contienen lípidos y vitaminas liposolubles.

Cenizas

Según Pflugfelder et al. 1988b, en el contenido de calcio de la masa influyen los niveles de cal, las temperaturas de cocción y de remojo, así como las características intrínsecas del maíz. Los cambios del contenido de otros minerales varían y dependen posiblemente de la pureza de la cal empleada y del tipo de aparato de molienda utilizado. La utilización de hidróxido de calcio en el proceso de transformación del maíz en tortillas aumenta considerablemente el contenido de calcio del producto (hasta en un 400 por ciento) por la absorción de cal. El calcio presente en la masa obtenida es altamente biodisponible reduciendo los problemas óseos asociados a su deficiencia. Adicionalmente se ha calculado con base en su alto nivel de consumo, que la tortilla puede aportar de 32 a 62% de los requerimientos diarios mínimos de hierro (Paredes et al., 2009).

Vitaminas

Durante la transformación del maíz en tortillas tienen lugar pérdidas significativas de tiamina,

riboflavina, niacina y caroteno por cocción en agua de cal. Sin embargo, la biodisponibilidad de niacina incrementa ya que durante la cocción se libera ácido nicotínico, su precursor. Es por ello que en los maíces sometidos a la nixtamalización disminuye el factor pelagragénico a diferencia de otros cereales.

La pelagra se debe a un desequilibrio de los aminoácidos esenciales, en particular su bajo contenido de triptófano, lo que aumenta los requerimientos de niacina del organismo (Paredes, et al., 2009).

Proteínas y aminoácidos

Aunque tras la cocción del maíz en agua de cal se producen pérdidas químicas de algunos nutrientes, la calidad de las proteínas es ligera pero persistentemente superior en las tortillas que en el maíz (FAO, 1993), la nixtamalización incrementa la disponibilidad de la mayoría de los aminoácidos esenciales.

La digestibilidad de las proteínas puede disminuir ligeramente en la masa nixtamalizada y sus productos derivados dependiendo del tiempo de cocción y la concentración de cal empleados, afectando sobre todo a las prolaminas.

Respecto a los aminoácidos esenciales, el maíz normal contiene en promedio 1.6 gramos de lisina y 0.5 gramos de triptófano por 100 gramos de proteína y su contenido no se modifica por el tratamiento térmico- alcalino, aunque pueden presentarse algunas pérdidas; además la generación de interacciones hidrofóbicas, la desnaturalización de las proteínas y su degradación probablemente dan lugar a cambios de la solubilidad de dichos elementos. Los aminoácidos liberados dan lugar a péptidos como la lisinoalanina (LAL), la l-antionina y la ornitina, que tienen efectos perjudiciales en pruebas con animales y no son biodisponibles disminuyendo el valor nutricional de la masa al afectar la calidad de las proteínas (Paredes et al., 2009, FAO, 1993).

Cambios morfológicos superficiales

La superficie externa de los granos tratados con álcali (nixtamalizados) muestra cambios estructurales importantes, los cuales facilitan su separación. La aleurona y algunas capas del pericarpio son retenidas y el germen permanece unido al endospermo almidonoso (Paredes y Saharopulos, 1982).

Utilizando microscopía electrónica de barrido se logra observar un cambio considerable de la estructura superficial del pericarpio que se ve como una superficie corrugada, discontinua, con perforaciones numerosas que indican la disolución parcial de algunos de sus componentes a diferencia del control no nixtamalizado el cual presenta una superficie cuticular continua. Tras el tratamiento alcalino al maíz, la aleurona permanece unida al endospermo y algunas capas

internas del pericarpio no son removidas durante los lavados del nixtamal (Paredes, y Saharopulos, 1982).

Almidón

El tratamiento alcalino modifica la conformación física del endospermo cristalino y almidonoso, ya que cambia el arreglo uniforme de los gránulos de almidón del endospermo duro y la microestructura del endospermo suave a un arreglo irregular.

Se creía que durante la nixtamalización una gran parte de los almidones eran gelatinizados, sin embargo, actualmente se ha demostrado que solamente se gelatiniza alrededor del 15% del almidón total. Con la gelatinización, se presentan otros cambios en el almidón como la pérdida de la birrefringencia y cristalinidad del gránulo, modificación del patrón de rayos X e incremento en la solubilidad (Salinas et al., 2003).

1.5 Fermentación del maíz

Un alimento fermentado es el resultado de la transformación de un sustrato por la actividad metabólica de microorganismos que bajo condiciones específicas lleva a la obtención de un producto apto para el consumo con características sensoriales, nutrimentales y en algunos casos toxicológicas distintas de las del sustrato inicial (Steinkraus, 1983b).

Los microorganismos involucrados en las fermentaciones pueden ser muy diversos por lo que las transformaciones pueden seguir distintas rutas metabólicas. Existen fermentaciones lácticas, acéticas, alcohólicas, entre otras y pueden obtenerse diferentes productos metabólicos, tales como los ácidos láctico, acético, butírico, propiónico, fórmico, etanol, butanol, acetona, isopropanol y otros más (Steinkraus, 1983a). La fermentación de alimentos, que existe desde épocas remotas, cuando no se sabía de la existencia de los microorganismos contribuyó a darle variedad a la dieta y su uso como método de conservación ha sido utilizado en todas las culturas del mundo, algunos productos fermentados son cerveza, vino, vinagre y quesos que han sido extensamente estudiados y ahora se conocen los microorganismos y los mecanismos involucrados.

Durante la fermentación de un alimento se modifica su pH, actividad de agua, estructura de proteínas y se generan diversos cambios fisicoquímicos por lo que presenta muchas **ventajas**, algunas de las cuales son:

- Es un método económico de conservación de alimentos.
- Se modifican algunas características sensoriales como sabor, aroma, apariencia, textura y consistencia, que los hacen más atractivos para el consumidor que los ingredientes no

fermentados (Steinkraus, 1983b).

- En muchos casos, el producto fermentado final es una mayor fuente de proteínas, calorías y ciertas vitaminas.

- Se reducen tiempos de cocción.

- Disminuyen algunos compuestos anti nutricionales como fitatos y taninos mejorando la biodisponibilidad de algunos minerales (Nout y Sarkar, 1999)

- Se eliminan algunos compuestos potencialmente tóxicos como, por ejemplo, los glucósidos cianogénicos y linamarina (Nout y Sarkar, 1999).

- La formación de ácidos orgánicos como: acético, láctico, butírico y propiónico, y de algunos alcoholes como el etanol y el láctico, así como la liberación de algunos aminoácidos (bacteriocinas) puede limitar el crecimiento microbiano o inhibir la presencia de ciertas cepas patógenas haciendo al alimento microbiológicamente inocuo. (Wacher, 2014).

- Se pueden obtener alimentos funcionales debido al contenido de prebióticos o presencia de probióticos. Por ejemplo está el caso de algunos yogures con bifidobacterias (EUFIC, 2006).

Antes del proceso de fermentación de cereales como el maíz, el sorgo, el mijo o el arroz se realizan operaciones para eliminar porciones de la cubierta seminal y el germen de los granos. Los procesos generalmente requieren lavado, tamizado y decantación, operaciones que modifican la composición química y el valor nutritivo del producto final. La fermentación natural del maíz cocido constituye una manera de mejorar las cualidades nutritivas del cereal, ya que aumenta la concentración de vitamina B y mejora su calidad proteínica, entre otros (Steinkraus, 1983a).

Debido a su composición, el maíz es un buen sustrato para el desarrollo de microorganismos, por lo que su fermentación es un procedimiento muy popular en diversas partes del mundo y particularmente en nuestro país, donde existe una gran variedad de alimentos fermentados de este cereal, en especial de bebidas tanto alcohólicas como refrescantes, cuyo consumo es habitual entre la población de las distintas regiones de México (González-Flores y Jiménez -Ocampo, 2010).

1.6 El pozol

Entre las bebidas y los alimentos fermentados tradicionales de México de fermentación no alcohólica de origen prehispánico, el más importante es el pozol hecho a base de maíz y el cual experimenta una fermentación natural y no controlada, que incluye la participación de levaduras, mohos y bacterias (Phister et al., 2004).

El pozol es una bebida tradicional de maíz de origen maya que forma parte de la alimentación

básica de muchos grupos étnicos de México: chontales, choles, mayas, lacandones, tzotziles o chamulas, tzetzales, zoques, mames, zapotecos, así como de la población mestiza. El nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso (Wacher, 2014).

Se consume en los estados del sureste (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Chiapas y Oaxaca) y en algunos países de Centroamérica (Guatemala). Es una bebida refrescante, un medicamento y un elemento en ceremonias rituales y como provisiones en travesías largas (López et al., 1994, Jiménez et al., 2010).

Se puede consumir recién elaborado (pozol fresco) o fermentado. Tradicionalmente se consume solo (pozol blanco), aunque también es común agregarle cacao o coco. Actualmente son sobre todo los miembros de los pueblos originarios los que consumen el pozol de maíz. Sin embargo, es también ampliamente consumido por los “mestizos” quienes agregan otros ingredientes (diversas frutas de la región o inclusive horchata o leche) y lo licuan, o consumen el pozol de maíz y de cacao y lo acompañan con dulces típicos.

1.6.1 Preparación

Los granos de maíz blanco, amarillo o negro se cocinan en agua de cal (1% p/v) en ebullición hasta que se hinchan los granos; se deja reposar entre 12 y 14 h en la misma solución para facilitar el desprendimiento de las cáscaras. El maíz cocido, llamado nixtamal, se escurre y se lava con agua limpia, frotándolo con las manos para remover el pericarpio. El maíz nixtamalizado se muele gruesamente en metate o en un molino y se amasa con agua formando bolas que son envueltas en hojas del árbol de plátano para mantener la humedad y se dejan reposando a temperatura ambiente durante 2 a 7 días, o hasta un mes.

Dependiendo del tiempo de reposo, variará el gusto del producto final (Steinkraus, 1983a). La bebida se prepara suspendiendo la masa fermentada en agua. Se puede agregar a la bebida sal y chile molido, azúcar o miel según el gusto. A la combinación del pozol con cacao se le llama “chorote” y ésta es una de las más consumidas; en este caso el cacao se muele junto con el nixtamal y con la mezcla se prepara la masa que luego se deja fermentar (Jiménez-Vera et al., 2010, Ampe et al. 1999a).

Cañas et al. (1993) y Wacher et al. (2000) identificaron dos formas básicas de preparación del pozol: la manera tradicional es la descrita anteriormente utilizada por la población indígena nativa y la forma de preparación mestiza en que se hace una cocción adicional a los granos descascarillados para reducir el sedimento que queda en la bebida.

1.6.2 Microbiota del pozol

Se han aislado una gran variedad de microorganismos de la fermentación natural del pozol, y se ha encontrado que son las bacterias ácido-lácticas (LAB) las que predominan desde el principio de la fermentación de la masa y están presentes durante todo el proceso (Wacher et al., 1993, Ampe, et al., 1999a). Nuraida et al. (1995) aislaron 46 LAB de diferentes etapas de fermentación entre las que predominó *Leuconostoc* spp., lactobacilos homofermentativos, lactococos y lactobacilos heterofermentativos productores de dextrano.

Utilizando técnicas moleculares modernas se ha determinado que las bacterias lácticas son responsables del 90 al 97% de la actividad total de la microbiota. Ampe et al., (1999b) estudiaron, mediante la técnica de hibridación cuantitativa, usando sondas filogenéticas y el ARN total de las masas como base para estudiar la ecología del pozol. A las 12 h de fermentación, las bacterias lácticas representaron 80.4 ± 13.9 % de la microbiota activa, siendo *Lactococcus* y *Leuconostoc* los géneros dominantes. Se detectó la presencia de otros géneros como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*, con predominio de *Streptococcus* y *Weissella* y las enterobacterias se encontraron en la superficie de las bolas. También se encontró una pequeña proporción de eucariotas (hongos y levaduras) y de enterobacterias en la superficie de la bola (Ampe et al.,1999b).

Usando métodos independientes del cultivo, mediante PCR-DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) se encontró que *Streptococcus bovis* estaba presente en toda la fermentación con una banda muy intensa, que indicaría su concentración alta (aunque este método es sólo semicuantitativo). También se han encontrado bacterias del género *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. pentosus*) sobre todo al final de la fermentación. Otros tipos de LAB encontrados fueron lactococos y miembros del grupo de *Leuconostoc-Weissella*. Se ha reportado la presencia de lactococos como *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* en el pozol en las primeras etapas de fermentación aunque su papel no ha sido bien definido.

Otras secuencias parciales de rDNA de LAB son cercanos a *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *Enterococcus saccharolyticus*. Otros microorganismos no-LAB identificados pertenecen al género *Exiguobacterium* (*Exiguobacterium aurantiacum* y *Exiguobacterium acetylicum*) y *Oxalophagus* (Ben Omar y Ampe,2000) .

El 40% de las bacterias lácticas presentes en la masa de maíz al inicio de la fermentación son amilolíticas y su proporción disminuye hasta el 3% después de 72 horas de fermentación (Díaz et al., 2003). El microorganismo amilolítico que predomina es *Streptococcus. bovis* (que fue

identificado posteriormente como *S. infantarius* 25124 *infantarius*), lo cual confirma su importancia en la fermentación. También identificaron *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, y *Enterococcus sulfureus* dentro de las bacterias amilolíticas importantes (Díaz et al., 2003).

Usando el mismo método de PCR-DGGE para evaluar masas de pozol de diferentes productores, se concluyó que aún cuando al inicio de la fermentación el tipo de LAB en las masas de cada productor es diferente, después de 24 o 72 h de fermentación se encuentran en cada uno los mismos géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, y también *Enterococcus* y *Leuconostoc* (Bolaños et al., 2004).

Se han detectado bacterias mesófilas no lácticas, como las del género *Bacillus* e incluso la presencia y el desarrollo de enterobacterias. Se ha reportado la presencia de cepas patógenas de *Escherichia coli* y su sobrevivencia cuando los valores de pH de la masa fermentada son de 4.0 o menos.

Los hongos involucrados en la fermentación tradicional del pozol fueron examinados en detalle por Ulloa (1974). En los granos de maíz predominó *Fusarium moniliforme*, mientras que en el nixtamal fueron *Trichoderma viridae* y *Monilia sitophila*. Las especies del género *Candida* se desarrollaron hasta 10^{10} UFC/g de masa fresca en 8 días; levaduras filamentosas como *Trichosporon cutaneum* y *Geotrichum candidum* hasta 10^8 UFC/g en 8 días; y *Cladosporium cladosporioides* y *Monilia sitophila* hasta 10^{10} UFC/g. Hace énfasis en algunos de los mohos superficiales, pero ninguna levadura, era amilolíticos y no observó licuefacción de la masa por lo que descartó que la hidrólisis del almidón fuera significativa durante la fermentación. Se han aislado hongos patógenos o potencialmente patógenos, como *Candida parapsilosis*, *Trichosporon cutaneum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus*, aunque estos se encontraron solamente en pozol con unas pocas horas de fermentación y no en más maduros o con un grado alto de fermentación (Steinkraus, 1983a, Ulloa y Herrera, 1972).

Nuraida et al. (1995) por su parte, determinaron la presencia de los hongos y levaduras durante la fermentación del pozol mestizo almacenado en bolsas de plástico y en hoja de plátano. Wachter et al., (2000) encontraron en pozol mestizo e indígena la presencia de BAL amilolíticos, levaduras y mohos (*Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, *Cladosporium cladosporioides* y *Geotrichum candidum*).

Phister et al. (2004) encontraron *Bacillus* sp. cepa CS93 identificada mediante secuenciación de rRNA 16S, la cual tiene actividad antimicrobiana termoestable, esta cepa es de las pocas identificadas con la capacidad de sintetizar clorotetaina, bacilisina e iturina con actividad contra Gram positivos y negativos incluyendo *E.coli* y mohos como *Absidia* sp. y pudiera ser uno de los

microorganismos que controlan la microbiota no deseable.

Entre los microorganismos que conforman la microbiota del pozol existen algunos fijadores del nitrógeno atmosférico que podrían ser las causantes del aumento en el contenido de nitrógeno del pozol, comparado con el de la masa del maíz sin fermentar; como, *Aerobacter aerogenes*, *Achromobacter pozolis* y *Agrobacterium azotophilum* que tiene actividad bactericida, bacteriolítica, bacteriostática y fungistática contra algunos microorganismos patógenos para el hombre. Se encuentran también levaduras que imparten aroma y sabor como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua* [antes *Saccharomyces exiguus*, anamorph *Candida (Torulopsis) holmii*], *Candida humilis* y *Pichia kudriavzevii* (Ulloa y Herrera, 1972, De Vuyst et al., 2009).

1.6.3 Modificación de la microbiota durante la fermentación del pozol

La microbiota del pozol es variable y cambiante durante el proceso de fermentación al igual que le ocurre a sus componentes.

En su estudio, Jiménez et al. (2010), encontraron que, durante la fermentación natural a temperatura ambiente, de tres tipos de pozol: blanco, con cacao y con coco; la concentración de bacterias coliformes disminuyó a partir del tercer día de fermentación y a los 12 días se obtuvo una concentración de 2.20 log UFC/g. En las bacterias lácticas se observó el mayor crecimiento; ya que alcanzaron una concentración de 8.00 log UFC/g a los 3 días de fermentación que se mantuvo durante los 9 días siguientes.

Ampe et al. (1999a) realizaron un estudio detallado sobre la distribución espacial de la microbiota de la masa fermentada en forma de bolas utilizada para la elaboración del pozol. En él demostraron que existe actividad importante en la superficie exterior de las mismas, donde se desarrollaron una mayor diversidad de microorganismos como eucariotes, enterobacterias y productores de exopolisacáridos mientras que en el centro de las bolas de masa crecieron sobre todo BAL.

La evolución de la fermentación del pozol de acuerdo con Ben-Omar y Ampe (2000) se puede dividir en tres etapas. La **primera** con una alta concentración de microbiota, la mayoría de la cual procede de la molienda y abarca géneros como *Exiguobacterium*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, los dos últimos presentes durante todo el proceso. Los microorganismos aerobios estrictos están presentes en la masa durante los primeros días de fermentación y después disminuye su concentración hasta niveles indetectables.

Durante la **segunda etapa** (24-48 h) se desarrollan LAB heterofermentativas incluyendo especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus fermentum*, que producen concentraciones de etanol, similares a las de lactato y alcanzan actividad máxima a las 48 h.

La producción de ácido láctico por las LAB heterofermentativas disminuye el pH (aprox 4.2) que a su vez favorece el desarrollo de levaduras y hongos en la periferia de las bolas de pozol.

La **etapa final** de la fermentación (48 a 96 h) se caracteriza por un descenso en la concentración de LAB heterofermentativas y aumento de LAB homofermentativas (*Lb plantarum*, *Lb casei* y *Lb delbrueckii*) y especies de *Bifidobacterium* que no habían sido detectadas en etapas previas y disminuyen aún más el pH. Esto ocurre porque estas especies son más resistentes a la acidez y pueden desarrollarse aún a pH menores de 4.

En el producto final (120 h), Ampe et al. (1999b) encontraron una proporción aún mayor de LAB (93.4 ± 4.4% del RNA total), sin embargo, la estructura de esta comunidad es radicalmente diferente de la población a las 12 h de fermentación, *Lactococcus* y *Leuconostoc* sólo representan una fracción mínima de la población (0.8 ± 0.6% y 4.9 ± 1.7% del RNA total), en cambio, predomina *Lactobacillus spp.* y géneros relacionados (*Pediococcus* y *Weissella*).

1.6.4. *Streptococcus infantarius ssp. infantarius*

La ecología microbiana del pozol ha sido estudiada como se mencionó previamente (apartado 1.6.2) por Ampe et al. (1999), Ben Omar y Ampe (2000), Escalante et al. (2001), y Díaz-Ruiz et al. (2003) quienes encontraron una diversidad variable de especies a lo largo de la fermentación del pozol; las cuales después de 24 h se pueden agrupar en cepas pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, y *Lactococcus*.

Streptococcus infantarius ssp. infantarius 25124 (Sii-25124) es la principal bacteria láctica amilolítica (BAL-A) del pozol. Comparado con otras BAL-A, muestra una baja actividad amilolítica (130.7 U/g células peso seco /h en MRS almidón (medio De Man Rogosa Sharp), aunque tiene una tasa de crecimiento específica alta ($\mu = 0.94/h$) en el mismo medio; comparada con *Lactobacillus fermentum* (BAL-A del pozol) que tiene actividad amilolítica de 1.890 U/g células peso seco/h y tasa de crecimiento específica de $\mu = 0.35/h$ en MRS-almidón (Díaz-Ruiz et al., 2003).

Cepas de *Streptococcus infantarius ssp. infantarius* han sido aisladas de productos lácteos fermentados africanos tradicionales como el maasai y el Fènè (leche de vaca fermentada) (Jans et al., 2017).

También se han registrado cepas patógenas y no se ha reportado actualmente un método general para discernir entre cepas patógenas de las no patógenas. Kaindi et al. (2018) aislaron y estudiaron bacterias de esta subespecie de productos lácteos fermentados africanos las cuales eran claramente diferentes de las cepas aisladas en humanos de *Streptococcus infantarius ssp.*

infantarius. Al provenir de un alimento fermentado, es posible que Sii-25124 sea también distinta a las cepas aisladas de humanos y por tanto no sea patógena.

Streptococcus infantarius ssp. *infantarius* (Sii) era clasificado anteriormente como *Streptococcus bovis* biotipo II/1, pero fue diferenciada mediante análisis fenotípicos y genotípicos por Schlegel et al. (2000, 2003) y por secuenciación del gen *sodA* (Poyart et al., 2002; Romero et al., 2011). *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius* 25124 (Sii-25124) pertenece al grupo de *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*, cuyos miembros han sido reportados como patógenos y han sido frecuentemente relacionados con cáncer colorectal; sin embargo, también han sido reportadas cepas no patógenas dentro del mismo grupo por lo que es necesario conducir mayores estudios respecto a la patogenicidad de éste género (Papadimitriou et al., 2014; Jans y Bolieij, 2018).

1.6.5 Cambios en la composición del maíz debidos a la fermentación láctica

Durante la fermentación de la masa del pozol, se modifica su composición, aumentando la concentración de algunos de sus componentes, entre ellos los aminoácidos. Se cree que este incremento es debido a la fijación de nitrógeno realizado por ciertos microorganismos como *Agrobacterium azotophilum* (López- Murguía et al. 1994). También se generan altas concentraciones de almidón soluble, dextrinas y maltosa por la actividad amilolítica de algunas BAL-A, aunque hay bajas concentraciones de mono y disacáridos, y solo se detectaron glucosa y maltosa, en cambio se encontraron altas concentraciones de productos de la fermentación, principalmente lactato, etanol, acetato y formiato, productos de las bacterias heterofermentativas (Ampe et al., 1999, Ben Omar y Ampe, 2000) y el formiato de las enterobacterias.

La concentración de mono y disacáridos en el maíz es muy baja (aproximadamente 0.5 g/100 g de masa), por lo que el almidón es la fuente más importante de carbono y energía. Los estudios sobre la fermentación láctica del pozol se han realizado bajo la premisa de que las bacterias lácticas utilizan los carbohidratos simples y posteriormente el almidón, que es el carbohidrato que se encuentra en mayor proporción en la masa de nixtamal.

1.6.6 Actividad metabólica de la microbiota del pozol

Se han estudiado algunas de las actividades metabólicas de la colección de los microorganismos aislados del pozol por Nuraida et al. (1988) y Cañas et al. (1991); Flores (1996) caracterizó la capacidad de las cepas de la colección para fermentar distintos azúcares utilizando el kit API50, encontrando que los LAB del pozol en conjunto pueden fermentar 30 azúcares diferentes, el 100% de los casos fermentan glucosa, fructosa y maltosa, 96% fermentan sacarosa, manosa,

esculina; 94% N- acetilglucosamina, 91% trehalosa.

Recientemente se ha estudiado individualmente a algunos microorganismos aislados de la masa de pozol y se ha encontrado que ciertas cepas no amilolíticas como *Weissella* presentan un crecimiento apropiado aun cuando se encuentran en las masas ausentes de otros organismos, indicando la posible utilización de sustratos distintos del almidón.

Flores (1996), encontró que dentro de la colección de LAB aisladas del pozol existen cepas que tienen actividad xilanolítica. Debido a la presencia de xilano en la hemicelulosa del maíz, estas bacterias podrían contribuir en la fermentación del pozol al fermentar dicho polisacárido.

De las 94 cepas utilizadas en dicho estudio, sólo el 20% presentaron actividad amilolítica, mientras que cerca del 60% pudieron hidrolizar xilano claramente y alrededor del 40% lo fermentaron débilmente, esto indica que 80 de las 94 cepas aisladas hasta ese momento (88%) presentaron actividad contra xilano.

Posteriormente, basándose en los resultados anteriores, se realizó la tipificación de las cepas xilanolíticas, cuyo dendrograma reveló que las bacterias con mayor actividad xilanolítica forman parte de varios grupos; se identificó una cepa de cada grupo con 99% de identidad siendo los grupos V, IX y X de mediana actividad y el grupo III con alta actividad del cual se identificó a *Lactococcus lactis var lactis* (12 cepas similares); Grupo V: *Lactobacillus pentosus* (4 cepas en el grupo); VII: *Lactobacillus plantarum* (baja actividad) (9 cepas); IX *Lactococcus lactis lactis* (actividad media, 6 cepas) (Flores, 2007).

Las bacterias con mayor actividad xilanolítica detectadas fueron identificadas como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus coprophillus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus acidophilus*.

Flores (2007) seleccionó algunas de las cepas previamente identificadas como xilanolíticas e intentó realizar las fermentaciones en caldo MRS xilano después de hacer una preselección con APT-RBB xilano y tomando la cepa con mayor actividad (SnC11) determinada por el tamaño del halo. Sin embargo, dicha cepa al ser inoculada en medio MRS xilano para evaluar su crecimiento, no presentó cambios significativos en el pH, no hubo crecimiento aparente, posiblemente por un falso positivo dado en el medio indicador debido a la presencia de hidrolasas no específicas.

1.7 Glucosilhidrolasas

Para realizar la hidrólisis completa de los polisacáridos complejos se requieren distintas enzimas como glucanhidrolasas, enzimas desramificadoras y glucosidasas. La mayoría presentan

actividad mínima o nula si se enfrentan individualmente a los polisacáridos (Francesch, 1996). Estas enzimas denominadas glucosilhidrolasas además, se clasifican por familias numeradas basadas en sus actividades catalíticas primarias según se ha determinado por la topografía de su sitio activo.

Previamente se dividían las enzimas en clanes marcados alfabéticamente basados en la similaridad del plegamiento de su proteína. Las enzimas categorizadas en familias numeradas y en clanes alfabéticos poseen actividades catalíticas similares ya que el criterio de clasificación ya sea el plegamiento de la enzima o la topografía del sitio activo están muy relacionadas entre sí, al determinar el comportamiento catalítico de las mismas (Coughlan et al., 1993, Gebler et al., 1992).

La hidrólisis de celulosa y xilanos hacia productos solubles requiere diversos tipos de enzimas. La composición de las hemicelulosas es más compleja que la celulosa, aunque no forma estructuras cristalinas tan densamente empacadas como en la celulosa por lo que son moléculas más accesibles al ataque enzimático. Sin embargo, dada la naturaleza compleja y variabilidad estructural de las hemicelulosas, se requiere la acción de múltiples actividades para su completa degradación (Marais, 2008). El xilano es un componente principal de la hemicelulosa y después de la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza. Su composición es variable y depende de la fuente vegetal de que provenga (Biely, 1985a).

1.7.1 Xilanasas

Las xilanasas son un grupo de enzimas extracelulares que actúan sinérgicamente, son producidas por diversos organismos como bacterias (saprofitas y fitopatógenas), micorrizas y algunas levaduras. Además están presentes en protozoarios, insectos, crustáceos, caracoles, y algunas semillas de plantas durante la fase de germinación en suelo (Mohd, 2008; Ponce y Perez, 2002).

El modo de acción y los productos de hidrólisis varían de acuerdo a la fuente de la enzima (Figura 5). Las xilanasas se cristalizan fácilmente en sulfato de amonio y fosfato de sodio potasio en pH de 3.5 a 9 y en otras sales, polímeros y solventes orgánicos. Su solubilidad se incrementa con el aumento de temperatura en concentraciones moderadas de sulfato de amonio; la solubilidad en buffer de fosfatos (pH 9) disminuye a temperaturas entre el rango de 0-10°C pero permanece constante entre temperaturas de 10-37° C (Krengel y Dijkstra, 1996).

Las hemicelulasas o xilanasas pueden ser agrupadas de acuerdo a sus propiedades catalíticas, ya sean glucosilhidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glucosídicos o bien estererasas de carbohidratos (CEs) que hidrolizan enlaces éster.

En la tabla siguiente se muestran algunas enzimas y su papel en la degradación de hemicelulosas

(Marais, 2008, Ponce y Pérez, 2002, Gilkes et al. 1991, Dornez et al., 2009, Iubmb, 2011).

Tabla 4. Enzimas degradadoras de hemicelulosa.

Enzima	Modo de acción	Clasificación catalítica
Exo- β-(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.156)	Hidroliza enlaces B-1,4-xilosa unida a xilooligosacáridos, libera xilobiosa	GH
Endo-β-(1,4)D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8)	Hidroliza enlaces B-1.4 haciendo cortes internos al azar en la cadena principal de la molécula.	GH
β-D-xilosidasa (E.C. 3.2.1.37)	Remueve residuos de xilosa de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos cortos y xilobiosa produciendo xilosa.	GH
α-N-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Remueve las cadenas laterales de arabinosa al hidrolizar el enlace entre arabinofuranosa en el extremo no reductor en los arabinoxilanos.	GH
α-Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139)	Remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico al hidrolizar los enlaces α -1,2-glucosídicos con los glucuronoxilanos	GH
Acetil-xilan esterasa (E.C. 3.1.1.72).	Libera grupos o-acetilos al hidrolizar enlaces acetil-ester en acetil-xilanos.	CE
Esterasa de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) Esterasa de ácido p-cumárico	Remueve al ácido ferúlico y p-cumárico de las arabinosas al hidrolizar enlaces feruloil-ester y p-Cumaril-ester con xilanos	CE
Endo-B-1,4-mananasa	Libera b-14 mananooligómeros asociados a xilanos	GH
Exo-B-1,4 manosidasa	Hidroliza los B1,4-manooligómeros liberando manosa	GH
Endo-galactanasa	Hidroliza B-1,4-galactano	GH
Acetil-manan-esterasa	Libera 2 ó 3-O-acetilxilanos	CE

GH= Glucosilhidrolasas, CE= Carbohidratoesterasas

La mayoría de las xilanasas conocidas pertenecen a las familias GH 10 (antes llamada F) y 11 (antes llamada G) aunque también existen en las familias 5, 7, 8, 26 y 43; están agrupadas en estas familias según sus propiedades físico-químicas como peso molecular y punto isoeléctrico.

Si se basa en análisis de clusters hidrofóbicos y homología de secuencias se ubican en las familias F y G; las xilanasas de la familia F son de mayor tamaño con un peso molecular de aproximadamente 35 KDa, mientras que las de la familia G (11) sólo tienen un peso de 20 KDa y corresponden a las familias 10 y 11 de la clasificación numérica de las glucosilhidrolasas (Krengel y Dijkstra, 1996).

Sin embargo existen diferencias catalíticas entre las familias 10 y 11, las primeras tienen menor especificidad hacia el sustrato, y se ha encontrado que también hidrolizan el enlace glucosídico e hidroliza los B-D- celobiosidos ya que están compuestas por un dominio de unión a celulosa y

un sitio catalítico ligados mediante un péptido de unión (Henrissat et al., 1998; Biely et al., 1997; Biely, 1993; Henrissat y Bairoch, 1993; Henrissat, 1991).

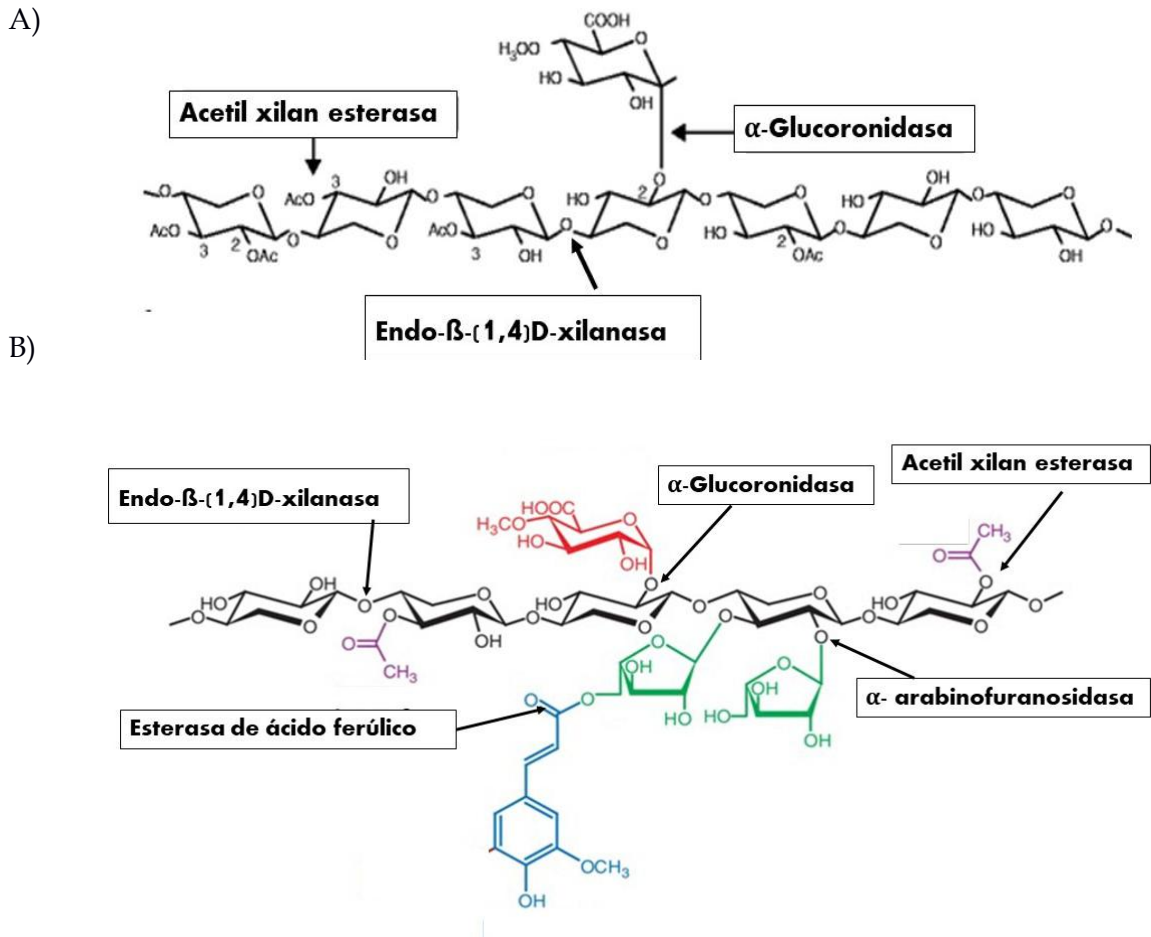


Figura 5 . Enzimas xilanólíticas involucradas en la degradación de xilanos típicos. A) Xilano de maderas duras B) Xilano de cereales (Adaptado).

Las endoxilanasas de la familia 10 son capaces de atacar los enlaces glucosídicos cercanos a puntos de ramificación y hacia el extremo no reductor mientras los de la familia 11 no lo hacen (Subramaniyan y Prema, 2003). Además estas endoxilanasas requieren un espacio de 2 residuos de xilopiranosil no sustituidos entre ramificaciones mientras los de la familia 11 requieren 3 residuos consecutivos no sustituidos (Figura 5). Según Biely (1993) las endoxilanasas de la familia 10 tienen propiedades catalíticas que los hacen compatibles con las B- xilosidasas que están en las familias G y H: 3, 39,43,52 y 54 de las glucosil hidrolasas y que hidrolizan xilooligómeros por mecanismos de retención o por inversión de configuración anomérica (sólo familia 43) (Veeresh y Jin, 2012).

1.7.2 Uso comercial de las xilanasas

Las xilanasas representan una gran proporción de las enzimas hidrolíticas comerciales relacionadas con la hidrólisis de materiales lignocelulósicos y se obtienen de fuentes bacterianas y fúngicas; las enzimas de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* y *Thermomonospora* se usan ampliamente, así como las de *P. chrysosporium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* de origen fúngico que también han sido estudiados por su producción de hemicelulasas (Marais, 2008).

En la actualidad la aplicación industrial y comercial de las enzimas xilanolíticas es creciente y de importancia en diversos ramos de producción (Cooper, 2014) entre ellas, la industria papelera para tratar sus residuos y el preblanqueado de la pulpa Kraft ya que se necesitan menos pasos de blanqueado y disminuye el gasto de reactivos químicos

Otras aplicaciones incluyen:

- Uso como aditivo en alimento de aves para mejorar el aumento de peso y mejorar la eficiencia de conversión, porque se mejora la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos.
- Uso en combinación con amilasas para mejorar el volumen específico en panadería (Gobetti et al., 1999)
- Tratamiento de aguas de desecho
- Mejoramiento de propiedades nutricionales de alimentos de origen agrícola
- Obtención de proteínas celulares, combustibles y sustancias químicas (Biely, 1985a)
- Aplicación en sistemas donde no se requieren enzimas celulolíticas como en el procesamiento de fibras como linaza y cañamo (Biely, 1985a).
- Obtención de xilitol y etanol (Beg, et.al,2001)
- Clarificación de mostos y jugos de fruta junto con celulasas y pectinasas

1.7.3 Celulasas

Las celulasas son enzimas inducibles en los microorganismos cuando crecen en materiales celulósicos. Son un grupo de enzimas con al menos tres actividades diferentes para completar la hidrólisis de la celulosa y con base en similitudes de secuencias, se han descrito 85 diferentes familias.

Las **endo- β -1,4-glucanasas** (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, y producen cadenas de oligosacáridos de diferentes longitudes con un lento incremento de grupos reductores

Las **exo- β -1,4-glucanasas** (E.C. 3.2.1.91) (celobiohidrolasas) remueven unidades de glucosa o

celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, con un incremento rápido en azúcares reductores.

La β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, liberando glucosa.

1.7.4 Uso comercial de celulasas

Algunos de los usos que se dan a las celulasas incluyen la preparación de arroz instantáneo, formulaciones farmacéuticas, preparación de detergentes, modificación de telas en la industria textil, procesamiento de alimentos, industria del papel y pulpas y preparación de biocombustibles.

Aunque se han estudiado celulasas de varias fuentes con diversas aplicaciones, se están logrando avances en la caracterización de complejos celulósicos (celulosomas) producidos por los procariotes así como la innovación en sus aplicaciones. Las fuentes de celulasas fúngicas son utilizadas predominantemente para la obtención industrial pero tardan mucho en crecer para la producción de enzimas. Las celulasas bacterianas son, en comparación con las fúngicas, menos efectivas, pero se obtienen más rápidamente y son más fácilmente manipuladas por la ingeniería genética (Ponnambalam et al., 2011).

La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas; sin embargo, algunos otros sólo producen celulasas o xilanasas. Su represión es regulada por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, y xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas (Ponce y Pérez, 2002). Muchas LAB utilizan frecuentemente los carbohidratos solubles en las harinas como maltosa, sacarosa, fructosa y glucosa y los monosacáridos derivados de los polisacáridos de las plantas como arabinoxilanos y arabinogalactanos lo cual puede reducir la competencia metabólica directa con otros LAB comunes.

Las pentosas (arabinosa y xilosa) son comúnmente utilizados por los LAB heterofermentativos como *Lb. plantarum* y raramente por los LAB homofermentativos obligados y se ha reportado el uso simultáneo de pentosas y maltosa durante la fermentación de masas ácidas para ciertas LAB homo y heterofermentativas (de Vuyst et al., 2009).

1.7.5 Detección de actividad enzimática

Para realizar los ensayos semicuantitativos de actividad enzimática es necesario tener xilano y celulosa teñidos con un colorante o de alguna manera evidenciar la actividad enzimática.

En el estudio de hidrolasas y liasas de polisacáridos se han utilizado muchos métodos entre los cuales son comunes los reológicos y los métodos de tamizaje en placas utilizando diferentes

colorantes (rojo Congo, rojo rutenio, blanco calcofluor, yodo, verde directo, remazol brilliant blue (RBB) y Oztatin brilliant blue (OBB). Estos pueden interactuar específica o no específicamente con polisacáridos. Así, cuando un sustrato colorido está embebido en una matriz de gel, su degradación enzimática puede ser visualizada por la formación de un halo claro o incoloro en el gel, donde el tamaño del halo es proporcional a la actividad enzimática dentro de los límites de difusión de las enzimas (Badel et al., 2011).

El uso de sustratos como el RBB-O-xilano como componentes de medios selectivos ha probado ser útil en el análisis de xilanasas bacterianas. Los sustratos unidos a colorantes al ser incorporados en los medios son divididos en fragmentos más pequeños que se difunden rápidamente dejando un halo brillante alrededor de colonias positivas, este marcaje directo hace posible la selección de un número grande de colonias que poseen las enzimas necesarias, como cuando se analiza una biblioteca hecha con plásmidos o fagos lambda.

Para mantener la solubilidad de los sustratos para la reacción de marcaje, se usan polisacáridos parcialmente hidrolizados o sustituidos. Incluso pueden usarse estos sustratos coloridos para determinar cinéticas de celulasas y mananasas porque la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de colorante liberado durante la digestión enzimática (Biely y Toman, 1988, Fulop y Pony, 1997).

En el caso de la celulosa, aunque existen sustratos coloridos, se ha demostrado que el ensayo del aclarado de zona (red clearing zone) del rojo Congo es adecuado para mostrar cualitativamente la actividad celulolítica; el revelado se logra después de impregnar las placas cultivadas con colorante y lavarlas con solución salina, con lo que se observa una zona clara de actividad enzimática alrededor del crecimiento. Puede tenerse una medida semicuantitativa si se crean pozos en las placas y se mide la zona aclarada alrededor de los pozos uniformemente formados (Ponnambalam et al., 2011).

1.7.6 Genómica de glucosilhidrolasas

Se conoce que los genes involucrados con el metabolismo de la lactosa, están organizados en operones o estructuras con organización modular en la cual los genes que codifican para el transporte de lactosa están muy estrechamente ligados a los de hidrólisis de lactosa, y en algunos casos los genes involucrados con metabolismo de galactosa están ligados o son cotranscritos con los genes del metabolismo de lactosa sugiriendo una ruta evolutiva en común. , Es posible que ocurra algo similar para las enzimas relacionadas con la degradación de xilano (deVos y Vaughan, 1994).

Es de conocimiento común que ciertas cepas de *Streptococcus thermophilus* fermentan los azúcares: lactosa, sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa y existen artículos reportados sobre transporte de lactosa, regulación y metabolismo en especies de este género. Algunas cepas de *Streptococcus* patógenos tienen cierta capacidad de degradar polímeros complejos como almidones o glucanos con enzimas como dextranasas, mutanasas y levanasas. Por otro lado se cuenta con el genoma completo de 4 especies de *Streptococcus* (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, y *S. mutans*) y se han identificado los genes que codifican para dextranasas, amilasas y pululaninas en cada especie (Hols et al., 2005).

Recientemente se han hecho proyectos de secuenciación de genomas de más de 30 bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, lo cual ha permitido, a partir del contenido del genoma, predecir el potencial de uso y degradación de carbohidratos complejos.

Muchos de los genes que contienen glucosil hidrolasas se encuentran integrados en clusters con genes que codifican para transportadores de oligosacáridos tipo MalEFG. Cada uno de los clusters tiene un tipo específico de LacI, represor de respuesta a azúcares, transportador de oligosacáridos tipo ABC MalEFG, y de uno a seis genes de varias clases de glucosil hidrolasas (Ventura et al., 2007).

Kim et al. (2008), caracterizaron (clonaron, secuenciaron y expresaron) un gen de *Lactobacillus plantarum* L137 aislada de alimentos fermentados (arroz y pescado) en Filipinas, con 6171bp de ORF con actividad de amilasa y pululanasa la cual contenía regiones altamente conservadas que son comunes a enzimas amilolíticas (p.e. de *Streptococcus agalactiae*, *Bifidobacterium breve*, *Cl. thermohydrosulfuricum* y *Bacillus stearothermophilus*) y generaba maltotriosa y maltotetraosa como productos finales a partir de almidón soluble. Existen otros reportes de caracterizaciones de enzimas amilolíticas sobre la misma cepa, entre las enzimas amilolíticas se encuentran las alfa amilasas y pululaninas desramificadoras.

La información disponible actualmente sobre la actividad xilanolítica de BAL es escasa, algunos de los esfuerzos por identificar actividad xilanolítica han detectado que incluso en presencia del operon xyl, el cultivo láctico *Lactococcus lactis* 210 muestra una falta de funcionalidad de los genes implicados en la hidrólisis de xilanos; incluso bacterias aisladas de muestras ambientales como *L. lactis* NRRL B4449 y *L. lactis* IO-1 mantienen la habilidad de metabolizar xilosa pero no tienen la capacidad de crecer en presencia de xilano o xilobiosa (Erlandson et al., 2001).

Sólo se han reportado enzimas xilanolíticas putativas en BAL: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* en bases de datos especializadas (tabla 5), ninguna de ellas se ha reportado como una enzima funcional.

Algunos de los genes identificados en LAB relacionados con la hidrólisis de xilano y celulosa

reportados en bases de datos disponibles en internet se encuentran en la tabla siguiente:

Tabla 5. Genes secuenciados para enzimas degradadoras de xilano y celulosa de LAB (UniProtKB).

Clave	enzima	Nombre del gen	Especie	longitud (pb)
<u>Q9CIS3</u>	Endo-1,4-beta-xilanasa D	xynD LL0283 L81453	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (cepa IL1403) (<i>Streptococcus lactis</i>)	372
<u>A2RI07</u>	Endo-1,4-beta-xilanasa D	xynD limg_0 293	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (cepa MG1363)	373
<u>Q02Y76</u>	Xilanase	LACR_1595	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (cepaSK11)	274
<u>Q03LZ0</u>	(Posible) xilanasa/ quitin desacetilasa	STER_0504	<i>Streptococcus thermophilus</i> (cepa ATCC BAA-491 / LMD-9)	77
<u>Q03NA4</u>	(Posible) xilanasa/ quitin desacetilasa	LVIS_2270	<i>Lactobacillus brevis</i> (cepa ATCC 367 / JCM 1170)	337
<u>A2RM80</u>	Alfa-xilosidasa	xyIS limg_18 36	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (cepa MG1363)	739
<u>A9QSS6</u>	Beta-1,4-xilosidasa	xynBLLKF_1 625	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (cepa KF147)	559
<u>Q9CFH1</u>	Beta-1,4- xilosidasa	xynB LL1505 L0234	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (cepa IL1403) (<i>Streptococcus lactis</i>)	559
<u>Q03XW6</u>	Beta-xilosidasa	LEUM_0848	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (cepa ATCC 8293 / NCDO 523)	552
<u>Q03N89</u>	Beta-xilosidasa	LVIS_2285	<i>Lactobacillus brevis</i> (cepa ATCC 367 / JCM 1170)	540
<u>Q03XW7</u>	Endoglucanasa	LEUM_0847	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (cepa ATCC 8293 / NCDO 523)	382
<u>Q02Z04</u>	Endoglucanasa	LACR_1290	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (cepaSK11)	393
<u>A9QS66</u>	Endoxilanasa/endoglucanasa, glucosil hidrolasa	LLKF_1370	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (strain KF147)	377

2. Hipótesis

Debido a las bajas concentraciones de azúcares libres en el nixtamal y a la baja proporción de BAL- amilolíticas, el arabinoxilano podría ser un sustrato disponible para la fermentación láctica del pozol y podría sostener la diversidad microbiana observada.

3. Objetivos

Determinar si la hemicelulosa (xilano) y/o la celulosa pueden ser utilizados como sustrato por cepas aisladas del pozol y cuantificar parámetros de crecimiento y actividad enzimática en fermentaciones de *S. infantarius* 25124 con arabinoxilano de maíz, para conocer su comportamiento en la masa de maíz nixtamalizado.

Objetivos particulares

- Determinar si las cepas seleccionadas de BAL aisladas del pozol son capaces de utilizar xilano y/o celulosa como fuente de carbono.
- Conocer la cinética de crecimiento, consumo de xilano y/o celulosa y productos de fermentación de las cepas seleccionadas.
- Obtener arabinoxilano de maíz para emular sustratos en el nixtamal. .
- Comparar parámetros de crecimiento y actividad enzimática de *S. infantarius* 25124 en medio con xilano de maíz y xilano de abedul.

Metodología

4. Determinación de actividad xilanolítica y celulolítica

4.1 Cepas. Reactivación de las cepas

Se tomaron cepas de la colección de bacterias lácticas aisladas del pozol, las cuales fueron seleccionadas por haber sido detectadas e identificadas con mayor frecuencia en los estudios previos realizados al pozol. Las cepas se encontraban conservadas en glicerol a -80°C y fueron inoculadas en 5 mL de caldo APT ya fuera con 1 chaquira o 50 μL del cultivo en condiciones asépticas. Se incubaron 24 horas a $28-30^{\circ}\text{C}$ y se resembraron individualmente por estriado por agotamiento en placas con agar MRS (De Man Rougosa y Sharp, Oxoid) de las cuales se tomaron colonias aisladas para su identificación morfológica y posterior resiembra. Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cepas de trabajo.

Clave	Identidad	Clave	Identidad
Lilis3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	25124	<i>Streptococcus infantarius</i>
Lilis9	<i>Weisella confusa</i>	A36202	<i>Enterococcus sulfureus</i>
Lilis36	<i>Lactococcus lactis</i>		
Lilis 39	<i>Lactobacillus pentosus</i>	6b	No identificado
Lilis 44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10p	No identificado
Tap50	<i>Leuconostoc argentum</i>	6a	No identificado
Amil47	<i>Streptococcus sp.</i>		

4.2 Actividad xilanolítica y celulolítica

Se realizó la evaluación semicuantitativa de las actividades celulolítica y xilanolítica de las cepas aisladas del pozol, en cajas Petri con medios de cultivo sólidos especificados en los apartados 4.2.1 y 4.2.2, de los cuales se seleccionaron para las siguientes pruebas aquellas cepas que presentaron un halo de actividad mayor.

4.2.1 Determinación semicuantitativa de actividad celulolítica

Se utilizó el ensayo del aclarado de zona (red clearing zone) con rojo Congo (Ponnambalam et al., 2011; Teather y Wood, 1982) para encontrar las cepas de la colección que presentaran actividad enzimática contra la celulosa. Esta técnica se fundamenta en la interacción entre el colorante y el polímero ya que se puede distinguir entre celulosa intacta y degradada según la presencia e intensidad del color. Este ensayo es adecuado para mostrar cualitativamente la actividad celulolítica tanto de endoglucanasa como de glucosidasa (pero no de celobiohidrolasa).

Se tomó una asada del cultivo reactivado para inocular viales con 5 mL de HSH (ver preparación en Anexo 1) sustituyendo sacarosa por hidroxietilcelulosa (Sigma) (medio HSH-C) al 1% (w/v) y se incubaron durante 20-24 h para inducir la actividad enzimática. Con éste preinóculo se inoculó por picadura en una caja Petri de HSH-C por triplicado e inoculando en una caja con MRS sin celulosa como control negativo y se incubaron a 30 °C por hasta 6 días. Una vez que se observó crecimiento, se tiñeron las placas inundándolas con rojo Congo al 0.1% y se dejaron reposar durante 15 min con agitación intermitente, posteriormente se decantó el exceso y se enjuagó con agua destilada y NaCl 1M para eluir el colorante. Como control positivo se usó una cepa de *Cellulomonas flavígena* CDBB531 (Colección Nacional de Cultivos Microbianos del CINVESTAV).

La actividad celulolítica se evalúa por el tamaño del halo amarillo o zona clara alrededor de las colonias en las que la celulosa fue degradada a azúcares simples, se midieron al menos 4 repeticiones de cada cepa.

4.2.2 Determinación semicuantitativa de la actividad xilanolítica

Para la detección de la actividad xilanolítica se utilizó la técnica de inundado de placa (Pointig, 1999) utilizando una solución de yodo-yoduro (Iugol de Gram) que da un color marrón al unirse con el xilano íntegro. La actividad positiva se comprueba con la aparición de un halo decolorado alrededor de las colonias.

Se tomó una asada de las cepas reactivadas en APT para inocular viales con 5 mL de HSH sustituyendo sacarosa por xilano de abedul (Sigma) al 1% (p/v) (medio HSH-X) y se incubaron durante 18-20 h o hasta presencia de turbidez. Con este preinóculo se inoculó por picadura en una caja Petri con el mismo medio (MRS-X) y se incubó a 28-30° C durante 3 o hasta 7 días. Se agregó tinte de yodo Gram (I₂ 2% y KI 1% p/v), y se dejó reposar 5 minutos, posteriormente se decantó el exceso y se enjuagó con agua destilada.

Se midió el diámetro de la zona de degradación de xilano alrededor de las colonias que se observa como un área amarilla-opaca contra un color marrón-purpúreo del xilano no degradado. Como control positivo se usó una cepa de *Cellulomonas flavígena* CDBB531 (Pérez-Avalos et al., 1996).

4.3 Evaluación del crecimiento en medio líquido

4.3.1 Preinóculo y cultivo en medios líquidos con celulosa o xilano como fuente de carbohidratos

Las colonias seleccionadas que presentaron mayor actividad xilanolítica y celulolítica, después de ser reactivadas, se inocularon al 10% v/v en medios líquidos HSH agregando la fuente de carbono a estudiar (HEcelulosa / xilano de abedul) incubando por 18-24 h o hasta que presentaran turbidez. Con éste preinóculo se inoculó otro vial con 10 % del volumen del mismo medio de cultivo, se incubó bajo las mismas condiciones para medir los parámetros de crecimiento y se tomaron alícuotas en diferentes tiempos de muestreo que fueron almacenadas en congelación hasta su uso para análisis de azúcares. Se trabajó al menos por triplicado con volúmenes de 5mL, incubación a 28-30 °C, sin agitación.

Para todos los experimentos en xilano y arabinoxilano, se utilizó un preinóculo de 18 h de *S. infantarius* 25124 en xilano de abedul.

4.3.2 Cinética de crecimiento en medio líquido

Se cuantificó el crecimiento microbiano por cuenta en placa haciendo las diluciones pertinentes tomando 0.5 mL del cultivo luego de inocular y en tiempos subsecuentes en 4.5 mL de solución salina estéril al 0.85%. 0.1 mL de cada una de las diluciones fueron depositados en la superficie de cajas Petri con medio MRS y sembradas por extensión del inóculo. Se incubaron a 28-30°C durante 24-30h y se realizó el conteo manual de UFC.

Cálculo de la velocidad específica de crecimiento.

La velocidad de crecimiento específica, se calculó de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{\ln(X_f - X_i)}{\Delta T}$$

Dónde μ = Vel. esp. de crecimiento en h⁻¹; X = UFC; T= tiempo en h; a partir de los datos obtenidos de la gráfica de Ln UFC /mL contra tiempo de los datos recabados durante la fase exponencial de crecimiento.

4.3.3 Fermentaciones usando medio definido HSH

Se evaluó la capacidad de cuatro cepas de estudio para crecer en el medio definido HSH para bacterias lácticas (Zaunmüller et al., 2006; Westby et al., 1993; Nuraida et al., 1992; Owens y

Keddie, 1969), inoculándolas con 10%v/v del cultivo reactivado en 5mL de volumen final del medio de cultivo utilizando diferentes fuentes de carbono (xilano de abedul, xilano de nejayote, celulosa al 1%p/v); se consideró la turbidez y/o presencia de precipitado como evidencia de crecimiento incubando a 28-30°C durante 48 h, sin agitación.

Se seleccionó a *Streptococcus infantarius* (BAL-A) para continuar las pruebas en un sustrato parecido a aquél de la cual fuera aislado (arabinosilano de nejayote) utilizando un sustrato más sencillo y de estructura simple (xilano de abedul) como punto de comparación. Para demostrar que *S. infantarius* 25124 *infantarius* creció a partir del sustrato provisto (diferentes xilanos), se realizaron fermentaciones simultáneas a partir del mismo inóculo en HSH glucosa 1%, HSH xilano de abedul 1% y como control medio de cultivo sin fuente de carbono, se incubó a 28-30° C 48 h y se evaluó el crecimiento por cuenta en placa.

Para los experimentos con xilano y *S. infantarius* 25124 *infantarius*, se preparó el medio líquido de acuerdo al procedimiento indicado y agregando xilano de abedul (HSH-X) o arabinosilano de maíz (HSH-AX) al 1% o 2% p/v, estableciendo un pH de 6.8.

Para los estudios comparativos entre xilanos, se realizó siempre un preinóculo en HSH-X 1% durante 18-20h de incubación a 28-30°C y se inoculó con éste utilizando un volumen de 10 % v/v ya fuera en 5, 20 o 50 mL de volumen total, cada fermentación se realizó al menos por triplicado y se tomaron alícuotas en diferentes momentos de la fermentación. Cada alícuota se centrifugó a 11,180 g durante 10 min para separar las células y se conservaron los sobrenadantes obtenidos en congelación (-5°C) para posteriores análisis.

4.3.4 Azúcares reductores

Se utilizó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Miller,1959; Chaplin y Kennedy,1987), colocando 0.5 mL de sobrenadante en un tubo de ensayo (con duplicados), se añadió 0.5 mL del reactivo DNS, se tapó y fue colocado en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se introdujo a un baño de agua fría, se le agregaron 5 mL de agua destilada y se midió su absorbancia a 540 nm utilizando un blanco de agua con reactivos. La curva patrón se preparó con soluciones de xilosa o glucosa en concentraciones de 0.1 a 1 mg/mL y el resultado se expresó como equivalentes de xilosa o glucosa dependiendo del sustrato.

4.3.5 Azúcares totales

El contenido de azúcares totales fue determinado en las muestras de fermentación, utilizando el método de fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) colocando 1 mL de sobrenadante, solución patrón

o blanco en un tubo de ensayo y agregando 0.5 mL de fenol al 5% en H₂SO₄ y 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se agitó cuidadosamente en un vortex y se dejó reposar durante 10 minutos. Posteriormente se introdujo en un baño maría a 30°C y se midió su absorbancia a 492nm para pentosas o 480 nm para hexosas y expresando los resultados como equivalentes de xilosa según lo calculado sobre los valores de absorbancia de la curva patrón de soluciones de xilosa de 0.01 a 0.1 mg/mL.

4.3.6 Técnicas de Análisis de productos de fermentación y azúcares

4.3.6.1 HPLC

Utilizando una columna Aminex-HPX-87H (300mm x7.8 mm) en un equipo: Waters AF equipment, Waters binary pump1525, Waters Autosampler 2707, Waters dual Absorbance detector 2487, fase móvil de H₂SO₄ 0.05N 30°C y flujo de 0.6 mL/min y el software Empower, se analizaron los sobrenadantes de muestras tomadas en diferentes tiempos de las fermentaciones (al menos 3 determinaciones independientes) utilizando el programa para análisis de azúcares y ácidos orgánicos precargado en el equipo. Se utilizó un detector UV para los productos de fermentación (ácidos láctico, acético, etanol), y detector IR para los azúcares.

Los sobrenadantes fueron filtrados por membranas de 0.45 µm antes de ser inyectados en el aparato y para confirmar su identidad se comparó el tiempo de retención con aquél de los estándares (todos de Sigma Aldrich) de xilano de abedul, hidroxietilcelulosa, xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa, ácidos orgánicos (acético, fórmico, láctico) y etanol (Ampe et al., 2001; Díaz et al., 2003; Utrilla, 2004) y sus concentraciones fueron calculadas de acuerdo al área de sus picos o señales en correspondencia con sus respectivas curvas patrón preparadas por separado en los siguientes rangos de concentraciones: : etanol, 0.2-1% (v/v); ácido láctico, 0.2-1.2 mg/mL; ácido acético ,0.012-0.0042mg/mL

4.3.6.2 Cromatografía de capa fina (TLC)

Una alternativa al análisis por HPLC de las muestras para detectar azúcares es el uso de cromatografía de capa fina (TLC) que, aunque es un método cualitativo podría indicarnos la aparición/desaparición de compuestos a lo largo de la fermentación.

Se utilizaron placas precubiertas de silica gel 60 Alugram Xtra (0.20 mm) (Macherey-Nagel, Dueren, Alemania), se probaron distintas condiciones de polaridad del eluyente que se mencionan en cada resultado. Se utilizaron como estándares: xilosa, galactosa, arabinosa y ácido láctico en agua destilada con una concentración de 1mg/mL cada uno. Una vez aplicada la

muestra y los estándares en un extremo de la placa, ésta se introdujo, en una cámara de saturación de vidrio con la mezcla de eluyentes y fue secada sobre una parrilla de calentamiento. Una vez seca se roció con solución reveladora de azúcares (Acetona, Fenilamina, Difenilamina y H_3PO_4 , 5:0.1:0.1: 0.75) o de polifenoles: 2-2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) que incrementa la fluorescencia de flavonoides.

4.3.7 Actividad enzimática. Endo-xilanasa

Para los ensayos de actividad enzimática, se utilizaron sobrenadantes de fermentaciones en medio definido HSH con 1% de xilano de maíz y 1% de xilano de abedul, que se inocularon e incubaron en las condiciones descritas previamente y se analizaron alícuotas de diferentes tiempos de fermentación.

Para la determinación de la actividad de Endo-xilanasa se midió el incremento en los azúcares reductores liberados a partir del sustrato de xilano. El medio de reacción consistió en 500 μ L de xilano de abedul al 1% en agua destilada, 500 μ L de sobrenadante de la fermentación y 500 μ L de Buffer citrato-fosfato pH 6.8 (Bailey et al., 1992, IUPAC, 1987), todos los reactivos fueron preincubados a 40 °C.

Una vez hecha la mezcla de reacción, se incubó durante 20 min a 40° C (Rickard y Laughlin, 1980). La reacción se detuvo con la adición de 1.5mL de DNS, se agitó y se colocó en agua en ebullición durante 5 min, posteriormente se atemperó y se midió la absorbancia a 540 nm (Spectronic 21D, Milton Roy, USA) utilizando una curva de calibración de xilosa (X3877, Sigma -Aldrich) de 0.025 a 0.6 mg/mL para calcular la concentración de azúcares reductores liberados. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se registraron los valores promedio.

Una unidad enzimática internacional (IU) se definió como 1 μ mol de xilosa o equivalente de xilosa liberado por minuto bajo las condiciones del ensayo, y se consideraron el blanco de reactivos y de enzima.

4.3.8 Actividad enzimática. β -xilosidasa

Se utilizó un sustrato acoplado a *para*-Nitrofenol (*p*NP) y se midió espectrofotométricamente la liberación del azúcar. Se midió esta actividad en sobrenadantes desde tiempo 0 a 12 y 24h de fermentaciones realizadas en xilano de maíz y abedul (1%) con el fin de demostrar que el xilano de maíz induce la producción de algunas enzimas necesarias para su hidrólisis completa.

El sistema de reacción consistió en 100 μ L de 1mg/mL *p*-nitrofenil- β -D xilopiranosido (*p*NP-xilosa, Sigma-Aldrich) en Buffer de citrato (0.1 M) y fosfato (0.2 M) pH 6.8 y 25 μ L de sobrenadante, se incubaron a 40 ° C durante 20 min. La reacción fue detenida añadiendo 75 μ L

de Na_2CO_3 0.25 M y el *p*NP liberado se midió en un espectrofotómetro de placas (Spectonic 21D, Milton Roy, USA) con un filtro de 405 nm. Para el cálculo de la concentración de *p*NP liberada, se comparó con una curva patrón de *p*-nitrofenol de 0 a 0.05 mM.

Una **unidad de actividad** se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol / $\text{mL} \cdot \text{min}$ de *p*NP bajo las condiciones del ensayo: la actividad específica se calculó de acuerdo al contenido de proteína en mg, medido por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

4.3.9 Actividad enzimática. Enzimas complementarias

Se midieron las actividades de enzimas complementarias a la Endoxilanasas utilizando los sustratos correspondientes unidos a *p*NP como sustrato, todos de Sigma Aldrich (*p*NP- β -D-glucopiranosido; *p*NP α -D-glucopiranosido; *p*NP β -arabinofuranósido, *p*NP α -arabinofuranósido; *p*NP β -D-galactopiranosido, *p*NP α -D-galactopiranosido, *p*NP α -xilopiranosido, y *p*NP 4-nitrofenil-acetato) utilizando las mismas condiciones descritas para *p*NP β -xilosidasa.

4.4 Extracción de Arabinoxilano de nejayote (AX)

Para la obtención de arabinoxilano se utilizó en todas las ocasiones nejayote proveniente de un molino ubicado en la colonia Niños Héroes de Chapultepec (deleg. Benito Juárez, Ciudad de México) el cual fue producido de acuerdo a las prácticas comerciales de dicho molino que implicaron calentamiento a ebullición del maíz en el agua (aproximadamente 95 °C) con 0.5 Kg de cal por cada 50 Kg de maíz durante 50-60 min y posterior reposo durante 12 h. El procedimiento de extracción se realizó basándose en la técnica de Carvajal et al. (2007) con algunas modificaciones. Se procuró coleccionar las muestras antes de las 9 AM y procesarlas en un lapso no mayor a 2h para evitar la degradación del polímero.

Se filtró el nejayote para separar residuos de grano de maíz utilizando tela de nylon y recuperando el filtrado, el cual fue centrifugado para eliminar residuos sólidos insolubles a 11, 180 g durante 15 min a temperatura ambiente (20°C) y se recuperó el sobrenadante. Se ajustó el pH que dependiendo del proceso puede variar entre 9 y 13, para detener la hidrólisis alcalina del polisacárido en suspensión utilizando HCl 3 M hasta un pH de 5 con ayuda de un potenciómetro.

Se agregó etanol al 65% (v/v) con agitación suave y se dejó reposar toda la noche cubriendo el recipiente en refrigeración para precipitar el polisacárido. Una vez formado el gel, se filtró el

precipitado y se lavó *in situ* en el filtro con etanol y acetona (0.5 y 0.25 volúmenes por cada volumen de filtrado). El residuo se secó a temperatura ambiente y se pesó para calcular el rendimiento. Para facilitar su uso, el arabinoxilano obtenido fue resolubilizado en el mínimo volumen de agua destilada para liofilizarlo.

4.4.1 Verificación de la identidad del compuesto extraído del nejayote.

Para verificar la identidad del compuesto extraído del nejayote se analizó el producto liofilizado por Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química y se determinaron azúcares reductores por la técnica de DNS.

4.5 Análisis estadístico

Las diferencias entre fermentaciones con sustratos y microorganismos distintos se evaluaron mediante el análisis del área bajo la curva y comparando los valores medios con una distribución T student ($\alpha = 0.01$).

5. Resultados y Discusión

5.1 Etapa1: Determinación de actividad xilanolítica/ celulolítica de cepas de la colección

Objetivos:

- Determinar si las cepas aisladas del pozol son capaces de utilizar xilano y celulosa como fuente de carbono:

1) Encontrar una metodología adecuada para detectar semicuantitativamente la actividad xilanolítica y celulolítica de las cepas representativas de la colección (12 cepas).

2) Evaluar la posibilidad de utilizar medios de composición definida para los experimentos.

3) Seleccionar a los microorganismos con mayor actividad enzimática contra xilano y celulosa.

5.1.1 Descripción de las cepas de trabajo

En la tabla 7 se presentan algunas características de las cepas de la colección usadas durante los experimentos en este trabajo.

Tabla 7. Características de las cepas de trabajo

Identidad	Clave de la cepa	Morfología	Prueba de catalasa
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lilis3	Bacilos Gram +	Negativo
<i>Weissella confusa</i>	Lilis9	Bacilos Gram +	Negativo
<i>Lactococcus lactis</i>	Lilis36	Cocos Gram +	Negativo
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Lilis 39	Cocobacilos Gram +	Negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lilis 44	Cocobacilos Gram +	Negativo
<i>Leuconostoc argenteum</i>	Tap50	Cocos Gram +	Negativo
<i>Streptococcus sp.</i>	Amil47	Cocos Gram +	Negativo
<i>Streptococcus infantarius</i>	25124	Cocos Gram +	Negativo
<i>Enterococcus sulfureus</i>	A36202	Cocos Gram +	Negativo
No identificado	6a	Bacilos Gram +	Negativo
No identificado	6b	Bacilos Gram +	Negativo
No identificado	10p	Bacilos Gram +	Negativo

Se confirmó que todas las cepas estaban puras y poseían características correspondientes a bacterias ácido lácticas.

5.1.2 Evaluación de actividad celulolítica por ensayo de aclarado de zona

Los resultados de la evaluación de actividad enzimática contra celulosa de las cepas representativas de la colección después de 6 días de incubación se encuentran resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Diámetro de los halos medidos (cm) en MRS-C con 6 días de incubación (promedio de al menos 4 determinaciones)

Cepa	Identificación	Diametro del halo (cm).
<i>Lactobacillus plantarum</i>	lilis3	0.16 ±0.05
<i>Weissella confusa</i>	lilis 9	0.16± 0.05
<i>Lactococcus lactis</i>	lilis36	0.45 ± 0.31
<i>Lactobacillus pentosus</i>	lilis 39	0.19 ± 0.06
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lilis 44	0.20 ± 0.00
<i>Leuconostoc argenteum</i>	Tap 50	0.13 ±0.05
<i>Streptococcus sp.</i>	Amil47	0.25 ±0.14
<i>Streptococcus infantarius</i>	25124	0.17 ±0.06
<i>Enterococcus sulfureus</i>	A36202	0.15 ± 0.05
No identificado	6a	0.20 0.09
No identificado	6b	0.18 ± 0.10
No identificado	10p	0.29 ± 0.09
Control	<i>Cellulomonas flavigena</i>	1.33 ± 0.51

La actividad celulolítica fue muy baja respecto al control (*Cellulomonas flavigena*) para todas las cepas, 10p y lilis 36 (*Lactococcus lactis*) presentaron los halos de mayor tamaño. Algunas imágenes de las placas reveladas con Rojo Congo se observan en la Figura 6.

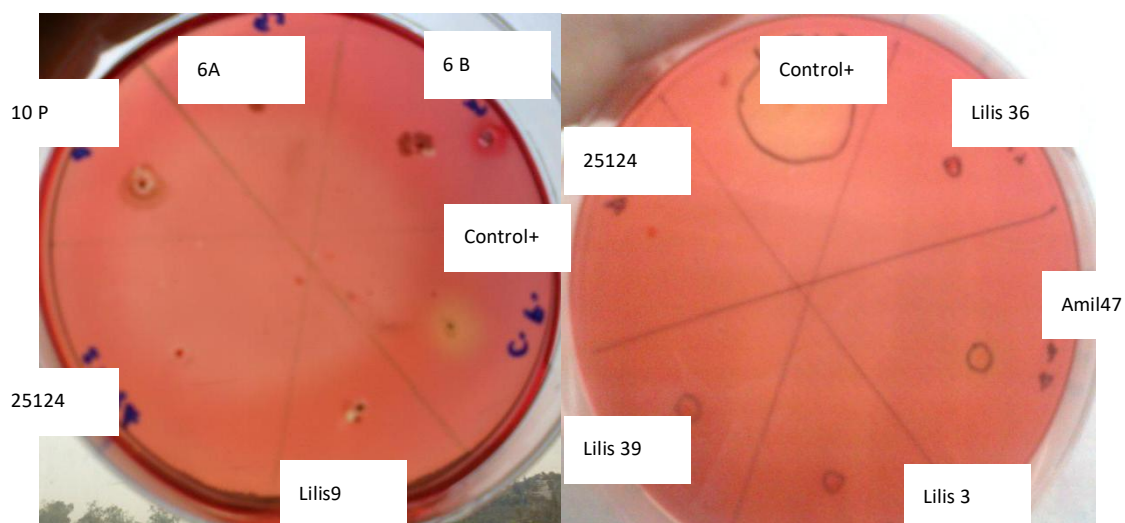


Figura 6. Halos formados por la actividad celulolítica de BAL del pozol en el medio HSH-C.

5.1.3 Evaluación de actividad xilanolítica por técnica de inundado de placa

Los resultados de la evaluación de la actividad xilanolítica general de cepas aisladas representativas de la fermentación del pozol se encuentran en la Tabla 9.

Las cepas que presentaron mayor actividad de acuerdo con el tamaño de sus halos fueron: 10 p, *Enterococcus sulfureus* (A36202), *Streptococcus sp.* (Amil47), *Weissella confusa* (lilis9) y *S. infantarius* (25124), en orden creciente. Se observó que la mayoría de estas cepas presentaron diámetros de halos mayores a los de la cepa de control positivo; sin embargo, es necesario aclarar que la cepa control no se manejó bajo sus condiciones óptimas de crecimiento. Algunas imágenes de las placas reveladas con lugol se observan en la Figura 7.

Tabla 9. Diámetro promedio en cm. de los halos de actividad xilanolítica observados en MRS-X

Cepa	Identificación	Diámetro (cm) después de 3 días de incubación	Diámetro (cm) después de 7 días de incubación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	lilis3	0.4 ± 0.17	0.43 ± 0.08
<i>Weissella confusa</i>	lilis 9 (Weissella confusa)	2.26 ± 0.43	2.30 ± 0.14
<i>Lactococcus lactis</i>	lilis36	0.7 ± 0.26	1.22 ± 0.14
<i>Lactobacillus pentosus</i>	lilis 39	0.3 ± 0.14	0.325 ± 0.14
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lilis 44	0.45 ± 0.07	0.50 ± 0.06
<i>Leuconostoc argenteum</i>	Tap 50	0	0
<i>Streptococcus sp.</i>	Amil47	1.43 ± 0.21	2.23 ± 0.06
<i>Streptococcus infantarius</i>	25124	2.66 ± 0.21	4.37 ± 0.15
<i>Enterococcus sulfureus</i>	A36202	1.53 ± 0.55	2.23 ± 0.74
No identificado	6a	0.9 ± 0.14	0.87 ± 0.32
No identificado	6b	0.55 ± 0.07	1.13 ± 0.55
No identificado	10p	1.35 ± 0.07	2.17 ± 0.15
Control positivo	<i>Cellulomonas flavigena</i>	1.2 ± 0.28	2.2 ± 0.28

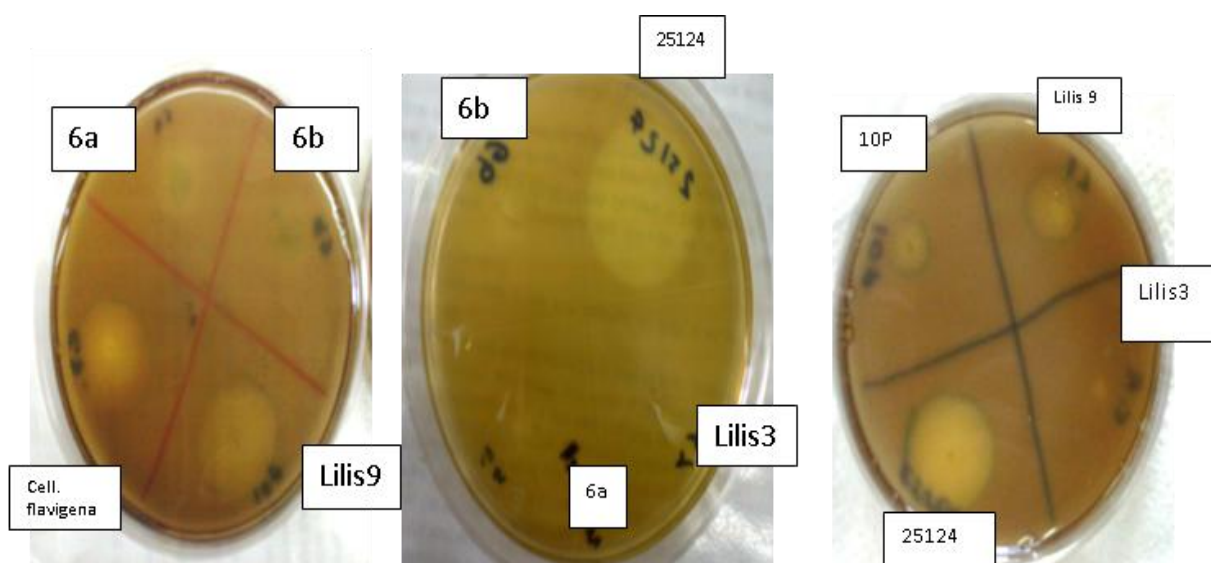


Figura 7. Halos de actividad xilanolítica de LAB del pozol.

5.1.4 Evaluación del medio definido

Para corroborar el crecimiento a partir de un sustrato particular, es necesario disminuir al mínimo otros componentes que pudieran funcionar como fuentes de carbono, para lo cual se prefiere el uso de medios definidos preparados a partir de compuestos simples o lo más puro posible. En el caso de las bacterias lácticas los medios definidos son complejos, ya que es necesario incluir por separado cada base, vitamina o compuestos que requieren. El medio HSH (Owens y Keddie, 1969) se diseñó con esta idea y se ha reportado su uso para el caso de varias bacterias lácticas (Zaunmüller et al., 2006, Westby et al., 1993, Nuraida et al., 1992).

Se evaluó la capacidad para crecer en dicho medio definido de tres cepas detectadas con mayor actividad xilanolítica y la cepa control utilizando 3 diferentes fuentes de carbono y como control medio sin fuente de carbono, se consideró la presencia de turbidez y/o precipitado como evidencia del crecimiento obteniendo los resultados recopilados en la Tabla 10:

Tabla 10. Crecimiento de diferentes cepas de la colección en medio HSH

Fuente de carbono	Almidón	Glucosa	Xilano	Sin fuente de carbono
Cepa				
<i>Cellulomonas flavigena</i>	+	++	+	-
<i>Weissella confusa</i> (L9)	-	++	+	-
<i>Streptococcus infantarius</i> (25124)	++	++	+	-
10 p	-	++	+	-

Crecimiento: Abundante (++), normal (+), ausente (-).

Se observó crecimiento de los diferentes microorganismos en el medio con glucosa, los reportados como no amilolíticos, *Weissella confusa* (L9) y cepa 10 p, no crecieron en el medio con almidón y en todos los casos se observó crecimiento en el medio de cultivo con xilano, lo que corrobora lo anteriormente encontrado sobre que tenían actividad xilanolítica, además de que para las cuatro cepas no hubo crecimiento ante la falta de fuente de carbono por lo que se eligió el medio HSH para ser utilizado en el resto de los experimentos.

5.1.5 Crecimiento de *S. infantarius* 25124 en medio líquido HSH

Se seleccionó a una de las cepas con mejores resultados en las evaluaciones previas para demostrar que el crecimiento observado era debido a la fuente de carbono agregada y no a otros componentes del medio de cultivo, por lo que se realizaron las cinéticas de crecimiento de *S. infantarius* 25124 paralelamente en HSH-glucosa, HSH- xilano y en HSH sin fuente de carbono, los resultados comparativos se encuentran graficados en la Figura 10.

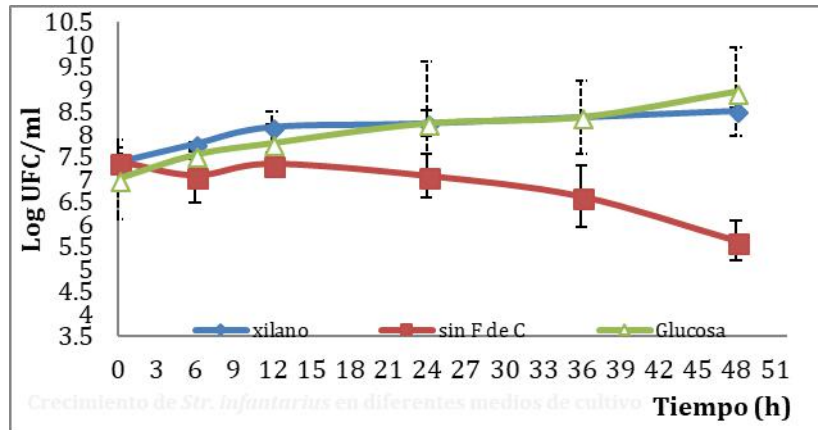


Figura 10. Cinética de crecimiento de *S. infantarius* en diferentes medios de cultivo: HSH glucosa, HSH xilano y HSH sin fuente de carbono **incubados a 30°C** sin agitación (promedio de tres determinaciones).

El mismo microorganismo en el mismo medio de cultivo, pero sin fuente de carbono mantuvo su población constante hasta 12 h y luego comenzó la fase de muerte celular, a diferencia del comportamiento con glucosa o xilano en los que la población se fue incrementando conforme transcurrió el tiempo de incubación, con lo que se demuestra que es el xilano y no otros componentes del medio de cultivo el que provoca el incremento en la biomasa.

5.1.6 Discusión de Etapa experimental 1

Todas las cepas utilizadas de la colección de bacterias aisladas del pozol presentan las características propias de las bacterias lácticas, son Gram positivas, de morfología cocoide o bacilar, catalasas negativas; su selección se basó en diversos estudios (Ampe et al. 1999, Escalante et al., 2001) donde se expone la prevalencia de las mismas durante la fermentación y en muestras de diferentes productores. Debido a la variación en el contenido de las BAL amilolíticas cuya población disminuye importantemente hacia el final de la fermentación (Díaz et al., 2003), mientras la cuenta de bacterias lácticas totales se mantiene alrededor de 10^8 UFC/mL, se propuso que existen otras fuentes de carbono además del almidón que soportan tan alta población.

Siendo la hemicelulosa y la celulosa los sustratos en mayor concentración después del almidón (Watson, 1987; Englyst y Hudson, 1996; Hespell, 1998; Corsetti y Settanni, 2007), dichos sustratos serían los candidatos como fuentes de carbono alternativas, de ahí la importancia de determinar si las cepas que predominan durante la fermentación de pozol poseen las herramientas enzimáticas necesarias para su degradación y obtención de energía. Una vez estandarizadas las técnicas para el tamizaje basado en actividad celulolítica y xilanolítica, se detectó que la mayoría de las cepas de la colección ensayadas presentaron una o ambas actividades enzimáticas en algún grado.

Respecto a la actividad xilanolítica, se observó actividad medible desde 3 días de incubación en el medio, siempre y cuando se realizara una preincubación en el mismo medio para inducir la actividad enzimática, todas las cepas excepto Tap50 (*Leuconostoc argentum*) presentaron actividad; las dos cepas con mayor tamaño de halo fueron *Weissella confusa* L9 y *S. infantarius* 25124, siendo el último, un microorganismo detectado durante toda la fermentación e incluso con mayor actividad aparente respecto al control positivo (que recibió mismas condiciones que BAL, no las ideales para su género).

En el caso de la actividad celulolítica, no se han encontrado reportes que indiquen este tipo de actividad enzimática para BAL aunque se han descrito secuencias putativas de celulasas en algunos genomas de *Lactococcus* y *Streptococcus* (UniProtKB). Los halos debidos a esta actividad fueron de mucho menor tamaño respecto al control, además de que se requirió al menos de 6 días para poder tener halos observables. Las cepas con mejor comportamiento ante la celulosa fueron 10p (no identificado) y lilis 36 (*Lactococcus lactis*), este comportamiento pudiera deberse a la dificultad para hidrolizar el sustrato. Se seleccionó el medio definido HSH para continuar con la experimentación ya que permite flexibilidad en cuanto a la selección de fuente de carbono.

5.2 Crecimiento en medio líquido

Objetivo

- Realizar la cinética de crecimiento en medio definido con xilano o celulosa de las cepas que presentaron mejor actividad en el tamizaje para elucidar su comportamiento durante la fermentación del pozol y compararlas.

5.2.1 Crecimiento en medio líquido con celulosa

Se utilizó medio definido HSH con 2-Hidroxietilcelulosa al 1% (p/v) y los microorganismos que presentaron un mayor tamaño de halo en la evaluación de actividad de las cepas de la colección: **Lilis36** (*Lactococcus lactis*) y **10 p** (identificación pendiente). Se determinó por pruebas preliminares que la cinética de fermentación en este medio de cultivo se tenía que seguir al menos 72 h, los resultados de cada microorganismo se presentan por separado.

5.2.1.1 Cinética de crecimiento y análisis de carbohidratos de *Lactococcus lactis* Lilis 36 en HSH-C

De acuerdo con la cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* Lilis 36 en medio con celulosa graficado en la Figura 10, no se encontró diferencia significativa en la población del

microorganismo a lo largo de 72 h de fermentación, por lo que el cultivo se mantiene estático, si bien no muere, tampoco se incrementa.

Los azúcares reductores de la misma fermentación (Figura 9) se encontraron en valores iniciales de concentración entre en un rango amplio (0.02 y 0.08 mg/mL) y durante el tiempo del experimento no se observaron diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores ni en el crecimiento del microorganismo.

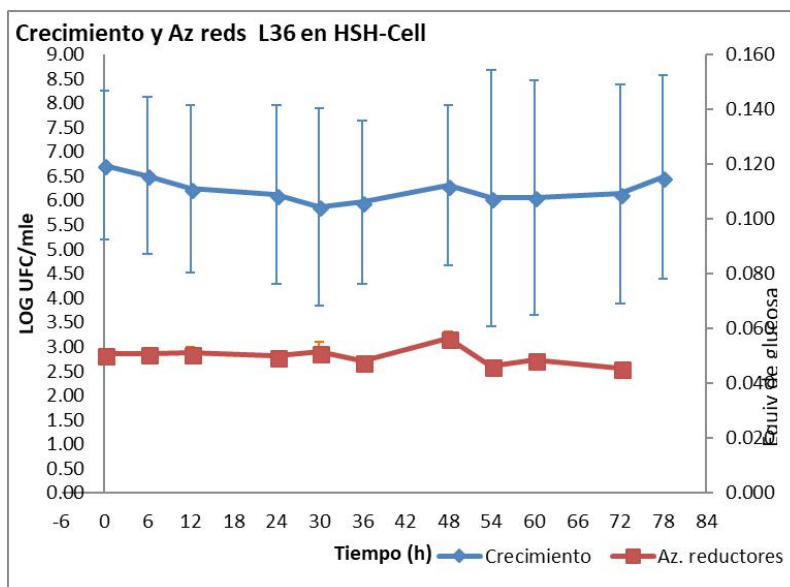


Figura 9. Cinética de crecimiento y concentración de azúcares reductores durante el desarrollo de *Lactococcus lactis* L36 en el medio definido HSH-C con 1% de Hidroxietilcelulosa como fuente de carbono, a 30°C.

5.2.1.2 Análisis de azúcares y ácidos por HPLC

Con el objeto de contar con un indicio sobre el posible consumo de celulosa (Hidroxietilcelulosa, HEcelulosa), se estudiaron mediante HPLC los azúcares y ácidos en los sobrenadantes del medio definido HSH-C con hidroxietilcelulosa como única fuente de carbón. En todos los cromatogramas obtenidos de los sobrenadantes durante la fermentación de *Lactococcus lactis* L36 en HSH-C se detectaron los mismos compuestos: HEcelulosa, glucosa y un pico mínimo cuyo tiempo de retención coincide con el de lactato, durante el tiempo de incubación (Figura 10).

Se observaron cambios mínimos de concentración de glucosa, en el orden de las milésimas de gramo, y se mantuvo en concentraciones cercanas a 6.5 µg/mL. También se detectó la presencia de ácido láctico desde el inicio en concentraciones alrededor de 0.012mg/mL y hubo incremento entre 30 y 48 h de fermentación (0.034 mg/mL máximo) que correspondió con un incremento en el promedio de la cuenta de microorganismos (UFC/mL) y de azúcares reductores; después de

este tiempo la población microbiana se mantuvo en estado estacionario y no se detectó lactato en muestras de tiempos posteriores.

Junto con los resultados de crecimiento se deduce que el microorganismo no fue capaz de usar la celulosa como fuente de carbono. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 11.

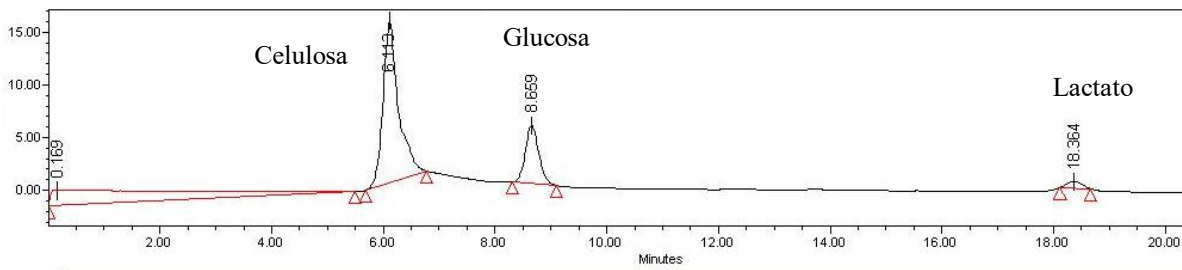


Figura 10. Cromatograma de muestra del sobrenadante del cultivo de *Lactococcus lactis* Lilis 36 a las 30 h después de iniciar la fermentación el medio definido HSH-C con 1% de Hidroxietilcelulosa como fuente de carbono, a 30°C.

5.2.1.3 Cinética de Crecimiento y análisis de carbohidratos de la cepa 10P en HSH-C

También se evaluó el crecimiento de la cepa 10p (bacteria láctica no identificada, tabla 7,p45) en HSH-HE celulosa, ésta presentó un comportamiento semejante al de *Lactococcus lactis* (L36); ya que no se observaron cambios significativos en el crecimiento ni en la concentración de azúcares reductores (Figura 11)..

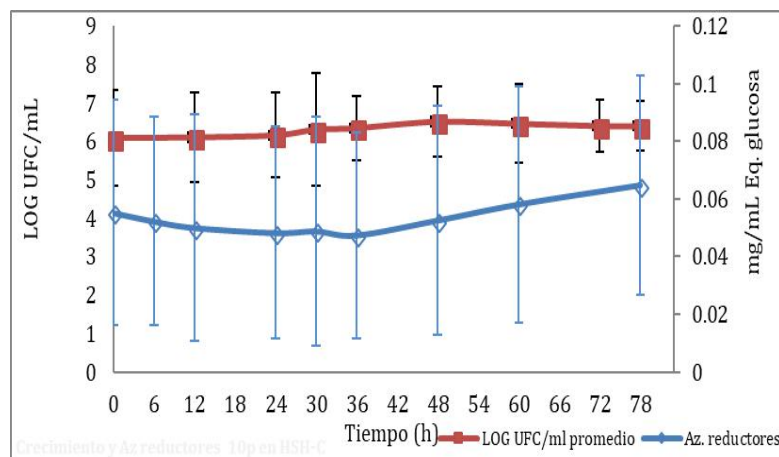


Figura11. Cinética de crecimiento de la cepa 10p y concentración de azúcares reductores en el medio HSH-C, 30°C, sin agitación.

5.2.1.4 Análisis de azúcares y ácidos por HPLC

Los cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC de los sobrenadantes de la cinética de crecimiento de la cepa 10 p en HSH-C fueron similares a los observados en la Figura 9. La

glucosa se mantuvo constante durante toda la fermentación, en concentraciones alrededor de 6.5 µg/mL. El lactato se empezó a detectar a partir de 12 h de fermentación, alcanzando una concentración máxima de 0.016 mg/mL a las 24h. la concentración del ácido láctico producido fue mínima, lo que coincide con el crecimiento observado.

5.2.1.5 Discusión sobre el uso de celulosa por las cepas de bacterias lácticas aisladas del pozol.

Para las pruebas en medio definido con celulosa como fuente de carbono, se seleccionaron dos cepas que presentaron la mayor actividad enzimática de acuerdo con ensayo realizado en la sección 5.1.2; Aunque los resultados no fueron muy favorables se decidió realizar el análisis completo de las muestras para verificar la poca actividad presentada y que no fuera debida a causas aleatorias. Para ambos microorganismos, *Lactococcus lactis* Lilis36 y la cepa 10P, se observó poca variación en cantidad de microorganismos y azúcares reductores durante toda la fermentación; sin embargo, las mismas cepas presentaron crecimiento en HSH-glucosa.

El pH fue determinado en el sobrenadante del medio fermentado, pero no se observó ninguna variación a lo largo del tiempo ya que el pH del medio está equilibrado con un buffer.

En ningún caso se observó desarrollo significativo de los microorganismos en el medio HSH con celulosa, pero éstas si crecieron en el mismo medio con glucosa, por lo que se concluye que, es posible que las BAL aisladas del pozol analizadas no son capaces de usar la celulosa.

Sería necesario realizar estudios más detallados con un mayor número de cepas para determinar el papel de la celulosa durante la fermentación del pozol.

5.2.2 Crecimiento en medio líquido con xilano

Se siguió la cinética de crecimiento de los microorganismos con mayor tamaño de halo en las cajas con el medio HSH-X (Tabla 9) seleccionando uno amilolítico (*S. infantarius* 25124) y otro no amilolítico (*W. confusa* Lilis9). Se seleccionó el xilano de abedul para esta etapa experimental debido a que es un sustrato comúnmente utilizado para la detección de actividad xilanolítica, su composición sencilla y libre de ramificaciones facilita además su degradación y accesibilidad a las enzimas (Bailey et al., 1992, Biely, 1993, Sheehan, 2010, Chen et.al, 2013). Los resultados se presentan por separado para cada microorganismo.

5. 2.2.1 Crecimiento de *Weissella confusa* Lilis 9 en HSH-X

En la Figura 12 se observa la cinética de crecimiento y la concentración de azúcares reductores de la fermentación de *Weissella confusa* Lilis 9 en HSH-X, el cultivo a pesar de haber sido

preincubado en xilano, permaneció en fase Lag las primeras horas después de haber sido inoculado en medio fresco. Se observa que la fase exponencial de crecimiento inicia a partir de las 4.5 h, incrementando su población en un ciclo logarítmico en 6h y en 2 ciclos después de 24h; a partir de los datos se calculó la velocidad específica de crecimiento siendo ésta $\mu = 0.6508 \text{ h}^{-1}$.

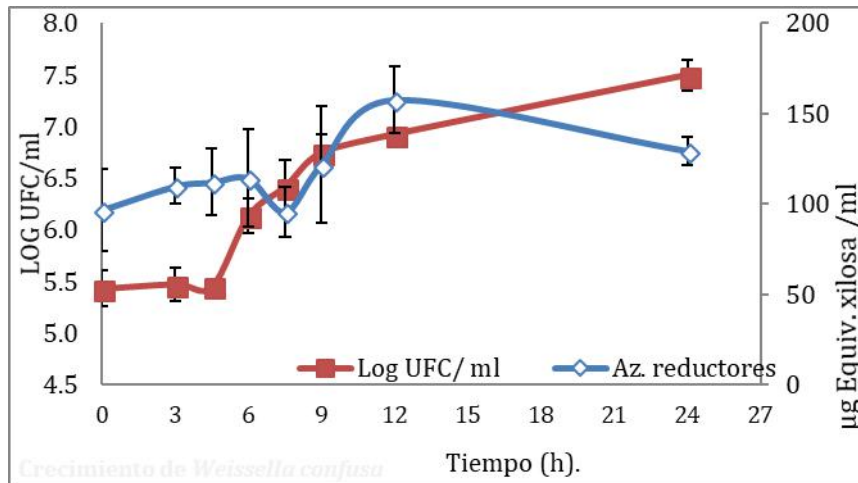


Figura 12. Cinética de crecimiento y concentración de azúcares reductores de *Weissella confusa* Lilis 9 en medio HSH con xilano de abedul. 30°C, sin agitación

En los azúcares reductores se observó un aumento en la concentración de 96.4 a 114.20 µg/ mL durante las primeras 6 h, luego una ligera disminución y un incremento importante entre las 9 y 12h de 94.6 a 157.6 µg/ mL cuando se ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento.

Estos parámetros indican que *Weissella* tiene la capacidad de desarrollarse con xilano como sustrato para el crecimiento, y además libera azúcares como resultado de la actividad enzimática. El pH se mantuvo constante durante el tiempo de la fermentación debido a que el medio mínimo utilizado contiene buffer de fosfatos.

5.2.2.2. Crecimiento de *Streptococcus infantarius* 25124 en HSH-X

S. infantarius 25124 inició su fase de crecimiento exponencial después de ser inoculado, y se estabilizó el crecimiento al alcanzar la fase estacionaria alrededor de las 12 h, a partir de estos datos se calculó su velocidad de crecimiento que fue $\mu=0.1606 \text{ h}^{-1}$, su población aumentó en una unidad logarítmica durante las primeras 12 h (Figura 13).

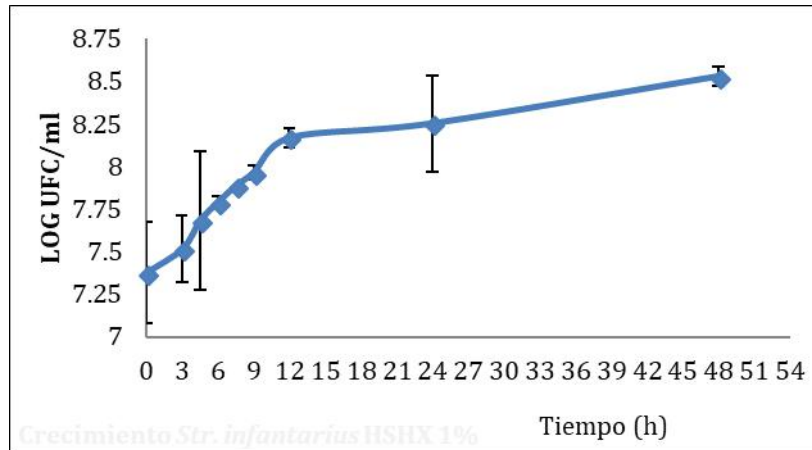


Figura 13. Cinética de crecimiento de *S. infantarius* 25124 en el medio HSH-X. 30°C, sin agitación.

Los azúcares reductores expresados como equivalentes de xilosa disminuyeron a partir de las 3 h de incubación desde concentraciones alrededor de 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 61.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, una disminución de 33.4%; después de las 12 h se observaron variaciones mínimas en su concentración (Figura 14).

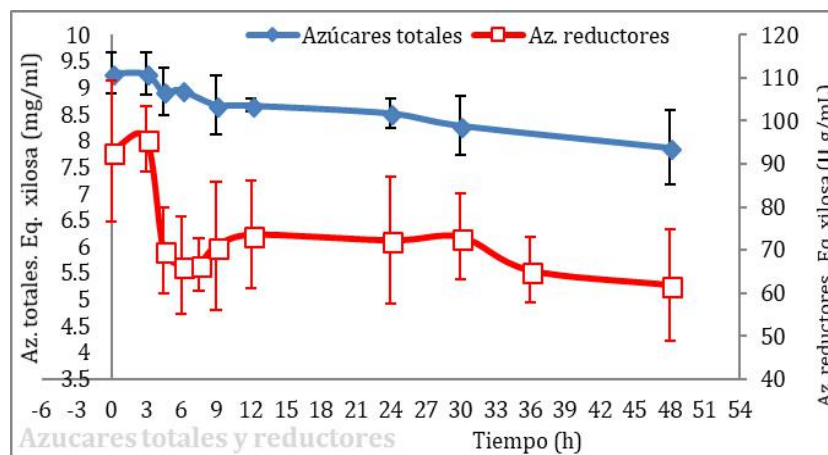


Figura 14. Concentración de azúcares totales y reductores a lo largo de la fermentación de *S. infantarius* 25124 en el medio HSHS-X.

La concentración de azúcares totales disminuyó rápidamente entre las 4.5 y 6 h y luego hubo una disminución continua el resto de la fermentación, variando desde 9.28 ± 0.39 hasta 7.87 ± 1.08 mg/mL; lo cual representa un consumo de 15.21% de azúcares totales a lo largo de 48 h (Figura 14).

El consumo de carbohidratos parece estar asociado al crecimiento, a partir de 3h de fermentación comenzó la fase exponencial y hubo una disminución en la concentración de azúcares reductores, aunque éstos se mantuvieron constantes en las muestras tomadas después de 9 h. Los azúcares totales continuaron disminuyendo a medida que aumentó la población.

5.2.2.3 Discusión de la fermentación en medio con xilano de abedul

Se obtuvieron resultados favorables en las fermentaciones de xilano con las dos cepas utilizadas, las cuales presentaron valores altos en la evaluación de actividad enzimática respecto del control. En la Figura 15 se expresan los datos de crecimiento de los 2 microorganismos; aunque *Weissella confusa* Lilis 9 tardó más en adaptarse, creció más rápidamente, su velocidad de crecimiento se calculó en $\mu = 0.6508 \text{ h}^{-1}$, aproximadamente 5 veces más rápido que el de *Str inf.* 25124 ($\mu=0.1606 \text{ h}^{-1}$) además de que su población se incrementó en 2 unidades logarítmicas, en tanto que *S. infantarius* 25124 no presentó periodo de adaptación, creció con menor rapidez, pero después de 24 h siguió incrementándose su población.

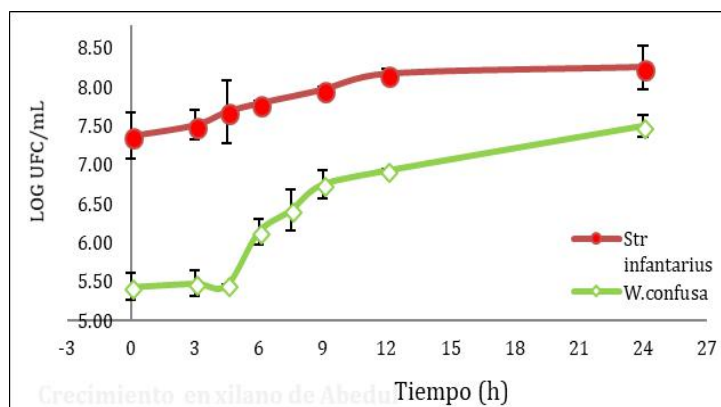


Figura 15 . Cinéticas de crecimiento de *W. confusa* L9 y *S. infantarius* 25124 en el medio HSH-X

Los azúcares reductores en las fermentaciones de *S. infantarius* 25124 disminuyeron gradualmente a partir de 3 h de fermentación (Figura 14) alcanzando valores mínimos cercanos a $60 \mu\text{g/mL}$ al igual que los azúcares totales presentaron una disminución constante a partir de 3 h de fermentación, mientras que en el cultivo de *Weissella confusa*, hubo un incremento a partir de las 12 h indicando la posible liberación de xilosa u oligosacáridos (Figura 12).

Ambos cultivos ensayados presentaron actividad enzimática de xilanasa ya que crecieron utilizando xilano de abedul como única fuente de carbono. En el cultivo de *Weissella confusa* Lilis 9 se observó la liberación de azúcares reductores y su acumulación, mientras que en el de *S. infantarius* 25124 no se acumularon, posiblemente debido a su consumo inmediato.

Con estos experimentos se logró conocer un poco mejor a dos cepas frecuentemente halladas en el pozol. A partir de este punto se decidió continuar trabajando únicamente con *S. infantarius* 25124 que es una cepa detectada con mucha frecuencia en muestras de pozol.

5.3 Extracción y caracterización de arabinoxilano de maíz

Objetivo:

- Obtener arabinoxilano de nejayote con características similares a las del maíz
- Verificar su pureza mediante IR

5.3.1 Extracción de AX del nejayote

Se obtuvo como producto de la extracción, un polímero pegajoso color café que una vez seco era poco flexible y quebradizo. Los rendimientos de recuperación fueron de 0.18 ± 0.23 % (W/V) mucho menores que los reportados para la técnica (Carvajal et al., 2007), dicha variación fue dada posiblemente por la variabilidad y poca homogeneidad entre lotes de nejayote. Algunos detalles de la extracción se observan en la Figura 16.



Figura 16. Separación de sedimentos del nejayote, formación del gel, xilano filtrado, xilano seco.

5.3.2. Caracterización del AX aislado del nejayote por FT-IR

En la Figura 17 se muestra el espectro de FT-IR (Infrarojo por transformada de Fourier) por reflectancia ATR del arabinoxilano de maíz extraído del nejayote, en la que se observan dos señales importantes, una alrededor de 3300 que corresponde a la señal emitida por los radicales hidroxilos, componentes de los azúcares, y otra en 1020 que corresponde al enlace C-O encontrado frecuentemente en las hemicelulosas.

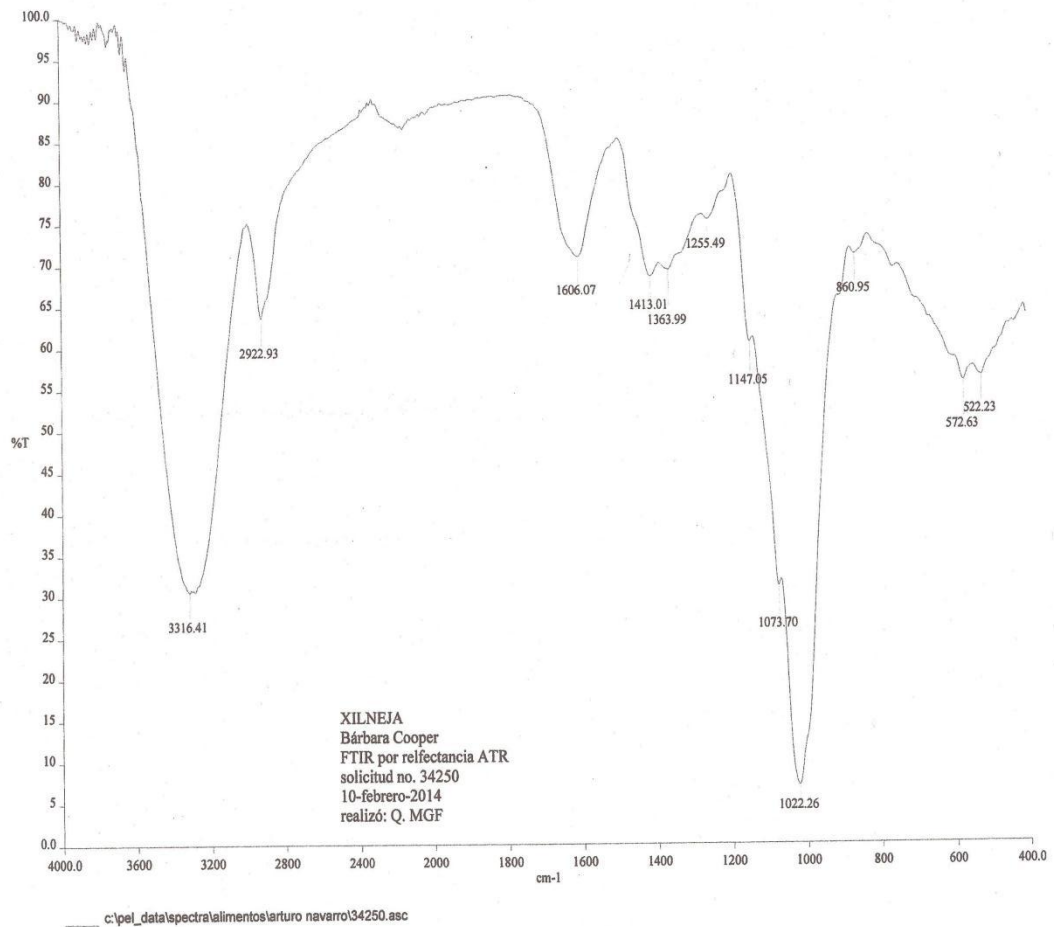


Figura 17. Espectro FT-IR del arabinosilano de maíz extraído de nejayote.

En la Tabla 11 se resume la interpretación de las señales obtenidas en el espectro.

La señal principal en 1022 cm^{-1} es distintiva de las hemicelulosas y es debida al doblamiento del enlace C-OH. La siguiente banda de importancia en el espectro es la localizada en 3316 cm^{-1} que es debida al estiramiento del enlace C-OH de los alcoholes y muy asociada a los grupos glucosídicos, las bandas alrededor de 860, 1022, 1073, 1147, 1361, 1606 son frecuentemente visibles en arabinosilanos.

No se observa la banda que caracteriza al agua absorbida por el polímero en $1635\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$ (Kacurakova et al., 1994) y aparentemente, la muestra no está contaminada con proteínas ni con lignina que darían varias señales distintivas en la región $1700\text{-}1500$ y proteínas: 1654 y 1539 cm^{-1} (Kacurakova et al., 1999); la señal presente en 1606 podría ser atribuida al ácido ferúlico ya que, además se observa una señal en 1413 que podría ser asociada a enlaces tipo C=C aromático.

Tabla 11. Interpretación de las señales del espectro FT-IR del xilano de maíz extraído de nejayote.

Señal (cm ⁻¹)	Interpretación	Referencia
3316.41	Estiramiento de OH característico de grupos glucosídicos, asociado a grupos polares unidos mediante puentes de hidrógeno intra e intermoleculares.	Eleamen et al., 2010 //Sun et al., 1998//Silverstein et al., 1981 //Sun et al., 2005
2922.93	C-H de alquilo (sp ³), estiramiento de CH relacionado con grupos CH ₂ -CH ₃ .	Silverstein et al., 1981/// Egüés et al., 2014//Eleamen et al., 2010
1606.07	Asociado a hemicelulosas, puede estar relacionado con agua absorbida, grupo carboxilato o anillo del ácido ferúlico	Sun et al., 1998//Sun et al., 2005//Coates, 2000// Kacuracova et al., 1999
1413	Plegamiento CH ₂ , asociado a carboxilato(sal de ácido), CH de alcano o C=C aromático	Sun et al., 1998//Coates, 2000//Silverstein et al., 1981
1363	Plegamiento de CH ₂ y OH en celulosa, hemicelulosa, OH terciario o fenol.	Sun, et al., 1998// Kacuracova, 1994// Coates, 2000
1255	Plegamiento de C-H, estiramiento ϕ -OH Aril-O de éteres aromáticos.	Sun et al., 1998//Coates, 2000
1147	Estiramiento de C-O, C-O-C y plegamiento de C-OH en arabinosilanos-hemicelulosas	Eleamen, et al., 2010 //Sun et al., 1998//Coates, 2000// Silverstein et al., 1981// Egüés et al., 2014
1073	Estiramiento C-O-C de éteres o enlaces glucosídicos; Asociado a hemicelulosas	Sun et al., 2005//Coates, 2000// Silverstein et al., 1981 //Kacuracova, 1994
1022	Plegamiento de C-OH en hemicelulosas.	Eleamen et al., 2010 // Sun, et al., 1998//Kacuracova et al., 1999, Kacuracova, 1994.
860	Enlaces β glucosídicos en hemicelulosas// anillo furanoide (arabinofuranosa)	Sun et al., 2005// Egüés et al., 2014// Kacuracova et al., 1999.
572	CCO vibración	Kacuracova et al., 1999
522	CCO vibración	Kacuracova et al., 1999

También se realizó la determinación de azúcares reductores en esta muestra de polímero liofilizado, obteniendo un valor de 7.71 $\mu\text{mg}/\text{mg}$ xilano, por lo que se calcula que los extremos reductores presentes o azúcares libres coextraídos equivalen a menos del 1% de la muestra y nos da una idea de la integridad del polímero.

5.3.3 Discusión de caracterización de arabinoxilano de maíz

La extracción de arabinoxilano de maíz extraído del nejayote no resultó ser un proceso muy eficiente debido a los bajos rendimientos; el producto obtenido es arabinoxilano, sin proteínas u otros azúcares co-extraídos.

El espectro de IR obtenido corresponde con lo esperado para un polisacárido de las características del arabinoxilano (hemicelulosa), además es similar a los espectros de otros xilanos obtenidos de maíz como el presentado por Eleamen et al. (2010) de olote en polvo (Figura 18) en la que se observan los mismos patrones de señales con algunas pocas diferencias debidas al origen de la hemicelulosa y por tanto su composición. No se observó la presencia de señales que indiquen posibles contaminantes de la muestra.

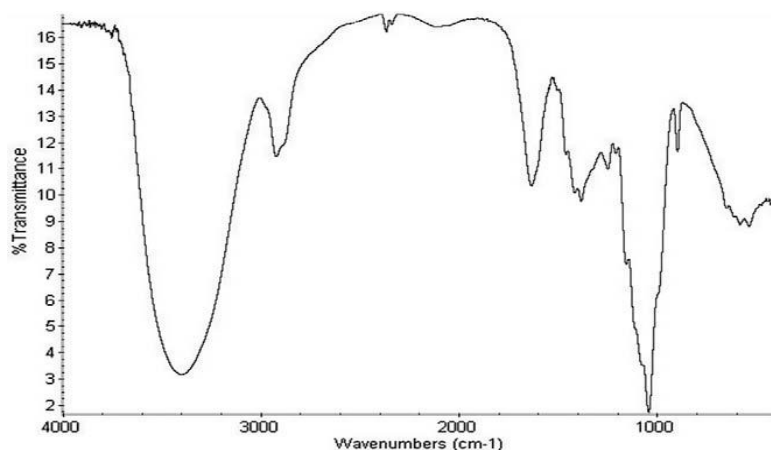


Figura 18 Espectro FT-IR del arabinoxilano de olote (Eleamen, 2010).

5.4 Evaluación del crecimiento en medio líquido con arabinoxilano de maíz

Objetivo:

Realizar la cinética de crecimiento, cuantificar los metabolitos producidos y medir la actividad enzimática de *S. infantarius* 25124 en medio definido con arabinoxilano de maíz extraído de nejayote para emular al arabinoxilano en la masa de nixtamal, comparando además su comportamiento con xilano de abedul.

5.4.1.1. Crecimiento en arabinosilano de maíz al 1%

Se siguió el mismo procedimiento de preparación del medio de cultivo HSH que con el xilano de abedul, utilizando arabinosilano extraído de nejayote al 1% p/v, el caldo tenía un aspecto turbio blancuzco.

Se observó un incremento importante en la población desde la inoculación, no hubo fase lag, el cultivo entró directamente a la fase Log de crecimiento que duró hasta las 12h, cuando empezó la fase estacionaria que duró 12 h más, hasta las 24 h cuando empezó la fase de muerte celular. Con este sustrato la población incrementó 3 unidades logarítmicas en sólo 7.5 h alcanzando el máximo a las 12 h (Figura 19). La velocidad de crecimiento se calculó en $\mu=0.651 \text{ hr}^{-1}$; 4 veces mayor que en xilano de abedul.

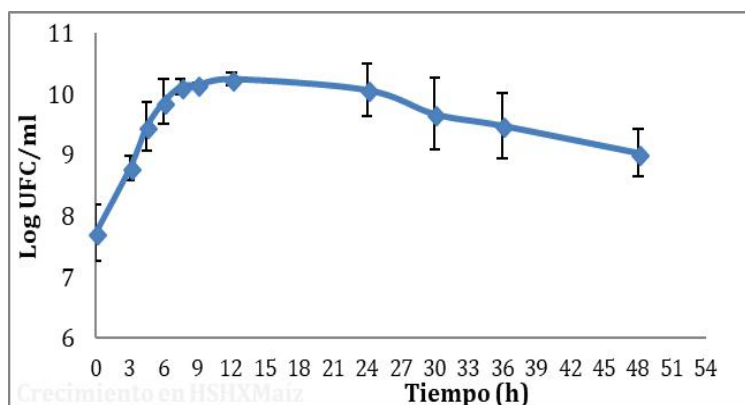


Figura 19. Cinética de crecimiento de *S. infantarius* 25124 en medio HSH con arabinosilano de maíz al 1%. 30°C.

El comportamiento de los azúcares reductores (Figura 20) fue muy distinto respecto al de xilano de abedul, durante la fermentación de arabinosilano se generaron más azúcares reductores que los presentes inicialmente lo que indica que hubo hidrólisis del mismo a diferencia del xilano de abedul en que sólo se consumieron los azúcares presentes. La concentración se incrementó desde 123.3 hasta 440.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 4.5 h, un incremento que equivale a 3.6 veces su concentración inicial, la concentración luego disminuyó constantemente hasta las 12 h en que se alcanzaron valores muy bajos (58.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en promedio), esta disminución representa una disminución de 86.84% de la concentración máxima.

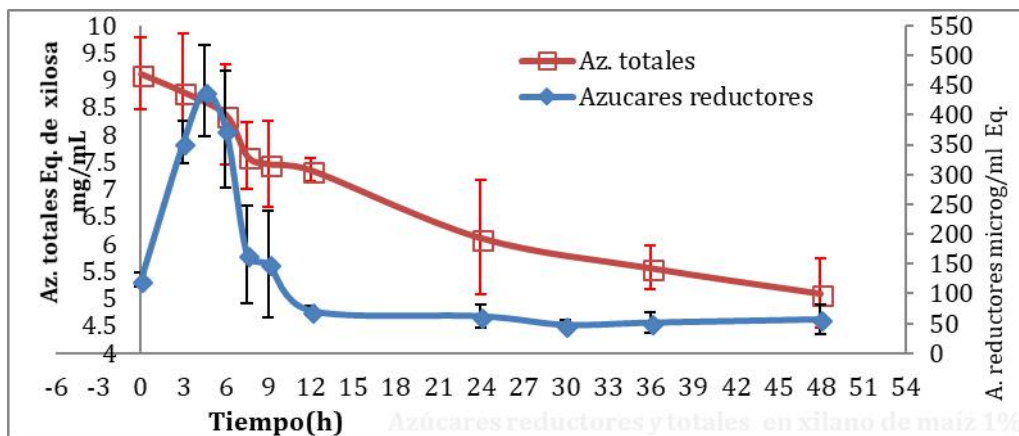


Figura 20. Concentración de azúcares totales y reductores durante el crecimiento de *S. infantarius* 25124 en HSH- Arabinoglucano de maíz(1%).

Los azúcares totales disminuyeron de manera constante desde 9.11 ± 0.66 a 5.1 ± 0.62 mg/mL de azúcares equivalentes de xilosa (44.04% de consumo) en 48 h, siendo el descenso más abrupto durante las primeras 9 h.

5.4.1.2. Crecimiento en arabinoglucano de maíz al 2%

Se realizaron fermentaciones en arabinoglucano de maíz al 2 % de concentración, este medio presentó dificultades para su preparación y para el tratamiento de las muestras fermentadas por su alta viscosidad. El comportamiento en este medio fue muy similar al encontrado utilizando xilano de maíz al 1 %, la fase exponencial de crecimiento se observó desde las 3 hasta las 9 h y se calculó la velocidad de crecimiento en $\mu=0.8794 \text{ h}^{-1}$; mayor que en 1% de concentración y 5.5 veces más que en xilano de abedul. La fase estacionaria como se observa en la Figura 21, se mantuvo desde las 9 hasta las 24 h y la población se incrementó en 3 unidades logarítmicas también en 7.5 h alcanzando el valor máximo a las 9 h.

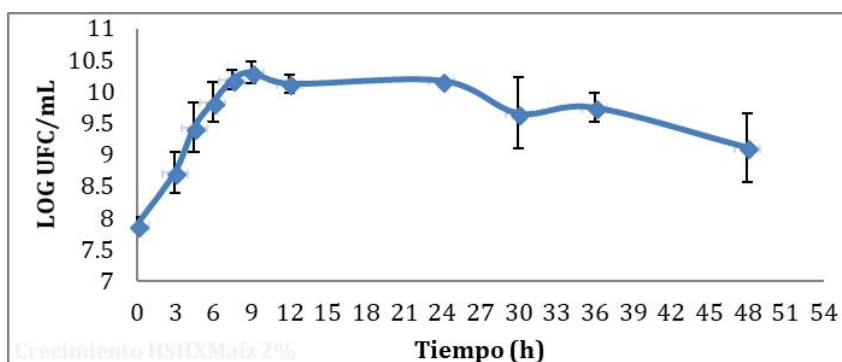


Figura 21. Cinética de crecimiento de *S. infantarius* 25124 en medio HSH con arabinoglucano de maíz al 2%, 30°C. Los azúcares reductores se comportaron igual que en el caso del xilano de maíz al 1%, hubo un incremento en la concentración de los mismos las primeras 4.5 h desde 171.27 hasta 448 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22), aumentando 2.6 veces su concentración y posterior reducción constante hasta las 24

h en que se alcanzan valores mínimos (95.4 µg/mL en promedio), esta disminución representa una disminución de 78.69% respecto de la concentración máxima.

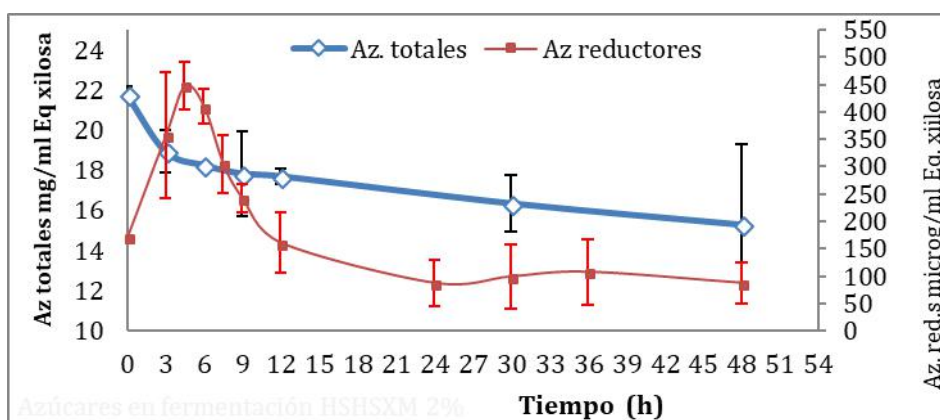


Figura 22. Concentración de azúcares reductores y totales durante el crecimiento de *S. infantarius* 25124 en el medio HSH Arabinoxilano de maíz 2%. 30°C.

Los azúcares totales presentaron la tendencia a disminuir y se detectó el consumo de 6.4 mg/mL en 48 h, que, aunque en apariencia es un consumo bajo, representa una disminución de 29.72 %, es posible que se dificultara su disponibilidad por la alta viscosidad del medio.

5.4.1.3 Discusión y comparación del crecimiento de *S. infantarius* 25124 entre medios de cultivo con xilano de abedul y arabinoxilano de maíz

Se encontró que el arabinoxilano de maíz es un sustrato adecuado para el crecimiento de *S. infantarius* 25124 , el crecimiento parece estar asociado con el rápido consumo de azúcares durante las primeras 12 h (Figuras 20 y 21); durante las fases estacionaria y de muerte celular, el consumo de azúcares continuó aunque con menor velocidad, ya que la población seguía siendo alta (alrededor de 9 Log UFC/mL).

También se encontró relación con los azúcares reductores, ya que cuando éstos decrecen a valores mínimos después de 12 h de fermentación, el cultivo comienza su decaimiento, es posible que la incapacidad de generar más azúcares libres sea la limitante para el mantenimiento del cultivo.

Las fermentaciones en arabinoxilano de nejayote al 2% tuvieron un comportamiento similar y se observa una mejor proporcionalidad entre el crecimiento y concentración de azúcares reductores, una vez que éstos alcanzaron el valor mínimo a las 24 h, la población empieza a disminuir como se observa en las Figuras 21 y 22.

Existe una diferencia muy clara respecto al comportamiento de *S. infantarius* 25124 en xilano de abedul y arabinoxilano de maíz (Figura 23), en el segundo ya fuera al 1 o 2% presentó un

crecimiento muy rápido ($\mu = 0.651$ y 0.8794 h^{-1} respectivamente) la población se incrementó en 3 unidades logarítmicas en 12 h de incubación, una velocidad de crecimiento de casi 5 veces más grande que en xilano de abedul ($\mu = 0.1606 \text{ h}^{-1}$).

No se esperaba una diferencia tan importante entre los dos sustratos, ya que, teóricamente el xilano de abedul es más fácilmente degradable por la sencillez de su estructura y composición, aunque cabe recordar que este microorganismo fue aislado de pozol y es muy probable que contenga todas las enzimas necesarias para la degradación completa del xilano de maíz aunque éste tenga una estructura más compleja, contiene otros azúcares que pueden ser asimilados para el crecimiento.

El tratamiento de nixtamalización puede ser determinante para hacer más disponible al xilano del maíz para su hidrólisis y fermentación ya que es necesario un pretratamiento de las capas externas del maíz para posibilitar su bio-procesamiento para la producción de biocombustibles, prebióticos u otros productos biológicos (Alonso et al., 2001) ya sea por tratamiento enzimático con celulasas y hemicelulasas o hidrólisis química o física. Con el tratamiento térmico alcalino de la nixtamalización se provoca una discontinuidad en la estructura de la lignina y su unión con los carbohidratos, removiendo acetilos y ácidos, facilitando el acceso de las enzimas. (Agbor et al., 2011)

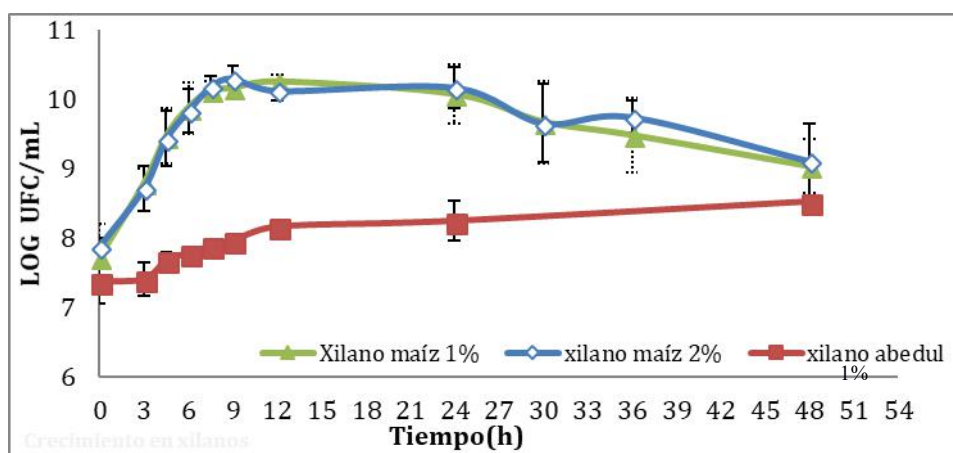


Figura 23. Cinética de crecimiento comparativa de *Str. infantarius* 25124 en el medio HSH con diferentes xilanos.

Otra diferencia la encontramos en que mientras que en el arabinoxilano de maíz después de 24 h comienza a decaer la población, en xilano de abedul el crecimiento continúa, este comportamiento podría explicarse por los cambios en azúcares reductores y totales en los distintos medios de cultivo.

Los azúcares totales disminuyen en todos los casos, pero en la fermentación de xilano de abedul se consumieron menos que en el xilano de maíz al 1 ó 2 % en los que se consumieron en igual medida, aproximadamente 30% de los azúcares iniciales, la viscosidad del medio fue un factor importante que podría impedir un mayor y mejor consumo de carbohidratos.

En cuanto a los azúcares reductores, es evidente que en el xilano de abedul sólo se consumieron los azúcares presentes (Figura 24), mientras que en el caso del xilano de maíz se liberaron entre 2.6 y 3.6 veces el valor inicial y fueron consumidos casi en su totalidad cuando la población empezó a decrecer. En la fermentación al 2% en xilano de maíz, los azúcares reductores duraron más tiempo, extendiendo también la fase estacionaria del cultivo.

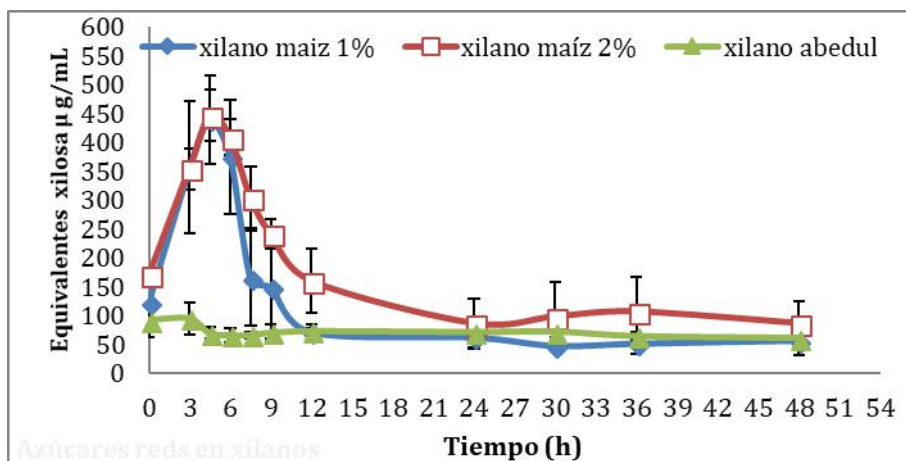


Figura 24. Concentración de azúcares reductores presentes en el crecimiento de *S. infantarius* 25124 en el medio HSH con diferentes xilanos.

Al haber concentraciones muy bajas de azúcares reductores casi desde el inicio de la fermentación en xilano de abedul y crecimiento, no podemos asociar únicamente la liberación de azúcares reductores con el crecimiento, es probable que la hidrólisis fuera tan rápida como el consumo y no fueran detectables los productos de la hidrólisis, en cambio los azúcares totales pueden asociarse mejor con el crecimiento.

5.4.2.1 Análisis de azúcares por TLC

Esta técnica se aplicó a muestras de las fermentaciones para detectar los azúcares liberados durante la fermentación, así como a los xilanos de maíz y abedul íntegros y tratados por hidrólisis ácida y enzimática para intentar caracterizar sus componentes. En el análisis de azúcares por TLC, se probaron distintas condiciones de polaridad del eluyente, para intentar hacer eluir a los xilanos del punto de aplicación, sin embargo, se observaron resultados semejantes, sin lograr la elusión completa del xilano debido a su alto peso molecular.

Al utilizar la mezcla: n-butanol : ácido acético: agua 4:5:1 como eluyente se obtuvo la placa de la Figura 25, en la que se observa una buena separación de los estándares (carriles 1,2,3), sin embargo, no se logró la elusión de ninguno de los dos xilanos con las condiciones de polaridad utilizadas (carriles 4 y 5).

En los siguientes carriles se observan las muestras concentradas de distintos tiempos de fermentación en xilano de maíz y se distinguen 3 compuestos en el tiempo 0 y 4.5 pero no en 24 h

de fermentación (carriles 6,7,8 respectivamente), éstos compuestos además no corresponden con ninguno de los estándares de monosacáridos que se esperaba encontrar. También se observó en estas muestras de la fermentación, que parte de las mismas fue retenida en el punto de aplicación.

La muestra de la hidrólisis ácida de arabinoxilano de maíz corrió de manera difusa (carril 9), se observan señales que corresponden a arabinosa y otros compuestos de mayor peso.

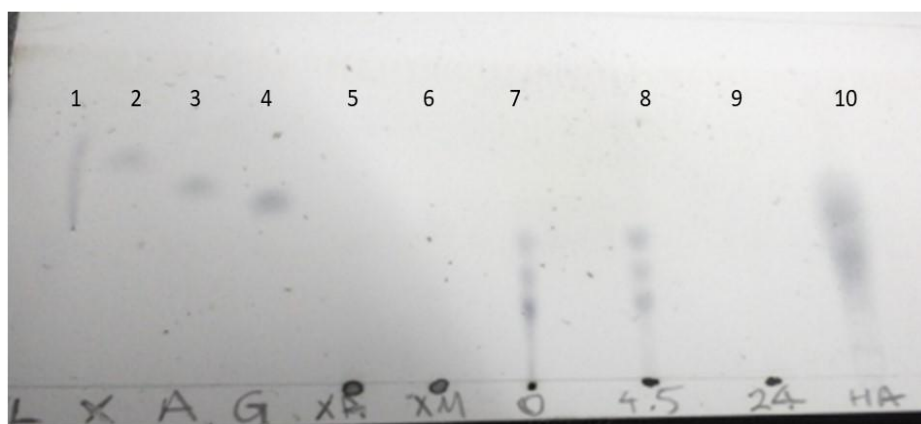


Figura 25. Cromatoplaque No. 1 Sobrenadantes de la fermentación en HSH-XM y estándares. Eluyente n-butanol:Ac acético: agua 4:5:1. Revelador: Azúcares (ver 4.3.6.2). **carril 1, L**=Lactato; **2, X**= Xilosa; **3, A** = Arabinosa; **4, G**= Galactosa; **5, XA** = Xilano de abedul; **6, XM**= Arabinoxilano de maíz; carriles 7 a 9 = sobrenadantes de la fermentación en HSH-XM de 0,4.5 y 24 h; **10, HA**= Xilano de maíz por hidrólisis ácida.

Se repitieron las condiciones del ensayo, pero haciendo 10 aplicaciones para concentrar las muestras e introduciendo la placa dos veces en la cámara de saturación. En esta placa se incluyeron muestras de medio de cultivo sin centrifugar (XM), muestras concentradas de la fermentación, hidrolizados mediante enzimas de xilano de abedul y maíz y muestras de fermentación no concentradas.

Se puede observar una diferencia entre el medio de cultivo estéril y el inoculado en el tiempo cero (Figura 26, carriles 1 y 2), la diferencia fue causada por la centrifugación al medio de cultivo inoculado para separar las células con la que además se separan fragmentos de xilano en suspensión, mientras que, en el medio de cultivo, el xilano fue forzado a mantenerse en solución. Se corroboró la presencia de al menos 3 compuestos que eluyen en el tiempo cero y 4.5 h, se observaron más tenues a las 9 h y en muestras posteriores no se observan (Carriles 1,3-6). En las muestras no concentradas de la fermentación, sólo se distinguen algunos azúcares en el tiempo cero (carriles 9-11).

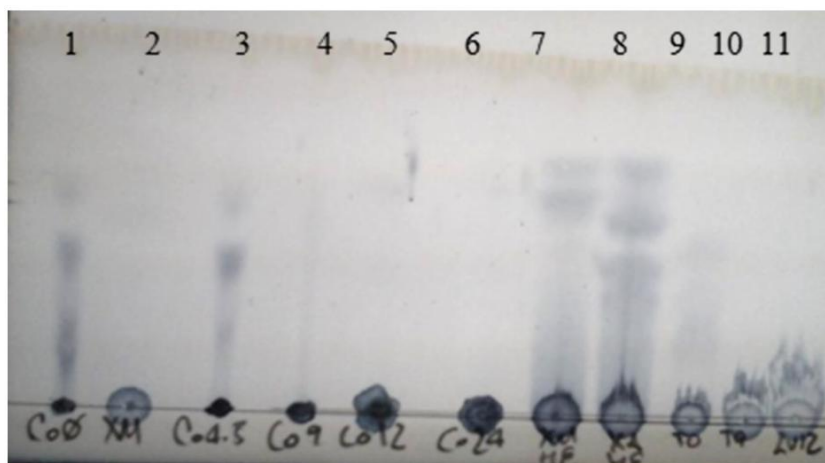


Figura 26 .Cromatoplaqa No.2. Sobrenadante de Fermentación en HSH-XM y estándares. Eluyente n-butanol:Ac acético: agua 4:5:1 .Revelador : Azúcares. Carril 2 ,**XM**= Medio de cultivo (HSHXM1%); Carriles 1 y 3 a 6 = Sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM concentrada tiempo: 0, 4,5,9, 12, 24h respectivamente; carril 7, **XM-HE**= Xilano Maíz enzimáticamente tratado; carril 8, **XA-HE** = Xilano de abedul enzimáticamente tratado; carriles 9 a 11= Sobrenadante de Fermentación en HSH-XM 0,9y12 h respectivamente.

Las muestras de xilanos sometidas a hidrólisis enzimática (carriles 7 y 8) presentaron perfiles distintos entre sí, coincidieron en un azúcar con Rf muy alto pero en el xilano de maíz se observa sólo otro compuesto y xilano mientras que en la hidrólisis enzimática de xilano de abedul se observan otros productos de diferentes tamaños. Este resultado concuerda con el obtenido en el análisis por HPLC, pero por CCF se logran separar compuestos de alto peso molecular que en la otra técnica no se alcanzaron a resolver.

Los azúcares presentes en el medio de cultivo son distintos de los detectados en las hidrólisis enzimáticas y no se detectó la liberación de monosacáridos a lo largo de la fermentación bajo las condiciones de análisis utilizadas.

5.4.2.2 Análisis de Compuestos fenólicos por TLC

Se utilizó el mismo sistema de eluyentes, pero utilizando el revelador de DPPH (1mg/mL en metanol) con el cual se visualizan los compuestos de actividad antioxidante p.e. polifenoles para conocer si se encontraban libres en el xilano sin tratamiento o si hubo liberación durante la fermentación de este tipo de compuestos (ácidos ferúlicos). Se ha reportado que los ácidos di y tri-ferúlicos en los arabinoxilanos se encuentran siempre unidos a la arabinosa, por lo que su presencia podría indicar indirectamente que se están consumiendo tales pentosas mientras se liberan ácidos ferúlicos. Se aplicaron muestras de diferentes tiempos de fermentación en arabinoxilano de maíz concentrados, no concentrados, estándares de ácido ferúlico y cumárico y el medio de cultivo estéril (Figura 27).

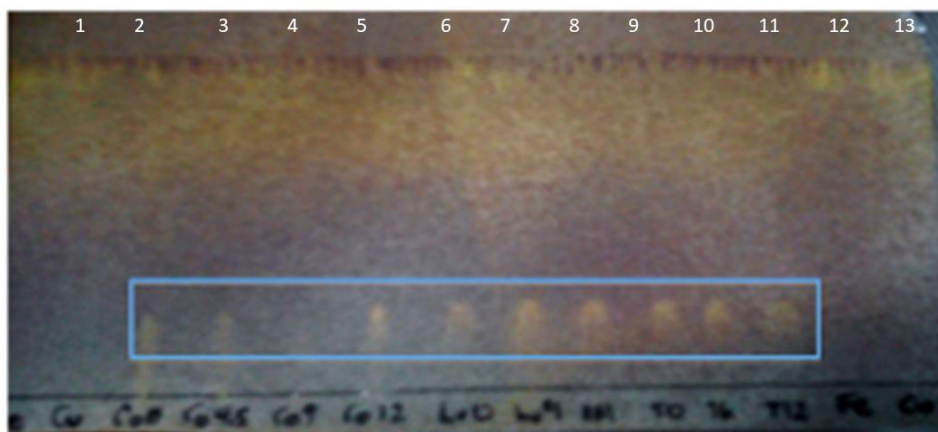


Figura 27. Cromatopla No. 3. Sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM. Eluyente: n-Butanol:Acético: Agua, 4:5:1.revelador:DPPH. En el recuadro, compuesto fenólico encontrado en XM. Carriles 1, 12 y 13 ,**Fe**, **Cu**= Estándares de ácidos ferúlico y cumárico; carriles 2 a 5,= Sobrenadantes de fermentación en HSH-XM concentrada tiempo: 0, 4.5,9, 12 h; **carriles 6 y 7** = sobrenadantes de tiempo 0 y 9 h de fermentación en HSH-XM 8 Agosto ; carril 8, **XM**= Medio de cultivo (HSHXM ,1%); carriles 9 a 11= sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM tiempo 0, 6 y 12 h de fermentación 22-abril.

No se logró detectar a los ácidos ferúlico y cumárico libres (carriles1,12 y13) en sobrenadantes concentrados y sin concentrar (carriles 2-5 y 6,7 ,9-11 respectivamente), tampoco se detectó en el medio de cultivo con xilano de maíz(carril 8); se observó 1 compuesto polifenólico en todas las muestras de fermentación y en el medio de cultivo (indicado en un recuadro, Figura 27) que no corresponde a ácido ferúlico ni cumárico libres, los cuales recorrieron casi toda la placa .

En otro experimento, se concentraron las muestras haciendo 10 aplicaciones en la placa, usando el mismo sistema de eluyentes, pero se introdujo la placa 2 veces a la cámara de saturación. Se observaron en todas las muestras de sobrenadantes de la fermentación en arabinosilano, 2 compuestos, uno con Rf de 1 cm y el segundo con Rf de aprox 4.5 cm. (Figura 28).

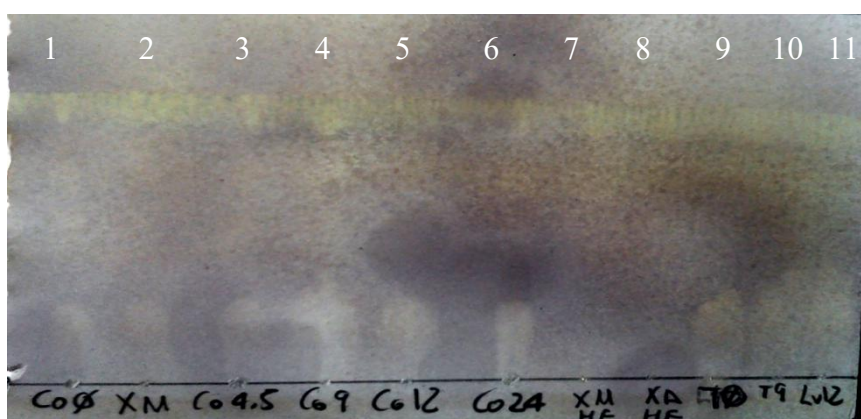


Figura 28. Cromatopla No. 4. Sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM.Eluyente: n-Bu:Acetic: Agua, 4:5:1.revelador.DPPH; columna 2, **XM**= Medio de cultivo (HSHXM1%); columnas 1,3 a 6= Sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM concentrada tiempo: 0, 4.5,9, 12 h; **columna 7, XM -HE** = Xilano Maíz enzimáticamente tratado; columna 8, **XA-HE**= XilanoAbedul enzimáticamente tratado;columnas 9 a 11= sobrenadantes de Fermentación en HSH-XM 22-abril tiempo: 0,9, 12 h.

En la muestra de hidrólisis enzimática de xilano de abedul (carril 8) no hay ninguna señal, como se esperaba ya que no se ha reportado la presencia de ácidos fenólicos asociados al xilano de abedul, mientras que en la hidrólisis enzimática de arabinoxilano de maíz (carril 7) sólo se observa el compuesto más ligero con mayor Rf. Este resultado puede indicar que al realizar hidrólisis con la enzima de *A. nidulans* (act. Xilanasa y feruloil esterasa) se elimina el compuesto de mayor peso molecular que incluye un polifenol y que aparece alrededor de 1 cm sobre el punto de aplicación, dicha actividad no está presente durante la fermentación con *S. infantarius* (carriles 1, 3-6, 9-11) por lo que podría asumirse que este microorganismo no posee dicha actividad enzimática.

5.4.2.3 Discusión TLC

Se esperaba encontrar arabinosa y xilosa en las diferentes muestras de sobrenadantes del medio de cultivo, sin embargo, la resolución con el sistema de elusión propuesto no fue suficiente para observar los monosacáridos previamente mencionados. En cambio, los oligosacáridos que se separaron con esta técnica y fueron detectados las primeras horas de fermentación no pudieron ser separados utilizando las condiciones preestablecidas del HPLC, por lo que es recomendable complementar los resultados de ambos análisis. Hay presencia constante de polifenoles unidos a azúcares que no varían durante la fermentación; al usar la enzima específica para escindir al ácido ferúlico, las bandas observadas en las muestras desaparecieron, sugiriendo que dicha actividad enzimática está ausente del cultivo de *S. infantarius* 25124.

5.4.3 Análisis de productos de fermentación

5.4.3.1 Análisis de productos de la fermentación por HPLC

En las fermentaciones de arabinoxilano de maíz (Figura 29) se detectaron dos compuestos o señales no identificados a las 4.5 y 6 h de fermentación que se mantuvieron hasta el final de la misma (t de retención de 9.0 y 10.9min) y otro más con tiempo de retención de 10.0 min después de 30h de fermentación. Estos pudieran corresponder a productos de hidrólisis del arabinoxilano, ya que no corresponden a ningún monosacárido y no fueron detectados en las fermentaciones de xilano de abedul (Figura 30).

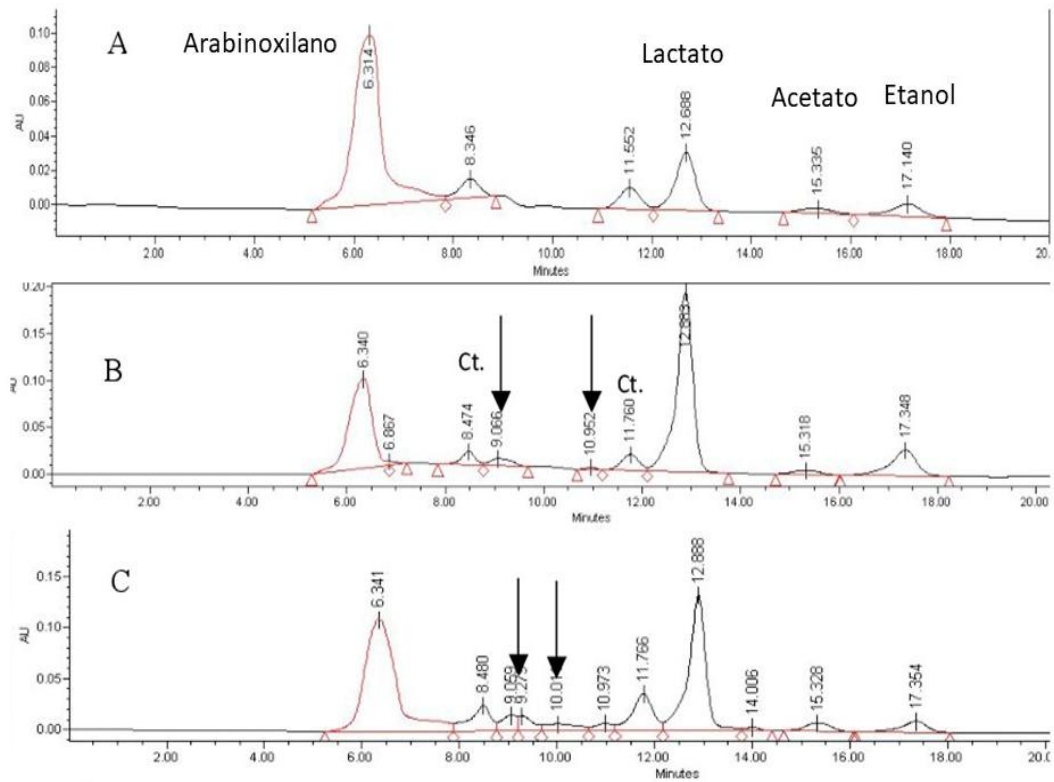


Figura 29. Perfil de HPLC de *Str infantarius* 25124 en HSH-X maíz de sobrenadantes de: A) 3, B) 12 y C) 30 h , con flechas se indican compuestos emergentes y Ct son los compuestos de concentración constante. Tiempos de retención: Xilano =6.3 min, Ac. Láctico=12.8 min, Ac. Acético= 15.3 min, Etanol =17 min.

Los perfiles de ambas fermentaciones son muy similares, coincidieron en 2 señales de componentes del medio de cultivo que tuvieron áreas similares y constantes a lo largo de las fermentaciones. Las últimas tres señales (Figuras 30 A, 30 B y 31B ,31 C) corresponden a los productos de fermentación: lactato, acetato y etanol y con sus áreas se calcularon las concentraciones de los metabolitos.

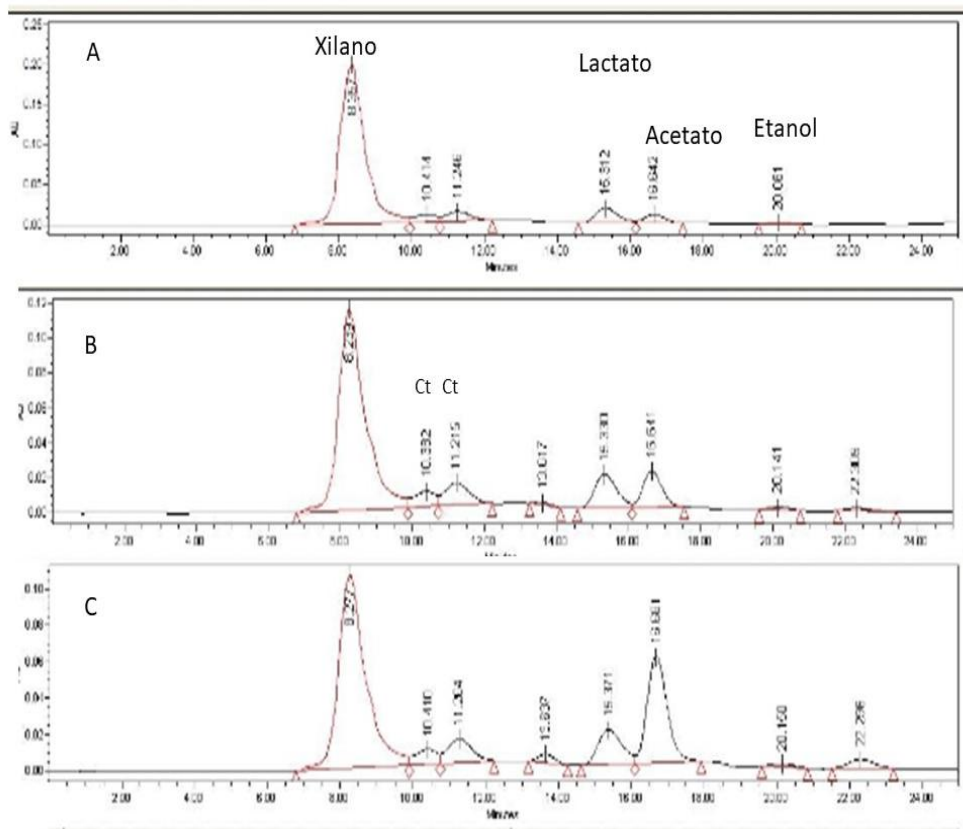


Figura 30. Perfil de HPLC de los sobrenadantes de la fermentación de xilano de abedul en el medio HSHX por *Str. infantarius* 25124. Sobrenadantes de: A) 3, B) 6 y C) 9 h de fermentación. Ct son los compuestos de concentración constante. Tiempos de retención: Xilano = 8.2 min, Ac. Láctico = 16.6 min, Ac. Acético = 20.1 min, Etanol = 22.2 min.

En la gráfica de la Figura 31 se representaron los datos de los productos de la fermentación generados en arabinoxilano de nejayote. Se produjeron concentraciones equimolares de ácido láctico y etanol durante las primeras 12 h de fermentación, tiempo en que los azúcares reductores disminuyeron al mínimo, manteniéndose en bajas concentraciones (Figura 20 p62) de igual manera se alcanzó un máximo desde las 7.5 h, con valores en ambos casos de: 23.28 ± 2.93 y 23.84 ± 4.36 $\mu\text{moles/mL}$ respectivamente. Este comportamiento es el esperado para este tipo de fermentaciones basadas en la ruta de la fosfoacetolasa, ya que, por cada mol consumido de pentosa, se producen un mol de etanol o de acetato y un mol de lactato (Kandler, 1983). Las condiciones del medio eran microaerófilicas, ya que no se agitó.

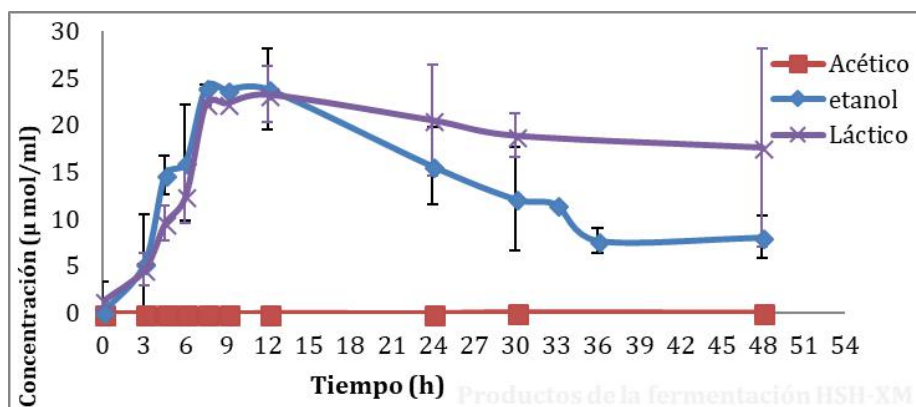


Figura 31. Ácido láctico, acético y etanol producidos durante el crecimiento de *S. infantarius* 25124 en HSH con arabinogalactano de nejayote 1%.

A partir de las 24 h se observó una concentración menor de etanol, la cual podría deberse a la alta volatilidad del compuesto y al manejo de muestras, ya que son manipuladas de distintas maneras para prepararlas para este análisis (congelar, descongelar, centrifugar, transvasar, filtrar).

El acetato que es parte de los componentes del medio de cultivo fue detectado en concentraciones muy bajas ($0.049 \mu\text{moles /mL}$ en promedio) y aunque su concentración se incrementó desde las 12 h de fermentación, alcanzó valores máximos hasta las 30 h y sólo fue de $0.15 \mu\text{moles /mL}$.

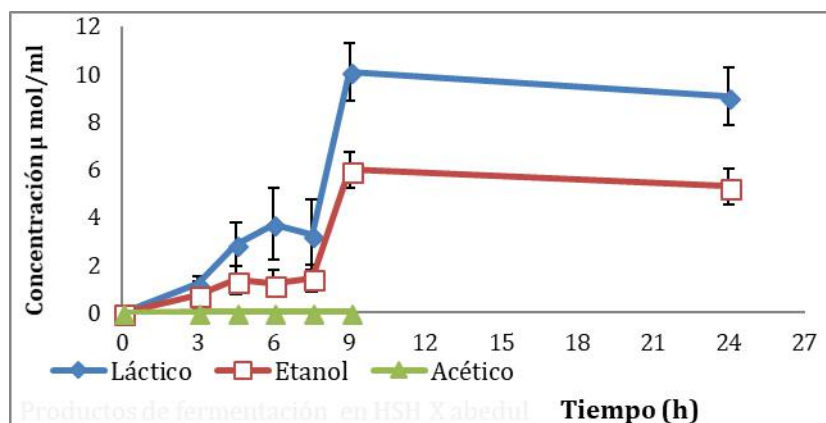


Figura 32. Ácido láctico, acético y etanol producidos durante el crecimiento de *S. inf* 25124 en HSHX abedul 1%.

En las fermentaciones en xilano de abedul se observó una menor concentración de productos de fermentación, los cuales se empezaron a detectar a partir de las 3 h (Figura 32), se observó una producción importante de ácido láctico entre las 7.5 y 9 h de fermentación, sin embargo, sólo se detectaron como máximo $10.1 \pm 1.22 \mu\text{moles /mL}$ y $6 \pm 0.75 \mu\text{moles /mL}$ de etanol; menos de la mitad de lo producido en la fermentación de xilano de maíz. Estos resultados concuerdan con la diferencia de biomasa producida y azúcares totales consumidos, que son menores al utilizar

xilano de abedul como sustrato.

En estas fermentaciones también se perdió etanol en las muestras con más tiempo de fermentación y el acetato se detectó en concentraciones muy bajas (0.029 $\mu\text{mol} / \text{mL}$ en promedio) y sólo hasta las 9 h.

5.4.3.2 Análisis de azúcares por HPLC

Se analizaron las concentraciones de azúcares usando el HPLC. No se detectó en ninguna de las muestras la presencia de monosacáridos (xilosa y arabinosa) que pudieran haberse generado durante la fermentación. Es probable que estuvieran por debajo de los límites de detección del equipo o que el tiempo transcurrido entre su liberación y su metabolización fuera muy corto.

5.4.3.3 Discusión de productos de fermentación y azúcares por HPLC

En el análisis por TLC de los sobrenadantes de la fermentación, fueron detectados algunos oligosacáridos que en HPLC no pudieron ser separados, en cambio algunos compuestos no identificados generados conforme avanzó la fermentación productos de la hidrólisis del xilano o los oligosacáridos fueron detectados sólo por esta técnica, lo que sugiere que las técnicas son complementarias.

Los productos de la fermentación de las pentosas en BAL serían ácido láctico y etanol o ácido acético según el grado de oxidación en el medio (Kandler , 1983) .

Es posible contrastar la aparición de productos de la fermentación con el consumo de azúcares, la tendencia observada fue que conforme aumentó el tiempo de fermentación, los metabolitos producidos incrementaron su concentración, los azúcares se consumieron, se produjeron ácido láctico y etanol, a partir del arabinoxilano de maíz, los azúcares reductores en principio en baja concentración, aumentaron y después fueron consumidos indicando que existe actividad enzimática y el xilano y arabinoxilano son fermentados por *S. infantarius* 25124.

De haberse encontrado otros azúcares libres o almidón en la muestra de arabinoxilano de maíz, la proporción de ácido láctico- etanol hubiera sido distinta, ya que *S. infantarius* 25124 es un microorganismo homofermentativo y se presentaría una proporción incrementada de ácido láctico durante las primeras horas de fermentación.

Aunque se observó una tendencia similar en la producción de lactato y etanol, dichos metabolitos alcanzaron concentraciones mayores y más rápidamente en la fermentación del arabinoxilano de nejayote (Figura 31 p72). Dichos resultados corresponden con el consumo de azúcares y biomasa producida que son mayores en arabinoxilano. También se detectó que la

mayor producción de metabolitos se da durante la fase exponencial sin importar el sustrato.

Al analizar los datos, se observa la clara relación inversa entre la disminución de azúcares totales y el aumento de lactato, aunque se encontró que mientras este metabolito alcanzó una concentración máxima entre las 9 y 12 h, los azúcares siguieron siendo consumidos.

Al comparar la concentración de azúcares totales con los productos de fermentación en el xilano de abedul (Figura 32, p72), se observa también, una relación inversa entre los dos parámetros y una disminución de azúcares importante en el mismo periodo en el cual la producción máxima de lactato se observó entre las 6 y las 9 h.

Durante dicho periodo, el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, indicando que hay mayor actividad metabólica fermentativa durante la fase exponencial en ambos xilanos. También se detectó acetato, en concentraciones no mayores a 0.03 $\mu\text{moles /mL}$ y a partir de las 24 h no fue detectado, sin embargo, este compuesto pudo ser el mismo presente en el medio de cultivo y no un metabolito.

Por medio de la TLC fue posible corroborar la presencia de polifenoles en el arabinoxilano de maíz, sin embargo, el microorganismo de estudio no tiene la capacidad enzimática para liberarlos de la unión con arabinosas como se observó en las muestras tratadas enzimáticamente con feruloil esterasa (Figura 28, p68).

5.4.4 Actividad enzimática

5.4.4.1 Endo-Xilanasa

Este ensayo se realizó para conocer la variación en la actividad enzimática durante las fermentaciones en ambos xilanos y así poder elucidar si hay inducción de la actividad enzimática con sustratos diferentes luego de una incubación en xilano.

La actividad de endoxilanasa estuvo presente desde el inicio sin importar el tipo de xilano incorporado al medio de cultivo, probablemente inducida por la preincubación en el medio con xilano. La actividad enzimática inicial medida en los sobrenadantes del medio de cultivo con xilano de abedul (HSH X) fue en promedio, mayor ($92.5 \pm 30.4 \text{ UI mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), no hay diferencia estadísticamente significativa del valor inicial encontrado en las fermentaciones del arabinoxilano de nejayote ($71.1 \pm 35.9 \text{ UI/mL}$).

En las fermentaciones de arabinoxilano de maíz, la actividad de endo-xilanasa se incrementó desde el inicio de la fermentación, alcanzando el valor máximo a las 3-4.5 h ($262.6 \pm 135.7 \text{ UI/mL}$) y disminuyendo gradualmente hasta que se presentó un descenso súbito entre las 7.5 y 9 h después de las cuales la actividad se mantuvo constante (Figura 33).

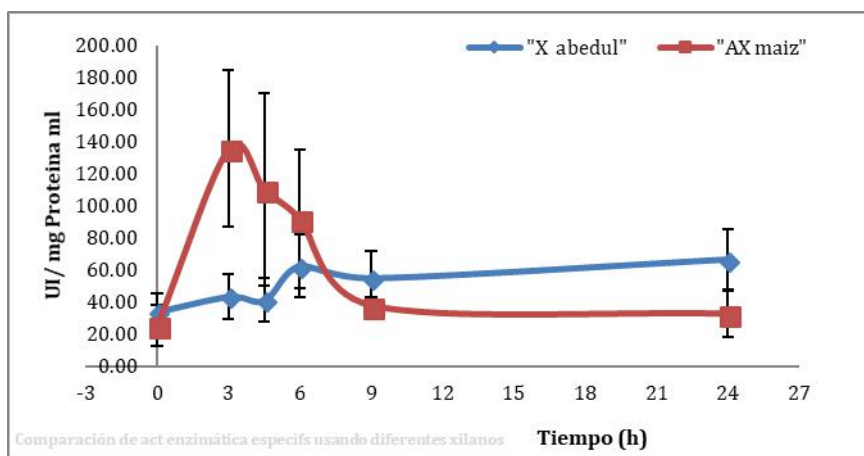


Figura 33 Actividad enzimática específica de endoxilanas de *S. infantarius* 25124 durante su crecimiento en HSH con xilano de abedul y arabinoxilano de maíz.

La actividad específica máxima se encontró a las 3h de fermentación y fue de 135.9 UI/mg de proteína, el doble del máximo presentado en la fermentación de xilano de abedul, así mismo, la actividad cesó una vez alcanzada la fase estacionaria.

Durante la fermentación de *Str infantarius* 25124 en xilano de abedul se observó un incremento importante en la actividad de xilanas entre las 4.5 y 6 h de fermentación cuando se alcanzó un pico de actividad máxima 142.3 ± 45.1 UI/mL (Fase exponencial), posteriormente disminuyó a las 7.5 h y se mantuvo prácticamente constante hasta las 48 h (Figura 33).

Al comparar los valores de actividad enzimática contra la actividad específica de acuerdo con la cantidad de proteína en el medio de cultivo se observó una tendencia similar en ambos xilanos, el incremento comenzó con la fase Log del cultivo, alcanzando valores de 62.4 UI/mg proteína en xilano de abedul, cuando se observó la actividad enzimática máxima (6h) y registrándose un valor máximo a las 24 h de 66.5 UI/mL.

5.4.4.2 Discusión de actividad Endoxilanas

El comportamiento de *S. infantarius* 25124 en ambos xilanos es muy distinto, ya que en arabinoxilano la actividad se incrementó mucho y muy rápidamente pero luego disminuyó, en cambio, en la fermentación de xilano de abedul se presentó un pico de actividad máxima y luego ésta se estabilizó. Estos resultados confirman la importancia de la naturaleza de los sustratos para inducir actividad metabólica.

En arabinoxilano se observó que existe una buena correlación entre los dos parámetros, al aumentar la actividad aumentaron los azúcares reductores y cuando disminuyó la actividad, disminuyeron también los azúcares reductores, aunque más drásticamente. Estos fueron consumidos por los microorganismos, podría proponerse que esta actividad enzimática

concluyó una vez que se hubieron escindido la totalidad de los enlaces posibles o si se presentó una inhibición por producto, aparentemente esta enzima es responsable de la mayoría de los azúcares reductores liberados en este sustrato.

En arabinoxilano de nejayote la fase exponencial de crecimiento y la actividad de endoxilanasas empezaron desde el inicio de la fermentación y se alcanzó el máximo de la población desde las 9 h cuando entró a la fase estacionaria, al tiempo en que la actividad de endoxilanasas disminuyó al mínimo, al igual que la concentración de azúcares reductores y sin embargo, el consumo de azúcares totales, se mantuvo durante el resto del tiempo de fermentación, las primeras 9 h a razón de 0.183 mg/mL/h, después disminuyó 3 veces la velocidad de consumo (Figura 20, p62). Esto indica que la actividad de endoxilanasas y las enzimas accesorias o complementarias podrían estar cumpliendo un papel vital en la supervivencia del microorganismo.

En xilano de abedul a pesar de encontrarse un pico de actividad alrededor de 6 h de fermentación, no se observó la liberación de azúcares reductores, éstos sólo fueron consumidos, al igual que los azúcares totales (Figura 13, p55) que se consumieron durante las primeras 12 h con una tasa de 0.134mg/mL/h y el resto de la fase estacionaria su concentración disminuyó a 0.052 mg/mL/h, valores ligeramente inferiores a los obtenidos con arabinoxilano. La actividad de endoxilanasas se mantuvo estable durante la fase estacionaria.

De acuerdo con la comparación de los valores, la actividad de endoxilanasas fue fuertemente inducida por el sustrato proveniente del nejayote, causando la subsecuente liberación de azúcares reductores y generación de biomasa, mientras que en xilano de abedul tardó más tiempo en inducirse la actividad y no se alcanzaron valores de actividad tan altos.

5.4.4.3 β -xilosidasa

La β -xilosidasa es una enzima básica para la hidrólisis del xilano, ya que libera xilosas de la cadena principal de cualquier tipo de xilano a partir del extremo no reductor. Durante las fermentaciones en arabinoxilano de maíz se mantuvo con una actividad inferior a 3.42 UI durante toda la fermentación. En cambio, en el xilano de abedul, la actividad fue mayor hasta que transcurrieron 7.5 h; posteriormente disminuyó hasta valores cercanos a 3.24 UI, una actividad mínima similar a la presentada en arabinoxilano de maíz. (Figura 34). Los valores máximos se reportan en la Tabla 12.

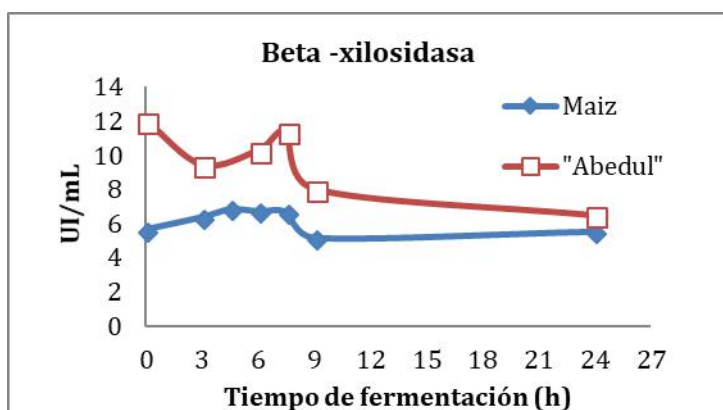


Figura 34. Actividad enzimática de β xilosidasa a lo largo del crecimiento de *S. infantarius* 25124 en medio HSH con xilano de abedul o arabinoxilano de nejayote.

5.4.4.4 Actividades enzimáticas complementarias

De acuerdo con el análisis del comportamiento catalítico de algunas de las enzimas complementarias o accesorias, las actividades enzimáticas expresadas por *S. infantarius* 25124 al fermentar diferentes xilanos son distintas. Estas enzimas son así denominadas ya que actúan como complemento de otras enzimas principales (xilanasa) para la hidrólisis de polímeros complejos. En la tabla 12 se presentan los valores máximos de actividad enzimática durante las fermentaciones en arabinoxilano de maíz y xilano de abedul.

Tabla 12. Actividad enzimática máxima y actividad específica máxima de enzimas complementarias a xilanasa detectadas en fermentaciones de *S. infantarius* 25124 con xilano de diferentes fuentes. (tiempo de fermentación entre paréntesis).

	Arabinoxilano de maíz	Xilano de Abedul
α -xilosidasa	16.13 IU (24 h) 8.29 IU/mg prot	10.01 IU (24h) 5.71 IU/mg prot
β -xilosidasa	6.86 IU (4.5 h) 3.17 IU/mg prot	12.02 IU (0h) 4.43 IU/mg prot
α - arabinosidasa	17.68 IU (24 h) 9.08 IU/mg prot	11.13 IU (9 h) 5.15 IU/mg prot
β -arabinosidasa	11.1 IU (0h) 3.99 IU/mg prot	12 IU (6h) 5.26 IU/mg prot
α -glucosidasa	12.94 IU (24 h) 6.65 IU/mg prot	11.25 IU (9h) 5.20 IU/mg prot
β -glucosidasa	17.34 IU (24 h) 8.91 IU/mg prot	11.25 IU (9 h) 5.21 IU/mg prot
Acetil-esterasa	72.17 IU (4.5 h) 33.4 IU/mg prot	16.02 IU (24 h) 9.13 IU/mg prot
α -galactosidasa	14.87 IU (0h) 5.35 IU/mg prot	10.16 IU (4.5 h) 4.46 IU/mg prot
β -galactosidasa	16.05 IU (6 h) 6.72 IU/mg prot	11.36 IU (0h) 4.18 IU/mg prot

IU= μ mol PNP liberado/ min*mL

En la Figura 35 se graficaron las cinéticas enzimáticas de las principales actividades complementarias expresadas durante las fermentaciones de arabinosilano de nejayote.

Se encontró que la acetil xilan-esterasa fue la principal actividad accesoria en la fermentación en arabinosilano de maíz; presentó un pico de actividad máxima a las 4.5 h de 72 IU, luego un descenso abrupto a un valor mínimo a las 9 h seguido de un repunte en la actividad hacia las 24 h. En xilano de abedul se observó un incremento hasta alcanzar el máximo en 24h, sin embargo, dicho incremento fue mínimo comparado con la actividad alcanzada con el sustrato de maíz (Figura 35A).

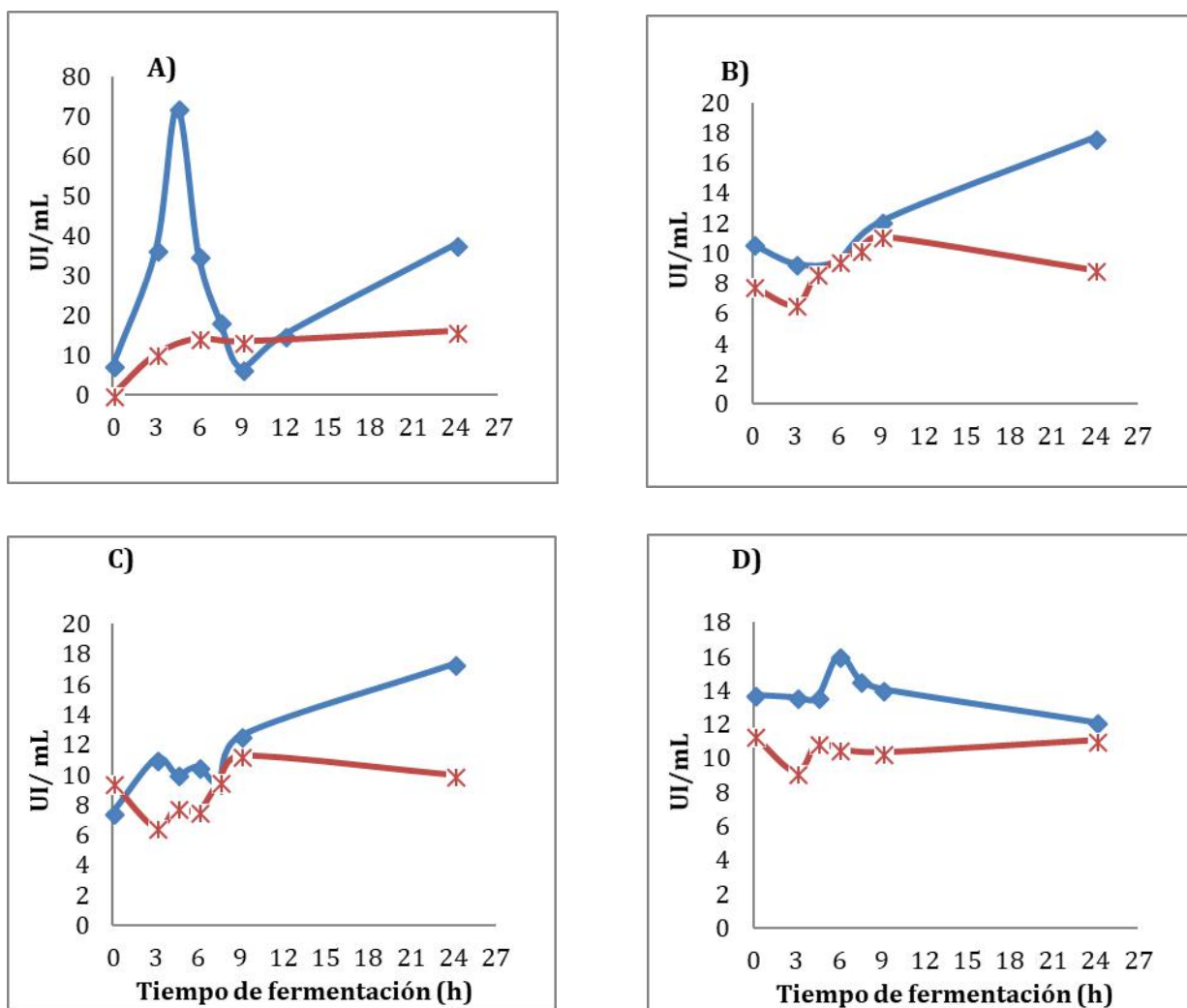


Figura 35. Actividad enzimática a lo largo de la fermentación en medio HSH con ■ Arabinosilano de maíz y * xilano de abedul de *S. infantarius* 25124. A) Acetil xilan esterasa, B) α -arabinosidasa, C) β -glucosidasa, D) β -galactosidasa

La α -arabinosidasa que es primordial para degradar arabinosilano, presentó en ambos xilanos un descenso de actividad las primeras 3 horas de fermentación y luego se incrementó, sin embargo, en arabinosilano de nejayote la actividad siguió incrementándose hasta las 24h, mientras que la actividad en xilano de abedul decayó después de 9h de fermentación (Figura 35

B).

La actividad de β -glucosidasa en arabinoxilano de maíz mostró un incremento inicial y una posterior estabilidad hasta las 7.5 h cuando se incrementó alcanzando su actividad máxima a las 24h. En presencia de xilano de abedul, la actividad disminuyó las primeras 3 h, luego tuvo un ascenso constante hasta las 9 h cuando alcanzó su actividad máxima, posteriormente regresó a los valores iniciales.

La β -Galactosidasa en las fermentaciones de arabinoxilano de maíz, se mantuvo constante hasta que presentó un pico de mayor actividad a las 6 h que luego decreció. En xilano de abedul la actividad se mantuvo en valores similares a lo largo de toda la fermentación, indicando que no se está induciendo la producción de más enzima con dicho sustrato y, que posiblemente no contiene galactosa unida a la cadena principal (Figura 35D).

5.4.4.5 Discusión Actividades enzimáticas complementarias y β -xilosidasa

Las actividades que se esperaba que fueran las más importantes debido a la naturaleza del arabinoxilano de nejayote eran alfa arabinofuranosidasa, beta xilobiosidasa, acetil esterasa y alfa galactosidasa, las cuales fueron detectadas en las fermentaciones en maíz y de abedul, como se reporta en la Tabla 12, aunque existieron diferencias en el comportamiento catalítico, de acuerdo con el tipo de xilano presente en el medio de cultivo.

La β - xilobiosidasa es necesaria para la hidrólisis del xilano, *S. infantarius* 25124 la expresa de acuerdo con el sustrato del cual se alimenta. Según los análisis e información referente al arabinoxilano de nejayote éste está sustituido por otros azúcares diferentes de la xilosa, además de que su complejidad estructural dificulta la disponibilidad para su hidrólisis. La escisión de xilosa de la cadena principal es sólo una de las varias acciones a realizar para obtener azúcares simples a partir de un arabinoxilano. Por este motivo, la actividad en arabinoxilano no es muy fuerte a diferencia del comportamiento frente al xilano de abedul, que tiene una estructura lineal y está compuesto principalmente de xilosas.

La actividad de xilosidasa sobre el xilano de abedul dejó de ser importante una vez alcanzada la fase estacionaria del cultivo, es poco probable que el sustrato de la enzima se hubiera acabado completamente dado que el contenido de azúcares totales en las muestras después de 9 h de fermentación seguía siendo alto. Es más probable que existiera inhibición o saturación. Esta enzima es inhibida por presencia de xilosa y glucosa (Jordan et al., 2012) aunque no se detectó acumulación de azúcares reductores a pesar de la alta actividad enzimática.

El crecimiento pudiera haberse debido en parte a esta enzima, pero no depende de la misma para el mantenimiento del cultivo ya que éste continuó creciendo a pesar de la disminución de la actividad de xilosidasa (Figuras 13 y 34, pp 55 y 77). Este fenómeno puede ser corroborado con el comportamiento ante el arabinoxilano de nejayote, en el cual esta enzima se expresa, pero no es la más importante para el crecimiento, desarrollo o mantenimiento del cultivo.

Los comportamientos catalíticos de las enzimas complementarias fueron distintos en cada tipo de xilano (Tabla 12), algunas de las enzimas fueron perdiendo actividad conforme transcurrieron las fermentaciones, como fue el caso de la beta- arabinofuranosidasa y alfa-galactosidasa en arabinoxilano de nejayote y beta xilosidasa en xilano de abedul.

Después de inducir actividad xilanolítica, en presencia de xilano de abedul, no se requirió la síntesis inmediata de α -glucosidasa o β -arabinosidasa, posteriormente se incrementaron sus actividades aunque luego de 9 h disminuyeron nuevamente; en fermentaciones de arabinoxilano, algunas enzimas tuvieron una actividad máxima en tiempos intermedios de la fermentación, tal fue el caso de la β -galactosidasa que presentó un pico de actividad a las 6 h y de la acetil esterasa cuya actividad máxima fue detectada a las 4.5 h. Otras enzimas tardaron en inducirse, de manera que la máxima actividad se detectó hacia el final de la fermentación transcurrida alrededor de 24 h, como fue el caso de α - xilobiosidasa, α -glucosidasa, β -arabinofuranosidasa y β glucosidasa.

La α -arabinosidasa tuvo también el comportamiento esperado ya que su actividad en presencia de arabinoxilano de nejayote se fue incrementando conforme transcurrió la fermentación reforzando las referencias que indican un alto nivel de sustitución con arabinosas de la cadena de xilano, así como la actividad del acetil esterasa que fue máxima en las primeras horas permitiendo la separación de grupos acetilo que pudieran interferir con la actividad de las otras enzimas.

Aunque no todos los autores reportan las actividades en las mismas unidades y normalmente la actividad xilanolítica es buscada en levaduras y mohos, es poco frecuente encontrar reportes de estas actividades en bacterias, y sin embargo, la actividad de xilanasa de *Streptococcus infantarius* 25124 resulta ser mayor a la reportada para *Cryptococcus albidus* (0.884 U/ mL en xilano de abedul y hasta 8.5 U /mL enz. purificada) (Biely y Vrsanska, 1988), *Bacillus* sp. (9.11 U/ml) (Gupta y Kar, 2009), *Pleurotus* sp. BCCB068 y *Pleurotus thailandia* (0.64 y 0.65 U/mL) (Ragagnin et al., 2009), *Flavobacterium johsoniae* (12 IU/mg) (Chen et al.,2013).

En el caso de *Cellulomonas flavigena* se ha reportado que tiene una actividad de endoxilanasas de 109 IU/mg en xilano de abedul y hasta 322 IU enz. purificada (Montes et al., 1998) y de B-glucosidasa de 0.078 U/mL (Ponce y de la Torre , 1995) lo que indica una mayor actividad

xilanólítica pero menor respecto a las actividades accesorias de *Str infantarius* 25124. Otras bacterias como *Lb. fermentum* 3.7 y *Lb. plantarum* presentan mucha más actividad de α -galactosidasa ligada a membrana de $1441.1 \pm 133.7\text{U/mL}$ y $1223.1 \pm 148.3\text{U/mL}$ usando estaquiosa como inductor (Songré et al., 2008); entonces por comparación *S. infantarius* 25124 posee buena capacidad catalítica respecto a otros organismos.

5.4.4.6 Conclusiones actividad enzimática

S. infantarius 25124 presentó todas las actividades enzimáticas complementarias ensayadas en diferente grado según el sustrato al que fuera enfrentado y en buena proporción respecto a otros microorganismos.

Durante la fermentación de arabinoxilano de maíz, la actividad enzimática de xilanasas se incrementó rápidamente al principio, lo que ocasionó un incremento rápido de azúcares reductores y biomasa. Conforme transcurrió la fermentación algunas otras enzimas complementarias tomaron importancia, particularmente la acetil esterasa y beta galactosidasa que durante las primeras 6 h actúan rápidamente sobre los grupos acetilos y las galactosas.

Hacia el final de la fermentación la mayoría de las enzimas alcanzan un valor máximo indicando que la hidrólisis continúa sobre las ramificaciones y azúcares constitutivos del arabinoxilano. Esto puede ser comprobado con los azúcares totales que siguen disminuyendo y el cultivo que se mantiene en fase de crecimiento estacionario al menos hasta las 48 h.

En el xilano de abedul el crecimiento y la actividad enzimática no fueron tan impactantes respecto al arabinoxilano, sin embargo se comprobó la influencia del sustrato utilizado. Se detectó una fuerte actividad de beta xilobiosidasa y la mayoría de las enzimas complementarias alcanzaron una mayor actividad alrededor de 9 h de fermentación, cuando se alcanzó la mayor concentración de lactato y con este sustrato se desarrollaron tardíamente las actividades de alfa xilosidasa y acetil esterasa.

6. Conclusiones fermentación de Arabinoxilano de maíz por *S. infantarius* 25124

Nuestros resultados demuestran que *Streptococcus infantarius* 25124 tiene la capacidad de crecer en presencia de arabinoxilano el cual induce la producción de enzimas extracelulares necesarias para facilitar su fermentación. La alta actividad de acetilesterasa observada al principio de la fermentación muestra la adaptación de la cepa al sustrato de maíz ya que al exponerlo a otro

tipo de xilano (abedul) se tiene una hidrólisis y fermentación menos eficiente.

Las desviaciones estándar en las fermentaciones pueden ser atribuidas a la heterogeneidad del mismo sustrato.

La actividad de xilanasas estuvo directamente relacionada con el crecimiento en ambos tipos de xilano, sin embargo pudiera existir represión catabólica mediada por los productos ya que se observó en muestras de fermentaciones de xilano de abedul, que el consumo de azúcares totales fue lento permitiendo el crecimiento continuo con una mínima acumulación de lactato. En tanto que durante la fermentaciones en arabinoxilano de maíz, la alta actividad enzimática produjo concentraciones altas de carbohidratos reductores que fueron rápidamente fermentados, produciendo lactato y etanol al momento que la actividad de xilanasas disminuyó a valores mínimos, mientras las enzimas complementarias continuaron activas, incluso alcanzando actividad máxima a las 24 h

Los resultados sugieren que las diferencias entre los dos tipos de xilanos surgen de las características estructurales de los mismos, pero también indican la capacidad de *S. infantarius* 25124 de adaptarse a medios con hemicelulosa como fuente de carbono y por lo tanto su prevalencia durante las fermentaciones de pozol.

Es importante resaltar que generalmente en masas fermentadas de trigo y alimentos fermentados de maíz no nixtamalizado, predominan cepas de *Lactobacillus* (Corsetti and Settani, 2007; De Vuyst et al., 2009; Iacumin et al., 2009) mientras que la microbiota del pozol es marcadamente diferente. Esto puede ser resultado del proceso de nixtamalización que podría actuar como elemento selectivo de las cepas presentes en el pozol.

7. Conclusiones Generales

- Una proporción alta (60%) de las cepas representativas que se han aislado del pozol presentan actividad enzimática de xilanasas. Esto les pudiera dar una ventaja ecológica sobre el resto de la microbiota y explicaría la mayoría numérica de BAL-no amilolíticas transcurridas 24 h de la fermentación (Diaz,2003).
- *Weissella confusa* (L9), mostró un crecimiento más rápido respecto al de *Streptococcus infantarius* 25124 y presentó un comportamiento notoriamente distinto en el patrón de consumo de azúcares reductores durante las fermentaciones en HSH-xilano. Esto puede deberse a que no es amilolítico y el xilano podría ser su sustrato principal. Este microorganismo tarda más tiempo en adaptarse al medio con xilano, lo que puede

explicar que no se haya detectado en las primeras horas de la fermentación en otros estudios (Ampe, et al., 1999). Sin embargo, tiene una fuerte actividad xilanólítica que pudiera permitirle un importante incremento de población una vez adaptado al sustrato.

- *S. infantarius* 25124 no mostró fase lag en las fermentaciones de xilano de abedul, después de ser preincubada en xilano. Incrementó su población rápidamente y después de 24 h siguió aumentando con menor velocidad, consumiendo alrededor de 15 % de los azúcares totales en 48 h. Estos resultados indican la capacidad catalítica de la cepa frente a la hemicelulosa.
- El procedimiento de separación del arabinoxilano del nejayote fue estandarizado adecuadamente, ya que, aunque los rendimientos fueron pobres, el producto final tiene un espectro de FT-IR similar a otros xilanos de maíz y no se observaron señales de proteínas o de agua ligada. La concentración de azúcares reductores es mínima lo que indica la integridad del polímero. Dicho producto se encontraba razonablemente puro para su uso como sustrato de las fermentaciones.
- Se hicieron determinaciones de parámetros de crecimiento en medio definido HSH – arabinoxilano de maíz al 1 y 2% encontrándose que, al parecer, a mayor concentración de sustrato, la velocidad de crecimiento aumenta. A pesar de la presencia de mayor concentración del sustrato, se producen las mismas concentraciones de azúcares reductores y el consumo de azúcares totales es similar. Se deberán realizar más pruebas con otras concentraciones para comprobarlo.
- El crecimiento de *S. infantarius* 25124 en xilano de maíz fue más rápido y abundante que en xilano de abedul. Éste también fue acompañado de un mayor consumo de azúcares totales y se observó un comportamiento distinto, ya que se liberaron azúcares reductores producto de la alta actividad de xilanasas y otras actividades enzimáticas complementarias; las cuales tuvieron comportamientos distintos. En cambio, durante las fermentaciones en xilano de abedul los azúcares reductores fueron sólo consumidos y no se observó liberación de los mismos.
- Existen diferencias en el comportamiento ante los dos tipos de xilano utilizado de acuerdo con la composición de cada uno; sin embargo, es posible proponer de acuerdo con los resultados obtenidos que el microorganismo se adapta adecuadamente a su entorno y esta ventaja adaptativa pudiera ser uno de los factores importantes que le

permitan ser prevalente durante la fermentación del pozol, en la que se dan cambios químicos importantes en la composición de la masa.

- La actividad de endoxilanasas de *S. infantarius* 25124 fue superior en arabinoxilano de maíz, y algunas de sus enzimas complementarias fueron producidas en presencia de xilano y arabinoxilano: siendo α -arabinosidasa, α -galactosidasa, α -glucosidasa y acetil xilano esterasa las más activas.
- No se han reportado estudios cinéticos de ninguna de las enzimas xilanolíticas en BAL por lo que con este trabajo se contribuye a ampliar el conocimiento sobre estos géneros, así como al entendimiento de los procesos que involucran microbios y sustratos complejos, como los de la fermentación del pozol.
- Estos resultados muestran que además del almidón, el arabinoxilano es un sustrato para la fermentación ácido láctica de la masa de pozol.
- Con este trabajo se logró demostrar que *S. infantarius* 25124 tiene la capacidad de crecer en presencia de arabinoxilano de nejayote, además de ser la BAL amilolítica de mayor prevalencia en la fermentación del pozol.

8. Perspectivas

En la actualidad, son muy solicitadas las enzimas con actividad hidrolítica sobre la hemicelulosa, pero que no ataquen celulosa, particularmente en la industria papelera. En el caso de *S. infantarius* 2514, no se ha detectado actividad celulolítica, sin embargo, dicha actividad podría ser inducida por otros sustratos distintos de los ensayados, por lo que sería conveniente realizar pruebas adicionales para poder proponer a *S. infantarius* 25124 como productor de xilanasas libres de actividad celulolítica. También se ha descrito el papel de las enzimas xilanolíticas en el mejoramiento de características sensoriales de productos de panificación (Gobetti et al., 1999, Maat et al., 1992), para lo cual podrían utilizarse las enzimas de *S. infantarius* 25124.

Sería importante profundizar además el conocimiento de la fisiología y genética del microorganismo, por ejemplo, buscando en su genoma a los genes asociados a las enzimas ensayadas en este trabajo, caracterizándolas y definiendo las condiciones óptimas de inducción de sus actividades.

9. Referencias

- Acevedo, E., Bressani, R. 1990. Contenido de fibra dietética de alimentos centroamericanos. Guatemala. Arch. Latinoam. Nutr. 40, 439-451.
- Agama-Acevedo E., Ottenhof M.A., Farhat IM, Paredes-López O, Ortíz-Cereceres J., Bello-Pérez L.A., 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz, *Interciencia Caracas INCI*. 29
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., and Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–685. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- Alonso, J. L., Dominguez, H., Garrote, G., Gonzalez-Munoz, M. J., Gullon, B., Moure, A., et al. (2001). Biorefinery processes for the integral valorization of agroindustrial and forestal wastes. *CyTA J. Food* 9, 282–289. doi: 10.1080/ 19476337.2011.598949
- Aman P., Westerlund E., 1996, Cell wall polysaccharides: structural, chemical and Analytical aspects, en *Carbohydrates in Food*, Ann-Charlotte Eliasson (Ed), Marcel Dekker Inc
- Ampe F., Sirvent A, Zakhia N., 2001. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int J. Food Mic.* 65, 45-54
- Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C y Guyot JP., 1999. 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, *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 5464–5473
- Ampe F., Ben Omar N, Guyot JP., 1999b. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough, *Journal of Applied Microbiology*, 87, 131–140
- Badel S., Laroche C., Gardarin C., Petit E., Bernardi T., Michau P., 2011. A new method to screen polysaccharide cleavage enzymes *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 248–252
- Bailey, M.J., Biely, P. y Poutanen, K., 1992, Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity, *J of Biotechnology* 23, 257–270
- Beg QK Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS, (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review *Appl Microbiol Biotechnol* 56:326–338
- Ben Omar N, Ampe F., 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol.* 66, 3664–73.
- Biely P., Vrsanská M., Tenkanen M., Kluepfel D. 1997. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* 57, 151–66
- Biely, P., (1993) Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases, en: Coughlan, P., Hazlewood, G. (Eds.), *Hemicelluloses and hemicellulases*. Portland Press, London, pp. 2–51 .
- Biely, P., Vrsanska, M., 1988. Xylanase of *Cryptococcus albidus* . *Methods in enzymology* 160, 638–648
- Biely P, Mislovičová D, Toman R. 1988. Blue-Xylan: A Soluble Chromogenic Substrate for Xylanases, *Methods in Enzymology* 160, 536–542
- Biely Peter, 1985. Microbial xylanolytic systems . *Trends in Biotechnology*, 3, 286–290
- Boyer C., Shannon JH.C. 1987. Carbohydrates of the kernel, en *Corn: Chemistry and Technology* Stanley A. Watson, Paul E. Ramstad (Eds). Am Assoc of cereal Chemists
- Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E. y Ortiz, M.A. 1990. Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during tortilla preparation , *Cereal Chem.* 67, 515–518.
- Bressani R., Turcios JC, Reyes L y Merida. 1983. Handbook of indigenous fermented foods, editado por Keith H. Steinkraus. Marcel Dekker, Nueva York.
- Cañas Urbina, A.O., Bárzana García, E., Owens, J.D. , Wachter Rodarte, M.C. , 1993 La elaboración de pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia (Mexico)* 44, 219–229.
- Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J.A., Micard, V., Ponce de León, N, Gardea, A., 2007. Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers* 69 , 280–285
- Chaplin M. F., Kennedy J. F.. 1987. Carbohydrate analysis: a practical approach. Chaplin y Kennedy (Eds) IRL Press, Oxford University Press, Washington D.C.

- Chen, S., Kaufman, M., Miazgowiec, K., Bagdasarian M., Walker, E., 2013. Molecular characterization of a cold-active recombinant xylanase from *Flavobacterium johnsoniae* and its applicability in xylan hydrolysis. *Bioresource Technology* 128, 145-155
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012. Maíces y Razas de Maíces, portal Biodiversidad Mexicana de CONABIO. Disponible en línea en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/ maices/ razas2012.html>
- Coates John, 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, En *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. pp. 10815-10837 disponible en línea: http://infrared.als.lbl.gov/BLManual/IR_Interpretation.pdf
- Cooper-Bribiesca BL. 2013. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus Aplicaciones Industriales. *Vertientes*, Revista especializada en ciencias de la Salud 16, 19-22
- Corsetti A., Settanni L., 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation, *Food Research International* 40, 539-558
- Coughlan MP, Tuohy MG, Filho E.X., Puls J, Claeysens M, Vranska, M, Houghes M. 1993. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems, En: Michael P. Coughlan, MP, Hazlewood GP, (Ed.s), *Hemicellulose and hemicellulases*. London: Portland Press; pp 53-84.
- de Vos WM., Vaughan EE., 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews* 15, 217-237
- De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux F y Wecks S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota, *Food Microbiology* 26, 666-675
- Díaz-Ruiz G., Guyot J. P., Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J., Wachter C., 2003. 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 *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4367-4374
- Dornez E., Gebruers K., Delcour J.A., Courtin C.M., 2009. Grain-associated xylanases: occurrence, variability, and implications for cereal processing, *Trends in Food Science & Technology* 20, 495-510
- Donnelly B.J., Helm J.L., Lee H.A., 1973. The carbohydrate composition of corn cob hemicelluloses, *Am Assoc. of Cereal Chem* 50, 548-552
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Ebringerova, A y Heinze T., 2000. Xylan and xylan derivatives- biopolymers with valuable properties, 1: naturally occurring xylan structure, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21, 542-556
- Egués, I.; Stepan, AM, Eceiza A, Toriz, G; Gatenholm P; Labidi J. 2014. Corn cob arabinoxylan for new materials, *Carbohydrate Polymers* 102, 12-20
- Eleamen O. E., Acarilia ES., Toshiyuki N J, Salgado Gomes MC, Muratori Aguiar L, Rodrigues Marcelino H; Batista Araújo I, Bayer Marc P, Nágila M.P.S. Ricardo, Gomes Oliveira A, Tabosa Egito ES. 2010. Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresource Technology* 101, 5402-5406
- Englyst HN., Hudson GJ., 1996. The classification and measurement of dietary. *Carbohydrates Food Chemistry*, 57, 15-21
- Erlandson, K. A., Delamarre, C., and Batt, C. A. (2001). Genetic evidence for a defective Xylan degradation pathway in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1445-1452. doi:10.1128/AEM.67.4.1445-1452.2001
- Escalante, A., Wachter, C., Farres, A., 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis, *International Journal of Food Microbiology* 64, 21 - 31
- FAO, 1993. El maíz en la nutrición humana (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25) Roma.
- FAO, 2003. Gross chemical composition of different types of maize en: *Maize in human nutrition* consultado en línea Agosto 2014, en: www.fao.org/3/a-t0395e/T0395E03.htm#Gross%20chemical%20composition
- Faostat, consultado en línea marzo 2011: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Flores Espinoza MT, 1996. Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol. Tesis Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM
- Flores González, AG, 2007. Estudio de bacterias lácticas aisladas de pozol por medio de ARDRA. Tesis Facultad de Química, UNAM

- Florida Center for Instructional Technology (2009) Clipart ETC disponible en línea: http://etc.usf.edu/clipart/30700/30783/maize_30783.htm
- Francesch M., 1996. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura, Curso de especialización FEDNA, Madrid, España
- FulopLászlo y Pony T, 1997. Rapid screening for endo β -1,4- glucanase and endo β -1,4- mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates .*Journal of Microbiological Methods* 29, 15-21
- Gaspar M., Juhasz T., Szengyel Zs., Reczey K., 2005.Fractionation of corn fibre carbohydrates. *Process Biochemistry* 40, 1183-1188
- Gebler J., Gilkes N.R., Claeysens M, Wilson D.B., Beguin, P., Wakarchuk, W.W., Kilburn,DG., Miller R.B., Warren R.A.J. ,Withers S.G. 1992. Stereoselective hydrolysis catalysed by related B-1,4-glucanases y B-1,4 xilanases . *J of Biological Chemistry* 267, 12559-12561
- Gilkes N., Henrissat R.,Kilburn D. G., Miller R. C.,Warren R. A. J.,1991. Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families, *Microbiological Reviews* 55, 303-315
- Gobbetti M, DeAngelis M, Arnaut P., Tossut P, Corsetti A.,Lavermicocca P., 1999. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. *Food microbiology* 16,409-418
- González Flores A y Jiménez Ocampo A,2010. Cambios químicos y reológicos durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado Tesis de Licenciatura FQ-UNAM
- Gupta U., Kar R .2009. Production by a Thermo-tolerant *Bacillus* Species under Solid-state and Submerged Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52,1363-1371
- Hespell Robert B , 1998. Tabla de composicion de azúcares complejos del maíz tomada de Extraction and Characterization of Hemicellulose from the Corn Fiber Produced by Corn Wet-Milling Processes . *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2615–2619
- Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J., 1998.,A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants *FEBS Lett.*, 425, 352–354
- Henrissat B., Bairoch A.,1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities *Biochem. J.*, 293, 781–788
- Henrissat B.,1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acids similarities sequences. *Biochem. J.*, 280, 309–316
- Hols P., Hancy F., Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme Christine, Dusko E, Guédond E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M,2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics, *FEMS Microbiology Reviews* 29, 435-463
- INNSZ (Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán), 1996. Tablas de composición de alimentos del INNSZ .publicación interna.,
- Iubmb: International Union of Biochemistry and Molecular Biology, información en línea accesada Nov 2011 en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
- IUPAC: Methods for henicellulases: Part 1 xylanases.1987.
- Jans, C., and Bolieij, A. (2018). The road to infection: host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members. *Front.Microbiol.*9:603.doi:10.3389/fmicb.2018.00603
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., et al. (2017). African fermented dairy products - overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications enhanced food safety and security. *Int. J. Food Microbiol.* 250, 27–36. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017. 03.012
- Jiménez Vera R. , González Cortés N, Magaña Contreras A, Corona Cruz A,2010. Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*), *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología Alimentaria*1, 1,070-080
- Jordan DB,Bowman MJ, BrakerJD, Dien BS, Hector RE, Lee CC, Mertens JA, Wagschal K., 2012. Plant cell Walls to ethanol. *Biochem J* 442, 241-252
- Kacurakova M., Wellner N., Ebringerova A., HromaDkova Z., Wilson RH, Belton PS, 1999.Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids* 13 ,35-41
- Kacurakova M., 1994. Infrared study of arabinoxylans. *J Sci Foo agric* 66,423-427
- Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lule, G. N., Kreikemeyer, B., Renault, P., Bonfoh,B.etal.(2018).Colorectal cancer-associated *Streptococcus infantarius* subsp.*infantarius* differ from a major dairy lineage providing evidence for pathogenic,pathobiont and food-gradel

- ineages. Sci.Rep.8:9181.doi:10.1038/ s41598-018-27383-4
- Kandler, Otto, 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria ; Antonie van Leeuwenhoek 49,209-224
 - Katz S.H.; Hediger M.L.,Valleroy L.A, 1974. Tradicional maize processing techniques in the new World., Science 184:765
 - Khan N., Zaman R., Elahi M.,1991. Effect of heat treatments on the Phytic acid content of maize products, J Sci Food Agric, 54, 153-156
 - Kim JH, Sunako M.,Ono H., Murooka Y., Fukusaki E. & Yamashita M., 2008. Characterization of gene encoding Amylopullulanase from Plant-Originated lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* L137, Journal of Bioscience and Bioengineering 106, 449-459
 - Krengel,U., Dijkstra, BW. ,1996. Three-dimensional Structure of Endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular Basis for its Low pH Optimum Journal of Molecular Biology, 263, 70-78)
 - López M y Segurajauregui J,1986. Efecto de la variedad del maiz en la cinetica de nixtamalización, TecnoL.Aliment. (Mex) 21,13
 - López -Munguía A, Wachter R., C, Rolz C. y Moser A., 1994. Integración de tecnologías Indígenas y Biotecnologías modernas: una utopia?. Interciencia 19,177-182
 - Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, daSilva MJS, Egmond MR, Hagemans MLD, vanGarcom RFM, Hessing JGM, vanDerhondel CAMJJ, vanRotterdam C, 1992. Xylanases and their application in bakery. En: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (Eds) Xylans and xylanases. Elsevier,Amsterdam, pp 349-360
 - Madhav P. Yadav, David B. Johnston, Kevin B. Hicks. 2009. Corn fiber gum: New structure/function relationships for this potential beverage flavor stabilizer. Food Hydrocolloids 23, 1488-1493
 - Marais Susan, 2008. Enzymatic hydrolysis with comercial enzymes of a xylan extracted from hardwood pulp, , University of Pretoria tesis de maestria, Departamento de Ingenieria Química, Facultad de ingeniería, ambiente y tecnología de la informacion
 - Michelin M, Peixoto-Nogueira SC., Silva TM, Terenzi JHF, Teixeira JA., Maria de Lourdes T. M. Polizeli. 2012. A novel xylan degrading b-D-xylosidase: purification and biochemical characterization. World J Microbiol Biotechnol 28,3179-3186
 - Miller, G L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428
 - Mohd Nizam B Zakariya, 2008.Isolation of Xylan degrading microorganism from local hotSpring. Tesis de licenciatura, Faculty of chemical and natural resources, University Malaysia Pahang
 - Montes, C., Ortega, J., Magaña I. 1998. Xylanases from *Cellulomonas flavigena*: purification and characterization Biotechnology Techniques, 12, 663-666
 - Niño-Medina G., Carvajal-Millán E, Lizardi J, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA., Gardea A., Martinez-Lopez AL, Guerrero V, 2009. Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking Food Chemistry 115, 1286-1290
 - Nout M.J., Sarkar P.K., 1999. Lactic acid food fermentation in tropical climates. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 395-401
 - NREL, National Renewable Energy Laboratory, Standard procedure No. 2CS (Determination of structural carbohydrate content in corn stover feedstocks by HPLC) revisado en linea septiembre 2013 en : <http://www.nrel.gov/>
 - Nuraida L, Wachter M.C., Owens JD.,1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough, World Journal of Microbiology & Biotechnology 11,567-571
 - Owens J.D. y Keddie R.M., 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. J.Appl. Bacteriol 32, 338-347
 - Paloheimo M., Piironen J., Vehmaanpera J., 2010. Xylanases and Cellulases as Feed Additives , En Michael R. Bedford & Gary G. Partridge (Eds) Enzymes in Farm Animal Nutrition, 2nd Ed., CAB International
 - Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Mavrogonatou, R., Blom, J., Papandreou, C., Hamodrakas, S. J., et al. (2014). Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. BMC Genomics 15:272. doi:10.1186/1471-2164-15-272
 - Paredes L.O., Saharopulos M.E., 1982. Scanning electronmicroscopy studies of limed corn kernels for tortilla making. J Food Tech 17, 687-693
 - Pérez-Avalos,O.,Ponce-Noyola,T.,Magaña-Plaza,I.,andDelaTorre,M.(1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. Appl.Microbiol.Biotechnol. 46, 405-409 .doi:10.1007/ BF00166237

- Phister Trevor G., O'Sullivan Daniel J., & McKay Larry L., 2004. Identification of Bacilysin, Chlorotetaine, and Iturin A Produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 Isolated from Pozol, a Mexican Fermented Maize Dough. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 631-634
- Pflugfelder, R.L., Rooney, L.W., Waniska, R.D. 1988a. Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chem.*, 65, 127- 132
- Pflugfelder, R.L., Rooney, L.W. y Waniska, R.D. 1988b. Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chem.* 65, 262-266
- Pointing Stephen B. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 2, 17-34
- Ponce-Noyola T, Perez Avalos O., 2002. Celulasas y xilanasas en la industria . *Avance y Perspectiva* 21, 273-277
- Ponce T., de la Torre M., 1995. Isolation of a high specific -growth- rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol* 42, 709-712
- Ponnambalam A.S., Deepthi R.S., Ghosh A.R., 2011. Qualitative Display and Measurement of Enzyme Activity of Isolated Cellulolytic Bacteria. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1, 33-37
- Poyart, C., Quesne, G., and Trieu-Cuot, P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp.coli' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1247-1255.
- Ragagnin de Menezes C, Serrano Silva I, Cristina Pavarina E, Franciscon Guímaro Dias EA, Gumaro Dias F, James Grossman M, Regina Durrant L., 2009. Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 673-678
- Rickard, P.A.D., Laughlin T.A., 1980. Detection and assay of Xylanolytic enzymes in a *Cellulomonas* isolate. *Biotechnology Letters* 2, 363-368
- Romero, B., Morosini, M.-I., Loza, E., Rodríguez-Baños, M., Navas, E., Cantón, R., et al. (2011). Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? *J. Clin. Microbiol.* 49, 3228-3233. doi:10.1128/JCM.00524-11
- Sahai D., Buendía M.O., Jackson D.S., 2001. Analytical techniques for understanding nixtamalized corn flour: particle size and functionality relationships in a masa flour sample. *Cereal Chem* 78, 14-18
- Saldaña G., Brown HE., 1984. Nutritional composition of corn and flour tortillas, *Food Science* 49, 1202-3,
- Salinas Moreno Y, Herrera Corredor J.A, Castillo Merino J., Pérez Herrera. 2003. Trabajos de Investigación Cambios físico-químicos del almidón durante la nixtamalización del maíz en variedades con diferente dureza de grano . *ALAN* 53 - Número 2
- Sanchez-Castillo CP, Englyst HN, Hudson GJ, Lara JJ, Solano ML, Mungumá JL, James A W., Philip T., 1999. The Non-Starch Polysaccharide Content of Mexican Foods, *J. of Food Composition & Anal.* 12, 293-314
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Régnault, B., Grimont, P. A. D., and Bouvet, A. (2000). *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. coli subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50(Pt 4), 1425-1434.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1981. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed, John Wiley and Sons, New York
- Songré-Ouattara L.T, Mouquet-Rivier C., Icard-Vernière C., Humblot C., Diawara B., Guyot J.P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128, 395-400
- Southgate, D.A.T., 1991. *Determination of food carbohydrates*. 2ª edición. Barking, UK, Elsevier Applied Science. pp. 107- 112
- Steinkraus, Keith H., 1983a. *Handbook of indigenous fermented foods*, Keith H. Steinkraus (ed). Marcel Dekker, Nueva York
- Steinkraus K.H., 1983b. Lactic Acid Fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 337-348
- Subramaniyan, S, Prema, P., 2003. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. *Critical reviews in Biotechnology*, 22, 33-64
- Sun RC., Fang M., Goodwin A., Lawther J. M., Bolton A. J., 1998. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. *Carbohydrate Polymers* 37, 351-359

- Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Geng Z.C., Fowler P., Baird M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw *Carbohydrate Polymers* 60 ,15-26
- Teather R. ,Wood P.,1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the BovinenRument. *J. App & Env. Mic.* 43, 777-780
- Ulloa M., Herrera T., 1972. Description of 2 new species of bacteria isolated from pozol: *Agrobacterium azotophilum* and *Achromobacter pozolis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 14, 15-24.
- Ulloa, M., 1974 Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Boletin de la Sociedad Mexicana de Micología* 8, 17-48.
- Utrilla Carreri José, 2004 .Evaluación de la Sobreexpresión de genes del metabolismo central de *Escherichia coli* etanologénica usando xilosa como fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Instituto tecnológico de Tuxtla Gutierrez , México
- Uniprot Database, revisado en línea Agosto, 2015 en: <http://www.uniprot.org>
- UniProtKB/Swiss-Prot revisado en línea, Noviembre 2011 en: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=cellulase+AND+%22lactic+acid%22&sort=score>
- Veeresh J, Jin CW. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* 30, 1219-1227
- Ventura M., O'Connell-Motherway M., Leahyb S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, van Sinderen D.,2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 120, 2-12,
- Wachter C., Cañas A., Bárzana E, Lappe P., Ulloa M, Owens J.D.,2000. Microbiology of Indian and mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 17, 251-256
- Wachter C., Cañas A., Cook P.E.,Bárzana E. y Owens J.D. , 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 2069-2074
- Wachter R., C., 2014. La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados " *Revista Digital Universitaria [en línea]* 15:8 . Consultada en línea en mayo 2019 : ISSN: 1607-6079.
- Watson SA., 1987. Structure and composition. En Stanley A. Watson, Paul E. Ramstad (Eds) *Corn: Chemistry and technology*. AACC, EUA
- Westby, A., Nuraida, L., Owens, J. D., and Gibbs, P. A. 1993. Inability of *Lactobacillus plantarum* and other lactic acid bacteria to grow on D-ribose as sole source of fermentable carbohydrate. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 168-175. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02763.x
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., and Uden, G., 2006. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids.*Appl.Microbiol.Biotechnol.* 72,421-429.doi:10.1007/s00253-006-0514-3

ANEXO 1

Preparación del medio líquido definido HSH

Medio definido HSH (Owens, 1969) contiene los nutrimentos necesarios para el crecimiento de bacterias lácticas.

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

Base E de minerales

Soluciones stock de minerales.

En la tabla 1 se muestran los minerales para prepararlas soluciones stock por separado, las cuales se almacenaron en refrigeración (4-6 °C)

Tabla 1. Soluciones stock para preparar la Base E de minerales

Mineral	g/L
K_2HPO_4	200
KH_2PO_4	156
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	4.96
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20
NaCl	10
$(NH_4)_2SO_4$	50

Mezcla de metales traza

Se preparó esta mezcla a partir de los reactivos en la tabla 2, éstos se disolvieron secuencialmente en aproximadamente 700 mL de agua destilada; después de cada adición se ajustó el pH a 6.0. Una vez adicionados todos los metales, se aforó la solución a un volumen de 1000 mL,. Se esterilizó por filtración y se almacenó a temperatura de refrigeración (4-6°C).

Tabla 2. Reactivos para preparar la mezcla de metales traza

Metales traza	g/L
EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$	6.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.57
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
H_3BO_3	0.229
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.161
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.157
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.151

Preparación de la base E de minerales (doble fuerza).

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

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

Solución stock	Volumen (mL)	g/L
Agua	900.00	-

K ₂ HPO ₄	10.4	2.08
KH ₂ PO ₄	9.6	1.50
CaCl ₂ ·6H ₂ O	20.0	0.10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0	0.40
NaCl	20.0	0.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	20.0	1.00
Metales traza	6.0	-

Mezcla de aminoácidos

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

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

Aminoácido	g/L
D-L alanina	5
L-arginina	5
D-L Ácido aspártico	5
Acido L- glutámico	5
L-lisina HCl	1
D-L metionina	1
Glicina	0.5
L-histidina	0.5
L-isoleucina	0.5
L-leucina	0.5
L-fenilalanina	0.5
L-prolina	0.5
L- serina	0.5
L-treonina	0.5
L-triptofano	0.5
Valina	0.5

Solución stock de vitaminas

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

Tabla 5. Mezcla I de vitaminas

Vitamina	mg/100 mL
Riboflavina	50
Ácido nicotínico	50
Pantotenato de Ca	50
Tiamina-HCl	50

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

Tabla 6. Mezcla II de vitaminas

Vitamina	mg/100 mL
Ácido fólico	10
Ácido p-aminobenzóico	10
Piridoxal HCl	10

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

Tabla 7. Mezcla III de vitaminas

Vitamina	mg/100 mL
Biotina	10
Cianocobalamina	10

Cisteína-HCl

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

Tirosina

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

Sulfato de Adenina.

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

Guanina-HCl

A 0.1 g de guanina-HCl se le adicionaron aproximadamente 50 mL de agua y suficiente HCl 3M para disolverla. La solución se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración.

Uracilo

Se preparó igual que la guanina-HCl.

Xantina

A 0.1 g de xantina se le adicionaron 50 mL de agua y suficiente hidróxido de amonio para disolverla. La solución se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración.

Composición del medio HSH

Los volúmenes de las soluciones stock requeridas para preparar 1000 mL de medio HSH se muestran en la tabla 8. La L-histidina se disolvió en la base E de minerales y se le adicionó agua. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1N. En forma aséptica se adicionaron los volúmenes de las soluciones stock. El carbohidrato correspondiente se adicionó en peso (g) después de agregar las soluciones stock correspondientes y antes de esterilizar. El medio se esterilizó 15 min a 121°C en autoclave.

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

Soluciones stock	Volumen
Agua	480
Base E de minerales	500
L-histidina	3.0 g
Mezcla de aminoácidos	10
Cisteina-HCl	1.0
Tirosina	1.0
Adenina-sulfato	1.0
Guanina HCl	1.0
Uracilo	1.0
Xantina	1.0
Mezcla de vitaminas	1.0
carbohidrato	variable

Composición por L de todos los componentes del medio HSH

Componente	g/l	Componente	g/l
METALES		AMINOACIDOS	
K ₂ HPO ₄	1.04	D-L alanina	0.05
KH ₂ PO ₄	0.7488	L-arginina	0.05
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.0496	D-L Ácido aspártico	0.05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	Ácido L-glutámico	0.05

NaCl	0.1	L-lisina HCl	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	D-L metionina	0.01
histidina	3	Glicina	0.005
Metales traza		L-histidina	0.005
EDTA Na ₂ .2H ₂ O	0.0189	L-iso-leucina	0.005
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0066	L-leucina	0.005
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.00171	L-fenilalanina	0.005
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0015	L-prolina	0.005
H ₃ BO ₃	0.000687	L-serina	0.005
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.000483	L-treonina	0.005
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.000471	L-triptofano	0.005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.000453	valina	0.005

Total proteína, 3.272 mg/mL

Vitamina	mg/L
Riboflavina	0.5
Acido nicotínico	0.5
Pantotenato de Ca	0.5
Tiamina-HCl	0.5
Ácido fólico	0.1
Ácido p-aminobenzoico	0.1
Piridoxal HCl	0.1
Biotina	0.1
Cianocobalamina	0.1
Cisteína-HCl	5
tirosina	5
Sulfato de Adenina	1
Guanina-HCl	1
Uracilo	1
Xantina	1