

00591
5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

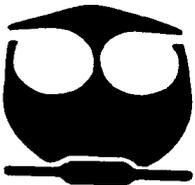
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR
BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS
AISLADAS DEL POZOL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
M. en C. GLORIA, DÍAZ RUIZ**

TUTORA: DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2003

A



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Se reconoce al Dr. José Mariano García Garibay y a la M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz por el apoyo brindado para continuar en su laboratorio el desarrollo de este proyecto durante el conflicto en la UNAM.

Se agradece a los Doctores David Collins y Paul Lawson por su ayuda en la obtención de secuencias del gen rRNA 16S.

Este proyecto fue apoyado parcialmente por PAEP UNAM (202309 y 103313). Durante los estudios de doctorado CONACYT y DGEP-UNAM me otorgaron una beca.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo del proyecto de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Agustín López-Munguía Canales	Inst. de Biotecnología, UNAM

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Gerardo Saucedo Castañeda	UAM-Iztapalapa
Vocal	Dr. Edgardo Escamilla Marván	I. Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Romina Rodríguez Sancio	I. Invest. Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. José Mariano García Garibay	UAM-Iztapalapa
Suplente	Dra. Gloria Soberón Chávez	I. Invest. Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A Carmen Wachter, por su confianza y apoyo incondicional. Por su ejemplo académico y humano.

A Francisco Ruiz, por su interés constante y la ayuda ilimitada.

A Jean-Pierre Guyot, por su cooperación entusiasta. Por sus enseñanzas.

A Eduardo Bárzana y Agustín López-Munguía, por sus aportaciones al proyecto y a mi formación profesional.

Al jurado de examen, por sus contribuciones para mejorar esta tesis.

A Daniel López, por la ayuda en el manejo de programas computacionales y por resolver las constantes dudas en el área computacional.

A Alejandro González Meza, por su valiosa colaboración en la realización de las figuras de esta tesis.

A Alicia Rivera Noriega, Jazmín Hernández Camacho, Ma. Jahel Escalona Mendoza, Verónica Rodríguez de San Miguel Arévalo, Norma Gabriela López Alcántara y Lilia Teresa Gutiérrez Dimas, por el apoyo en la realización del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 324, por la oportunidad de conocerlos y de compartir momentos inolvidables: Gabriela Baltierra, Alicia Rivera, Sandra Bolaños, Clementina Cueto, Teresita Sainz y Rina González.

A los profesores y compañeros de la Planta Piloto de Carnes de la UAM-Iztapalapa, por su solidaridad en momentos difíciles.

D

Al personal académico y a mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Microbiana Tropical del IRD de Montpellier, Francia, por ser parte de una experiencia fundamental en mi vida profesional y personal.

A los profesores del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, por su constante apoyo.

2

Amar significa comprometerse sin garantías,
entregarse totalmente con la esperanza de producir amor.
El amor es un acto de fe, y quien tenga poca fe también tiene poco amor.
Erich Fromm.

ESTA TESIS ESTA DEDICADA A AQUELLOS QUE TIENEN FE EN MÍ.

A Gloria y Carlos, mis padres. Por su amor infinito. Por su ejemplo. Por ser mi piedra angular.

A Claudia, César y Carlos, mis hermanos. Por ser mis más antiguos compañeros y amigos. Por estar presentes en las buenas y en las malas. Por su generosidad.

A Sebastián y Diego, mis sobrinos. Por su luz, por su fuerza. Por inundarnos de dicha con su sola presencia.

A Mónica Mora, Verónica Alcalá y Adolfo Seelbach, mis cuñados. Por su amor hacia mis hermanos y sobrinos. Por su amistad. Por ser parte importante de mi familia.

A Ma. del Carmen Barba Ruiz, mi prima y hermana. Por su cariño profundo.

A Mónica Serrano, Claudia Rodríguez, Lidia Estrada, Génaro Rivera, Gabriela Espino y Alejandro Roldán. Por el enorme privilegio de su amistad.

F

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	6
2.1 EL POZOL	6
Descripción	6
Elaboración	6
Microbiología del pozol	8
2.2 CARBOHIDRATOS DEL MAÍZ Y DEL NIXTAMAL	9
2.3 MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD AMIOLÍTICA EN EL POZOL	10
2.4 LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU CLASIFICACION	10
<i>Streptococcus</i>	11
<i>Lactococcus</i>	14
<i>Enterococcus</i>	15
<i>Carnobacterium</i>	16
<i>Pediococcus, Tetragenococcus y Aerococcus</i>	17
<i>Vagococcus</i>	18
<i>Lactobacillus</i>	18
<i>Leuconostoc</i>	19
<i>Weissella</i>	20
2.5 LAS AMILASAS Y LOS MICROORGANISMOS QUE LAS PRODUCEN	21
Almidón	21
Amilasas	21
Microorganismos con actividad amilolítica	22

2.6 BACTERIAS LÁCTICAS AMILOLÍTICAS	22
2.7 AMILASAS DE BACTERIAS LÁCTICAS	25
2.8 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR BACTERIAS LÁCTICAS	29
CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	34
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	35
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METODOS	36
6.1 Descripción de la muestra	36
6.2 Medición de pH	36
6.3 Cuantificación de bacterias lácticas y de bacterias lácticas amilolíticas	36
6.4 Cuantificación de otros grupos microbianos	36
6.5 Aislamiento de bacterias lácticas amilolíticas	37
6.6 Determinación de la vía metabólica	37
6.7 Identificación bioquímica	38
6.8 Ribotipificación	38
6.9 Determinación de las secuencias del gen rRNA 16S	40
6.10 Números de acceso de las secuencias de nucleótidos	40
6.11 Evaluación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a las células de bacterias lácticas del pozol	40
6.12 Caracterización de amilasas de <i>S. bovis</i> cepa 25124, <i>L. lactis</i> cepa A45212 y <i>E. sulfureus</i> cepa A36202.	41
a) Preparación de extractos crudos	41
b) Actividad amilolítica del extracto celular	42
c) Estimación del peso molecular	42
d) Efecto del pH en la actividad de la enzima (pH óptimo y estabilidad al pH).	42
e) Efecto de la temperatura en la actividad de la amilasa (temperatura óptima y estabilidad a la temperatura).	43
f) Energía de activación.	43
g) Productos de la hidrólisis del almidón.	44

6.13 Fermentación del almidón por una cepa de la especie dominante	44
a) Activación de la cepa	44
b) Preparación del precultivo	44
c) Cultivos	44
d) Seguimiento de la fermentación	45
e) Determinación de la concentración de biomasa	45
f) Parámetros de crecimiento	46
g) Medición de pH	46
h) Métodos analíticos	46
i) Actividad amilolítica asociada a las células	47
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	48
7.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL POZOL. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS.	48
Descripción de la etapa	48
Objetivos	48
Resultados y discusión	49
Conclusiones	56
7.2 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS EN EL POZOL MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN POLIFÁSICA.	57
Descripción de la etapa	57
Objetivo	57
Resultados y discusión	58
Evaluación de la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas mediante ribotipificación y análisis de la secuencia del rDNA 16S.	58
Caracterización de cepas por métodos fenotípicos.	64
Determinación de la vía metabólica	64
Identificación bioquímica de bacterias lácticas amilolíticas	65
Conclusiones	69
7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS AMILASAS	70

Descripción de la etapa	70
Objetivos	70
Resultados y discusión	71
Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a las células en las cepas de bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica.	71
a) Actividad amilolítica extracelular	71
b) Actividad amilolítica asociada a las células	71
Caracterización de las amilasas de <i>S. bovis</i> cepa 252124, <i>L. lactis</i> cepa A45212 y <i>E. sulfureus</i> cepa A36202.	72
Amilasa de <i>Streptococcus bovis</i> cepa 25124	72
a) Actividad amilolítica asociada a las células	72
b) Rompimiento celular y liberación de la enzima	72
c) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica de la enzima	73
d) Estimación del peso molecular de la enzima	75
Amilasa de <i>Lactococcus lactis</i> cepa A45212	76
a) Actividad amilolítica asociada a las células	76
b) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica de la amilasa	76
c) Estimación del peso molecular de la enzima	80
Amilasa de <i>Enterococcus sulfureus</i> cepa A36202	80
a) Actividad amilolítica asociada a las células	80
b) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica de la amilasa	81
Productos de hidrólisis del almidón	82
Conclusiones	86
7.4 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR <i>S. bovis</i> CEPA 25124	87
Descripción de la etapa	87
Objetivo	87
Resultados y discusión	88

Conclusiones	95
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL	96
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES	100
CAPÍTULO X. PERSPECTIVAS	102
CAPÍTULO XI. REFERENCIAS	103
ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA POR EL MÉTODO DE EXTINCIÓN DEL COMPLEJO ALMIDÓN- YODO.	118

LISTA DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Condiciones para la cuantificación de diversos grupos microbianos.	37
2	Concentración de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas y valores de pH durante la fermentación del pozol a 30°C.	49
3	Perfiles de fermentación de carbohidratos de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol (muestras A y B).	66
4	Rendimientos y cocientes metabólicos para <i>Streptococcus bovis</i> cepa 25124, <i>Lactobacillus manihotivorans</i> 18010 ^T , <i>Lactobacillus plantarum</i> A6 y <i>Lactobacillus fermentum</i> OgiE1.	89

LISTA DE FIGURAS.

Número	Título	Página
1	Grupos filogenéticos principales de las bacterias lácticas y de bacterias Gram-positivas con bajo y alto contenido de G+C en el DNA (% mol).	12
2	Morfologías de las bacterias lácticas amilolíticas en la fermentación del pozol, muestra A.	50
3	Distribución de los diámetros de hidrólisis en el medio MRS-almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol (muestra B).	52
4	Cuantificación de grupos microbianos durante la fermentación del pozol.	54
5	Dendrograma de la ribotipificación de las 40 cepas de bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica (muestras A y B) e identificación por comparación de secuencias del gen rRNA 16S.	59
6	Actividad amilolítica de la amilasa de <i>S. bovis</i> cepa 25124 en función del pH y de la temperatura.	73
7	Estabilidad al pH de la amilasa de <i>S. bovis</i> cepa 25124.	74
8	Estabilidad a la temperatura de la amilasa de <i>S. bovis</i> cepa 25124.	75
9	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de extractos celulares de <i>S. bovis</i> cepa 25124.	76
10	Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la amilasa de <i>L. lactis</i> cepa A45212.	77
11	Estabilidad a la temperatura y al pH de la amilasa de <i>L. lactis</i> cepa A45212.	77
12	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones	

	desnaturalizantes de extractos celulares de <i>L. lactis</i> cepa A45212.	80
13	Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la amilasa de <i>E. sulfureus</i> cepa A36202.	81
14	Productos de hidrólisis del almidón por la amilasa de <i>L. lactis</i> cepa A45212.	82
15	Productos de hidrólisis del almidón por la amilasa de <i>S. bovis</i> cepa 25124.	83
16	Crecimiento de <i>Streptococcus bovis</i> cepa 25124 en el medio MRS-almidón.	90
17	Presencia de carbohidratos en la fermentación del almidón por <i>S. bovis</i> cepa 25124.	91
18	Maltooligosacáridos presentes en la fermentación del almidón por <i>S. bovis</i> cepa 25124.	92
19	Hidrólisis del almidón por la amilasa de <i>S. bovis</i> cepa 25124.	119

RESUMEN

El pozol es una bebida ácida que se obtiene de la fermentación natural de la masa de nixtamal. Durante el proceso de nixtamalización del maíz, la concentración de mono- y disacáridos se reduce, dejando al almidón como el principal carbohidrato disponible para la fermentación ácido láctica. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol y sus principales características fisiológicas, con el fin de comprender su papel en este alimento. Mediante un enfoque fenotípico y molecular se caracterizaron las 40 cepas con mayor actividad amilolítica. Del dendrograma de la ribotipificación se observaron 4 grupos, de los cuales las cepas de *Streptococcus bovis* fueron las dominantes. Se identificaron también las especies *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*. Las amilasas de *S. bovis* y *L. lactis* están asociadas a la célula, son de alto peso molecular (200-250 kDa) y presentan mayor actividad en el intervalo de temperatura de 30-37°C y en valores de pH neutros. *S. bovis* cepa 25124 se caracterizó por tener un bajo rendimiento de amilasa relativo a la biomasa [$139 \text{ U (g células secas)}^{-1}$] y una baja velocidad específica de producción de amilasa [$130.7 \text{ U (g células secas)}^{-1} \text{ h}^{-1}$]. En contraste, la cepa mostró una alta velocidad específica de crecimiento (0.94 h^{-1}) y una conversión eficiente de sustrato en biomasa [$0.31 \text{ g biomasa (g sustrato)}^{-1}$]. Estas características le darían a *S. bovis* ventajas competitivas sobre otras especies de bacterias lácticas y explicarían su dominio. Los maltooligosacáridos producidos por estas bacterias desde las primeras horas de la fermentación podrían ser utilizados por las bacterias lácticas no amilolíticas del pozol, lo que explicaría sus altas cuentas al final de la fermentación. Estos constituyen los primeros resultados para comprender la importancia de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol.

ABSTRACT

Pozol is an acid beverage obtained from natural fermentation of nixtamal (heat and alkali treated maize) dough. The concentration of mono- and disaccharides from maize is reduced during nixtamalization, so that starch is the main carbohydrate available for lactic acid fermentation. In order to provide some basis to understand the role of amyolytic lactic acid bacteria (ALAB) in this fermented food, their diversity and physiological characteristics were determined. Forty amyolytic strains were characterized by phenotypic and molecular taxonomic methods. Four different biotypes were distinguished through ribotyping, of which *Streptococcus bovis* strains were dominant. *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus sulfureus* strains were also identified. Amylases from *S. bovis*, *L. lactis* and *E. sulfureus* are cell-associated, of high molecular weight (200-250 kDa), with optimum temperature of 30-37°C and neutral pH. *S. bovis* strain 25124 showed extremely low amylase yield relative to biomass [$139 \text{ U}(\text{g cell dry weight})^{-1}$] and specific rate of amylase production [$130.7 \text{ U}(\text{g cell dry weight})^{-1} \text{ h}^{-1}$]. In contrast, it showed a high specific growth rate (0.94 h^{-1}) and an efficient energy conversion yield to bacterial cell biomass [$0.31 \text{ g biomass}(\text{g substrate})^{-1}$]. These would confer the strain competitive advantage and are the possible reasons for its dominance. Transient accumulation of maltooligosaccharides during fermentation could presumably serve as energy sources for non-amyolytic species in pozol fermentation. This would explain the observed diversity and the dominance of non-amyolytic lactic acid bacteria at the end of fermentation. These results are the first step to understand the importance of ALAB during pozol fermentation.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida, refrescante, no alcohólica que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado. Es de origen maya y hasta la fecha la siguen consumiendo grupos indígenas y mestizos del sureste de México (Ulloa y col. 1983).

La fermentación del pozol es efectuada por una microbiota natural constituida por bacterias, hongos y levaduras (Wacher y col. 1993). Las bacterias lácticas son el grupo predominante durante la fermentación del pozol. Su concentración inicial en masas frescas es de $10^5 - 10^6$ ufc/g, mientras que a las 48 h esta concentración puede llegar hasta 10^9 ufc/g. Las bacterias lácticas del pozol forman un grupo heterogéneo y se han identificado los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella* (Nuraida y col. 1995; Wacher y col. 2000; Ampe y col. 1999; Escalante y col. 2001).

El almidón es el principal carbohidrato del maíz (72 – 73%), otros carbohidratos como la sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa constituyen una proporción pequeña del grano (1 – 3%) (Boyer y Shannon, 1987). En el proceso de nixtamalización del maíz (cocción alcalina, remojo y lavado del grano) se reduce drásticamente la concentración de los mono- y disacáridos. La concentración de sacarosa, el más abundante entre los disacáridos, se reduce de 2 a 0.1 - 0.7 g/100 g en base seca (Santillana, 1995; Díaz, 1996).

Si en el nixtamal, sustrato de la fermentación del pozol, la concentración de mono y disacáridos es tan reducida, entonces, a partir de ellos, no se explicarían una diversidad microbiana tan rica y números tan altos de bacterias lácticas totales.

En este trabajo se propone que el almidón es el principal sustrato disponible para la fermentación ácido láctica y que las bacterias lácticas que cuenten con la capacidad de hidrolizarlo tendrán un papel fundamental.

El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol y sus principales características fisiológicas, con el fin de comprender su papel en este alimento.

Los resultados de este trabajo se separaron en cuatro partes. En la primera se determinó la importancia de las bacterias lácticas amilolíticas para la fermentación del pozol. Se establecieron los números de bacterias lácticas totales y bacterias lácticas con capacidad amilolítica presentes en las diferentes etapas de la fermentación del pozol. También se realizó el conteo de otros grupos microbianos tales como mesófilos aerobios, hongos y levaduras. De cada etapa de la fermentación se aislaron, caracterizaron y conservaron cepas de bacterias lácticas amilolíticas. De esas cepas, se observó la morfología y se determinó la actividad amilolítica mediante la medición de los diámetros de los halos de hidrólisis en el agar MRS-almidón.

El proceso de obtención del nixtamal, sustrato de la fermentación del pozol, puede afectar la composición de la microbiota, específicamente de las bacterias lácticas amilolíticas. En la segunda parte se identificaron las cepas de bacterias lácticas aisladas con mayor actividad amilolítica mediante pruebas fenotípicas, como el perfil de fermentación de carbohidratos y genotípicas como la ribotipificación y el análisis de la secuencia del rDNA 16S. Se determinó cuales eran las especies presentes y cual de ellas era la predominante entre las bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica. Así mismo, se determinó si las especies encontradas son similares a las que se encuentran en otros alimentos fermentados tradicionales amiláceos.

La hidrólisis eficiente del almidón durante la fermentación del pozol dependerá de las características bioquímicas de las amilasas producidas por las bacterias lácticas. En la tercera parte se detallaron las propiedades generales de

las amilasas producidas por tres de las especies de bacterias lácticas identificadas. Se determinó la proporción de la actividad amilolítica detectada en el medio de crecimiento respecto a la que mantiene unida a las células. En los extractos crudos se evaluó el efecto del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica, se estimó el peso molecular de la amilasa y se determinaron los productos de hidrólisis del almidón.

En la última parte se evaluó la cinética de fermentación en almidón soluble por una cepa de la especie dominante con el fin de determinar las condiciones bajo las cuales esta cepa crece en presencia de ese sustrato y la forma en que su amilasa lo hidroliza. Durante la fermentación se evaluó el pH, las concentraciones de biomasa, el ácido láctico, el almidón residual, los azúcares totales y reductores, así como mono- di y oligosacáridos. Se cuantificó la actividad amilolítica y se determinaron los parámetros de crecimiento de la cepa tales como la velocidad específica de crecimiento, los cocientes metabólicos y los rendimientos.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 EL POZOL.

Descripción.

El pozol, del náhuatl *pozolli* que significa espumoso, es una masa de maíz fermentada, moldeada en forma de bolas de diferentes formas y tamaños. El pozol es consumido por pueblos indígenas y mestizos principalmente en estados del sureste de México como Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y en menor proporción en Veracruz y Oaxaca. Para su consumo, las bolas de pozol son diluidas con agua, para obtener una bebida de sabor ácido a la que opcionalmente puede adicionársele sal, chile, azúcar o miel (Ulloa y col. 1983).

Elaboración.

Ulloa y col. (1983) indicaron que el pozol se prepara para consumo familiar o comercial a baja escala, según un proceso tradicional que se ha transmitido generacionalmente. El nixtamal es el sustrato de la fermentación del pozol. El proceso de nixtamalización, que es similar al usado para la preparación de tortillas, consiste en la cocción alcalina del grano en exceso de agua, reposo y lavado del grano (Trejo-González y col. 1982). El nixtamal (maíz cocido y lavado) se muele para obtener una masa martajada a la que se le da forma esférica manualmente. Las bolas así formadas se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se fermentan durante un tiempo que varía de 1 a 14 días o más, dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevalecientes (Cañas y col. 1993). Los mestizos de Chiapas han modificado el proceso tradicional indígena agregando un paso extra de cocción para reducir la cantidad de sedimento sólido presente en la bebida cuando la masa se suspende en agua (Wacher y col. 2000).

En Villahermosa, Tabasco, el consumo de pozol se encuentra muy arraigado en la población. El pozol se consume sobre todo en la mañana o a medio día como parte de los hábitos de los ciudadanos y como forma de mitigar

el calor. La producción del pozol, inicialmente doméstica, se ha hecho comercial y hoy en día constituye una actividad económica importante. De hecho, hay un buen número de productores de pozol que venden su producto en el mercado o en locales comerciales denominados "pozolerías". La mayoría de los productores venden tanto la masa de pozol como la bebida ya preparada y las cantidades de pozol destinadas a la venta pueden sobrepasar los 300 kg por día. En un trabajo de campo realizado por Río (1999), se encuestaron un total de 62 pozolerías en tres zonas de esa ciudad. Los hábitos de consumo de pozol en Tabasco, específicamente en Villahermosa, son diferentes a los observados en otras zonas del sureste de México. La población, en su mayor parte, prefiere el pozol fresco y con cacao, aun cuando inicialmente se consumía natural y fermentado. El proceso de fabricación del pozol natural en Villahermosa es similar al que se describe para el pozol indígena en el estado de Chiapas, aunque hay que considerar algunas diferencias. Durante la nixtamalización del maíz, prácticamente se omite el reposo del grano en el agua de cocción, ya que se lava inmediatamente después de la cocción. El nixtamal se muele en pequeños molinos y la masa martajada se mezcla con agua para formar bolas de 1 hasta 30 kg, las cuales están listas para venderse o consumirse como bebida. Al pozol también se le puede adicionar cacao y en ese caso los granos de cacao se pasan por el molino al mismo tiempo que el maíz o se muelen por separado hasta formar una pasta que se agrega a la masa al momento de obtener el pozol. El producto que se fermenta hasta por 15 días, se vende como "pozol agrio". Para preparar la bebida, la masa se mezcla manual o mecánicamente (en licuadora) con agua y otros ingredientes (azúcar, leche, horchata), según los gustos del consumidor. La mayor parte de las ventas son de pozol con cacao. Para algunos habitantes de Tabasco, el verdadero pozol es el "pozol con cacao". Algunos consumidores consumen el pozol acompañándolo con conservas (frutas confitadas), sal o chile. Consumen el pozol no sólo hombres y mujeres, sino también los niños. Su inicio en el consumo se da alrededor de 1 año de edad.

Microbiología del pozol.

La fermentación del pozol es efectuada por una microbiota natural que es consecuencia de la contaminación del nixtamal durante la molienda y está constituida por bacterias, levaduras y hongos (Wacher y col. 1993). Las bacterias lácticas son el grupo principal entre las bacterias Gram positivas del pozol de acuerdo con los resultados obtenidos al utilizar técnicas tradicionales de cultivo (Nuraida y col. 1995) y de técnicas moleculares que dependen o no del cultivo de los microorganismos (Ampe y col. 1999; Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante y col. 2001). No existe un consenso sobre cuál es el principal grupo de bacterias lácticas encontrado en muestras de pozol. *Leuconostoc* spp. fue el microorganismo predominante entre las cepas de bacterias lácticas aisladas (23 de 46 cepas) de muestras de pozol del estado de Chiapas, aunque también se identificaron *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuraida y col. 1995). Cuando se evaluó la diversidad de las bacterias lácticas del pozol mediante la secuencia de una biblioteca de clonas de una región del gen ribosomal 16S, se determinó que *Lactococcus lactis* fue el organismo más abundante y que también se encontraban presentes las especies *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus delbruekii*. En este trabajo no se detectaron especies nuevas de microorganismos, pero sí bacterias lácticas que no se habían reportado previamente en el alimento (Escalante y col. 2001). Mediante la técnica del DGGE se determinó la huella de la comunidad microbiana de una muestra de pozol con 5 días de fermentación. La banda más intensa correspondió a especies de *Streptococcus*. *S. bovis* fue el pariente más cercano que se encontró cuando se comparó la secuencia y se encontró en todos los tiempos de fermentación (Ampe y col. 1999). La cuantificación de los RNA's de los taxos microbianos usando sondas de oligonucleótidos, corroboró que el grupo de *Streptococcus* fue el principal grupo activo de la población del pozol (Ben Omar y Ampe, 2000). También se identificaron otras bacterias lácticas que no se habían detectado antes: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

fermentum, *Lactobacillus pentosus* y *Weissella paramesenteroides* (Ampe y col. 1999); así como *Enterococcus sacharolyticus* y *Lactobacillus delbrueckii* (Ben Omar y Ampe, 2000).

Además de las bacterias lácticas, en el pozol se han identificado otras especies de bacterias como *Bacillus minimum* (Ben Omar y Ampe 2000), *Bacillus subtilis* (Ampe y col. 1999), *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus lentus* (Rivera, 2001), *Clostridium* sp. (Escalante y col. 2001), *Acetobacter* sp. (Ampe y col. 1999), *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bifidobacterium minimum*, *Sphingomonas* sp. (Ben Omar y Ampe, 2000) y diferentes serotipos de *E. coli* (Sainz y col. 2001). Asimismo, se han identificado hongos como *Geotrichum candidum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium* sp. (Ulloa y col. 1987), *Phoma glomerata*, *Phoma fimeti* y *Penicillium fellatanum* (Wacher y col. 2000), así como las levaduras *Candida guilliermondii* var *guilliermondii* (Ulloa y col. 1987), *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debariomyces hansenii* y *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (Wacher y col. 2000). Mediante la técnica de DGGE se detectó la presencia de hongos y levaduras tanto en la superficie como en el interior de la bola de pozol pero no se precisaron géneros ni especies (Ampe y col. 1999).

2.2 CARBOHIDRATOS DEL MAÍZ Y DEL NIXTAMAL.

El principal carbohidrato del maíz es el almidón (72-73%) y los mono y oligosacáridos, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, representan del 1 al 3 % del grano (Boyer y Shannon, 1987). Sin embargo, la concentración de estos carbohidratos disminuye durante el proceso de nixtamalización debido a las pérdidas de azúcares del maíz en las aguas de cocción y lavados. Trejo-González y col. (1982) reportan una concentración de 14.5 g/L de carbohidratos totales en el nexayote (agua de cocción de nixtamal para la producción de tortillas). De los carbohidratos solubles de la harina de maíz nixtamalizada se han detectado: glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, siendo este último el que

se encuentra en mayor concentración: 0.4 - 0.9 g/100 g materia seca (Santillana, 1995; Díaz, 1996).

2.3 MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD AMILOLÍTICA EN EL POZOL.

En el pozol se ha detectado la presencia de bacterias lácticas amilolíticas. La mayoría de las bacterias lácticas aisladas por Nuraida y col. (1995) hidrolizaron el almidón en cajas, mientras que Ampe y col. (1999) aislaron diversas cepas de *L. fermentum* con actividad amilolítica de una muestra de pozol de 5 días de fermentación y sugieren un papel importante de este microorganismo en la fermentación.

También se ha descrito la presencia de microorganismos no lácticos con actividad amilolítica en el pozol. Dichos estudios incluyen bacterias del género *Bacillus*, hongos y levaduras. El 50% de las levaduras aisladas por Nuraida y col. (1995) hidrolizaron el almidón en medio sólido y sólo algunas cepas lograron hacerlo en medio líquido, mientras que en una muestra de pozol de 5 días de fermentación se aislaron hongos y levaduras que carecieron de actividad amilolítica (Ampe y col. 1999). Rivera (2001) estudió el efecto de la presencia de un microorganismo amilolítico, *Bacillus lentus*, en el crecimiento de una bacteria láctica no amilolítica, *Lactobacillus plantarum* durante la fermentación del nixtamal y observó que el crecimiento de *B. lentus* se inhibía por los ácidos producidos por *L. plantarum*, por lo que *B. lentus* no aportaba azúcares simples para la bacteria láctica, a pesar de que en cultivo puro se había detectado actividad. En este trabajo también se evaluó la actividad amilolítica de algunos hongos aislados del pozol, *Phoma glomerata*, *Cladosporium* sp. y *Cladosporium cladosporoides* y se detectó menor actividad amilolítica que en las cepas de *Bacillus*.

2.4 LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU CLASIFICACIÓN.

El enfoque clásico de la taxonomía bacteriana se basa en características morfológicas y fisiológicas. Este enfoque se amplió para incluir la composición

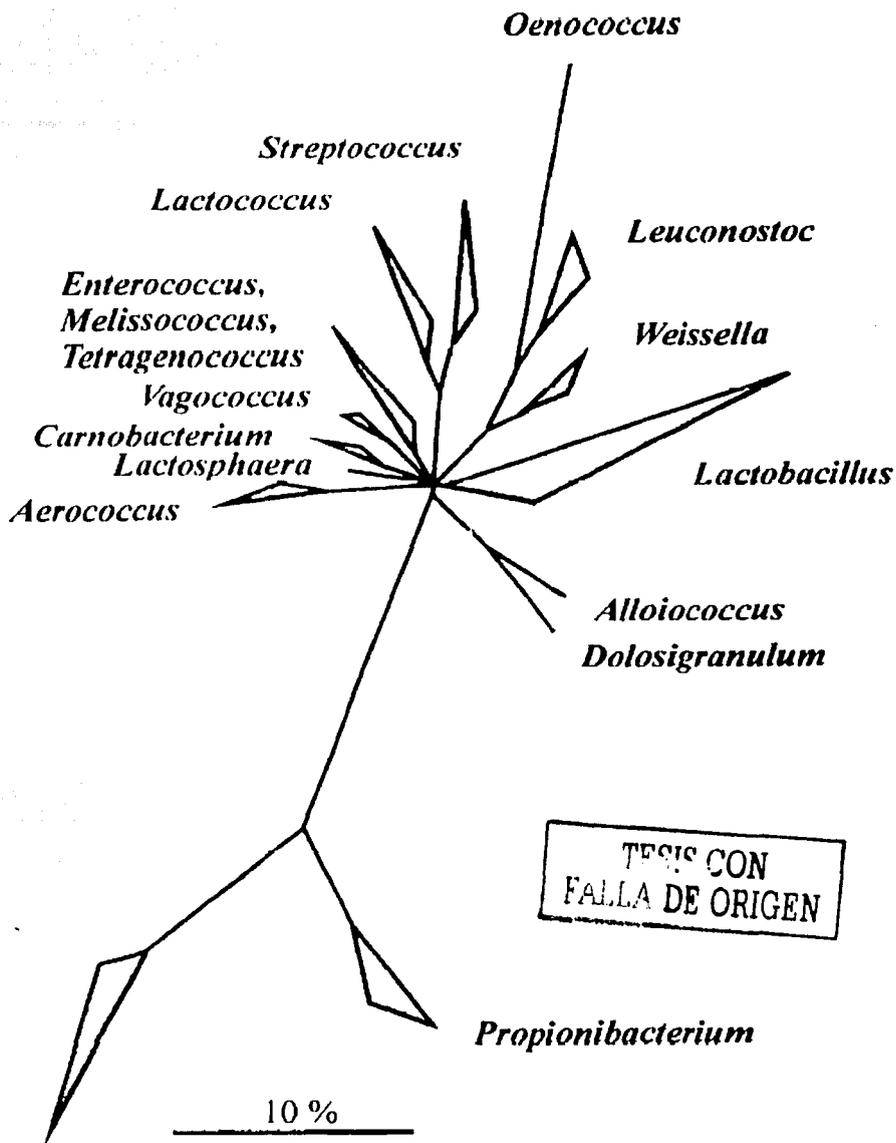
de la pared celular, los ácidos grasos celulares, las quinonas isoprenoides y otras características de las células. Con frecuencia, la caracterización fenotípica se ve obstaculizada debido a la expresión variable de ciertos genes y a la interpretación ambigua que comúnmente se hace de esos datos. Actualmente, las características moleculares, tales como el contenido de G + C del DNA (% mol), las propiedades electroforéticas de los productos de los genes, los estudios de hibridación DNA:DNA y las estructuras y las secuencias del RNA ribosomal (rRNA), son herramientas taxonómicas importantes. Esto ha provocado cambios dramáticos en la taxonomía de las bacterias lácticas (Schleifer, 1987). En los últimos años se realizan estudios taxonómicos intensos y ha aumentado la urgencia para usar una aproximación polifásica que involucre la caracterización fenotípica y filogenética de las bacterias, Figura 1 (Vandamme y col. 1996; Stiles y Holzapfel, 1997).

Filogenéticamente, las bacterias lácticas pertenecen a la rama clostridial de las bacterias gram-positivas. Son catalasa negativa, no forman esporas, son cocos, cocobacilos o bacilos que tienen un contenido de G+C menor al 55% mol en su DNA. Las bacterias lácticas de importancia en alimentos pertenecen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Vandamme y col. 1996).

***Streptococcus*.**

La taxonomía del género *Streptococcus* ha sufrido revisiones importantes. El árbol evolutivo de la rama Clostridium de las bacterias gram positivas, basado en las similitudes de las secuencias del rRNA 16S, mostró que era apropiado separar los estreptococos en tres grupos genéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; 1987).

En la actualidad existen aproximadamente 40 especies dentro del género *Streptococcus*. Mediante el análisis comparativo de las secuencias del rDNA 16S se demostró que la mayoría forman parte de seis grupos de especies:



Bifidobacterium

Figura 1. Grupos filogenéticos principales de las bacterias lácticas y de bacterias Gram positivas con bajo (parte superior) y alto (parte inferior) contenido de G+C en el DNA (% mol). Basado en el análisis comparativo de secuencias del rRNA 16S. — % de divergencia (Stiles y Holzapfel, 1997).

"piogénico", mitis, salivarius, bovis, anginosus y mutans (Hardie y Whiley, 1995). Dentro de las especies que aún permanecen en este género destacan los estreptococos orales y patogénicos; *S. thermophilus* es una excepción en este género debido a su importancia como cultivo iniciador para la elaboración de queso y yogurt, de hecho es el único microorganismo clasificado todavía como *Streptococcus* que se usa como cultivo iniciador en alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997).

S. bovis es un habitante normal del tracto digestivo de rumiantes y de humanos. Diversos grupos han estudiado la diversidad bioquímica y genética entre cepas de esta especie y han definido esquemas para distinguir cepas por medio de biotipos. Se dice que las cepas de *S. bovis* de humanos son del biotipo I (o típicas) si fermentan el manitol y del biotipo II si no lo hacen. Dentro de este último, la fermentación de la trehalosa permite diferenciar los sub-biotipos II1 (trehalosa negativo) y el sub-biotipo II2 (trehalosa positivo). Existen otras características que permiten igualmente diferenciar los sub-biotipos, ya que a diferencia de las cepas del sub-biotipo II1, las cepas del sub-biotipo II2 no producen ácido a partir de almidón ni de glucógeno y ambas producen una β -glucuronidasa y una β -galactosidasa. La cepa tipo de *S. bovis* (la cepa NCDO 597) pertenece al biotipo II (Euzéby, 2000; Ciarridge y col. 2001).

El estatus taxonómico de las cepas de *S. bovis* ha evolucionado en las últimas décadas y ha cambiado progresivamente de acuerdo con la descripción de nuevas especies originalmente identificadas como *S. bovis*. En los años 90 se describieron cuatro nuevas especies, *Streptococcus gallolyticus* (Osawa y col. 1995), *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou y col. 1998), *Streptococcus infantarius* (Bouvet y col. 1997) y *Streptococcus waius* (Flint y col. 1999) aunque Manachini y col. (2002) reclasificaron a *S. waius* como *S. macedonicus*. Se han desarrollado tecnologías basadas en los ácidos nucleicos, tales como la hibridación DNA:DNA o la amplificación de secuencias blanco seleccionadas, para complementar y mejorar la identificación de estreptococos a nivel de especie (Poyart y col. 2002). Farrow y Collins (1984) demostraron con base en

los datos de hibridaciones DNA:DNA que las cepas de *S. bovis* pueden clasificarse en 6 grupos genómicos que muestran entre el 40 y 60% de similitud de DNA entre ellos. Estos autores también demostraron que las cepas del biotipo I fueron genotípicamente homogéneas y distintas de las cepas del biotipo II, el cual incluye las cepas tipo de *Streptococcus bovis* y *Streptococcus equinus*. Más recientemente, Clarridge y col. (2001), basados en el análisis de las secuencias del rDNA 16S, sugirieron que las cepas de *S. bovis* del biotipo II2 constituyen una especie separada que es diferente de *S. bovis*, *S. gallolyticus* y *S. infantarius*. Poyart y col. (2002) realizaron un análisis taxonómico del grupo de *S. bovis*, mediante el análisis de secuencias del gen *sodA* (el cual codifica para la superóxido dismutasa dependiente de oxígeno) y demostraron la utilidad de la base de datos basada en la *sodA* para la identificación de cepas del complejo *S. bovis*-*S. equinus*. Estudios filogenéticos de las secuencias de los genes *sodA* y experimentos de hibridación DNA:DNA soportan el reconocimiento de dos especies nuevas distintas dentro del género *Streptococcus*, para las cuales se propusieron los nombres *Streptococcus lutetiensis* (antes *S. infantarius* subsp. coli) y *Streptococcus pasteurianus* (antes *S. bovis* biotipo II2).

Lactococcus.

Las especies de *Lactococcus* se han aislado de plantas, tales como maíz fresco y congelado, frijoles, coles, lechuga, chícharos, trigo, papas, calabazas y melón. No se han encontrado en materia fecal ni en suelos.

Las subespecies de *Lc. lactis* son de gran importancia económica y se han estudiado mucho sus características bioquímicas y fisiológicas, así como su efecto en los alimentos. Comúnmente, *Lc. lactis* se ha aislado de plantas aunque el hábitat más reconocido para los lactococos son los productos lácteos. Las cepas tipo se han aislado de leche cruda, leches fermentadas y quesos diversos. Son bacterias homofermentativas de forma cocoide, no móviles que crecen a 10°C pero no a 45°C, no crecen en presencia de 6.5% de NaCl ni a pH 9.6. Producen ácido L (+) láctico a partir de glucosa. La especie *Lc. lactis* es

capaz de fermentar el almidón a diferentes niveles de reacciones positivas (10-90%) aunque son incapaces de fermentar el glucógeno. Mediante la adquisición de plásmidos que codifican el sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS) algunas cepas están bien adaptadas para crecer en leche debido a un eficiente consumo y fermentación de la lactosa (Roissart y Luquet, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Teuber, 1995). El género *Lactococcus* incluye algunas especies no comunes, como *Lc. garvieae* asociada con mastitis en vacas, *Lc. piscium* aislada de salmones, *Lc. plantarum* aislada de chicharos congelados y *Lc. raffinolactis* aislada de leche bronca (Stiles y Holzapfel, 1997).

Enterococcus.

La taxonomía de este grupo de bacterias es vaga, ya que no hay características fenotípicas que separen al género de los otros cocos que son gram positivos y catalasa negativos (Stiles y Holzapfel, 1997). Por razones prácticas se utiliza la siguiente descripción para las bacterias del género *Enterococcus*: cocos gram positivos, catalasa negativos, capaces de crecer en caldo con 6.5% de NaCl y de tener buen crecimiento en un medio con 0.04% de azida de sodio. Esta es comúnmente usada en el aislamiento selectivo de enterococos y puede usarse para la identificación presuntiva del género *Enterococcus*. En caso de duda, pueden hacerse las pruebas de fermentación de ribosa y Voges-Proskauer, con resultados generalmente positivos. En forma típica, solo *S. bovis* presenta colonias características similares a las clásicas de enterococos en medios selectivos. *S. bovis* es ribosa negativo y no crece en 6.5% de NaCl (Devriese y col. 1993).

La aplicación de técnicas genéticas para diferenciar los enterococos ha resuelto algunas de las imprecisiones con estas bacterias. Desde el reestablecimiento del género en 1984, se han transferido un total de 9 especies hacia el género *Streptococcus* y se han agregado 10 nuevas especies (Stiles y Holzapfel, 1997).

Los enterococos se encuentran típicamente en el tracto intestinal y en las heces de hombres y animales. Algunas especies se han aislado del suelo, de

alimentos, agua y plantas. Su capacidad para crecer y sobrevivir bajo un amplio rango de condiciones ambientales, incluyendo temperaturas extremas y concentraciones altas de sal probablemente influyan para su distribución casi ubicua (Devriese y Pot, 1995).

La importancia de los enterococos para los microbiólogos de alimentos y de salud pública está relacionada con su hábitat entérico, su uso como indicadores para la seguridad alimentaria y su posible involucramiento en enfermedades de origen alimentario.

Los enterococos también se han utilizado como cultivos iniciadores en algunos alimentos y están disponibles comercialmente como probióticos para la prevención y tratamiento de trastornos intestinales de hombres y animales. En particular, *E. faecium* está asociado con la fermentación de quesos del sur de Europa y frecuentemente se aplican en su procesamiento. Algunas de las especies de *Enterococcus* descritas recientemente son de origen clínico, como *E. durans* y *E. flavescens*, mientras que las especies pigmentadas como *E. sulfureus* se han aislado principalmente de plantas (Stiles y Holzapfel, 1997). Las bacterias de esta última especie, descrita por Martínez-Murcia y Collins (1991), son de color amarillo y no móviles. Crecen a 10 y 40°C pero no a 45°C, en medios con NaCl al 6.5% y sobre agar bilis-esculina. No se ha reportado que esta especie produzca ácido láctico a partir del almidón pero se sabe que no lo hace a partir de glucógeno.

***Carnobacterium*.**

Los análisis comparativos de las secuencias del rRNA 16S del género *Carnobacterium* indicaron que estos organismos son diferentes del resto de las bacterias lácticas. Filogenéticamente, *Carnobacterium* está más relacionado al género *Enterococcus* y *Vagococcus* que con los lactobacilos, aún cuando se asemejan mucho a éste último. Las carnobacterias asociadas con alimentos tienen características fisiológicas en común con los enterococos (y no con los lactobacilos), especialmente su capacidad para crecer a pH 9.5, resistencia al acetato, resistencia a antibióticos y requerimientos de vitaminas. Existe poca

información disponible sobre la asociación de carnobacterias con alimentos diferentes a la carne de res, pollo y pescado. Se ha reportado a *C. piscicola* y *C. divergens* como microorganismos que predominan en la microflora de queso blanco madurado con hongos (Millière y col. 1994). Aún se desconoce el hábitat original de estas especies (Stiles y Holzapfel, 1997).

***Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Aerococcus*.**

La formación de tétradas y su forma esférica sirvieron como características clave para su reconocimiento inicial. Los pediococos eran las únicas bacterias lácticas que se dividían en dos planos para producir tétradas o pares, pero los cambios taxonómicos han aumentado el número de géneros formadores de tétradas a tres: *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Aerococcus*. Es común confundir a los pediococos con microcococos y con aerocococos, debido a sus similitudes morfológicas, producción de pseudocatalasa y tolerancia a la sal. Collins y col. (1991) demostraron que el género *Pediococcus* es filogenéticamente heterogéneo y que existe una relación entre los pediococos y los lactobacilos del grupo *Lb. casei* a pesar de sus diferencias morfológicas. *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus* se agrupan evolutivamente con *Lb. pentosus*, *Lb. brevis* y *Lb. buchneri*.

Es frecuente encontrar bajos números de pediococos, junto con leuconostocs y lactobacilos, en plantas, en diversos alimentos y como agentes de descomposición en bebidas alcohólicas tales como la cerveza. Los pediococos son importantes cultivos iniciadores en salsas fermentadas de diversas regiones. Algunos de esos cultivos, tales como *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* producen bacteriocinas. Los pediococos crecen poco en leche debido a que no usan rápidamente la lactosa. Algunas especies muestran tolerancia extrema a la temperatura, al pH y al NaCl. *P. halophilus*, microorganismo importante en la fermentación de la soya moromi para producir salsa, crece en 18% de NaCl, pero se ha transferido al género *Tetragenococcus*, el cual está más relacionado con enterococos y carnobacterias que con los pediococos y lactobacilos. Las cepas pertenecientes a *P. urinaeequi*, se

transfieren al género *Aerococcus*. En este género también se encuentran *A. viridans* y *A. urinae*. El hábitat de estas especies no se relaciona con alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997; Dellaglio y col. 1994).

***Vagococcus*.**

Mediante los estudios de comparación de secuencias del rRNA 16S se estableció que el grupo de estreptococos N móviles está más relacionado al género *Enterococcus*, a las carnobacterias y a *Listeria* que a los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* (Collins y col. 1993; Devriese y col. 1993). El grupo estreptococos N móviles aislado de heces de pollos y de agua de río se nombró *Vagococcus fluvialis* (Collins y col. 1989). De salmón enfermo se aisló una especie nueva, *V. salmoninarum* (Wallbanks y col. 1990).

***Lactobacillus*.**

La división clásica de los lactobacilos estaba basada en sus características fermentativas: (1) homofermentativos obligados; (2) heterofermentativos facultativos y (3) heterofermentativos obligados. Diversos lactobacilos de los grupos 1 y 2 y algunos lactobacilos heterofermentativos del grupo 3 se usan para producir alimentos fermentados, pero los del grupo 3 están comúnmente asociados con la descomposición de alimentos. El género *Lactobacillus* es heterogéneo, contiene del 33 al 55 de G+C en el DNA (% mol) (Collins y col. 1991; Hammes y Vogel, 1995). Los lactobacilos son fermentativos estrictos y tienen requerimientos nutricionales complejos. Son acidúricos o acidofílicos, produciendo un pH de 4.0 en alimentos que contienen carbohidratos fermentables. Como resultado, inhiben el crecimiento de otras bacterias o las matan. Generalmente se acepta que los lactobacilos se desarrollan a un pH máximo de 7.2, aunque existen excepciones en cuanto a los sustratos y a las cepas. Los lactobacilos son utilizados como cultivos iniciadores para diferentes variedades de queso, alimentos fermentados vegetales, carnes fermentadas, en la producción de vino y cerveza, masas panaderas acidificadas y ensilados (Stiles y Holzapfel, 1997).

Leuconostoc.

La clasificación original de las bacterias, basada en la morfología, colocó al género *Leuconostoc* cerca de los estreptococos, un género aparte que incluía a los "cocos heterofermentativos" inicialmente llamados betacocos por Orla-Jensen en 1924. Se caracterizan por producir D(-) lactato a partir de glucosa, a diferencia de los lactococos, que producen L(+) lactato y al DL-lactato producido por los lactobacilos heterofermentativos, con quienes comparten algunas características. *Leuconostoc* es el género predominante entre las bacterias lácticas de plantas, siendo *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* el que se aísla más. En los alimentos fermentados de origen vegetal, generalmente *Leuc. mesenteroides* es el primer organismo que crece y luego le siguen lactobacilos más tolerantes a la acidez (Stamer, 1975). A *Leuconostoc* se le asocia con la producción de compuestos aromáticos a partir del citrato en fermentaciones lácticas y la producción de dextranas que tienen amplias aplicaciones en la investigación, la industria y la medicina. En el procesamiento del azúcar, la presencia de *Leuconostoc* provoca descomposición del producto (Holzapfel y Schillinger, 1991). *Leuconostoc* incluye tres grupos o líneas evolutivas distintas. Al grupo principal, se le ha denominado *Leuc. sensu stricto* basado en una homología de la secuencia del 97-99%. De este se han diferenciado tres subgrupos: (i) *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides*; (ii) *Leuc. lactis* y *Leuc. citreum*; y (iii) los aislados de la carne *Leuc. carnosum* y *Leuc. gelidum*. El organismo atípico parecido a leuconostoc aislado de col fermentada por Schillinger y col. (1989) tiene 94-96% de homología con *Leuc. sensu stricto* y representa una especie nueva designada *Leuc. fallax* (Martínez-Murcia y Collins, 1991). En un estudio de *Leuconostoc* spp. aislados de leche bronca en Argentina, se encontró que del 7 al 10% de los aislados tenían bajos niveles de homología de DNA con otros leuconostocs y se les propuso como una especie nueva, *Leuc. argentinum* (Dicks y col. 1993).

En los últimos diez años se han realizado diversos cambios en la clasificación taxonómica de las especies que conforman el género *Leuconostoc*.

Se han descrito especies nuevas y se han identificando tres géneros principales, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (Barrangou y col. 2002). *Leuconostoc oenos*, importante en la fermentación maloláctica en la manufactura del vino, fue reclasificada como *Oenococcus oeni* por Dicks y col. en 1995.

***Weissella*.**

La filogenia de las bacterias que en la actualidad se clasifican dentro del género *Weissella* se aclaró en 1990. Mediante el uso de los datos de las secuencias del rRNA 16 y 23S, Martínez-Murcia y Collins (1990) y Martínez-Murcia y col. (1993) demostraron que *Leuconostoc paramesenteroides* es filogenéticamente diferente de *Leuconostoc mesenteroides* y que se agrupa junto con cinco lactobacilos heterofermentativos, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* y *Lactobacillus viridescens*. En un estudio de organismos parecidos a los leuconostocs, aislados de salsas fermentadas (Collins y col. 1993) se evaluó la taxonomía de estas especies. Se determinó que la descripción del género *Weissella* incluyera a *Leuconostoc paramesenteroides*, las cinco especies de *Lactobacillus* y *Weissella hellenica*, que en ese tiempo era una especie nueva. Posteriormente, se incorporaron dos especies nuevas, *Weissella thailandensis* (Tanasupawat y col. 2000) y *Weissella cibaria* (Björkroth y col. 2002). En la actualidad existen nueve especies en el género *Weissella*: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis*, *Weissella viridescens* y *Weissella cibaria*. Las cepas de *Weissella* se han aislado de distintas fuentes. *Weissella paramesenteroides* es una de las especies predominantes en vegetales frescos y también juega un papel importante en la primera etapa de la fermentación de ensilados. *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica* y *Weissella viridescens* se han asociado comúnmente con carne y productos cárnicos, mientras que se desconoce el hábitat natural de *Weissella kandleri*. La cepa tipo de *Weissella kandleri* se aisló de plantas del desierto, por lo que se ha sugerido que este es el hábitat principal de esta especie. Las cepas de

Weissella confusa se han detectado en azúcar de caña, jugo de zanahoria y ocasionalmente en leche bronca y drenajes. Las cepas utilizadas para la descripción de *Weissella minor* se aislaron de natas de máquinas lecheras. Las cepas tipo de *Weissella cibaria* sp. nov., se aislaron del chili bo en Malasia (Björkroth y col. 2002).

2.5 LAS AMILASAS Y LOS MICROORGANISMOS QUE LAS PRODUCEN.

Almidón.

El almidón se compone de dos tipos de moléculas de polisacárido, una lineal (amilosa) formada por unidades de α -D-glucosa con uniones α -1,4 y otra ramificada (amilopectina) con unidades de α -D-glucosa unidas tanto en α -1,4 como en α -1,6. El grado de ramificación es una característica importante del sustrato, dado que las enzimas hidrolizan los diferentes sustratos con especificidades diferentes. La fuente del almidón determina el contenido relativo de amilosa y amilopectina. El tamaño promedio de la cadena de amilosa es de aproximadamente 1000 unidades de glucosa mientras que la amilopectina tiene una distribución bimodal con cadenas más largas y más cortas que tienen longitudes promedio de 40 a 60 y de 11 a 24 residuos D-glucosil, respectivamente (Vihinen y Mäntsälä, 1989).

Amilasas.

Las enzimas capaces de hidrolizar las uniones α -glucosídicas del almidón se denominan enzimas amilolíticas o α -glucanasas y son producidas por animales, plantas y microorganismos. Diversas enzimas amilolíticas hidrolizan el almidón o sus productos de degradación. Las acciones de estas enzimas pueden dividirse en dos categorías. Las endoamilasas, que rompen uniones al azar en el interior de la molécula de almidón y las exoenzimas, que hidrolizan a partir del extremo no reductor, produciendo productos pequeños. Se puede distinguir otra división de las amilasas, de acuerdo con los enlaces que las enzimas son capaces de degradar, por ejemplo, las enzimas desramificantes pueden hidrolizar uniones α -1,6.

La α -amilasa es una endoenzima que hidroliza enlaces internos α -1,4 y que puede saltarse las uniones-1,6. La β -amilasa es una exoenzima que libera maltosa hidrolizando uniones-1,4 a partir del extremo no reductor, no puede saltarse los enlaces-1,6 por lo que siempre habrá dextrinas β -límite después de su acción. La glucoamilasa produce glucosa y puede degradar tanto enlaces 1,4 como 1,6 (Vihinen y Mäntsälä, 1989). Debido a sus usos comerciales e industriales, las α -amilasas de diversos orígenes se han estudiado con gran detalle.

Microorganismos con actividad amilolítica.

Una gran variedad de microorganismos producen y secretan amilasas de diferentes especificidades y algunas con características interesantes. Las bacterias Gram-positivas y particularmente las del género *Bacillus* son productores prolíficos de amilasas y se encuentran muy pocas entre las bacterias Gram-negativas. Las enzimas producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* son de significado comercial particular, debido a su gran termoestabilidad. Una gran variedad de hongos producen amilasas, particularmente el género *Aspergillus*, mientras que de las amilasas producidas por levaduras se han generado un número importante de estudios (Pandey y col. 2000).

2.6 BACTERIAS LÁCTICAS AMILOLÍTICAS.

La capacidad de las bacterias lácticas para fermentar el almidón fue reportada por primera vez por Sherman en 1937 cuando encontró que algunos estreptococcus aislados del tracto digestivo de rumiantes producían ácido en sustratos amiláceos. A partir de esa fecha se han aislado bacterias lácticas amilolíticas de sustratos diversos. De ensilados de maíz se aislaron e identificaron las especies *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981; Nakamura y Crowell, 1979), mientras que *Lactobacillus cellobiosus* se aisló de desperdicios vegetales (Sen y Chakrabarty, 1984). De maltas y mostos cerveceros se aisló la especie *Lactobacillus amyolyticus*

(Bohak y col. 1998). Diversas cepas de *Streptococcus bovis* con actividad amilolítica se han aislado tanto del tracto digestivo como de heces de bovinos, ovejas y puercos; *Streptococcus equinus* se aisló de las heces de caballos (Cotta, 1992). Algunas cepas de *Lactobacillus* se aislaron del tracto digestivo de pollos (Champ y col. 1983). De ensilados de pescado mezclado con cereales se aislaron cepas amilolíticas de *Leuconostoc* (Lindgren y Refai, 1984).

Los alimentos fermentados amiláceos son una fuente potencial de bacterias lácticas amilolíticas. Dichos alimentos se preparan con cereales diversos o con tubérculos como la yuca. Se conocen una gran variedad de productos fermentados de yuca. El almidón ácido de yuca es un producto alimenticio fermentado que se seca al sol y que tiene propiedades panaderas poco comunes. Se produce en Colombia y en Brasil, donde se le denomina "almidón agrio" y "polvilho azedo" respectivamente. La producción de almidón ácido de yuca involucra una fermentación ácido láctica que reduce el pH hasta 3.5. La especie *Lactobacillus manihotivorans* con actividad amilolítica se aisló de este producto (Morlon-Guyot y col. 1998). En África, es común el consumo de productos de yuca fermentada, tal es el caso del gari y el fufu (Steinkraus, 1996). Tradicionalmente, en países africanos tales como Congo y Nigeria, la yuca entera se remoja en agua y se fermenta naturalmente de 3 a 5 días. Durante la fermentación el contenido de glucósidos cianogénicos se reduce del 90 al 100% y se suaviza el producto, facilitando la extracción del almidón del tubérculo. El género *Lactobacillus* es el predominante entre las cepas aisladas de la yuca fermentada tradicional y *Lactobacillus plantarum* fue la especie que se identificó con mayor frecuencia (Brauman y col. 1996). Nwankwo y col. (1989) así como Giraud y col. (1991) aislaron cepas amilolíticas de *Lactobacillus plantarum* de la yuca ablandada por fermentación en Nigeria y en Congo, respectivamente.

El ogi y el mawè son dos productos tradicionales africanos obtenidos de cereales fermentados y que se utilizan como productos intermediarios para la preparación de diversos platillos. El ogi se prepara a partir de maíz o de sorgo

remojado en agua, molido y cernido en forma húmeda y se deja sedimentar y fermentar espontáneamente (Johansson y col. 1995). El mawè es una masa ácida de maíz. Para prepararlo, el maíz se lava, se fragmenta en un molino de discos y se separan las fracciones con cernidores metálicos, de nylon o de fibra de palma. Los trozos de endospermo y el pericarpio se separan por gravedad en el cernido y la fracción fina del endospermo se colecta en un recipiente. En el proceso comercial, los trozos de endospermo se lavan al chorro de agua, el germen y los restos de pericarpio flotan y se eliminan después de decantar el agua; los trozos de endospermo sedimentados se mezclan con la fracción fina del endospermo. En la producción casera, los fragmentos de endospermo no se lavan pero el pericarpio se separa manualmente. Los fragmentos de endospermo resultantes y la fracción fina se humedecen de 2 a 4 horas y se muelen. El producto se amasa, se cubre con polietileno y se deja fermentar naturalmente (Hounhouigan y col. 1993). Durante el proceso fermentativo del ogi y del mawè, se da una sucesión natural de microorganismos dominada por bacterias lácticas, siendo *Lactobacillus* spp. la bacteria predominante. Del ogi y del mawè producidos en Benin, se aislaron y caracterizaron cepas amilolíticas de *Lactobacillus fermentum* (Agati y col. 1998); mientras que del ogi nigeriano se aislaron cepas de *L. plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* (Johansson y col. 1995).

El kenkey es un alimento fermentado de maíz que se produce y consume en países africanos como Ghana y Nigeria. Se obtiene una masa que se moldea en forma de bolas y se envuelve en hojas de maíz o de plátano (Steinkraus, 1996). De este alimento, se aislaron cepas de *Lactobacillus plantarum* con actividad amilolítica (Olasupo y col. 1996). De otros alimentos fermentados tradicionales de Nigeria, como el nono, fufu, burukutu, ogi-baba y kunu-zakki, se aislaron cepas de bacterias con actividad amilolítica que se identificaron como *L. plantarum* y *L. fermentum* (Sanni y col. 2002).

De otros alimentos fermentados que se preparan mezclando vegetales o pescado con cereales también se han aislado bacterias lácticas con actividad

amilolítica. El "sayur asin", un alimento en el que la col mostaza se fermenta naturalmente en presencia del agua de cocimiento de arroz, fue el origen de una cepa amilolítica de *Leuconostoc* (Puspito y Fleet, 1985). Del plaa som, que se prepara con pescado, arroz cocido y ajo, se aislaron tres cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* con actividad amilolítica (Østergaard y col. 1998). Así mismo, del burong bangus, un producto fermentado de arroz y pescado de Filipinas, se aislaron e identificaron cepas amilolíticas de *Lactobacillus plantarum* (Olympia y col. 1992).

2.7 AMILASAS DE BACTERIAS LACTICAS.

Aunque a la fecha existen diversos reportes sobre la presencia de bacterias lácticas amilolíticas tanto en alimentos fermentados como de otras fuentes, existe poca información respecto a la caracterización de sus amilasas. La mayoría de los estudios se han realizado en α -amilasas y en menor proporción en glucoamilasas (James y Lee, 1995). Sin duda, las amilasas producidas por bacterias del género *Lactobacillus* han sido las más estudiadas, si bien, existen estudios en amilasas producidas por bacterias lácticas de otros géneros (Lindren y Refai, 1984; Østergaard y col. 1998; Satoh y col. 1997; Simpson y Russell, 1998). La mayor parte de las amilasas producidas por bacterias lácticas son extracelulares, existen especies que producen amilasas asociadas a la célula y en algunos casos que son intracelulares.

L. amylovorus produce una α -amilasa que libera al medio de crecimiento y que tiene su mayor actividad a pH 5 y 62°C; también produce una glucoamilasa unida a la célula cuyos parámetros óptimos son pH 6.0 y 60°C (Rodríguez-Sanoja y col. 2000; James y Lee, 1995). La α -amilasa de *L. amylovorus* es capaz de adherirse a los gránulos de almidón, lo cual permite la producción de ácido láctico a partir de almidón crudo o que no se ha gelatinizado previamente. La secuenciación del gen α -amilasa de *L. amylovorus* determinó que consiste de 2862 pb que codifican para 954 aminoácidos y con una masa molecular de aproximadamente 105 kDa (Giraud y Cuny, 1997).

Rodríguez-Sanoja y col. (2000) demostraron que el extremo C-terminal de esa enzima contiene secuencias repetidas involucradas en su capacidad para unirse al almidón crudo.

Aguilar y col. (2000) purificaron y caracterizaron la amilasa extracelular de la cepa tipo de *Lactobacillus manihotivorans*. El peso molecular aparente fue de 135 kDa, el pH y temperatura óptimos fueron 55°C y 5.5, respectivamente. La α -amilasa presentó buena estabilidad en el rango de pH de 5 a 6 y la enzima fue sensible a la temperatura, perdiendo actividad después de 1 h de incubación a 55°C.

De *Lactobacillus plantarum* A6 se purificó una amilasa extracelular cuyos parámetros óptimos son pH de 5 y una temperatura de 65°C. La hidrólisis de almidón por la enzima se presentó con una reducción rápida de la capacidad de tinción del yodo del sustrato y una liberación lenta de azúcares reductores. Los productos de la hidrólisis del almidón fueron glucosa, maltosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Se observó que la síntesis de la enzima se inhibe con glucosa y que su producción se ve afectada por el pH del medio. Se determinó la capacidad de la cepa de utilizar el almidón crudo y se evaluó su uso potencial como cultivo iniciador de ciertas fermentaciones. La secuencia completa del gen α -amilasa incluye 2739 pb que codifican para 913 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 100 kDa. El extremo N-terminal tiene características similares a la familia de las amilasas, mientras que el extremo C-terminal muestra una estructura poco común que consiste de 4 secuencias repetidas (Giraud y Cuny, 1997).

El análisis de las secuencias de los genes α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum* A6 y *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010 indica que tienen más del 98% de identidad en sus secuencias de nucleótidos y niveles similares de identidad para las secuencias deducidas de aminoácidos (Morlon-Guyot y col. 2001).

Lactobacillus cellobiosus D-39, aislada de desperdicios vegetales, fue reportado como productor de α -amilasas por Sen y Chakrabarty en 1984. Los

estudios sobre la purificación y caracterización de la enzima mostraron que se trata de una amilasa de bajo peso molecular, 22.5 kDa, estable en un rango neutro de valores de pH (6.3-7.9) y a temperaturas hasta de 50°C (Sen y Chakrabarty, 1986).

Olympia y col. (1995) estudiaron las propiedades de la amilasa L137 producida por la cepa *Lactobacillus plantarum* L137. La mayor actividad de la amilasa se presentó a pH 3.8-4 y a 35°C y tiene un peso molecular de 230 kDa. Los productos de la hidrólisis del almidón indicaron que se trata de una amilasa del tipo endo, ya que produce maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa. La amilasa no fue capaz de hidrolizar el almidón crudo, dextranas ni α , β o γ -ciclo dextrinas.

Las cepas de *Lactobacillus fermentum* (Ogi E1 y Mw2) aisladas del ogi y del mawè, respectivamente, produjeron amilasas extracelulares y asociadas a la célula en cultivos de 12 horas. La mayor actividad para la cepa Ogi E1 se presentó a un pH de 5 y 45°C mientras que para la cepa Mw2 se obtuvo a pH 4.5 y 35°C (Agati y col. 1998).

La actividad α -amilasa de una cepa de *Leuconostoc* (presumiblemente se trata de *Leuc. dextransicum*) está asociada a la célula y sólo se libera al medio en la última etapa de crecimiento. La mayor actividad de la amilasa se presentó a pH 6.0 y 40°C y es sensible al almacenamiento a valores de pH menores a 4 y mayores a 8. La enzima tiene un peso molecular mayor a 50 kDa y produce maltosa y glucosa (en relación 5:1) como principales productos de la hidrólisis de almidón (Lindgren y Refai, 1984).

Dos cepas amilolíticas del género *Lactobacillus* aisladas del tracto digestivo de pollos tuvieron actividad amilolítica asociada a la célula (Champ y col. 1983). La mayor actividad de las amilasas de las cepas LEM 220 y LEM 207 fueron pH 5.5 y 55°C y pH 6.4 y 40°C, respectivamente. Mediante el uso del microscopio electrónico de barrido se pudo observar el rompimiento de los gránulos de almidón *in vitro* e *in vivo* por las amilasas de esas cepas en tejidos del tracto digestivo de pollo.

Se ha profundizado en el estudio de dos cepas de *S. bovis* aisladas del rumen, JB1 y 148. *S. bovis* 148 produce amilasas intra y extracelulares codificadas por genes diferentes y produce altas concentraciones de ácido láctico tanto de almidón crudo como de almidón soluble. Ambas enzimas se purificaron y caracterizaron. El principal producto obtenido de la hidrólisis del almidón por la amilasa intracelular de *S. bovis* 148 fue la maltotriosa (80%), mientras que la enzima extracelular mostró un patrón de hidrólisis de almidón típico de las amilasas sacarificantes. Se determinó que la mayor actividad se presentó a pH 6.5 y 40°C para la amilasa intracelular y a pH 5.5 y 50°C para la amilasa extracelular. La amilasa intracelular no fue capaz de unirse al almidón crudo mientras que la extracelular sí lo hizo. La secuencia deducida de aminoácidos de la enzima intracelular correspondió a 484 codones con una masa molecular de 56 kDa y se determinó que la proteína no tiene péptido señal. La amilasa extracelular está formada por 703 codones y tiene una masa molecular de 79,000 Da. El análisis de la secuencia de la α -amilasa extracelular de *S. bovis* 148 confirmó su similitud con las α -amilasas extracelulares de *Bacillus subtilis* y no se observó homología entre las α -amilasas intra y extracelulares de esa cepa (Satoh y col. 1993;1997). Al igual que la cepa 148, *S. bovis* JB1 también produce amilasas intra y extracelulares, las cuales presentan prácticamente las mismas características bioquímicas a las descritas para las correspondientes amilasas de la cepa 148. Se determinó que la distribución celular de la enzima depende del sustrato en el que crece. Cuando crece en un medio que contiene almidón, aproximadamente el 80% de la actividad amilolítica total está asociada a la célula, mientras que cuando crece en presencia de maltosa, más del 90% de la actividad amilolítica total se encuentra en el medio de cultivo. La síntesis de amilasa se reprime por glucosa, celobiosa y fructosa, mientras que la inulina y la lactosa tuvieron un pequeño efecto en la acumulación de la enzima (Cotta y Whitehead, 1993).

Del estudio del gen de la amilasa de *S. mutans* se determinó que la proteína no tiene un péptido señal típico de las proteínas secretadas y parece

localizarse predominantemente de forma intracelular. Este consta de 486 aminoácidos con un peso molecular calculado de 56,347 Da. En presencia de almidón, la enzima produce desde glucosa hasta maltohexaosa así como oligosacáridos de mayor tamaño (Simpson y Russell, 1998).

2.8 FERMENTACION DEL ALMIDON POR BACTERIAS LACTICAS.

El almidón se utiliza comúnmente como materia prima para la producción industrial de ácido láctico. Las bacterias lácticas amilolíticas, en especial aquellas capaces de hidrolizar el almidón crudo, son una alternativa adecuada para realizar este tipo de procesos. Diversos autores han estudiado las cinéticas de fermentación del almidón crudo y soluble utilizando diversas cepas de bacterias lácticas. Con *Lactobacillus amylophilus*, se evaluó la producción de ácido láctico usando glucosa y almidón como sustratos y a diferentes valores de pH (de 5.4 a 7.8) (Mercier y col. 1992). Con *Lactobacillus amylovorus* se evaluó la producción de ácido láctico a partir de almidón gelatinizado. La conversión de almidón a ácido láctico fue de 98.1% bajo condiciones óptimas (Cheng y col. 1991). Zhang y Cheryan (1991) estudiaron la fermentación directa del almidón hasta ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* en cultivos por lotes y en continuo, lográndose una mayor productividad en este último en condiciones similares: 4.8 g/L/h y 8.4 g/L/h, respectivamente (Zhang y Cheryan, 1994).

También se ha evaluado el uso de diferentes sustratos en la producción de amilasas por bacterias lácticas, así como el efecto del pH en el crecimiento y producción de amilasas. *Lactobacillus plantarum* A6 presentó crecimiento similar tanto en glucosa como en almidón ($0.43 - 0.45 \text{ h}^{-1}$) y tuvo un alto rendimiento de conversión de almidón/ácido láctico (80%). La velocidad de hidrólisis del almidón fue mayor que la de consumo de los productos de hidrólisis, ya que a las 7 horas se acumuló la maltosa (Giraud y col. 1991). Se comparó la fermentación del almidón por *Lactobacillus manihotivorans* y *L. plantarum* A6 a pH controlado y no controlado. *L. plantarum* fue capaz de crecer y de convertir el almidón en ácido láctico más rápida y eficientemente hasta valores de pH de 4.5. Cuando el

pH se mantuvo en 6.0 se observó un aumento en la producción de ácido láctico, de amilasa y de biomasa final para *L. manihotivorans* mientras que para *L. plantarum* solo se observó un aumento en la producción de amilasa. La velocidad específica de crecimiento fue la misma tanto en glucosa como en almidón para *L. manihotivorans* (0.35 h^{-1}) y la bacteria no produjo amilasa en presencia de glucosa (Guyot y col. 2000).

Las investigaciones también se han dirigido a otros aspectos como son las condiciones para el crecimiento de las bacterias lácticas amilolíticas. El estudio de los requerimientos nutricionales de *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 dio como resultado un medio simplificado (SYAM) (extracto de levadura, acetato y solución de minerales) que produjo resultados similares a los obtenidos con el medio MRS, pero sin la cinética de fermentación bifásica que se presenta en dicho medio. Los mejores sustratos tanto para el crecimiento como para la producción de amilasa fueron la maltosa y el almidón (Calderón y col. 2001).

Desde hace varios años se han realizado diversos estudios sobre *Streptococcus bovis*, bacteria láctica amilolítica habitante del rumen de ganado y del colon de humanos (Hardie, 1986). *S. bovis* es una bacteria que crece rápidamente y que tiene requerimientos nutricionales simples. *S. bovis* puede dominar en el rumen cuando están disponibles grandes cantidades de carbohidratos (azúcares o almidón). *S. bovis* puede cambiar su fermentación de lactato a acetato, formato y etanol para obtener más ATP, pero no es capaz de competir efectivamente con otras bacterias del rumen si hay limitación de carbohidratos. La mayoría de las cepas de *S. bovis* no pueden utilizar las pentosas pero crecen rápidamente (más de 1.5 h^{-1}) en una gran variedad de mono- y disacáridos (Wells y col. 1997; Bond y col. 1998). Se han reportado velocidades máximas de crecimiento en glucosa de diversas cepas de colección de *S. bovis* de $1.71 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$. Otros trabajos con *S. bovis* JB1 indicaron que la velocidad máxima de crecimiento podría llegar hasta 2.0 h^{-1} en cultivos con varias resiembras (Jarvis y col. 2001).

Como parte de un estudio global sobre la capacidad de diversos microorganismos del rumen para crecer en un medio con almidón y producir amilasas, Cotta (1988) determinó que *S. bovis* JB1 es capaz de crecer a velocidades similares de crecimiento cuando se encuentra en presencia de glucosa o almidón (2.07 y 1.98 h⁻¹, respectivamente) y a menor velocidad en presencia de maltosa (1.38 h⁻¹). *S. bovis* JB1 creció a mayor velocidad que el resto de las bacterias del rumen evaluadas en los distintos sustratos (glucosa, maltosa y almidón). También se estudió la hidrólisis y el uso de los oligosacáridos, productos de la hidrólisis del almidón por cepas de bacterias amilolíticas y no amilolíticas del rumen utilizando cultivos puros y mixtos y se sugiere que existe un intercambio de maltooligosacáridos entre especies de bacterias y que dicho intercambio es el responsable de la complejidad de los tipos de bacterias encontrados en el rumen (Cotta, 1992).

Con el fin de determinar si la velocidad de crecimiento en diversas cepas de *S. bovis* está regulada por la disponibilidad de intermediarios glicolíticos tempranos o por la generación de ATP *per se*, Bond y col. (1998) determinaron que veinte cepas de *S. bovis* del rumen (tanto cepas tipo como otros aislados) crecieron más lentamente en lactosa (1.21 ± 0.12 h⁻¹) que en glucosa (1.67 ± 0.12 h⁻¹) y resiembras repetidas o crecimiento prolongado en cultivo continuo (más de 200 generaciones en cada caso) no mejoraron la velocidad de crecimiento en lactosa. Se concluyó que se requiere de un flujo glucolítico rápido a través de la vía EMP para el crecimiento rápido (más de 1.2 h⁻¹) de *S. bovis*.

El papel de la amilasa intracelular en el crecimiento de *S. bovis* WI-1 fue estudiado por Brooker y McCarthy (1997) mediante la eliminación selectiva del gen de la amilasa intracelular. La velocidad de crecimiento exponencial de la recombinante fue del 15-20% de la cepa silvestre en un medio con glucosa, almidón o celobiosa al 1%. La actividad amilolítica de los extractos libres de células del cultivo recombinante en presencia de 1% de almidón fue de sólo 7% del de la cepa silvestre. Los resultados sugieren que podría ser importante un

nivel crítico de expresión del gen amilasa intracelular para el crecimiento rápido de la bacteria.

CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La investigación sobre bacterias lácticas amilolíticas en alimentos fermentados amiláceos se ha justificado debido al alto contenido de almidón en la materia prima (cereales como el maíz y sorgo o tubérculos como la yuca). Sin embargo, el papel de ese almidón en las fermentaciones lácticas aún tiene que estudiarse, dado que también se encuentran presentes mono y disacáridos (como la glucosa y sacarosa) que podrían estar disponibles para la fermentación.

La manera en que se procesa la materia prima podría determinar la composición de la microbiota y específicamente la relevancia de bacterias lácticas amilolíticas. Por ejemplo, durante el procesamiento de la yuca para la producción de almidón ácido, la extracción del almidón se realiza mediante cernido de la materia prima bajo una corriente de agua, lo que favorece la eliminación de la mayoría de los mono y disacáridos, dejando al almidón como el principal sustrato disponible, permitiendo que predominen las bacterias lácticas amilolíticas (Ben Omar y col. 2000). De forma similar, el pozol puede ser otro ejemplo interesante de la influencia de las condiciones del proceso en la diversidad microbiana. En el proceso de nixtamalización del maíz (cocción alcalina, remojo y lavado del grano) se reduce drásticamente la concentración de la sacarosa, principal carbohidrato soluble, de 2 a 0.1-0.7 g /100g (base seca). Si la concentración de azúcares solubles en el nixtamal es tan baja sería difícil mantener una diversidad microbiana tan rica y números tan altos de bacterias lácticas totales, tal como se ha reportado previamente por Wachter y col. (2000) y Escalante y col. (2001).

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Siendo el almidón el principal sustrato disponible para la fermentación ácido láctica del nixtamal, las bacterias lácticas amilolíticas deberían constituir una proporción importante dentro de las bacterias lácticas y tener un papel determinante para sostener la diversidad microbiana observada.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Determinar la diversidad y la importancia de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol, así como sus principales características fisiológicas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la diversidad de bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol.
- Identificar las bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica y caracterizar sus amilasas.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la bacteria láctica amilolítica predominante durante la fermentación de almidón soluble.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Descripción de la muestra.

Se adquirieron dos muestras de pozol recién molido (A y B) en un mercado de Villahermosa, Tabasco. Cada muestra se dividió en porciones de 100 g, se envolvieron en hojas de plátano y se incubaron a 30°C por 7 días.

6.2 Medición de pH.

Se midió en un potenciómetro Jenway 3020 a 25°C, suspendiendo 2 g de muestra en 5 ml de agua destilada.

6.3 Cuantificación de bacterias lácticas y de bacterias lácticas amilolíticas.

Se homogenizaron 25 g de masa en 225 ml de peptona al 0.1% en un equipo Stomacher 400 (Seward) a velocidad normal durante un minuto y se realizaron las diluciones correspondientes. El conteo de bacterias lácticas y de bacterias lácticas amilolíticas se realizó por duplicado, inoculando superficialmente cajas de agar MRS (Oxoid, CM361) y de agar MRS con 2% de almidón soluble (J.T. Baker) en lugar de glucosa, respectivamente (Tabla 1). La humedad de las masas se determinó por pérdida de peso después de secarlas a 80°C por 24 h. Las cuentas se expresaron como el log UFC/g masa seca. Las colonias seleccionadas al azar se evaluaron mediante la tinción de Gram y la reacción catalasa. Para las bacterias lácticas amilolíticas se consideraron las colonias que presentaron halos de hidrólisis después de adicionar lugol a las cajas con almidón.

6.4 Cuantificación de otros grupos microbianos.

Se realizó el conteo de enterobacterias, mohos y levaduras, mohos y levaduras amilolíticas, mesófilas aerobias y mesófilas aerobias amilolíticas. En la Tabla 1 se describen las condiciones para el conteo de cada grupo.

Tabla 1. Condiciones para la cuantificación de diversos grupos microbianos.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Tipo de inoculación
Bacterias lácticas	Agar MRS (Oxoid CM 361)	30°C	1-2 días	superficial
Bacterias lácticas amilolíticas	Agar MRS-almidón ^a	30°C	1-3 días	superficial
Enterobacterias	Agar bilis rojo violeta glucosa (Oxoid CM 485)	30°C	1-2 días	vertido
Mohos y levaduras	Agar papa dextrosa (Oxoid CM 139)	30°C	3-7 días	superficial
Mohos y levaduras amilolíticas	Agar papa dextrosa almidón ^b	30°C	3-7 días	superficial
Mesófilas aerobias	Agar cuenta en placa (Oxoid CM 325)	30°C	2 días	superficial
Mesófilas aerobias amilolíticas	Agar cuenta en placa almidón ^c	30°C	2 días	superficial

^a Composición del medio MRS-almidón (g/L): peptona pancreática de caseína, 10; extracto de carne, 10; extracto de levadura, 5; almidón, 20; citrato diamoniacal, 2.17; acetato de sodio, 5; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.207; sulfato de manganeso, 0.056; fosfato dipotásico, 2.62; agar bacteriológico, 15. El pH final fue de 6.8.

^b Preparación del medio papa dextrosa almidón: El extracto obtenido después del cocimiento de 300 g de papa blanca pelada en 1L de agua, se mezcló con 20 g de agar bacteriológico y se aforó a 1L. Se esterilizó el medio (121°C por 15 minutos) y se acidificó con ácido tartárico al 10% para tener un valor final de pH de 5.5.

^c Componentes del agar cuenta en placa almidón (g/L): triptona, 5.0; extracto de levadura, 2.5; almidón, 1.0; agar bacteriológico, 9. El pH final fue de 7.0.

6.5 Aislamiento de bacterias lácticas amilolíticas.

Las bacterias lácticas amilolíticas se aislaron de duplicados de placas MRS-almidón tomando colonias al azar con diferentes diámetros de zonas de hidrólisis. Las cepas recuperadas se purificaron inoculando por estria sobre el medio MRS-almidón. Para determinar la pureza se observó la homogeneidad en la morfología de las colonias y de las células después de realizar una tinción de Gram. Se realizó la reacción catalasa (Harrigan y McCance, 1976). Los cultivos puros se almacenaron a -70°C en perlas de vidrio con glicerol al 20% como crioprotector (Feltham y col. 1978).

6.6 Determinación de la vía metabólica.

La vía metabólica se determinó mediante el análisis de los productos finales de la fermentación, ejemplo: lactato (homofermentativa) o una mezcla

equimolar de lactato y etanol/acetato (heterofermentativa). Se incubaron las cepas durante 18 h a 30°C en 10 ml de caldo MRS (Difco Laboratories 0881-17-5, Detroit, MI, U.S.A.). Las células se separaron por centrifugación y los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore, HVLP 04700). Los filtrados se analizaron en un cromatógrafo de líquidos Waters 515 (Waters, Milford, MA, USA) equipado con una columna de intercambio iónico (BioRad Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm). La fase móvil fue H₂SO₄ 6 mM, con una velocidad de flujo 0.8 ml/min a 65°C. Se utilizó un detector de índice de refracción Waters 2410. El caldo MRS no inoculado se utilizó como control.

6.7 Identificación bioquímica.

Los perfiles de fermentación de carbohidratos se hicieron con el sistema API 50 CH (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las pruebas enzimáticas y de fermentación de las cepas 15430, 25124, A56203, A57206, A12203, A57103, A45201, A36202 y A45212 se realizaron con el sistema API 20 STREP (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Se obtuvieron identificaciones preliminares mediante el uso del programa APILAB Plus V.3.3.3.

6.8 Ribotipificación.

Un cultivo de 18 h se diluyó 1:10 en caldo MRS fresco y se incubó por 4 horas a 30°C. Las células se colectaron centrifugando (10 min, 4480 g, 4°C) y se lavaron dos veces con solución amortiguadora TS (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, sacarosa 25% p/v). Las células se resuspendieron en solución amortiguadora TS hasta lograr un valor de absorbancia de 3 a 600 nm. La suspensión celular se trató con lisozima (100 mg/ml) durante una hora a 37°C. Los protoplastos se colectaron centrifugando (10 min, 4480 g, 4°C), se resuspendieron en 500 µL de solución amortiguadora SE (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM) y se incubaron por una hora a 37°C. La preparación de los bloques de agarosa que contenían el DNA extraído y su digestión con la endonucleasa *EcoRI* se realizó de acuerdo con el

método de McClelland y col. (1987). La electroforesis de las muestras de DNA se realizó en una celda grande (30x20 cm) en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE (Tris 40 mM, acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) a 4 V/cm y 10°C por 15 horas. La sonda utilizada para la hibridación consistió de una mezcla de fragmentos del gen rRNA 16S amplificados por PCR, de las cepas 15136, 15125 y 25421. Se utilizaron los cebadores 27f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') y 354r (5'CTGCTGCSYCCCGTAG3') (Lane, 1991) para la amplificación del gen rRNA 16S. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: la desnaturalización inicial fue de 94°C por 11 min, 30 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94°C, alineamiento por 30 s a 50°C y elongación a 72°C por 30 s. La extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de la amplificación se limpiaron (Wizard, DNA clean-up system, Promega), se liofilizaron y se marcaron con digoxigenina siguiendo las indicaciones del proveedor (Dig high prime detection kit, Boehringer Mannheim). Los gels a los que se les aplicó la electroforesis y que contenían los fragmentos de DNA generados con *EcoRI* se sumergieron dos veces en HCl 0.25N por 15 min y en una solución de NaCl 1.5M/NaOH 0.5N por 20 min. Se realizó una transferencia Southern (Southern, 1975). Las membranas se fijaron calentando a 80°C por 30 min. Durante la prehibridación se agregaron 15 ml de la solución de hibridación (SSC 5X, N-laurilsarcosil al 0.1%, agente bloqueador al 10%, SDS al 0.02%) en cada membrana y se incubaron a 65°C por 3 horas. La detección de la hibridación se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia, utilizando los componentes de un sistema comercial de marcaje y detección de DNA y los anti-DIG-anticuerpos de Boehringer Mannheim de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los perfiles de bandas de la hibridación se evaluaron por la presencia o ausencia de bandas únicas comunes y se construyó una matriz, la cual se analizó utilizando el programa Treecon v.1.2 (Van de Peer y De Wachter, 1994). El análisis incluye el cálculo de similitud de distancias usando el procedimiento de Link y col. (1995), la construcción del árbol usando el método de pares de grupo no proporcionales con promedios aritméticos (UPGMA) y la generación del fenograma.

6.9 Determinación de las secuencias del gen rRNA 16S.

Se amplificó un fragmento del gen rRNA 16S (correspondiente a las posiciones 30 a 1521 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) mediante PCR utilizando cebadores conservados cercanos a los extremos 3' y 5' del gen. Los productos de PCR se secuenciaron directamente utilizando el sistema de secuenciación (Taq dye-Deoxy terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.) y un secuenciador automático (modelo 373, Applied Biosystems). Las identificaciones se basaron en comparaciones de las secuencias parciales (correspondiente a las posiciones 30 – 338 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) o casi totales (correspondiente a las posiciones 30 – 1521 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*). Los "parientes" más cercanos se determinaron realizando búsquedas en las bases de datos del GenBank utilizando el programa BLAST.

6.10 Números de acceso de las secuencias de nucleótidos.

Los número de acceso al GenBank de las secuencias parciales del gen rRNA 16S de las cepas 25124, 15430, A12203, A45201, A57206, A57103, A56203, A45212 y A36202 son AY184231 a AY184239, respectivamente.

6.11 Evaluación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a las células de bacterias lácticas del pozol.

Los cultivos de bacterias lácticas a los que se les midió la actividad amilolítica crecieron por 23 h a 30°C en el medio MRS-almidón. Para separar las células del sobrenadante, se centrifugaron a 27200 g por 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con agua estéril y la actividad asociada a las células se determinó en la suspensión celular obtenida al resuspender las células lavadas en agua destilada. Tanto la actividad amilolítica extracelular (sobrenadantes) como la asociada a las células se midieron con el método de extinción del complejo almidón-yodo y con el método de reductores con DNS.

La determinación de actividad amilolítica, usando el método de extinción del complejo almidón-yodo, se basa en la propiedad del almidón soluble de

formar un complejo café en presencia del reactivo yodo-yoduro que absorbe a 620 nm. Por acción de la amilasa disminuye el color producido por el complejo almidón-yodo (Agati y col. 1998). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Anexo 1).

La actividad amilolítica también se determinó midiendo el incremento de los azúcares reductores que se forman por la hidrólisis enzimática del almidón soluble. Los azúcares reductores se cuantificaron por el método de DNS (Miller, 1959), usando glucosa (Sigma) como patrón. Una unidad de actividad amilolítica se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto (Rodríguez-Sanoja y col. 2000).

6.12 Caracterización de amilasas de *S. bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202.

La descripción de amilasas se realizó en tres especies de bacterias lácticas amilolíticas. Las cepas A45212 (*Lactococcus lactis*) y A36202 (*Enterococcus sulfureus*) se aislaron de la muestra A, a las 48 y 24 h de fermentación, respectivamente. La cepa 25124 (*Streptococcus bovis*) se aisló de la muestra B cuando habían transcurrido 24 h de fermentación.

a) Preparación de los extractos celulares.

Las cepas crecieron durante 4 h en 250 ml de medio MRS-almidón (20 g/L). Se centrifugaron estos cultivos (10 min a 15300 *g* y 4°C) y las células se lavaron con agua destilada estéril. Las células se trataron con lisozima 4 mg/ml (Sigma L-6751) en solución amortiguadora TS (Tris-HCl 50 mM; pH 8, sacarosa 25%) durante 1 h a 37°C. Los protoplastos se recuperaron al centrifugar 15 min a 27200 *g* y 4°C y se resuspendieron en 10 ml de solución de rompimiento [solución amortiguadora de fosfatos 0.1M al pH óptimo de cada amilasa, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y mezcla inhibidora de proteasas (Roche) 1/100 volumen final]. Se realizó el rompimiento con la sonda de ultrasonido 550 (Fisher), el número de ciclos fue variable según la cepa a romper y se realizaron ciclos

intermedios de enfriamiento. Los protoplastos rotos se trataron con tritón X-100 (Sigma) al 1% de concentración final y se agitaron a baja temperatura durante 1 hora. El extracto celular se separó centrifugando (15 min a 27200 g y 4°C).

b) Actividad amilolítica del extracto celular.

Se midió la actividad amilolítica en el extracto celular mediante la técnica de extinción del complejo almidón-yodo, previa adición de cloruro de calcio a una concentración final de 50 mM, a pH y temperatura óptimos tal como se describió previamente por Agati y col. (1998).

c) Estimación del peso molecular.

El peso molecular de las amilasas en el extracto crudo se estimó por SDS-PAGE como lo describió Laemmli (1970). Se utilizaron los equipos de electroforesis vertical Mini Protean II y 3 de BioRad. La actividad amilolítica en el gel del SDS-PAGE se desarrolló según Lacks y Springhorn (1980). Las soluciones necesarias para la migración y la obtención de los geles se prepararon siguiendo las instrucciones del proveedor BioRad. Las migraciones se realizaron bajo la acción de una corriente eléctrica continua de 110 V. Para la revelación de los geles se utilizaron las siguientes técnicas: Coloración de las proteínas totales con azul de Coomassie y nitrato de plata (Silver Stain Plus, BioRad) y detección de la actividad amilolítica en los geles mediante un zimograma.

d) Efecto del pH en la actividad de la enzima (pH óptimo y estabilidad al pH).

El efecto del pH sobre la actividad de los extractos crudos se evaluó en el intervalo de valores de pH 4.0 a 7.5 con solución amortiguadora citrato-fosfato 0.1M y en el intervalo de 7.5 a 9.0 con solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M. Para determinar la estabilidad al pH, se utilizaron las soluciones amortiguadoras descritas previamente y también se consideró la solución amortiguadora citrato-fosfato 0.1M pH 3.0. Los extractos celulares se dializaron contra agua destilada

durante 24 horas a 4°C utilizando la membrana SpectraPor 7, PM 50,000. Se incubaron volúmenes iguales del extracto dializado y de la solución amortiguadora al pH correspondiente durante 25 horas a 4 y 30°C y se midió la actividad amilolítica residual en condiciones óptimas de cada amilasa (pH 6.8 y 37°C para la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 y pH 6 a 30°C en el caso de la amilasa de *L. lactis* cepa A45212). Antes de la medición de la actividad amilolítica se agregó cloruro de calcio a una concentración final de 50 mM.

e) Efecto de la temperatura en la actividad de la amilasa (temperatura óptima y estabilidad a la temperatura).

El efecto de la temperatura se estudió entre 10 y 65°C al valor de pH de mayor actividad amilolítica para cada cepa.

La estabilidad de la amilasa se evaluó incubando los extractos crudos a 15, 25, 30, 37, 45, 50, 55 y 60°C para la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 y a 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C para la amilasa de *L. lactis* cepa A45212. Los extractos celulares se incubaron por 10 y 60 minutos en presencia y en ausencia de almidón (0.7 %) en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, con un valor de pH correspondiente a la mayor actividad amilolítica (6 y 6.8 para el extracto celular de *L. lactis* cepa A45212 y *S. bovis* cepa 25124 respectivamente), también se agregó cloruro de calcio a una concentración final de 50 mM. Las muestras se enfriaron en un baño de agua después de la incubación y se determinaron las actividades residuales bajo condiciones óptimas.

f) Energía de activación.

La energía de activación se calculó siguiendo la ecuación de Arrhenius:

$$d(\ln V) / d(1/T) = - E_a/R = - p$$

donde:

Ea: energía de activación de la reacción (J/mol o cal/mol)

R: constante de los gases (J/mol.K o cal/mol.K)

V: velocidad de la reacción o actividad relativa

T: temperatura (K)

p: pendiente de la zona lineal al graficar el ln actividad (%) vs. $1000/T$ (K^{-1})

g) Productos de la hidrólisis del almidón.

La hidrólisis de los productos del almidón soluble (Prolabo-Merck Eurolab) se determinó agregando 0.1 ml del extracto crudo de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 y de *L. lactis* cepa A45212 (13.9 y 13.7 U/ml, respectivamente) a 0.8 ml de una solución de almidón 10 mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a las condiciones óptimas de pH y temperatura para cada amilasa. La hidrólisis se efectuó durante 16 h. Los productos de hidrólisis del almidón se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se utilizó una bomba isocrática (LC 250 Perkin Elmer) y un detector de índice de refracción (RI 30 Perkin Elmer). Se usó la columna C18 Prodigy 5 ODS (2) 250 x 4.6 mm (Phenomenex) a 35°C con agua como fase móvil (0.8 ml/min).

6. 13 Fermentación del almidón por una cepa de la especie dominante.

Se realizó la fermentación del almidón con *S. bovis* cepa 25124.

a) Activación de la cepa.

Para activar la cepa se inoculó 1 ml del cultivo *S. bovis* cepa 25124, conservado en glicerol a -70°C , en 10 ml de medio MRS-A (2% de almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab) y se incubó por 8 o 9 horas a 30°C .

b) Preparación del precultivo.

El precultivo se obtuvo inoculando 10 ml del cultivo de la cepa activada en 100 ml de medio MRS-A (2% de almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab) y se incubó por 12 horas a 30°C .

c) Cultivos.

Se realizaron cultivos en matraces de 1 L con 800 ml de medio MRS con almidón soluble de papa, Prolabo-Merck Eurolab, (20 g/L) en lugar de glucosa, inoculando el volumen necesario del precultivo para tener una densidad óptica inicial de 0.1. Se incubaron en condiciones estáticas a 30°C.

d) Seguimiento de la fermentación.

Se evaluó el crecimiento de la cepa durante 26 horas. Desde el tiempo cero hasta a las 7.5 horas, se tomaron muestras cada 30 minutos; desde ese momento y hasta las 12 horas las muestras se tomaron cada hora. A las 26 horas se tomó una muestra final. La fermentación se realizó por triplicado.

e) Determinación de la concentración de biomasa.

La concentración de biomasa se determinó en forma indirecta, midiendo la densidad óptica (a 600 nm en el espectrofotómetro Spectronic Milton Roy) y relacionándola con una curva patrón de densidad óptica vs. peso seco.

Determinación de peso seco.

La determinación de peso seco se realizó según lo reportado por Cooney (1981). Condiciones del cultivo: *S. bovis* cepa 25124 creció en 200 ml de medio MRS-almidón durante 8 horas a 30°C bajo condiciones estáticas. Las células se separaron del cultivo por centrifugación (27 200 g por 15 min a 4°C) y se lavaron dos veces con agua destilada. Las células lavadas se diluyeron en 20 ml de medio MRS y se prepararon las diluciones correspondientes. A dichos cultivos se les determinó la densidad óptica y se filtraron de acuerdo con el siguiente procedimiento: se secaron membranas de 0.45 µm de tamaño de poro y 45 mm de diámetro (Millipore HVLP04700) hasta peso constante en un horno (Felisa) a 80°C. Las membranas se colocaron en el equipo de filtración (Millipore) y se humedecieron uniformemente con agua destilada estéril. Las células se homogenizaron y se procedió a filtrar. Al final, se adicionaron 20 ml de agua destilada para lavar la membrana y se secó hasta peso constante. El peso seco de la muestra se obtuvo restando el peso inicial del peso final.

f) Parámetros de crecimiento.

La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) se determinó durante la fase de crecimiento exponencial como pendiente de la recta obtenida mediante la regresión lineal del ln de la biomasa vs. tiempo. Los rendimientos de producto y de crecimiento ($Y_{lac/s}$ y $Y_{x/s}$, respectivamente) relativos al sustrato se calcularon como la pendiente de las regresiones lineales, ya sea del ácido láctico o de la biomasa vs. sustrato residual. De manera similar, graficando los productos vs. la biomasa, se calcularon los rendimientos de amilasa y de ácido láctico respecto a la biomasa ($Y_{amy/x}$ y $Y_{lac/x}$, respectivamente). Todos los cálculos se realizaron con los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento. Las velocidades específicas de producción de ácido láctico y de producción de amilasa (q_{lac} y q_{amy} , respectivamente), así como la de consumo de sustrato (q_s) se calcularon de acuerdo con Pirt (1985): $q_p = Y_{p/x} \mu$ (p para producto, por ejemplo, ácido láctico o amilasa) y $q_s = \mu / Y_{x/s}$.

g) Medición de pH.

Se midió en un potenciómetro Jenway 3020 a 25°C

h) Métodos analíticos.

Las muestras se centrifugaron para separar las células (27200 g por 15 min a 4°C) y se filtraron con membranas de 0.22 μ m de tamaño de poro (Millipore GSWP 01300) y prefiltros Millipore AP2501000. Para la cuantificación de ácido láctico, las muestras filtradas se analizaron en un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer 250 al que se conectó una columna de intercambio iónico (Bio-Rad Aminex HPX-87H, 300x7.8 mm) a 50°C; se utilizó H₂SO₄ 0.01N a 0.6 ml/min como fase móvil. Como patrón se utilizó L-lactato (Sigma L-2250). Los productos de hidrólisis generados durante la fermentación del almidón se cuantificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Se utilizó una columna C18 Prodigy 5 ODS (2) 250 x 4.6 mm (Phenomenex) y un detector de índice de refracción. Los productos eluyeron con agua a un flujo de 0.8 ml/min y la temperatura de la columna era de 35°C. Como patrones se utilizaron

desde maltosa hasta maltoheptaosa (Sigma). El almidón residual se determinó mediante el método de extinción del complejo almidón-yodo (Nakamura, 1981). Los carbohidratos totales y reductores se cuantificaron mediante los métodos de Dubois y col. (1956) y Miller (1959), respectivamente. La cuantificación de glucosa y de maltosa se realizó con el sistema enzimático comercial (Boehringer Mannheim 1113950).

i) Actividad amilolítica asociada a las células.

Para cuantificar la actividad amilolítica asociada a la célula, por centrifugación se separaron las células de cultivos de 10 ml (27200 g por 15 minutos a 4°C). Las células se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en agua o solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.8. La actividad amilolítica se determinó a pH 6.8 y 37°C determinando la capacidad que tiene el almidón de acomplejar al yodo tal como fue descrito por Agati y col. (1998). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Anexo 1).

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL POZOL. CUANTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AMILOLÍTICAS.

Descripción de la etapa.

En la fermentación del pozol participa una microbiota compleja que incluye bacterias, levaduras y hongos. La acción de las bacterias lácticas es muy importante ya que son las responsables de iniciar la fermentación, acidificar el producto y producir aromas y sabores característicos del producto (Wacher y col. 1993). El pozol se prepara y consume en diversas regiones del sureste de México. La caracterización microbiológica del producto se ha realizado de muestras del estado de Chiapas (Wacher y col. 1993; 2000; Nuraida y col. 1995) y de muestras de pozol del estado de Tabasco (Ampe y col. 1999). Algunas de las bacterias lácticas aisladas del pozol tienen actividad amilolítica (Nuraida y col. 1995; Ben Omar y Ampe, 2000), aunque no se ha evaluado su desarrollo ni su proporción con respecto a las bacterias lácticas totales durante la fermentación.

Objetivos:

- Determinar la proporción y el desarrollo de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol.
- Aislar y conservar bacterias lácticas amilolíticas de las diferentes etapas de la fermentación del pozol.
- Cuantificar los principales grupos microbianos presentes durante la fermentación del pozol.

Resultados y discusión

Se caracterizaron dos muestras de pozol, A y B, adquiridas en un mercado de Villahermosa, Tabasco (fueron dos muestras independientes, adquiridas en tiempos diferentes y del mismo productor). En ambas muestras se cuantificaron a lo largo de la fermentación las bacterias lácticas totales y las bacterias lácticas amilolíticas. En la muestra A se realizó además el conteo de otros grupos microbianos con el fin de determinar si la fermentación del pozol se realizaba de acuerdo con lo reportado previamente.

La concentración inicial de bacterias lácticas fue de 4.9 log ufc/g de masa seca (Tabla 2). A las 24 h, ésta se incrementó hasta 9.9 log ufc/g de masa seca y se mantuvo constante hasta las 72 h de fermentación. Las bacterias lácticas son el grupo predominante durante todas las etapas de la fermentación del pozol, tal como se ha demostrado previamente tanto por métodos de cultivo tradicionales (Nuraida y col. 1995; Wachter y col. 2000), como por métodos independientes de cultivo (Ampe y col. 1999; Escalante y col. 2001). La cuenta inicial de bacterias lácticas amilolíticas (BLA) fue alta (4.5 log ufc/g de masa seca). Ésta aumentó hasta 8.4 log ufc/g de masa seca durante las primeras 24 h y permaneció constante hasta las 72 h, 8.7 log ufc/g de masa seca (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas y valores de pH durante la fermentación del pozol a 30°C^a.

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Concentración (log UFC/g de masa seca) de:	
		Bacterias lácticas amilolíticas	Bacterias lácticas
0	7.4	4.5	4.9
6	5.9	7.6	8.2
24	4.8	8.4	9.9
48	4.8	8.7	10.4
72	4.4	8.7	10.2

^a Son los valores promedio de dos fermentaciones independientes (muestras A y B). Los valores de pH variaron de 0.2 a 1.6 y los valores del log UFC/g de masa seca variaron de 0.1 a 0.6 .

Debido a la baja concentración de azúcares que permanecen en el maíz después de la nixtamalización, de 0.1 hasta 0.7 g de sacarosa/100 g maíz nixtamalizado seco (Santillana, 1995), el almidón debe ser un sustrato importante para la fermentación láctica. Cuarenta por ciento de las bacterias lácticas presentes en la masa al inicio de la fermentación fueron amilolíticas y esta proporción se redujo hasta 3% después de 72 h (Tabla 2).

El valor de pH se redujo de 7.4 a 4.8 en 24 h y permaneció constante hasta las 72 h (Tabla 2). El valor inicial de pH de esta muestra coincide con los reportados de muestras de pozol de la misma región (Sainz y col. 2001). En muestras de pozol del estado de Chiapas, los valores iniciales de pH de las muestras fueron menores a 7.0, a las 12 h fueron de 4.7 a 5.0, hasta llegar a 3.9 - 4.1 en 3 o 4 días (Wacher y col. 2000).

De ambas muestras se aislaron y conservaron 257 cepas de bacterias lácticas amilolíticas de diferentes tiempos de fermentación.

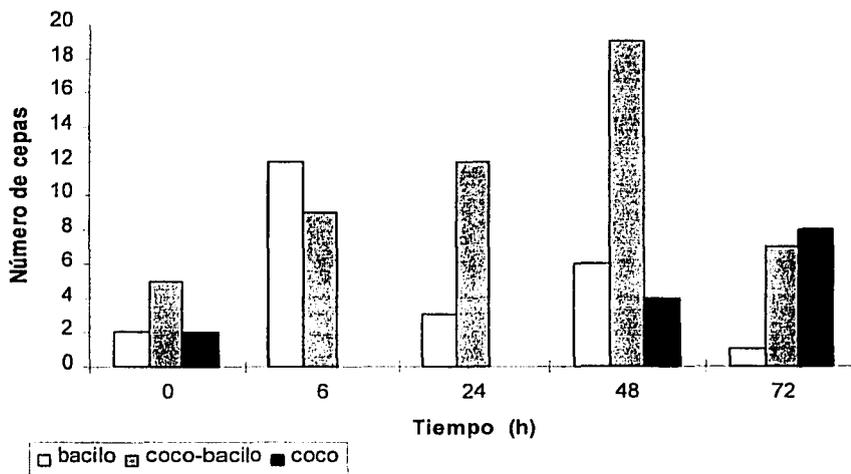
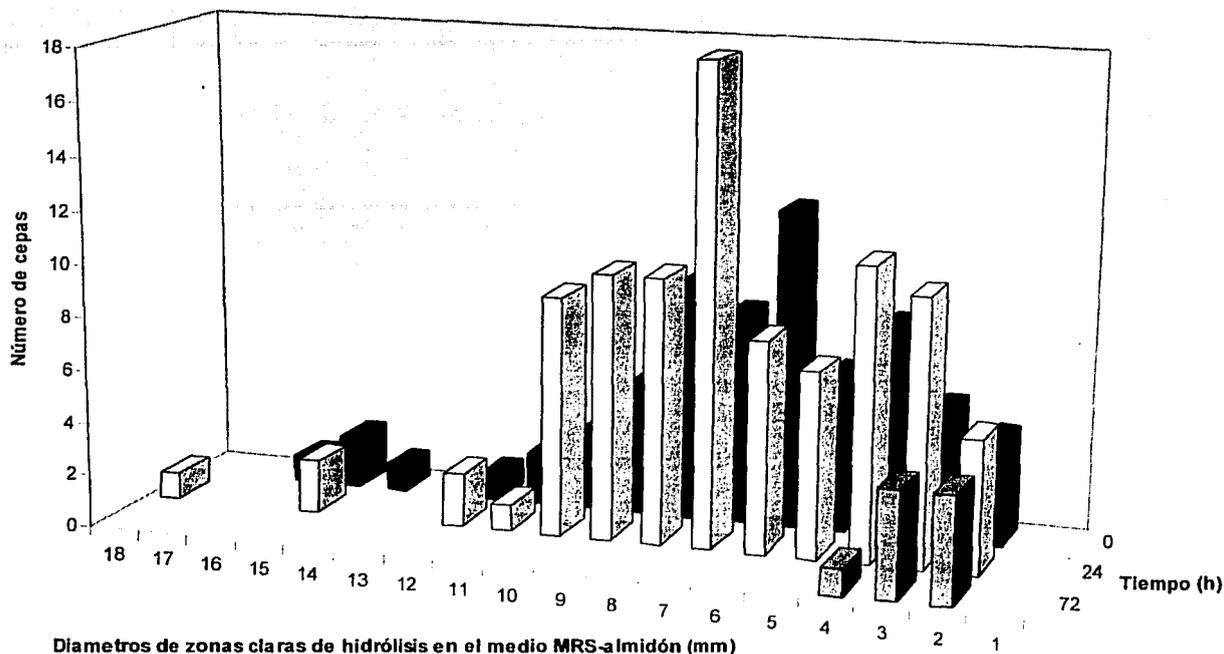


Figura 2. Morfologías de las bacterias lácticas amilolíticas en la fermentación del pozol, muestra A.

En todas las etapas de la fermentación se aislaron cepas con morfologías bacilares y cocoides (Figura 2). De acuerdo con la morfología observada, no predominan las cepas con forma bacilar cuando se aislaron de muestras acidificadas (valores de pH de 4.8 a 4.4 a las 24 y 72 h de fermentación, respectivamente). Esto contrasta con lo que se ha observado en etapas finales de otras fermentaciones lácticas, donde predominan las bacterias con formas bacilares como *Lactobacillus*, que generalmente predomina por ser más resistente a la acidez (Damelin y col. 1995). La mayor parte de las cepas de bacterias lácticas con actividad amilolítica aisladas de alimentos fermentados pertenecen al género *Lactobacillus* (Morlon-Guyot y col. 1998; Sanni y col. 2002). Los resultados descritos indican que las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol presentan diversidad en cuanto a su morfología, aunque no es un criterio de identificación concluyente. Se ha descrito la tendencia polimórfica de las bacterias lácticas de morfología bacilar, ya que se presentan en formas que van desde coco-bacilos distribuidos irregularmente a bacilos largos en cadenas (Parés y Juárez, 1997). Los *Lactococcus* presentan una morfología básica típica, células ovoides que pueden estar solas, en pares o en cadenas y que pueden elongarse en la dirección de la cadena, que no es suficiente para diferenciar a este género de otros como *Streptococcus* o *Enterococcus* (Teuber, 1995). De hecho, la elongación de algunas de las células de *Lactococcus* en el plano de formación de la cadena (pareciendo coco-bacilos) provoca la clasificación errónea de algunos lactococos como lactobacilos (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las cepas aisladas de la muestra B presentaron halos de hidrólisis en el medio MRS-almidón de mayor diámetro (2 - 18 mm) que los producidos por las cepas de la muestra A (1 - 9 mm). Un gran número de cepas tuvieron halos de hidrólisis de 7 mm de diámetro y el diámetro promedio fue de 6.8 mm tanto a las 6 como a las 24 h mientras que a las 72 h fue de 2.7 mm (Figura 3). Los mayores diámetros de halos de hidrólisis del almidón (18 mm) se observaron en cepas aisladas a las 24 h en la muestra B. Se obtuvieron resultados similares para las cepas de la muestra A.



Diametros de zonas claras de hidrólisis en el medio MRS-almidón (mm)

Figura 3. Distribución de los diámetros de hidrólisis en el medio MRS-almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol (muestra B).

Los halos de hidrólisis observados en el medio MRS-almidón fueron similares (10 - 15 mm) a los reportados para cepas amilolíticas de *Lactobacillus fermentum*, aisladas del ogi en el mismo medio de cultivo (Agati y col. 1998).

La alta concentración inicial de BLA indica su importancia durante la fermentación del pozol, principalmente en las primeras 24 horas, cuando un alto número de BLA presentan diámetros de halos de hidrólisis en el rango de 7 - 18 mm. Esto sugiere que condiciones tales como valores iniciales de pH altos (7.4) podrían haber favorecido el crecimiento de bacterias con mayor actividad amilolítica. En contraste, el alto número relativo de bacterias lácticas no amilolíticas que se observó al final de la fermentación se podría explicar por un

uso eficiente de mono y disacáridos presentes inicialmente en la masa a concentraciones bajas y a otros azúcares disponibles a partir de la hidrólisis del almidón por las BLA.

La presencia de bacterias lácticas con capacidad amilolítica ya se había reportado previamente en el pozol. La mayoría de las bacterias lácticas aisladas por Nuraida y col. (1995) hidrolizaron el almidón en cajas; Ampe y col. (1999) sugieren un papel importante de *Lactobacillus fermentum* con actividad amilolítica en el pozol. Ben Omar y Ampe (2000) detectaron BLA aunque no recuperaron ni identificaron alguna de las cepas. Sorpresivamente, estos autores reportaron cuentas similares tanto de bacterias lácticas amilolíticas como de bacterias lácticas totales (mayores a 10^9 ufc/g a las 72 h de fermentación), esto pudo deberse a errores en la técnica de cuenta en placa, ya que el conteo total de colonias en las placas de agar MRS-almidón, sin considerar solo las que tengan zonas claras de hidrólisis, puede dar resultados similares a la cuenta en placa en MRS-glucosa.

Aunque existen diversos reportes de la presencia de bacterias lácticas amilolíticas en alimentos fermentados, éste es el primer trabajo en el que se realiza un conteo, purificación y conservación de ese grupo de microorganismos durante toda la fermentación, sin considerar sólo las más amilolíticas, tal como ha sucedido en dichos reportes.

Cuantificación de grupos microbianos.

La fermentación del pozol inició con una cuenta de enterobacterias de 1.3×10^6 ufc/g de masa seca, con una cuenta máxima de 5.1×10^8 ufc/g de masa seca a las 24 h. Aunque la cuenta disminuyó durante el avance del proceso fermentativo, no desaparecieron después de una semana de fermentación, 3.3×10^6 ufc/g de masa seca (Figura 4).

Durante toda la fermentación se tuvieron cuentas altas de mesófilos aerobios. Inicialmente se detectó una cuenta de 1.8×10^9 ufc/g de masa seca y la cuenta más alta se presentó a las 72 h, 2.5×10^{10} ufc/g de masa seca (Figura 4). La cuenta de mesófilos aerobios amilolíticos fue aumentando con el avance de la fermentación, ya que al inicio se tuvo una cuenta de 1.6×10^6 ufc/g de masa seca y a las 72 h aumentó hasta 2.6×10^9 ufc/g de masa seca (Figura 4).

La fermentación del pozol inició con cuentas bajas de hongos y levaduras (5×10^2 y 1.1×10^4 ufc/g de masa seca, respectivamente). Desde las 24 h las cuentas se incrementaron en forma acelerada, a las 72 h se tuvo una cuenta de hongos de 1.2×10^8 ufc/g de masa seca y una cuenta de levaduras de 6.1×10^9 ufc/g de masa seca (Figura 4).

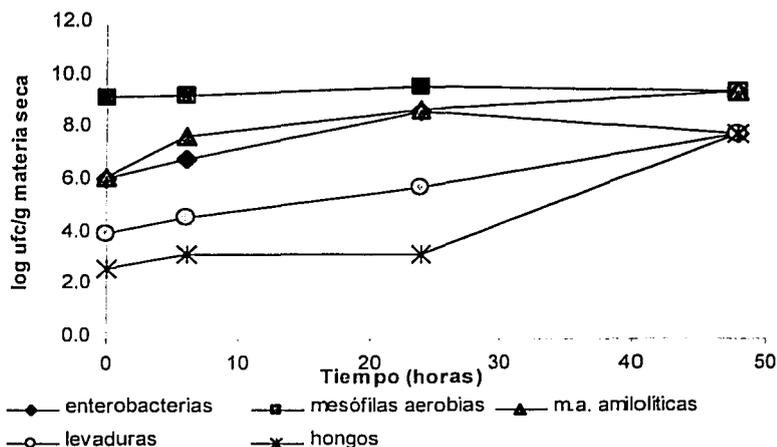


Figura 4. Cuantificación de grupos microbianos durante la fermentación del pozol. Muestra A.

La cuantificación de los grupos microbianos presentes en la muestra A indicó que la fermentación del pozol se desarrolló de acuerdo con lo reportado previamente (Wacher y col. 1993; Nuraida y col. 1995; Ampe y col. 1999).

No fue posible realizar el conteo de hongos y levaduras amilolíticas, ya que el crecimiento de dichos grupos se dio sin la presencia de halos de hidrólisis del almidón y coincide con lo reportado por Ampe y col. (1999) en una muestra de pozol de 5 días de fermentación. Se ha reportado la capacidad de algunas levaduras aisladas del pozol para hidrolizar el almidón tanto en medio sólido como líquido (Nuraida y col. 1995) así como de algunos hongos (Rivera, 2001). De los mesófilos aerobios, se evaluó la actividad amilolítica de algunas cepas de *Bacillus*. Se determinó que *Bacillus lentus* es muy sensible a la acidez cuando crece en cultivo mixto con *Lactobacillus plantarum*, reduciendo su actividad amilolítica y su crecimiento (Rivera, 2001). Durante la fermentación del pozol se da una reducción en los valores de pH, por lo que es muy posible que la actividad amilolítica sea aportada básicamente por las bacterias lácticas, dada la incapacidad de otros grupos para mantener su actividad amilolítica en las condiciones del medio.

Conclusiones

- Los altos números de bacterias lácticas amilolíticas y su desarrollo durante la fermentación indican que son importantes para la fermentación del pozol.
- Las bacterias lácticas con la mayor actividad amilolítica (halos de hidrólisis en cajas de medio MRS-almidón) proceden de las etapas iniciales de la fermentación.
- Por las morfologías encontradas a lo largo de la fermentación, parece que la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas es amplia y no predominan las formas bacilares.

7.2 DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS AMILOLÍTICAS EN EL POZOL MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN POLIFÁSICA.

Descripción de la etapa.

Las bacterias lácticas amilolíticas son un grupo importante en la fermentación del pozol ya que se encuentran presentes en números altos durante todo el proceso fermentativo. En el caso del pozol, como en el de otros alimentos fermentados que sufren una fermentación natural, es posible que la acción de las bacterias lácticas sobre el almidón no se deba a la presencia de un solo tipo de bacterias sino a la intervención conjunta de grupos diferentes. Se determinarán las diferencias entre las cepas aisladas de diferentes etapas de la fermentación. Se utilizará una aproximación polifásica, que incluya el uso de pruebas fenotípicas y genotípicas.

Objetivo:

- Identificar a las cepas de bacterias lácticas con mayor capacidad amilolítica mediante pruebas fenotípicas y genotípicas.

Resultados y discusión.

Se caracterizaron las 40 cepas más amilolíticas (aquéllas con diámetros de hidrólisis mayores a 9 mm) mediante una combinación de enfoques fenotípicos y taxonómicos moleculares.

Evaluación de la diversidad de las BLA mediante ribotipificación y análisis de la secuencia del rDNA 16S.

Del dendrograma de la ribotipificación de las bacterias lácticas amilolíticas se distinguieron dos grupos y dos líneas, las líneas son grupos con una cepa (Figura 5). El grupo 1a incluyó 22 cepas (19 de la muestra B y 3 de la muestra A) y emergieron a un nivel de similitud del 54%. El grupo 1b incluyó 1 cepa de la muestra B y 13 cepas de la muestra A, mismas que emergieron con un nivel de similitud del 54%. Una de las líneas (L1), que emergió a un nivel de similitud del 32%, incluyó una cepa de la muestra A. Dos cepas de la muestra A emergieron a un nivel de similitud del 49% (grupo 2) y una línea (L2) con una cepa de la muestra A emergió a un nivel de similitud del 10%.

Se observó que mayoría de las cepas de la muestra B se agruparon en el grupo 1a, mientras que en el grupo 1b se aglutinaron la mayor parte de las cepas de la muestra A (Figura 5). El agrupamiento generado no está relacionado con el tiempo de fermentación del cual se aislaron las cepas, sin embargo, debe considerarse que la selección de cepas se realizó con base en la capacidad amilolítica sin considerar el tiempo de fermentación en el que se aislaron, de ahí las diferencias en el número de cepas por etapa de fermentación.

Se ha demostrado que la ribotipificación es un método general para el análisis taxonómico de bacterias. Este método es una herramienta poderosa para la identificación de especies y también para distinguir entre subespecies o

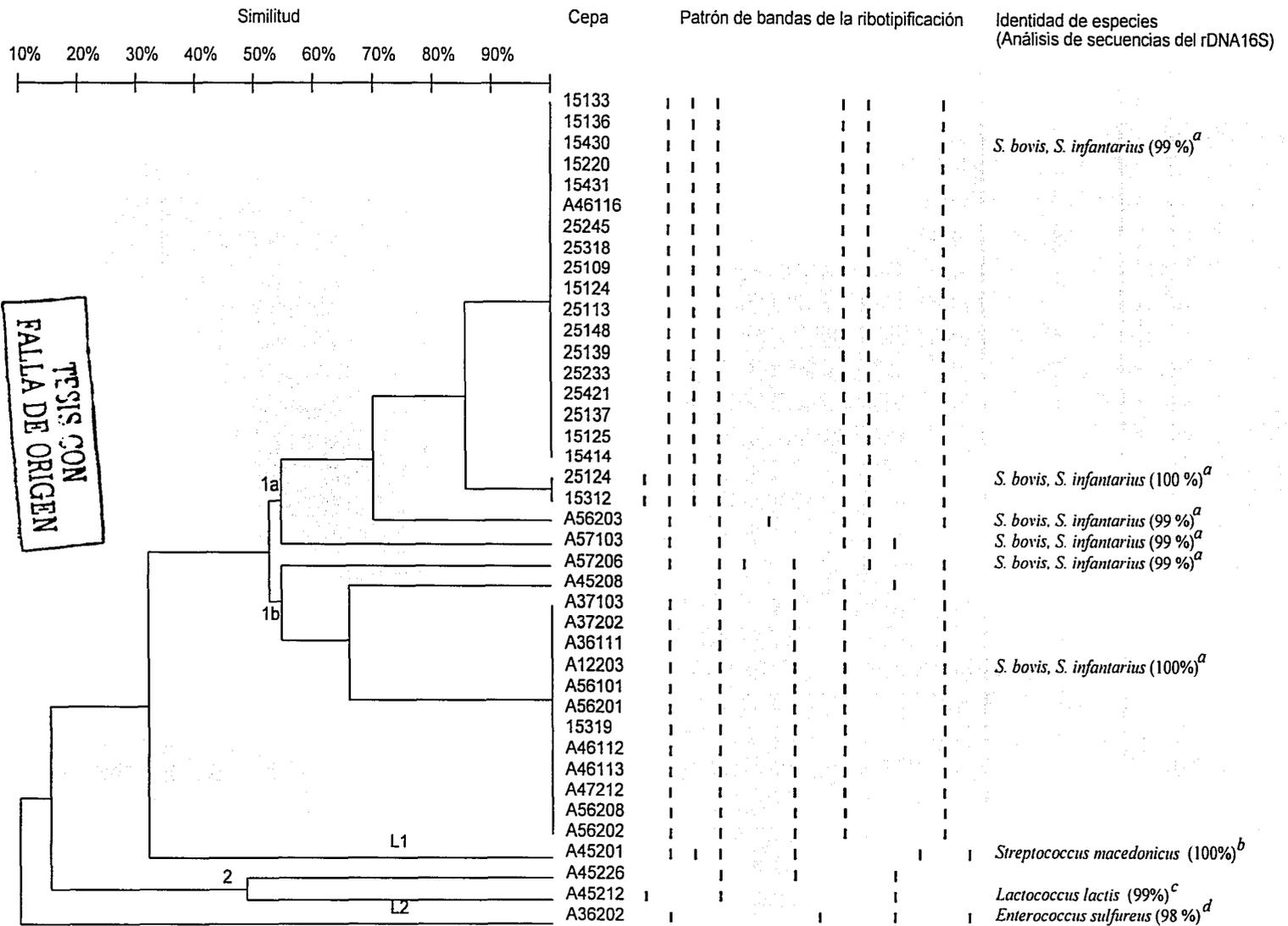


Figura 5. Dendrograma de las 40 cepas de bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica (muestras A [cepas marcadas con una "A"] y B [cepas que no tienen letra en su clave] basado en la ribotipificación con EcoRI. El análisis de similitud se realizó con el procedimiento de Link y col. (1995) y se construyó el árbol usando el UPGMA. Las identificaciones de "a", "b" y "c" se basaron en comparaciones con la secuencia del gen rRNA 16S de una secuencia parcial (correspondiente a las posiciones 30 – 338 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) y la identificación de "d" se basó en la secuencia casi completa (correspondiente a las posiciones 30 – 1521 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*). En paréntesis se indican los porcentajes de similitud de las identificaciones por comparación de secuencias del gen rRNA 16S.

biotipos. Hasta la fecha, la aplicación de la ribotipificación se ha extendido más allá de la diferenciación de especies bacterianas de importancia médica y tiene un gran potencial para su uso en otras áreas, incluyendo aquéllas de la industria de alimentos y de los lácteos.

Schlegel y col. (2000) utilizaron la ribotipificación en combinación con otros métodos moleculares y pruebas fenotípicas para la identificación de 18 cepas aisladas de humanos y de alimentos, las cuales se caracterizaron como variantes atípicas manitol negativas de *Streptococcus bovis*. El análisis comparativo de las secuencias del rRNA 16S demostró que estas cepas representan a una especie nueva, *Streptococcus infantarius* (Bouvet y col. 1997). Los resultados de la ribotipificación y de las pruebas de hibridación demostraron la presencia de dos subgrupos de DNA diferentes entre las 18 cepas. Con base en estos datos, se propusieron los nombres *S. infantarius* subs. *infantarius* (aesculina negativa) y *S. infantarius* subsp. *coli* (aesculina positiva) para nombrar a las subespecies dentro de esa especie.

Se obtuvieron las secuencias de la región hipervariable V1 (posiciones 30-338 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) de los genes rRNA 16S de cepas de los principales grupos del dendrograma de la ribotipificación (Figura 5). Las cepas 15430, 25124, A56203 y A57103 del grupo 1a y las cepas A57206 y A12023, del grupo 1b se identificaron tentativamente como *Streptococcus bovis*, ya que tuvieron coeficientes de similitud entre 99 y 100% con esta especie, pero también con *Streptococcus infantarius* ssp. *coli*. Estas cepas de *S. bovis* fueron las bacterias lácticas amilolíticas dominantes. La cepa A45201 (L1) mostró 100% de similitud con *Streptococcus macedonicus* y la cepa A45212 (grupo 2) 99% de similitud con *Lactococcus lactis* (*L. lactis*). La secuencia casi completa (posiciones 30-1521 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) de la cepa A36202 mostró 98% de similitud con *Enterococcus sulfureus* (*E. sulfureus*), Figura 5, aunque aún debe confirmarse su identidad, ya que algunas especies de

enterococos muestran menos del 1% de divergencia en sus secuencias (Devriese y Pot, 1995).

En trabajos previos (Ampe y col. 1999; Escalante y col. 2001; Nuraida y col. 1995) ya se había demostrado que las bacterias lácticas del pozol forman un grupo heterogéneo, identificándose los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. En este trabajo se demuestra la importancia y la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol. Las cepas aisladas pertenecen a géneros relacionados: *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, con *S. bovis* como la especie dominante durante la fermentación.

Se han aislado cepas amilolíticas de *S. bovis* del rumen de bovinos (Cotta, 1988; Walker, 1965). *Streptococcus suis* fue detectado en el pozol por Escalante y col. (2001). Previamente ya se había detectado la presencia de *S. bovis* en muestras de pozol mediante patrones generados en el DGGE y con sondas moleculares (Ben Omar y Ampe, 2000), sin embargo, no se había logrado aislar al microorganismo.

S. bovis incluye cepas capaces de crecer en presencia de 6.5% de NaCl y a pH 9.6 y algunas cepas son termodúricas (Hardie y Whiley, 1995). Considerando estas características, es posible que la cocción alcalina realizada durante la elaboración del nixtamal contribuya en la selección de este tipo de bacterias. Sin embargo, no se esperaban altas frecuencias de sobrevivencia de esta bacteria durante la fermentación, pues se ha reportado que esta especie inhibe rápidamente su crecimiento cuando el pH baja (Hardie y Whiley 1995). Esto podría influir en la reducción de la población global de bacterias lácticas amilolíticas al final de la fermentación del pozol; sin embargo, las cepas que pertenecen a la especie *S. bovis* se aislaron durante todo el proceso de fermentación, a pesar de la disminución del pH a valores de 4.8 hasta 4.4. Estos

resultados contradicen resultados preliminares (Ampe y col. 1999; Ben Omar y col. 2000), en los que se mostró una banda intensa en el DGGE correspondiente a *S. bovis* durante 96 h de fermentación, la cual además representó el 50% de la microbiota total activa. Sin embargo, de acuerdo con los autores, estos datos podrían estar sesgados por las técnicas utilizadas para determinar la abundancia de especies y por una posible co-migración del rDNA 16S de especies diferentes (Ben Omar y Ampe 2000). Sin embargo, una concentración alta de DNA no es contradictoria con las cuentas en placa bajas, ya que la capacidad de crecimiento de las especies podría verse alterado por las condiciones de pH generadas durante la fermentación, produciéndose por ejemplo, células viables pero no cultivables. Otra explicación complementaria para la sobrevivencia de *S. bovis* en la masa acidificada sería la presencia de microambientes de pH más alto (mantenidos después del tratamiento alcalino del maíz).

Se encontraron otras tres especies de bacterias lácticas amilolíticas, *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de cepas amilolíticas de *S. macedonicus* y de *E. sulfureus*. *S. macedonicus* se aisló de un queso griego Kasseri (Tsakalidou y col. 1998) y ya se había reportado la presencia de *L. lactis* en el pozol (Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante y col. 2001; Nuraida y col. 1995). De un producto tailandés, el plaa-som, se aisló una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* que fermenta el almidón (Østergaard y col. 1998), sin embargo, a diferencia de la cepa aislada del pozol, ésta solo se aisló durante el primer día de fermentación (Paladun-Müller y col. 1998). La mayoría de las bacterias lácticas amilolíticas aisladas de alimentos fermentados de otros cereales o de la yuca pertenecen al género *Lactobacillus* (Agati y col. 1998; Johansson y col. 1995; Sanni y col. 2002). En comparación con los alimentos fermentados africanos que se preparan con cereales, pareciera que el pozol es un ecosistema alimenticio en el que se desarrollan otros tipos de bacterias lácticas

amilolíticas. La ausencia de *Lactobacillus* entre las bacterias lácticas más amilolíticas en el pozol podría estar relacionado con las condiciones impuestas por el proceso (la cocción alcalina) o a que su actividad amilolítica sea más baja en estas condiciones.

Se ha utilizado con éxito el análisis de las secuencias del rDNA 16S en combinación con otras herramientas moleculares o taxonómicas para identificar cepas del género *Streptococcus* y para ayudar a esclarecer la taxonomía del grupo *S. bovis*, cuya diversidad genética y bioquímica no han permitido un consenso. Se han identificado especies nuevas, como *Streptococcus infantarius* (Schlegel y col. 2000); mientras que Clarridge y col. (2001) utilizaron el análisis de las secuencias del rDNA 16S para diferenciar un conjunto de cepas clínicas de *S. bovis* aisladas de hombres adultos; demostraron que las cepas analizadas son distintas a las cepas tipo de *S. bovis*, *S. gallolyticus* y *S. infantarius* y que pertenecen a variedades nuevas de *S. bovis*.

La interpretación de los datos de secuencias del rDNA 16S puede ser complicada, dado que pueden existir secuencias diferentes del rDNA 16S dentro de un solo organismo (Ueda y col. 1999) o de manera alternativa, por el hecho que especies diferentes puedan tener secuencias de rDNA 16S casi idénticas. Esto último se ha observado para miembros del género *Streptococcus*, principalmente *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis* (Kawamura y col. 1995). Las secuencias del rDNA 16S de las cepas tipo del grupo de *S. bovis* (*S. bovis*, *S. caprinus*, *S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius* y *S. macedonicus*) muestran un porcentaje de identidad en el rango del 97.1 (por ejemplo para *S. equinus* y *S. gallolyticus*, y *S. gallolyticus* y *S. infantarius*) al 99.8% (*S. bovis* y *S. infantarius*). Para diferenciar dichas cepas, se requiere que las secuencias a estudiar tengan una sola copia y que tengan una mayor divergencia que la del rDNA 16S. El gen *sodA* de los cocos Gram-positivos, que codifica para la enzima superóxido dismutasa dependiente de

manganeso (Mn-SOD) cumple con este requisito (Poyart y col. 2002). A pesar de las limitaciones, el análisis de las secuencias del gen rRNA 16S es de gran importancia para la taxonomía bacteriana moderna y la base de datos de las secuencias de este gen es la más completa que existe (Larsen y col. 1993).

Poyart y col. (2002) realizaron un análisis taxonómico del grupo de *S. bovis*, mediante el análisis de secuencias del gen *sodA* y demostraron la utilidad de la base de datos basada en este gen para la identificación de cepas del complejo *S. bovis* - *S. equinus*. Mediante estudios filogenéticos de las secuencias de los genes *sodA* y experimentos de hibridación DNA:DNA se reconocieron dos especies nuevas dentro del género *Streptococcus*, para las cuales se propusieron los nombres *Streptococcus lutetiensis* (antes *S. infantarius* subsp. *coli*) y *Streptococcus pasteurianus* (antes *S. bovis* biotipo II2). Esta misma metodología podría utilizarse para ayudar a determinar la identidad de las cepas de *S. bovis* aisladas de pozol.

Caracterización de cepas por métodos fenotípicos.

Determinación de la vía metabólica.

Mediante el uso de una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se determinó que todas las cepas eran homofermentativas. Las cepas solo produjeron ácido láctico a partir de glucosa, en concentraciones promedio de 50 - 60 mM, excepto la cepa A36202 cuya concentración de ácido láctico en el cultivo fue de 25 mM.

La mayoría de las bacterias lácticas amilolíticas aisladas de alimentos fermentados son homolácticas, como *L. manihotivorans* (Morlon-Guyot y col. 1998) o heterolácticas facultativas, tales como *L. plantarum* (Olympia y col. 1995). También hay reportes sobre el aislamiento de bacterias lácticas amilolíticas heterofermentativas estrictas, tales como *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del ogi nigeriano (Johansson y col. 1995), cepas de

Leuconostoc sp. aisladas de forraje de pescado fermentado (Lindgren y Refai, 1984) y *Lactobacillus fermentum* aislada de masas fermentadas de maíz, mawe y ogi (Agati y col. 1998).

Identificación bioquímica de BLA.

A partir del sistema API 50 CH se determinó que todas las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol fueron capaces de fermentar sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa y almidón, los cuales corresponden a los principales carbohidratos del maíz (Boyer y col. 1987), reflejando una adaptación a su hábitat. Además, todas las cepas (excepto la A36202) fueron capaces de fermentar rafinosa, un α -galactósido que se encuentra presente en cereales y leguminosas y que es responsable de trastornos digestivos. Otros sustratos como la D-manosa, la N-acetil glucosamina, la esculina, la salicina y el glucógeno también fueron fermentados por todas las cepas.

Ninguna de las cepas produjo ácido a partir de eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, β -metil-xilósido, L-sorbosa, ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α -metil-D-manósido, lactosa, inulina, melezitosa, xilitol, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-ceto-gluconato y 5-ceto-gluconato. La producción de ácido fue variable a partir de glicerol, ribosa, galactosa, α -metil-D-glucósido, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, celobiosa, melibiosa, trehalosa, D-rafinosa, β -gentobiosa y D-turanosa (Tabla 3). La mayoría de las cepas de los grupos 1a y 1b de la ribotipificación (Figura 5) compartieron el mismo perfil bioquímico, con la excepción de la fermentación de trehalosa, la cual fue negativa para la mayoría de las cepas del grupo 1a y positiva para la mayoría de cepas del grupo 1b. En comparación con los grupos 1a y 1b, las cepas del grupo 2 y de ambas líneas mostraron variaciones en la fermentación de α -metil-D-glucósido, amigdalina, arbutina, celobiosa, D-turanosa, melibiosa, glicerol, β -gentobiosa, galactosa y D-rafinosa. De acuerdo con los perfiles API 50 CH, el programa APILAB Plus

Tabla 3. Perfiles de fermentación de carbohidratos de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol^a (muestras A y B).

Cepa	Número de													grupo ^b
	GLY	RIB	GAL	MDG	NAG	AMY	ARB	CEL	MEL	TRE	RAF	GEN	TUR	
15133	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15136	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15430	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15220	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	1a
15431	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1a
A46116	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1a
25245	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25318	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
25109	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15124	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25113	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25148	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25139	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25233	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25421	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25137	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15125	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15414	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
25124	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15312	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
A56203	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	1a
A57103	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	1a
A57206	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1b
A45208	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A37103	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A37202	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A36111	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A12203	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1b
A56101	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1b
A56201	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
15319	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1b
A46112	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1b
A46113	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1b
A47212	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A56208	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A56202	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	1b
A45201	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	L1
A45226	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	2
A45212	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	2
A36202	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	L2

^a (+), el carbohidrato se fermentó; (-), no se fermentó el carbohidrato. Abreviaciones: GLY, glicerol; RIB, ribosa; GAL, galactosa; MDG, α-metil-D-glucósido; NAG, N-acetil-glucosamina; AMY, amigdalina; ARB, arbutina; CEL, celobiosa; MEL, melibiosa; TRE, trealosa; RAF, D-rafinosa; GEN, β-gentobiosa; TUR, D-turana. ^b Los números de grupo corresponden a los de la ribotipificación (Figura 5).

TP SIS CON
 FALLA DE ORIGEN

identificó a todas las cepas como *Lactobacillus crispatus*, sin embargo, solo el 7.5% de los patrones resultaron en identificaciones excelentes y el resto fueron dudosas.

A partir de los resultados del sistema API 20 STREP, las cepas 15430, 25124, A56203, A57206 y A12203 se identificaron como *Streptococcus bovis* biotipo II1 con un porcentaje de identificación (%id) del 93.1, las cepas A57103 y A45212 se identificaron como *Streptococcus bovis* biotipo II1 con 95.1 y 96.3 %id, respectivamente. Las cepas A45201 y A36202 se identificaron como *Streptococcus equinus* con 85.7 y 45.9 %id, respectivamente. En el caso de las cepas 15430, 25124, A56203, A57206, A57103 y A12203, las cuales tuvieron alta homología en la secuencia del rDNA 16S con *S. bovis*, las galerías API20 STREP dieron buenas identificaciones con esta especie, mientras que las cepas A45201 y A45212 se identificaron como *S. equinus* y *S. bovis*, respectivamente y se obtuvo una identificación no válida para la cepa A36202. Desde el principio de los años 80's se ha evidenciado la diversidad bioquímica en el grupo de *S. bovis*. Diversos grupos han estudiado esta diversidad y han producido esquemas para clasificar estas cepas en biotipos (Clarridge y col. 2001). El biotipo I incluye a las cepas manitol-positivas, mientras que el biotipo II considera a las cepas manitol-negativas. Las cepas del biotipo II1 fermentan almidón, melibiosa y glucógeno pero no trehalosa; no producen β -glucuronidasa o β -galactosidasa. Las cepas del biotipo II2 fermentan trehalosa pero no almidón ni glucógeno; producen β -glucuronidasa y β -galactosidasa (Schlegel y col. 2000). Esta terminología se ha utilizado comúnmente para la identificación de cepas clínicas y en ella se basa la identificación con el API 20 STREP. La caracterización fenotípica del grupo de *S. bovis* ha sido utilizada por diversos autores, incluyendo el uso de sistemas comerciales como el API 20 STREP y el Rapid ID32 Strep (Clarridge y col. 2001; Schlegel y col. 2000; Devriese y col. 1998).

Se han descrito las limitaciones del uso de sistemas comerciales para la identificación de cepas aisladas de ambientes que se han estudiado extensamente, como en el caso del pozol. En general, los sistemas comerciales (como las galerías API) basan su identificación en bases de datos preexistentes, que contienen información de especies clínicas o de interés comercial y no son adecuadas para especies de ambientes distintos (Busse y col. 1996; Russek-Cohen y Colwell, 1996). Asimismo, se han reportado las deficiencias de los sistemas comerciales disponibles para la identificación de especies clínicas importantes del género *Enterococcus* (Iwen y col. 1996).

Conclusiones

- Del dendrograma de la ribotipificación y del perfil de fermentación de carbohidratos se observa que existe diversidad entre las cepas de bacterias lácticas del pozol.
- El agrupamiento de las cepas de bacterias lácticas amilolíticas obtenido del análisis de los perfiles de la ribotipificación no está relacionado con el tiempo de fermentación pero sí con la muestra de la cual se aislaron.
- *Streptococcus bovis* es la especie dominante entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas del pozol, aunque también se identificaron otras especies como *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.
- No fue posible precisar la identidad de las cepas relacionadas con *S. bovis* y con *E. sulfureus*. Es necesario el uso de otros métodos como el análisis de los patrones de proteínas totales o la comparación de secuencias de otros genes como el de la superóxido dismutasa y el *rpoB*.
- El sistema API 50 CH no fue suficiente para la identificación de las bacterias lácticas amilolíticas del pozol aunque coinciden los perfiles de fermentación de carbohidratos de las cepas de cada grupo de ribotipificación. Con las galerías API 20 STREP se obtuvieron buenas identificaciones para la mayoría de las cepas que tuvieron alta similitud en la secuencia del rRNA 16S con *S. bovis*.

7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS AMILASAS.

Descripción de la etapa.

Las bacterias lácticas amilolíticas son importantes en la fermentación del pozol. Existe diversidad entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas y pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, siendo *S. bovis* la especie dominante.

En comparación con los alimentos fermentados africanos que se preparan con cereales, en los que las bacterias lácticas amilolíticas pertenecen al género *Lactobacillus*, parece que en el pozol se desarrollan otros tipos de bacterias. Las diferencias entre las especies de bacterias lácticas amilolíticas encontradas en el pozol podrían estar relacionadas con las condiciones del proceso (ejemplo: la cocción alcalina). Este mismo proceso podría influir en las características de las amilasas de las bacterias lácticas del pozol de tal forma que las amilasas producidas por estas bacterias sean diferentes a las reportadas previamente.

Mediante el estudio de las propiedades bioquímicas de las amilasas producidas por las bacterias lácticas del pozol se determinará su importancia en la fermentación. Es de particular interés determinar si dichas enzimas se mantienen activas a lo largo de la fermentación, cuando el pH baja.

Objetivos:

- Determinar la actividad amilolítica de las cepas de bacterias lácticas con mayor capacidad amilolítica del pozol.
- Describir las propiedades generales de las amilasas producidas por tres especies de bacterias lácticas del pozol (*S. bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202).

Resultados y discusión.

Determinación de la actividad amilolítica extracelular y asociada a las células en las cepas de bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica.

a) Actividad amilolítica extracelular.

No se detectó actividad amilolítica en los sobrenadantes de los cultivos MRS-almidón de algunas de las cepas más amilolíticas (A57206, A36202, A56203, A12203, A57103, 25124, A45212, 15430, 25318, A46116, A46112, A45201, A45208, A36111 y A45226) cuando se utilizó la técnica del complejo almidón-yodo. Tampoco se detectó actividad amilolítica extracelular en los cultivos de las cepas: A57206, A36202, A56203, A12203, A57103, 25124, A45212 y 15430 con la metodología de reductores con DNS.

b) Actividad amilolítica asociada a las células.

La actividad amilolítica asociada a las células de las cepas 25124, A36202 y A45212 fue de 1.1, 0.07 y 1.7 U/ml, respectivamente cuando se usó la técnica de reductores con DNS. Usando el método de extinción del complejo almidón-yodo, se determinó la actividad amilolítica de cinco cepas: 15430, A57206, A46112, A45212 y A36202. No se detectó actividad amilolítica a 55°C ni a 45°C cuando el pH era de 5.5. A 45°C y pH 7.0 tres cepas tuvieron actividad: 15430 (1.36 U/ml), A36202 (0.42U/ml) y la A45212 (0.28 U/ml).

La mayoría de las bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados, principalmente del género *Lactobacillus*, liberan las amilasas que producen al medio de crecimiento (Olympia y col. 1995; Giraud y col. 1991), mientras que otras, como *Lactobacillus fermentum* y *L. manihotivorans* producen amilasas tanto extracelulares como asociadas a la célula (Agati y col. 1998; Morlon-Guyot y col. 1998).

Caracterización de las amilasas de *S. bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202.

Se caracterizaron las amilasas de *S. bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202.

Amilasa de *Streptococcus bovis* cepa 25124.**a) Actividad amilolítica asociada a las células.**

La actividad amilolítica asociada a las células fue de 0.06 U/mg células cuando se evaluó con el método de extinción del complejo almidón-yodo y de 0.125 U/mg células cuando se utilizó el método de reductores con DNS. El hecho de que *S. bovis* cepa 25124 sólo presente actividad amilolítica asociada a la célula la hace diferente a otras cepas de la misma especie aisladas de hábitats diferentes al pozol. Las cepas de *S. bovis* (148 y JB1) aisladas del rumen producen amilasas intra y extracelulares. Los primeros estudios con la cepa 148 se dirigieron a la amilasa extracelular y se desconocía la presencia de la amilasa intracelular. Se determinó que la distribución celular de la enzima depende del sustrato en el que crece. Cuando crece en un medio que contiene almidón, aproximadamente el 80% de la actividad amilolítica total está asociada a la célula, mientras que cuando crece en presencia de maltosa, más del 90% de la actividad amilolítica total se encuentra en el medio de cultivo (Sato y col. 1993;1997).

b) Rompimiento celular y liberación de la enzima.

Una vez que se determinó que la actividad de la cepa estaba asociada a la célula, se probaron diferentes metodologías (físicas y químicas, así como combinaciones de ellas) para romper las células y liberar a la enzima.

El uso de la sonda de ultrasonido facilitó la liberación de la amilasa. Las células limpias se trataron con lisozima, mutanolisina o la mezcla de ambas, los protoplastos obtenidos se rompieron con la sonda de ultrasonido y los fragmentos generados se trataron con un detergente no iónico. La mayor actividad del extracto celular (73 U/ml) se dio en cultivos MRS-almidón de 250 ml cuyas células se trataron con lisozima. Dada la alta concentración de enzima en el extracto, se

consideró a esta metodología como la más eficiente para la extracción de la enzima y se continuó utilizando posteriormente (Ver Materiales y Métodos). Este tratamiento favoreció la extracción de la amilasa, pero no indica la localización de la enzima.

c) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica de la enzima.

Para estudiar el efecto combinado de la influencia del pH y de la temperatura en la actividad amilolítica del extracto celular de *S. bovis* cepa 25124 se utilizó un diseño de segundo orden rotativo (Murado y col. 1993). Se obtuvo la mayor actividad de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 a pH 6.6 y 36 - 40°C (Figura 6). Esto coincide con los parámetros de mayor actividad amilolítica de la amilasa intracelular de *S. bovis* 148, pH 6.5 y 40°C (Satoh y col. 1997). La amilasa extracelular de *S. bovis* cepas 148 y JB1, así como las producidas por algunas especies de *Lactobacillus* presentan mayor actividad a pH 5.5 (Freer, 1993; Satoh y col. 1997; Morlon-Guyot y col. 1998). Otras como *Lactobacillus cellobiosus* D-39 tiene mayor actividad a pH 7.3 (Sen y Chakrabarty, 1984).

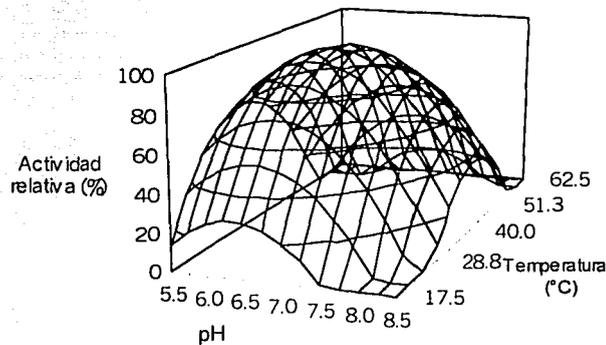


Figura 6. Actividad amilolítica de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 en función del pH y de la temperatura.

La mayor estabilidad de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 se observó a pH 6.5 cuando se incubó por 25 h tanto a 4 como a 30°C (Figura 7). La amilasa fue más estable a valores de pH entre 7.0 y 9.0 (60-80% de actividad relativa) que a valores de pH ácidos, con una disminución muy marcada en el rango de pH de 5.0 a 6.0. En ambas temperaturas se observó una inactivación total de la enzima cuando se incubó a pH 4. En el intervalo de valores de pH 5 a 6 la actividad residual para la amilasa incubada a 30°C fue menor que la de la incubada a 4°C. A valores de pH 7 y 9 hubo mayor actividad residual en los extractos incubados a 30°C que en los incubados a 4°C, mientras que a pH 8 las actividades residuales fueron similares a ambas temperaturas (Figura 7).

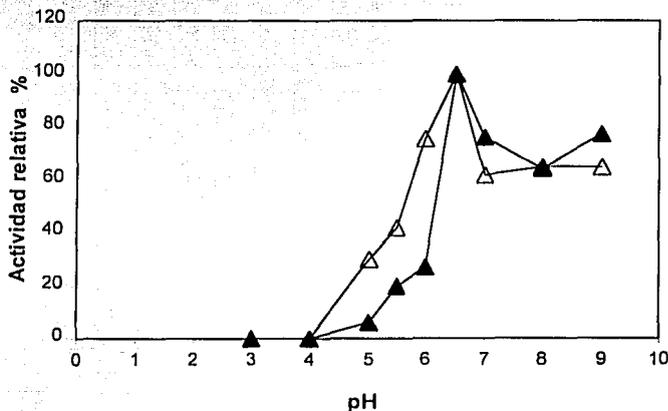


Figura 7. Estabilidad al pH de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124, después de 25 h de incubación a 30°C (▲) y a 4°C (△).

La mayor parte de la actividad amilolítica del extracto celular de *S. bovis* cepa 25124 se mantuvo a temperaturas menores de 45°C cuando se incubó por 10 minutos. A medida que las temperaturas de incubación se incrementaron se observó una reducción en la actividad de la enzima, la cual fue más marcada en ausencia de almidón. A 60°C, la enzima perdió la actividad (Figura 8).

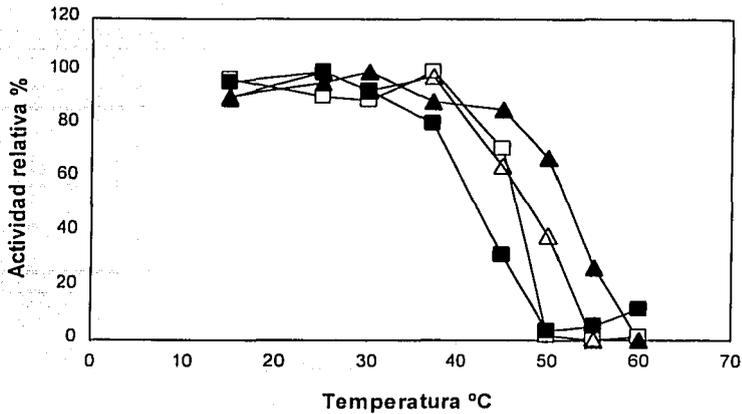


Figura 8. Estabilidad a la temperatura de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124. (60 minutos: ■, sin almidón; □, con almidón; 10 minutos: ▲, con almidón; △, sin almidón).

La amilasa de esta cepa fue sensible a temperaturas mayores a los 30°C cuando se incubó por 1 hora, perdiendo aproximadamente el 70% de su actividad a 45°C en ausencia de almidón, mientras que la estabilidad térmica fue mas alta en presencia de almidón. Después de que la enzima se incubó por una hora a 50°C perdió su actividad (Figura 8). La α -amilasa extracelular de *S. bovis* JB1 fue relativamente estable entre pH 5.5 y 8.5 y a temperaturas menores a 50°C (Freer, 1993).

d) Estimación del peso molecular de la enzima.

La amilasa de *S. bovis* cepa 25124 tuvo un peso molecular aproximado de 250 kDa (Figura 9), que es el mayor peso reportado para una amilasa de bacterias lácticas. Estos resultados se obtuvieron cuando la separación electroforética se realizó tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. Se han reportado amilasas de alto peso molecular como la de una cepa de *Lactobacillus plantarum* cuyo peso es de 230 kDa (Olympia y col. 1995) y la amilasa de *Lactobacillus amylovorus* con 105 kDa (Nakamura, 1981). Rodríguez-Sanoja y col. (2000) demostraron que el papel de las secuencias repetidas en el extremo carboxilo de

la amilasa de *Lactobacillus amylovorus* es el de unirse al almidón crudo. Las amilasas intra y extracelulares de *S. bovis* 148 tienen pesos moleculares de 57 y 77 kDa, respectivamente (Sato y col. 1997) menores al reportado en este trabajo.

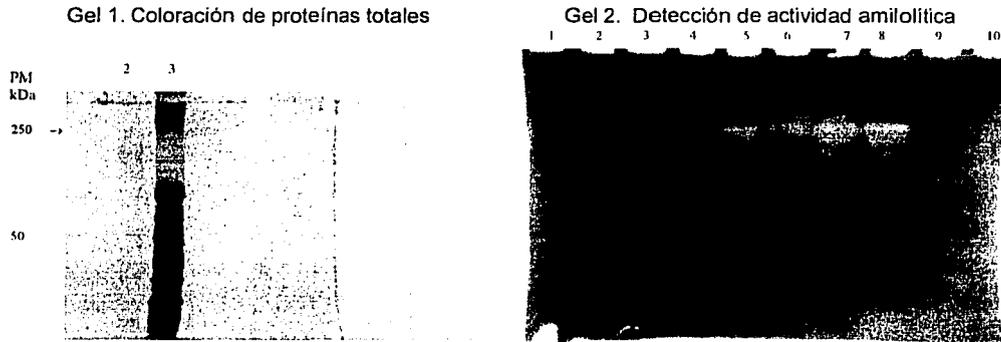


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de extractos celulares de *S. bovis* cepa 25124. Gel 1: La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. Carril 2, marcador de peso molecular; carril 3, extracto celular de *S. bovis* cepa 25124. Gel 2: Zimograma. Carriles 5-8, extracto celular de *S. bovis* cepa 25124.

Amilasa de *Lactococcus lactis* cepa A45212.

a) Actividad amilolítica asociada a las células.

La actividad amilolítica asociada a las células fue de 0.04 U/mg células con el método de extinción del complejo almidón-yodo y de 0.19 U/mg células cuando se utilizó el método de reductores con DNS.

b) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la amilasa.

El pH y la temperatura óptimos de la amilasa de *L. lactis* A45212 fueron 6 y 30°C, respectivamente (Figura 10). La ley de Arrhenius se siguió entre los 10 y 30°C y la energía de activación de la enzima fue de 16.1 Kcal/mol y de 67.43 KJ/mol. A temperaturas mayores a 37°C se observó una reducción muy marcada en la actividad.

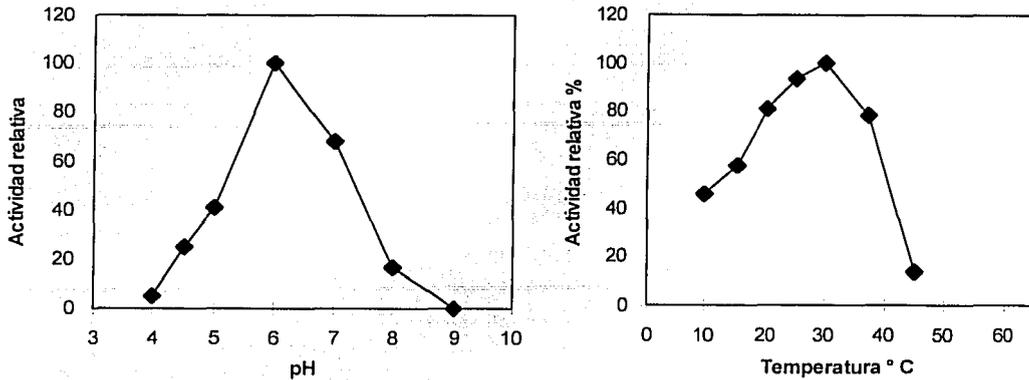


Figura 10. Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la amilasa de *L. lactis* cepa A45212.

La mayor estabilidad de la amilasa de *L. lactis* cepa A45212 se observó en el rango de valores de pH entre 5 y 9 a 4°C y la enzima se inactivó a pH 4.0 (Figura 11 B). A 30°C, se observó una mayor inestabilidad de la enzima a valores ácidos de pH. A esta temperatura, la máxima estabilidad se observó a pH 8.0. La amilasa fue estable en valores de pH alcalinos (6.5-9.0) en ambas temperaturas de incubación (Figura 11 B).

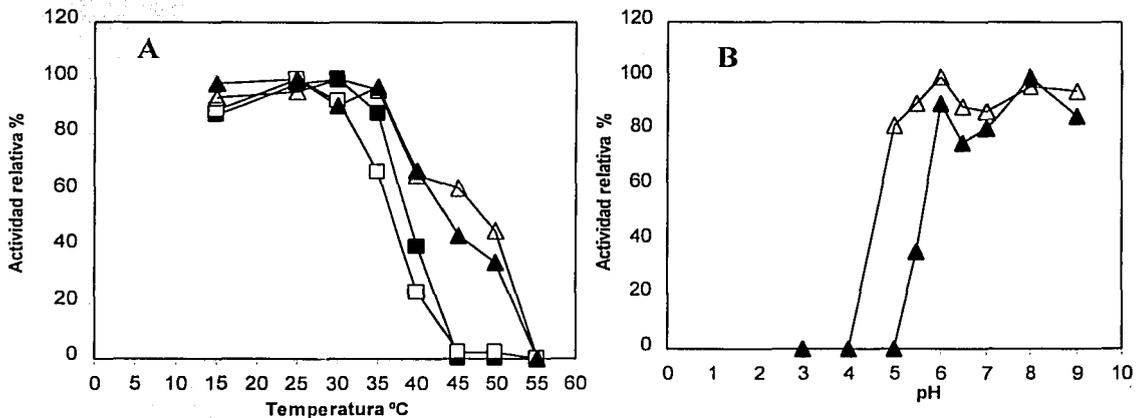


Figura 11. Estabilidad a la temperatura y al pH de la amilasa de *L. lactis* cepa A45212. A: temperatura (60 minutos: ■, sin almidón; □, con almidón; 10 minutos: ▲, sin almidón; △, con almidón). B: pH, después de 25 h de incubación a 30°C (▲) y a 4°C (△).

No se observó pérdida de actividad amilolítica entre 15 y 25°C después de 60 minutos de incubación tanto en presencia como en ausencia de almidón. Se observó una reducción gradual en la actividad cuando la enzima se incubó entre 30 y 40°C y ya no hubo actividad a 45°C (Figura 11 A).

Cuando la amilasa se incubó solo por 10 minutos, la mayor actividad amilolítica se presentó entre los 15 y 35°C, con y sin almidón (Figura 11 A). A partir de los 40°C se observó una reducción en la actividad de la enzima y se determinó que la presencia de almidón favoreció la conservación de mayor actividad amilolítica que en ausencia del mismo. A los 55°C ya no se detectó actividad residual.

Las amilasas de *S. bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 tienen estabilidad muy baja a valores de pH menores de 5.0. La estabilidad a valores bajos de pH se incrementó ligeramente en presencia de almidón, sugiriendo que el alto contenido de almidón en el pozol podría tener un papel protector. Es interesante observar que las amilasas de ambas cepas están bien adaptadas a las condiciones de pH inicial que imperan en el nixtamal debido a la cocción alcalina, pero su inestabilidad a valores bajos de pH probablemente limitarían su acción durante el desarrollo de la fermentación.

Aunque existen algunos reportes de las condiciones óptimas de pH y temperatura para las amilasas de bacterias lácticas, no en todos los casos se reportan pruebas de estabilidad. El hecho de que algunas amilasas de bacterias lácticas presenten un pH óptimo en el rango ácido no significa que sean estables a una incubación prolongada en esas condiciones. La amilasa de *L. manihotorans* tuvo un pH óptimo de 5.5 pero no fue resistente a una incubación prolongada a pH ácido (Aguilar y col. 2000).

Algunas amilasas de bacterias lácticas aisladas tanto de alimentos fermentados como de otros sustratos mostraron un comportamiento de estabilidad

al pH similar a las amilasas de las cepas estudiadas en este trabajo. Las amilasas de las especies *L. cellobiosus* D 39 (aislada de desperdicios vegetales), *L. manihotivorans* (aislada de harina de yuca fermentada), *Leuconostoc* (aislada de pescado fermentado con cereales) fueron estables en un rango neutro de valores de pH pero inestables en condiciones ácidas o alcalinas (Sen y Chakrabarty, 1986; Aguilar y col. 2000; Lindgren y Refai, 1984). A diferencia de las amilasas de las especies descritas previamente, las amilasas de la especie *L. plantarum* aislada del Burong isda y de la yuca fermentada (cepa A6) fueron estables en el rango de valores de pH 3.5 a 5.3 (Olympia y col.1995; Giraud y col. 1993).

En cuanto a la termoestabilidad, las amilasas de las cepas del pozol se inactivaron rápidamente a temperaturas mayores a 40°C tal como se reportó para las amilasas de *L. plantarum* (aislada del burong isda) y de *L. manihotivorans* (aislada de la harina de yuca fermentada). La amilasa de esta última especie tuvo una temperatura óptima mayor (55°C) a la que presentaron las amilasas estudiadas (30 - 37°C) pero mostraron la misma sensibilidad cuando se incubaron por tiempos prolongados a su temperatura óptima o mayores (Aguilar y col. 2000). En contraste, la amilasa de *L. amylovorus* fue estable a mayores temperaturas (Rodríguez-Sanoja y col. 2000). La amilasa de *Lactobacillus cellobiosus* se inactivó a temperaturas mayores que las de las amilasas de las cepas evaluadas, 90°C (Sen y Chakrabarty, 1984).

No es posible comparar todos los estudios sobre termoestabilidad de amilasas, ya que en muchos de ellos la incubación de la enzima se realizó en períodos muy cortos de tiempo o en condiciones diferentes. También existen algunos factores que pueden afectar la termoestabilidad, tal es el caso de la pureza del preparado, así como la presencia de calcio (estabilizante y activador), del sustrato y de otros estabilizantes (Vihinen y Mäntsälä, 1989).

c) Estimación del peso molecular.

La amilasa de esta cepa tiene un peso aproximado de 200 kDa, que es menor al obtenido para la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 (Figura 12).

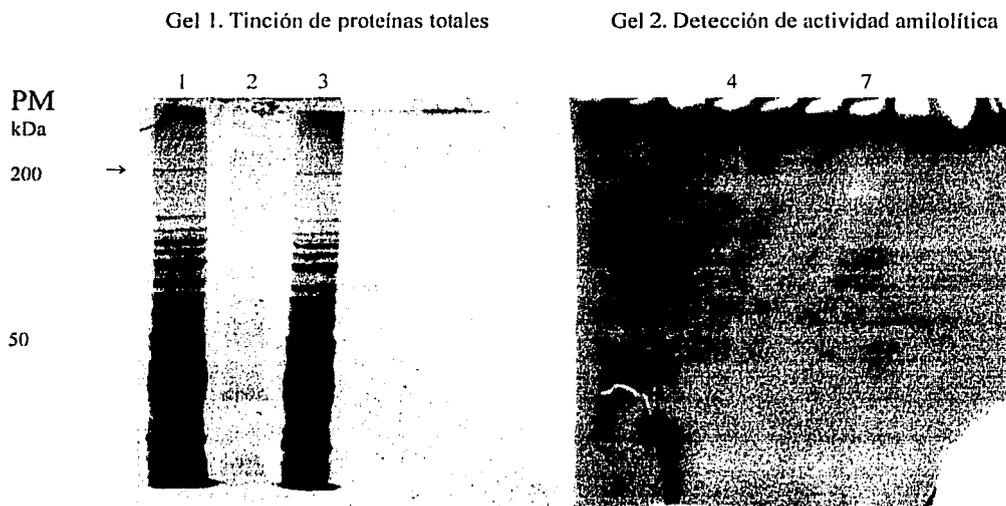


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de extractos celulares de *L. lactis* cepa A45212. Gel 1: La tinción de las proteínas se realizó con nitrato de plata. Carril 2, marcador de peso molecular; carriles 1 y 3, extracto celular de *L. lactis* cepa A45212. Gel 2: Zimograma. Carriles 4 y 7, extracto celular de *L. lactis* cepa A45212.

Amilasa de *E. sulfureus* cepa A36202.

a) Actividad amilolítica asociada a las células.

La actividad amilolítica asociada a las células de *E. sulfureus* cepa A36202 fue de 0.048 U/mg células cuando se utilizó el método de extinción del complejo almidón-yodo y de 0.008 U/mg células cuando se utilizó el método de reductores con DNS.

b) Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la enzima.

La mayor actividad de la amilasa de *E. sulfureus* cepa A36202 se dio a 37°C y pH 6.0 (Figura 13). La enzima no estaba activa en valores de pH de 4.5 y 9 ni a 65°C. De la representación de Arrhenius (entre 15 y 37°C) se calculó la energía de activación de la enzima y fue de 25.54 Kcal/mol y de 106.89 KJ/mol. A temperaturas mayores a 45°C se observó una reducción muy marcada en la actividad. Estos valores fueron mayores a los calculados para la amilasa de *L. lactis* A45212 (67.4 KJ/mol). La energía de activación de las α -amilasas de *L. plantarum* A6 y de *L. manihotivorans* fue de 30.6 y de 32.6 KJ/mol, respectivamente (Giraud y col. 1993; Aguilar y col. 2000).

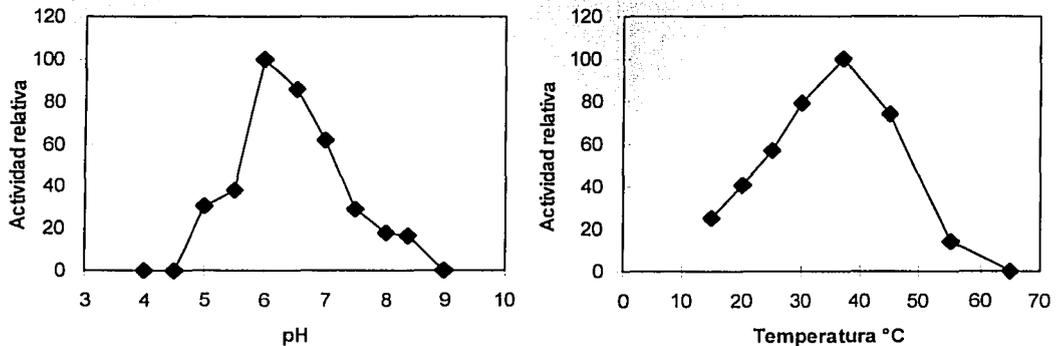


Figura 13. Efecto del pH y de la temperatura en la actividad de la amilasa de *E. sulfureus* cepa A36202.

E. sulfureus cepa A36202 perdió la actividad amilolítica después de almacenarse a -70°C , por lo que no fue posible estimar el peso molecular de su amilasa ni realizar pruebas de estabilidad al pH y a la temperatura.

La pérdida de la actividad amilolítica en esa cepa podría indicar que el gen correspondiente se encuentra en un plásmido. Olimpia y col. (1995) sugieren que un plásmido de 33-kb contiene un gen necesario para la síntesis de la amilasa producida por *Lactobacillus plantarum* cepa L-137. Se ha demostrado que *L. manihotivorans* pierde su actividad amilolítica irreversiblemente y se han aislado algunas variantes que carecen de actividad amilolítica (Morlon-Guyot y col. 2001).

Productos de hidrólisis del almidón.

Se cuantificó la concentración de almidón presente antes y después de 16 h de hidrólisis por las amilasas a evaluarse. En todos los casos se partió de una concentración inicial de almidón de 10 g/L y después de la hidrólisis se detectaron concentraciones muy bajas de sustrato sin hidrolizar (menores a 2 g/L).

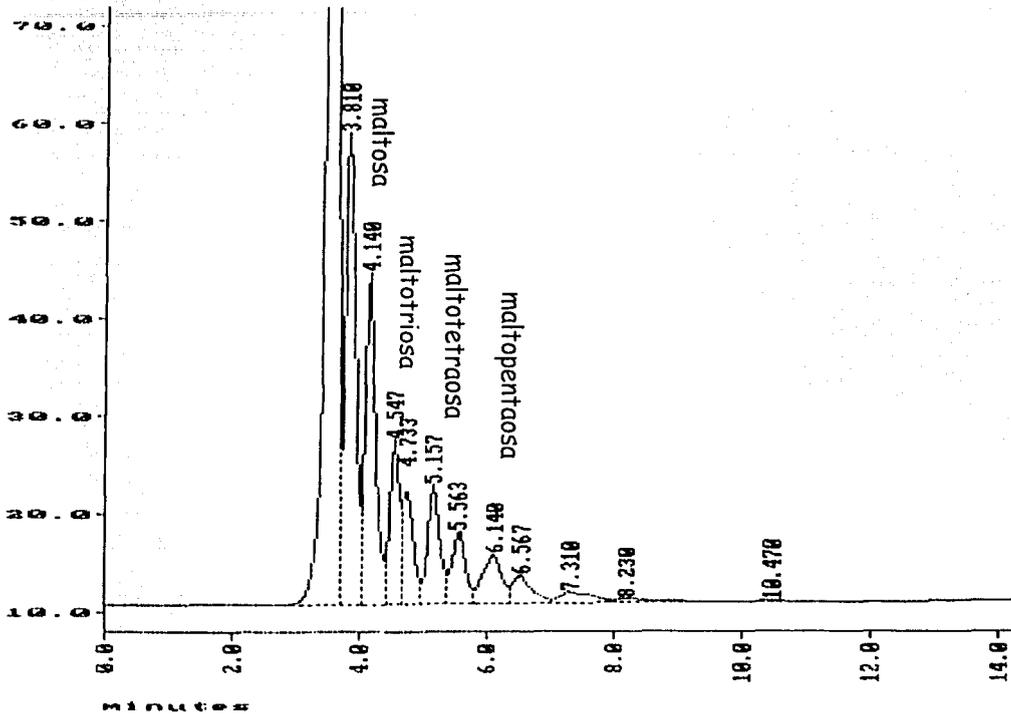


Figura 14. Productos de hidrólisis del almidón por la amilasa de *L. lactis* cepa A45212. La separación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución.

La amilasa de *S. bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 produjeron desde glucosa hasta maltooctosa y maltodextrinas. Los principales productos de la hidrólisis del almidón por la amilasa de *L. lactis* cepa A45212 fueron maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa (Figura 14). La maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa y maltohexaosa fueron producidos por la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 (Figura 15).

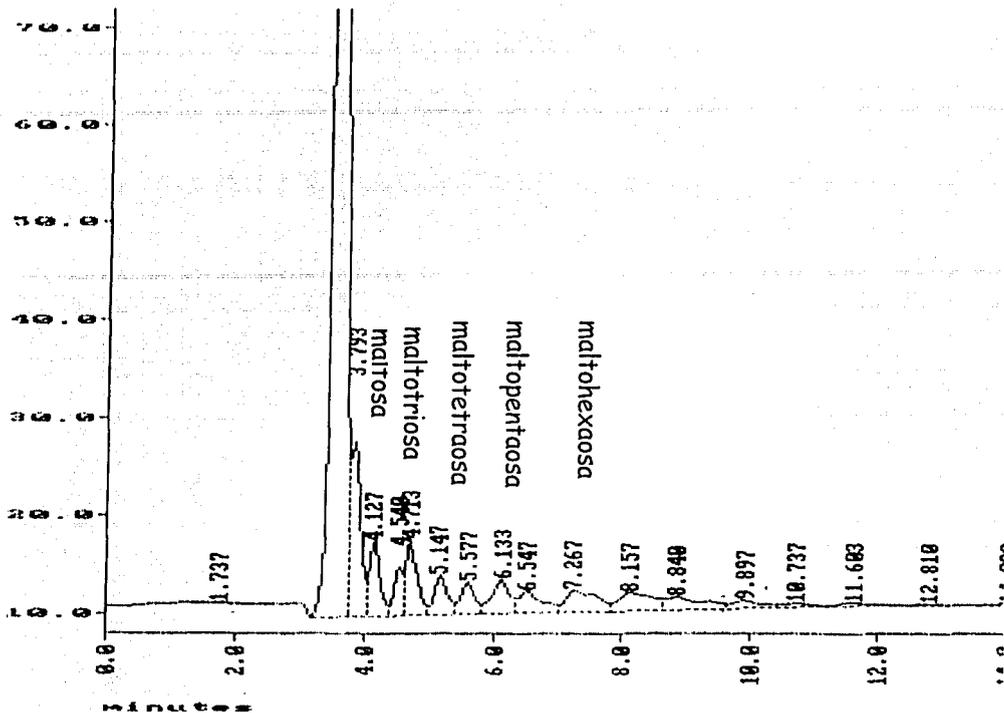


Figura 15. Productos de hidrólisis del almidón por la amilasa de *S. bovis* cepa 25124. La separación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Con las condiciones cromatográficas utilizadas no se lograron separar componentes mayores a 10 unidades de glucosa (maltodecaosa) y es posible que la amilasa haya producido fragmentos de mayor tamaño, dado el escaso almidón residual detectado después de la hidrólisis y que las concentraciones de los oligosacáridos con cadenas menores a 10 unidades de glucosa no fueron muy altas (la suma de dichas concentraciones no corresponde a la cantidad inicial de almidón). El perfil de compuestos generados durante la hidrólisis del almidón por la amilasa de *L. lactis* cepa A45212 fue diferente al obtenido para la amilasa de *S. bovis* cepa 25124.

Se han evaluado los productos de hidrólisis del almidón por amilasas tanto intra como extracelulares de diversas cepas de *S. bovis*. En el caso de amilasas

extracelulares se ha reportado la producción de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (Cotta, 1988; Satoh y col. 1997), mientras que con la amilasa intracelular se produjo principalmente maltotriosa (Satoh y col. 1997). En el perfil de oligosacáridos para la amilasa de la *S. bovis* cepa 25124 también se detectaron los productos ya descritos, aunque por su concentración sobresalieron los de mayor tamaño.

Aunque ya se ha descrito la capacidad de algunas cepas de *Lactococcus lactis* para hidrolizar el almidón (Østergaard y col. 1998), hasta la fecha no hay una descripción de sus amilasas y se desconoce el perfil de productos de la hidrólisis del almidón. Las amilasas de otras bacterias lácticas produjeron desde glucosa hasta maltohexaosa en diferentes proporciones. Por ejemplo, la amilasa de *Lactobacillus amylovorus* produjo preferencialmente glucosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa después de 7 h de incubación a 37°C y pH 6 (Nakamura, 1981); mientras que la amilasa de *Lactobacillus cellobiosus* produjo glucosa y maltosa, sin que se indiquen las condiciones de la hidrólisis (Sen y Chakrabarty, 1984). La amilasa de *Lactobacillus plantarum* L-137 produjo principalmente maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa después de 1 h de incubación a 37°C y pH 4.5, este mismo perfil se observó después de 24 h de hidrólisis (Olympia y col. 1995).

El patrón de acción de una α -amilasa es característico del origen de la enzima y de las condiciones experimentales bajo las que se realizó la hidrólisis. Algunas de las condiciones que afectan el patrón de rompimiento son: estructura y longitud de la cadena del sustrato, temperatura, pH y ciertos aditivos (Pandey y col. 2000). También se tendría que considerar la forma en que se analizaron y cuantificaron los productos de la hidrólisis, por ejemplo si se utilizó cromatografía en capa fina o cromatografía de líquidos de alta resolución. En esta última, el tipo de separación utilizada (fase reversa o de intercambio iónico) puede influir en la detección de compuestos en concentración baja.

El consumo de los maltooligosacáridos producidos por las amilasas de las bacterias lácticas del pozol, tales como *S. bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212, dependerá de la capacidad de las bacterias lácticas para transportarlos. Existen pocos reportes sobre el transporte de maltooligosacáridos y de dextrinas por bacterias lácticas, en la mayoría de los reportes se estudia el transporte de mono- y disacáridos, tales como la glucosa y la lactosa, respectivamente, mediante el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). *S. mutans*, que posee una α -amilasa intracelular, puede introducir dextrinas límite al interior de la célula mediante el sistema de transporte de metabolismo múltiple de carbohidratos (Simpson y Russell, 1998). El operon de ese sistema (*msm*), que no es un sistema de transporte de azúcares PTS, es el responsable del transporte y metabolismo de azúcares como la melibiosa, rafinosa e isomaltosacáridos. Del operon *msm* de *S. mutans* se identificaron y secuenciaron ocho genes. Dentro de las proteínas correspondientes a los genes de este operón se incluyen una α -galactosidasa, una proteína de unión a carbohidrato, dos proteínas de membrana, una sacarosa-fosforilasa, una proteína de unión al ATP y una dextranoglucosidasa. Parece que estos genes están bajo control de un regulador positivo (*msmR*) y tienen un alto grado de homología con los componentes de unión periplásmica de los sistemas de transporte dependiente de proteína de las bacterias Gram-negativas (Tao y col. 1993). *E. coli* produce una α -amilasa citoplasmática que hidroliza los maltooligosacáridos de seis o siete unidades de glucosa y que se pueden transportar a la célula mediante el sistema de transporte de maltosa, MalK. Las maltodextrinas (compuestos con más de 6 unidades de glucosa) que entran al periplasma mediante la maltoporina de membrana externa LamB pueden ser hidrolizadas por una α -amilasa periplásmica producida por *E. coli* (Raha y col. 1992).

Conclusiones

- La actividad de las cepas de bacterias lácticas más amilolíticas aisladas del pozol se encuentra asociada a las células. No se detectó actividad extracelular.
- La mayor actividad de las amilasas producidas por *S bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202 se presenta en valores de pH cercanos a la neutralidad. Estas amilasas son estables en condiciones de pH alto e inestables a valores bajos de pH. Estos resultados sugieren que la actividad de estas enzimas sería mayor al inicio de la fermentación del pozol cuando los valores de pH se aproximan a la neutralidad y se reduciría a medida que la fermentación avance cuando los valores de pH sean más bajos.
- Las amilasas de *S bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202 tienen mayor actividad amilolítica en el rango de temperatura de 30 a 37°C, lo que coincide con las condiciones de incubación del pozol en Villahermosa, Tabasco. Estas enzimas se mantienen estables a temperatura ambiente y pierden rápidamente su estabilidad a temperaturas mayores a los 40°C.
- Las amilasas producidas por las cepas *S bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 son de alto peso molecular. El peso molecular de la amilasa producida por *S. bovis* cepa 25124 es el más grande que hasta el momento se ha reportado y no coincide con los reportados para las amilasas de otros estreptococos.
- El perfil de productos de la hidrólisis del almidón generado por las amilasas de las cepas *S bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 indica que se trata de amilasas del tipo endo o α -amilasas. Los maltooligosacáridos liberados por estas amilasas podrían ser utilizados por otras bacterias lácticas no amilolíticas presentes durante la fermentación del pozol.

7.4 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR *S. bovis* CEPA 25124.

Descripción de la etapa.

La investigación sobre la fisiología de bacterias lácticas de origen no lácteo y particularmente los miembros del grupo amilolítico, es necesaria para determinar su relevancia ecológica en fermentaciones naturales, para el desarrollo de nuevos procesos y para mejorar los criterios existentes, con una base más racional, para la selección de cultivos iniciadores específicos.

Se han realizado estudios sobre la fermentación del almidón de bacterias lácticas tales como *L. manihotivorans* (Guyot y Morlon-Guyot, 2001), *L. plantarum* A6 (Guyot y col. 2000) y *L. fermentum* (Calderón y col. 2001; 2003A; 2003B), aisladas de fermentaciones naturales de yuca y de maíz. Algunos reportes han descrito aplicaciones posibles de las bacterias lácticas amilolíticas, tales como la producción de ácido láctico a partir de almidón crudo por *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* (Zhang y Cheyran, 1991; Mercier y col. 1992; Yumoto e Ikeda, 1995; Xiaodong y col. 1997).

En cambio, no existe mucha información sobre los parámetros cinéticos de fermentación del almidón por cepas de *S. bovis*. El estudio de la fermentación del almidón en medio líquido (MRS-almidón) por una cepa de la especie dominante (*S. bovis*) en la fermentación del pozol, determinará las condiciones bajo las cuales esta cepa crece en presencia del almidón soluble y la forma en que su amilasa lo hidroliza.

Objetivo:

- Determinar los parámetros cinéticos de fermentación del almidón soluble de una cepa de la especie dominante (*Streptococcus bovis*).

Resultados y discusión.

Se estudió la fermentación del almidón por una cepa de la especie dominante (*S. bovis* cepa 25124) en el medio MRS-almidón. Después de una fase lag de 1.5 h (Figura 16 A), las concentraciones de biomasa y de ácido láctico se incrementaron con una velocidad específica de 0.94 h^{-1} y $2.4 \text{ g ácido láctico/g células secas/h}$, respectivamente (Tabla 4), mientras que el pH disminuyó hasta 4.9 (Figura 16 B). La actividad amilolítica, que se encuentra asociada a la célula, tal como se describió en los resultados previos, se incrementó con una velocidad específica de $130.7 \text{ U/g células secas/h}$ (Tabla 4). Los rendimientos de producto ($Y_{\text{lac/s}}$) y de biomasa ($Y_{\text{x/s}}$) relativos al sustrato fueron de 0.31 y 0.78 (g ácido láctico o biomasa/g sustrato), respectivamente, mientras que los rendimientos de producto relativos a la biomasa ($Y_{\text{lac/x}}$ y $Y_{\text{amy/x}}$) fueron de $2.56 \text{ g ácido láctico/g células secas}$ y de $139 \text{ U/g células secas}$, respectivamente (Tabla 4).

Los cocientes metabólicos y el rendimiento de ácido láctico relativo al sustrato ($Y_{\text{lac/s}}$) están en el rango de los valores clásicos reportados para otras bacterias lácticas, entre 1.1 y 3.1 g/g células secas/h para q_{lac} , 2.3 a 3.5 g/g células secas/h para q_{s} y 0.67-0.84 (g/g) para $Y_{\text{lac/s}}$. El resto de los parámetros fueron diferentes. En este estudio, la cepa se caracterizó, en primer lugar, por un bajo rendimiento de ácido láctico relativo a la biomasa ($Y_{\text{lac/x}}$) y un bajo rendimiento de amilasa relativo a la biomasa; $Y_{\text{amy/x}}$ (Tabla 4). En segundo lugar, por una alta velocidad específica de crecimiento y un alto rendimiento de biomasa ($Y_{\text{x/s}}$). Estos últimos parámetros son muy diferentes a los descritos para bacterias lácticas amilolíticas aisladas de otros alimentos fermentados amiláceos como *L. manihottivorans*, *L. plantarum* (Guyot y col. 2000) y *L. fermentum* (Calderón y col. 2001), Tabla 4.

Las cepas de *S. bovis* aisladas del rumen de bovinos crecieron más rápido que otras bacterias lácticas con glucosa o lactosa, así como sobre una amplia variedad de mono y disacáridos, con velocidades específicas de crecimiento mayores de 1.5 h^{-1} (Bond y col. 1998). En particular, *S. bovis* JB1

Tabla 4. Rendimientos y cocientes metabólicos para *S. bovis* cepa 25124, *L. manihotivorans* 18010^T, *L. plantarum* A6 y *Lactobacillus fermentum* Ogi E1.

Parámetro ^a	Valor ^b obtenido para:			
	<i>S. bovis</i> 25124 ^c	<i>L. manihotivorans</i> 18010 ^d	<i>L. plantarum</i> A6 ^d	<i>L. fermentum</i> OgiE1 ^e
Azúcares totales consumidos (%)	25.5	45	Nd	78
Y x/s (g g ⁻¹)	0.31	0.09 (0.15)	Nd (0.18)	0.1
Y lac/s (g g ⁻¹)	0.78	0.71 (0.67)	Nd (0.84)	0.33
Ylac/x (g g ⁻¹)	2.56	7.89 (4.47)	Nd (4.7)	3.3
Yamy/x (U g ⁻¹)	139	2400 (4900)	2300 (5700)	5400
μ (h ⁻¹)	0.94	Nd (0.36)	0.43 (0.41)	0.35
qlac [g (g células peso seco) ⁻¹ h ⁻¹]	2.4	Nd (1.0)	3.1 (3.0)	1.1
qs [g (g células peso seco) ⁻¹ h ⁻¹]	3.0	Nd (2.4)	Nd (2.3)	3.5
qamy [U (g células peso seco) ⁻¹ h ⁻¹]	130.7	Nd (1764)	989 (2337)	1890

^a Y x/s, rendimiento de crecimiento relativo al sustrato; Y lac/s, rendimiento de ácido láctico relativo al sustrato; Ylac/x, rendimiento de ácido láctico relativo a la biomasa; Yamy/x, rendimiento de amilasa relativo a la biomasa; μ, velocidad específica de crecimiento; qlac, velocidad específica de producción de ácido láctico; qs, velocidad específica de consumo de sustrato; qamy, velocidad específica de producción de amilasa.

^b Los valores obtenidos a pH controlado (6.0) se indican con paréntesis. Nd, no determinado.

^c Resultados de este trabajo.

^d (Guyot y col. 2000). ^e (Calderón y col. 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

aislada del rumen de bovinos creció más rápido en almidón que en maltosa; 1.98 y 1.38 h^{-1} , respectivamente (Cotta, 1988). Para explicar el alto rendimiento de crecimiento relativo al sustrato ($Y_{x/s}$) observado en este trabajo se tendrían que profundizar los estudios fisiológicos, particularmente sobre la eficiencia del acoplamiento energético con la síntesis de material celular.

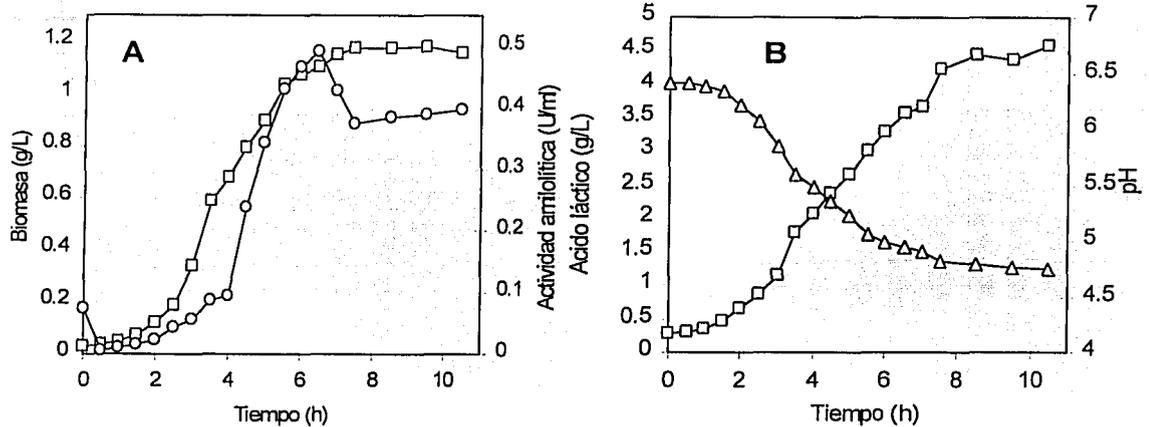


Figura 16. Crecimiento de *Streptococcus bovis* cepa 25124 en el medio MRS-A.

A: Concentración de biomasa (\square) y actividad amilolítica asociada a la célula (o).

B: Concentración de ácido láctico (\square) y valores de pH (\triangle).

Durante la fermentación, las concentraciones de almidón y de azúcares totales se redujeron hasta 9.7 y 14.8 g/L , respectivamente (Figura 17). A diferencia de las cinéticas de fermentación con *L. manihotivorans* y *L. fermentum* Ogi E1 (Guyot y col. 2000; Calderón y col. 2001), el almidón se hidrolizó lentamente y al final de la fermentación permaneció una alta concentración de carbohidratos totales. La hidrólisis lenta del almidón podría explicarse por el bajo nivel de amilasa producida, pero como se demostró para *L. manihotivorans* y *L. fermentum* Ogi E1, aún con una actividad amilolítica reducida, estas especies hidrolizaron completamente el almidón cuando crecieron en el mismo medio (Guyot y col. 2000; Calderón y col. 2001). La inestabilidad de la amilasa de *S.*

bovis cepa 25124 a valores bajos de pH podría explicar la baja eficiencia en la hidrólisis del almidón.

Con *S. bovis* cepa 25124, la concentración inicial de azúcares reductores se redujo de 0.25 hasta 0.05 g/L a las 6.5 h (Figura 17). No se observó una acumulación de azúcares reductores, a pesar de que durante la fermentación del almidón por algunos *Lactobacillus* amilolíticos se presenta una acumulación temporal de esos carbohidratos (Guyot y col. 2000; Calderón y col. 2001).

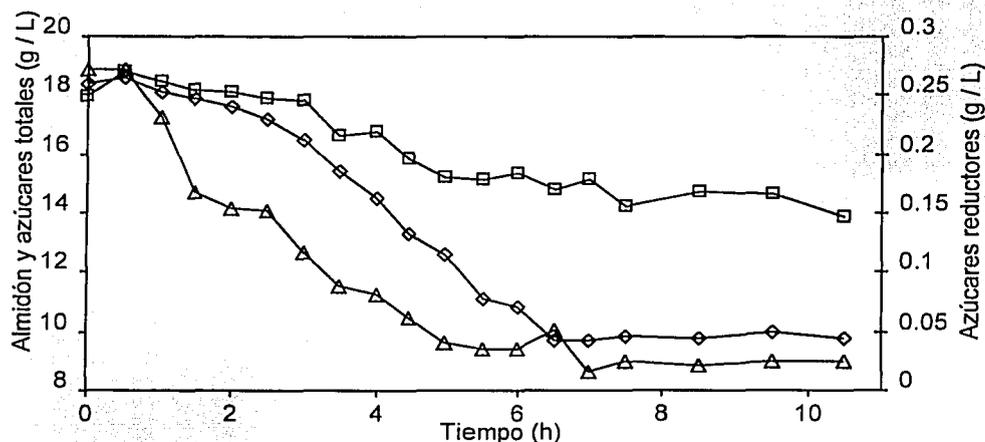


Figura 17. Presencia de carbohidratos en la fermentación del almidón por *S. bovis* cepa 25124. Concentración de: azúcares totales (□); almidón (◇); y azúcares reductores (△).

Después de 10.5 h, la cepa había fermentado solo el 26.6% de los azúcares totales y había hidrolizado el 50% de la concentración inicial de almidón. Estos valores se mantuvieron constantes después de 26 h de fermentación. La diferencia entre las concentraciones de los azúcares totales y de almidón sin hidrolizar sugiere la presencia de dextrinas en el medio de cultivo.

En el medio inicial se detectaron pequeñas concentraciones (menores que 0.5 g/L) de glucosa, maltosa y maltooligosacáridos [maltotriosa (G3),

La velocidad específica de crecimiento determinada para la cepa *S. bovis* del pozol (0.94 h^{-1}) podría conferirle una ventaja competitiva sobre otras especies de bacterias lácticas. Aún cuando la producción de energía, indicada por los parámetros de consumo de sustrato y de producción de ácido láctico, se encuentran dentro del rango clásico observado para otras bacterias lácticas (Tabla 4), la conversión eficiente de energía en biomasa, indicada por el rendimiento de crecimiento relativo al sustrato ($Y_{x/s}$), le daría a la cepa una ventaja competitiva adicional, a pesar de la baja eficiencia para la hidrólisis de almidón y para el consumo de azúcares totales. Sin embargo, se tendrían que considerar otros parámetros para explicar la dinámica de las poblaciones microbianas, tales como los relacionados con la baja tolerancia al pH de la cepa de *S. bovis* del pozol y la inestabilidad a bajos valores de pH de su amilasa, tal como se determinó en los resultados previos con el extracto celular de *S. bovis* cepa 25124; aunque se obtuvo la mayor actividad amilolítica de la cepa cuando el pH del medio era de 4.9 (6.5 h). Las diferencias en los resultados podrían estar relacionadas con la forma como se evaluó la actividad amilolítica, directamente en las células o en la enzima soluble extraída de la célula. Si los valores bajos de pH afectan menos la actividad amilolítica de la enzima asociada a la célula que a la enzima soluble, entonces la asociación a la célula le confiere una ventaja a *S. bovis* cepa 25124.

Además, estas ventajas competitivas sólo serían efectivas durante las primeras horas de la fermentación del pozol, cuando el pH es lo suficientemente alto, ya que a medida que la fermentación avanza se presentaría un efecto inhibitorio debido a la acidificación. Este hecho tendría que investigarse posteriormente con cultivos mixtos definidos compuestos por esta cepa y otras bacterias lácticas. Además de esto, se tendrían que investigar otros factores, tales como las posibles limitaciones nutricionales y el comportamiento celular en fermentaciones sólidas.

Los maltooligosacáridos producidos por *S. bovis* podrían servir, presumiblemente, como fuentes de energía para especies no amilolíticas en la fermentación del pozol y sostener la diversidad observada. En este respecto, se tendría que estudiar la capacidad de otras bacterias lácticas presentes en el pozol para consumir esos maltooligosacáridos.

Conclusiones

- *S. bovis* cepa 25124 hidrolizó lentamente el almidón, produciendo una alta concentración de dextrinas y una menor concentración de glucosa, maltosa y maltooligosacáridos (maltotriosa-maltoheptaosa). La maltotetraosa fue el principal intermediario producido.
- La hidrólisis lenta y parcial del almidón por la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 podría estar asociada con la inestabilidad de la amilasa cuando disminuye el pH del medio.
- Es posible que la alta velocidad específica de crecimiento y la eficiente conversión de sustrato en biomasa por *S. bovis* cepa 25124 le confieran una ventaja competitiva sobre otras especies de bacterias lácticas no amilolíticas del pozol. Estas ventajas podrían explicar la dominancia de esta cepa durante la fermentación del pozol.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL

El propósito de este trabajo fue determinar la diversidad de las bacterias lácticas amilolíticas durante la fermentación del pozol y sus principales características fisiológicas, con el fin de comprender su papel en este alimento.

En este proyecto se trabajó con dos muestras de pozol de Villahermosa, Tabasco. La microbiología de esas muestras se desarrolló de acuerdo con lo esperado, ya que se detectaron los grupos microbianos descritos previamente (Nuraida y col. 1995; Wachter y col. 2000): enterobacterias, hongos, levaduras y bacterias mesófilas aerobias. Las bacterias lácticas totales estuvieron presentes en números similares a los reportados y el producto se acidificó antes de 24 h. Los valores iniciales de pH fueron similares a los reportados de muestras de pozol de Tabasco (Sainz y col. 2001). Esto aseguraba que las muestras analizadas eran representativas.

En este trabajo se demostró que las bacterias lácticas amilolíticas son importantes, ya que se desarrollan durante toda la fermentación. Constituyen una proporción importante de las bacterias lácticas totales, principalmente durante las primeras horas de la fermentación, cuando los valores de pH son más altos (7.4 - 5.9). Las cepas de bacterias lácticas con mayor actividad (hasta 18 mm de diámetro de hidrólisis en cajas de medio MRS-almidón) se aislaron de las etapas iniciales de la fermentación. Esto podría sugerir que los valores altos de pH inicial favorecieron tanto el desarrollo como la actividad amilolítica de las cepas.

Ya se había reportado que algunas cepas de bacterias lácticas aisladas de muestras de pozol del estado de Chiapas tienen la capacidad para hidrolizar el almidón cuando crecen en medio sólido con almidón (Nuraida y col. 1995), sin embargo esta actividad es mucho menor que la de las cepas aisladas en este trabajo.

En la mayoría de los reportes sobre bacterias lácticas amilolíticas aisladas de alimentos fermentados, la atención se dirige a las cepas con mayor actividad amilolítica. Este es el primer reporte del conteo, purificación y conservación de bacterias lácticas a lo largo de la fermentación de un alimento amiláceo.

De la caracterización de las cepas con mayor actividad amilolítica (aquellas con diámetros de hidrólisis mayores a 9 mm), mediante un enfoque fenotípico y molecular, se determinó que comparten algunas características, como la de producir sólo ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa (homofermentativas) y la capacidad de crecer en glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, carbohidratos presentes en baja concentración en el nixtamal. También se determinó que existen diferencias entre esas cepas. El dendrograma de la ribotipificación y el perfil de fermentación de carbohidratos indican que existen diferencias entre las cepas de bacterias lácticas con mayor actividad amilolítica.

De acuerdo con el análisis de las secuencias del rDNA 16S, la mayoría de las cepas se identificaron tentativamente como *S. bovis*, ya que se obtuvieron coeficientes de similitud entre 99 y 100% con esta especie pero también con *Streptococcus infantarius* ssp. *coli*. Estos resultados confirman que el esclarecimiento de la taxonomía del grupo *S. bovis* es un asunto pendiente y que será necesario utilizar herramientas alternativas para identificar las cepas.

S. bovis fue la especie dominante dentro de las bacterias lácticas con mayor capacidad amilolítica en la fermentación. Se identificaron también las especies *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

La presencia y la importancia del género *Streptococcus* entre las bacterias lácticas del pozol fue reportada previamente cuando se utilizaron técnicas moleculares que no dependen del cultivo de los microorganismos. Con el uso de métodos tradicionales de cultivo no se habían logrado aislar cepas de esta

especie. Es posible que la presencia de almidón en los medios de cultivo favorezca su crecimiento. Su presencia y dominancia entre las bacterias lácticas de mayor actividad amilolítica confirman su importancia durante la fermentación del pozol.

La mayoría de las bacterias lácticas amilolíticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales de otros cereales o de la yuca pertenecen al género *Lactobacillus*. En comparación con estos alimentos pareciera que el pozol es un ecosistema alimenticio en el que se desarrollan otros tipos de bacterias lácticas amilolíticas. Se propone que la capacidad de las cepas de *S. bovis* para sobrevivir a valores altos de pH y a temperaturas altas, como las que prevalecen durante el proceso de obtención del nixtamal, como las razones para explicar su predominancia en el mismo y para explicar la ausencia de *Lactobacillus*.

La dominancia de *S. bovis* durante la fermentación del pozol también podría relacionarse sus características fisiológicas, tales como su alta velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0.94 \text{ h}^{-1}$) y con la conversión eficiente de sustrato en biomasa ($Y_{x/s} = 0.31 \text{ g g}^{-1}$).

La descripción de las propiedades generales de la amilasa producida por algunas de las especies de bacterias lácticas del pozol permitió determinar su importancia en la fermentación. Las amilasas de *S. bovis* y de *L. lactis* son de alto peso molecular y están asociadas a la célula, lo que las hace diferentes a las amilasas producidas por bacterias lácticas aisladas de otros alimentos fermentados amiláceos. La asociación con la célula podría representar una ventaja ecológica para estas bacterias.

Las amilasas de las diferentes especies de bacterias lácticas están bien adaptadas a las condiciones de pH inicial que imperan en el nixtamal debido a la cocción alcalina, pero su inestabilidad a valores bajos de pH puede limitar su acción durante el desarrollo de la fermentación. Esto coincide con la reducción en

la proporción de bacterias lácticas amilolíticas a medida que la masa se acidifica y con el menor diámetro de hidrólisis de almidón de las cepas aisladas en las últimas horas de fermentación. La inestabilidad de la amilasa de *S. bovis* cepa 25124 a los valores bajos de pH explica la baja actividad amilolítica mostrada por esta cepa cuando creció en almidón soluble.

Las amilasas de *S. bovis* cepa 25124, *L. lactis* cepa A45212 y *E. sulfureus* cepa A36202 tienen mayor actividad amilolítica entre 30 y 37°C. Estas temperaturas coinciden con las que se lleva a cabo la fermentación del pozol.

La acción de las amilasas producidas por *S. bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 sobre el almidón, similar a la que ejercen las α -amilasas, genera maltooligosacáridos de bajo peso molecular que podrían estar disponibles para estas bacterias y para otros microorganismos durante la fermentación del pozol. Durante la fermentación del almidón por *S. bovis* cepa 25124 se produjeron maltooligosacáridos de bajo peso molecular y dextrinas en alta concentración. El perfil de productos observados durante esa fermentación coincidió con el que se obtuvo cuando la amilasa del extracto celular hidrolizó el almidón soluble.

La reducción de la proporción de bacterias lácticas amilolíticas con respecto a las bacterias lácticas totales al final de la fermentación del pozol podría ser consecuencia de la inhibición en el crecimiento de la especie dominante, *S. bovis*, y a la inestabilidad de su amilasa frente a valores bajos de pH. Es posible, sin embargo, que los maltooligosacáridos producidos por estas bacterias desde las primeras etapas de la fermentación, puedan ser utilizados por las bacterias lácticas no amilolíticas del pozol, lo que explicaría sus altos números al final de la fermentación.

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Los altos números de bacterias lácticas amilolíticas y su desarrollo durante la fermentación indican que son importantes para la fermentación del pozol.
- ✓ Existe diversidad entre las bacterias lácticas amilolíticas del pozol, mostrada por los diferentes perfiles de ribotipificación y de fermentación de carbohidratos.
- ✓ Las cepas de bacterias lácticas amilolíticas del pozol, *S. bovis*, *S. macedonicus*, *L. lactis* y *E. sulfureus*, son diferentes a las reportadas de otros alimentos fermentados amiláceos, en los que predominan cepas del género *Lactobacillus*.
- ✓ *S. bovis* es la especie dominante entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas del pozol. Las características fisiológicas de esta especie seguramente promueven su permanencia después del proceso de nixtamalización del maíz y facilitan su desarrollo durante la fermentación del pozol.
- ✓ Las amilasas de *S. bovis* cepa 25124 y de *L. lactis* cepa A45212 son diferentes a las amilasas producidas por bacterias lácticas aisladas de otros alimentos fermentados amiláceos. Son de alto peso molecular, están asociadas a la célula, su pH de mayor actividad se presenta en valores cercanos a la neutralidad y son inestables a valores bajos de pH.
- ✓ El perfil de productos de la hidrólisis del almidón generado por las amilasas producidas por *S. bovis* cepa 25124 y *L. lactis* cepa A45212 indica que se trata de amilasas del tipo endo o α -amilasas.

- ✓ La presencia de bacterias lácticas desde las primeras horas de la fermentación explica la diversidad de la población microbiana mediante relaciones tróficas. Es posible que las bacterias lácticas amilolíticas aporten sustratos para las bacterias lácticas no amilolíticas. Esta consideración abre nuevos campos de investigación en la ecología microbiana de alimentos fermentados amiláceos.

CAPÍTULO X. PERSPECTIVAS

- La masa de maíz nixtamalizado, sustrato de la fermentación del pozol, contiene partículas pequeñas de germen, pericarpio, aleurona, gránulos de almidón, proteínas y lípidos. Ya se comprobó que el almidón es importante para el desarrollo de las bacterias lácticas, sin embargo, es importante evaluar la importancia de otros componentes presentes en el maíz nixtamalizado para el desarrollo de las bacterias lácticas.
- Mediante el uso de otras metodologías confirmar la identidad de las cepas relacionadas con las especies *Streptococcus bovis* y *Enterococcus sulfureus*.
- Evaluar el crecimiento en almidón soluble de las distintas cepas de *S. bovis* y de las otras especies de bacterias lácticas amilolíticas encontradas.
- Profundizar en la caracterización de las amilasas producidas por las diferentes especies de bacterias lácticas del pozol, lo que permitiría explicar sus diferencias con respecto a las que producen las bacterias lácticas aisladas de otros alimentos amiláceos.
- Estudiar el crecimiento en almidón de cultivos mixtos compuestos por una cepa de *Streptococcus bovis* y por una bacteria láctica sin capacidad amilolítica.
- Investigar si las bacterias del género *Streptococcus* y *Enterococcus*, presentes desde el inicio de la fermentación y reconocidas por su capacidad de tolerar condiciones extremas como altas temperaturas, pueden permanecer en el maíz después del proceso de nixtamalización.

CAPÍTULO XI. REFERENCIAS

- **Agati V., J. P. Guyot, J. Morlon-Guyot, P. Talamond y D. J. Hounhouigan.** 1998. Isolation and characterization of new amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* **85**:512-520.
- **Aguilar G., J. Morlon-Guyot, B. Trejo-Aguilar y J. P. Guyot.** 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microbial Technol.* **27**:406-413.
- **Ampe F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter y J. P. Guyot.** 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12):5464-5473.
- **Barrangou R., S. Yoon, F. Breidt, H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer.** 2002. Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2877-2884.
- **Ben Omar, N. y F. Ampe.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(9):3664-3673.
- **Ben Omar N., F. Ampe, M. Raimbault, J. P. Guyot y P. Tailliez.** 2000. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:285-291.
- **Bohak I., W. Back, L. Richter, M. Ehrmann, W. Ludwig y K. H. Shleifer.** 1998. *Lactobacillus amyolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. *System. Appl. Microbiol.* **21**:360-364.
- **Bond, D. R., B. M. Tsai y J. B. Russell.** 1998. The diversion of lactose carbon through the tagatose pathway reduces the intracellular fructose 1,6-

- biphosphate and growth rate of *Streptococcus bovis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:600-605.
- **Björkroth K. J., U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. Holzappel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:141-148.
 - **Bouvet A., F. Grimont, M. D. Collins, F. Benaoudia, C. Devine, B. Régnault y P. A. D. Grimont.** 1997. *Streptococcus infantarius* sp. nov. related to *S. bovis* and *S. equinus*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**:393-395.
 - **Boyer C. D. y J. C. Shannon.** 1987. Carbohydrates of the kernel, p. 253-272. En: S. A. Watson and P. E. Ramstad (ed.), *Corn: Chemistry and Technology*. The American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, Minnesota U. S. A.
 - **Brauman A., S. Kéléké, M. Malonga, E. Miambi y F. Ampe.** 1996. Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(8):2854-2858.
 - **Brooker J. D. y J. M. McCarthy.** 1997. Gene knockout of the intracellular amylase gene by homologous recombination in *Streptococcus bovis*. *Current Microbiol.* **35**:133-138.
 - **Busse, H. J., E. B. M. Denner y W. Lubitz.** 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotech.* **47**:3-38.
 - **Calderon M., G. Loiseau y J. P. Guyot.** 2001. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *J. Appl. Microbiol.* **90**:508-516.
 - **Calderon M., G. Loiseau, R. Rodríguez-Sanoja y J. P. Guyot.** 2003A. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and α -amylase production at pH 4.0. *Int. J. Food Microbiol.* **80**:77-87.

- **Calderon M., G. Loiseau y J. P. Guyot.** 2003B. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and α -amylase production. *Int. J. Food Microbiol.* **80**:161-169.
- **Cañas A. O., E. Bárzana, J. D. Owens y M. C. Wachter.** 1993. La elaboración del pozol en Los Altos de Chiapas. *Ciencia.* **44**:219-229.
- **Champ M., O. Szylit, P. Raibaud y N. Ait-Abdelkader.** 1983. Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J. Appl. Bacteriol.* **55**:487-493.
- **Cheng P., R. E. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai y E. L. Iannotti.** 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. Ind. Microbiol.* **7**:27-34.
- **Clarridge J. E., S. M. Attorri, Q. Zhang y J. Bartell.** 2001. 16S Ribosomal DNA sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis*: *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. *J. Clinical Microbiol.* **39**(4):1549-1552.
- **Collins M. D., B. A. Phillips y P. Zanoni.** 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:105-108.
- **Collins M. D., U. Rodriguez, C. Ash, M. Aguirre, J.A.E. Farrow, A. Martínez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams y S. Wallbanks.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:5-12.
- **Collins M. D., R. R. Facklam, U. M. Rodrigues y K. L. Ruoff.** 1993. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **343**:425-429.

- **Cooney C. L.** 1981. Growth of microorganisms, 73-112. En: H. J. Rhem y G. Reed (ed.), *Biotechnology, a Comprehensive Treatise*, Vol 1. Verlag Chemie, Weingheim, Deerfield Beech, Florida.
- **Cotta M. A.** 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(3):772-776.
- **Cotta M. A.** 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(1):48-54.
- **Cotta M. A. y T. R. Whitehead.** 1993. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:189-196.
- **Damelin L. H., G. A. Dykes y A. von Holy.** 1995. Biodiversity of lactic acid bacteria from food-related ecosystems. *Microbios* **83**:13-22.
- **Dellaglio F., H. de Roissart, S. Torriani, M. C. Curk y D. Janssens.** 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: Roissart H. y F M Luquet (ed.), *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. Vol. 1. Lorica. Chemin de Saint Georges, France.
- **Devriese L. A., B. Pot y M. D. Collins.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:399-408.
- **Devriese L. A. y B. Pot.** 1995. The genus *Enterococcus*, p. 327-367. En: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), *The lactic acid Bacteria. The genera of lactic acid bacteria*, vol. 2. Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
- **Devriese L. A., P. Vandamme, B. Pot, M. Vanrobaeys, K. Kersters y F. Haesebrouck.** 1998. Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human, clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *J. Clinical Microbiol.* **36**(12):3520-3523.

- **Díaz R. G.** 1996. Metabolismo de carbohidratos de una bacteria láctica aislada del pozol. Tesis de Maestro en Ciencia de Alimentos (Química de Alimentos). Facultad de Química, UNAM, México, 121 pp.
- **Dicks L. M. T., L. Fantuzzi, F. C. González, M. du Toit y F. Dellaglio.** 1993. *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from Argentine raw milk. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:347-351.
- **Dicks L. M. T., F. Dellaglio y M. D. Collins.** 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corríg.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:395-397.
- **Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**:350-356.
- **Euzéby J. P.** 2000. Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/bovissequinusgallyolyticus.html>.
- **Escalante, A., C. Wachter y A. Farrés.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **64**:21-31.
- **Farrow J.A.E. y M. D. Collins.** 1984. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:357-362.
- **Feltham, R. K. A., A. K. Power, P. A. Pell y P. H. A. Sneath.** 1978. A simple method for storage of bacteria at -76°C. *J. Appl. Bacteriol.* **44**:313-316.
- **Flint S. H., J. H. Ward y J. D. Brooks.** 1999. *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:759-767.
- **Fogarty W. M.** 1983. Microbial amylases, p. 1-92. En: W. M. Fogarty (ed), Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers, London.
- **Freer S. N.** 1993. Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5):1398-1402.

- Giraud, E., A. Brauman, S. Keleke, B. Lelong y M. Rimbault. 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:379-383.
- Giraud E., L. Gosselin y M. Rimbault. 1993. Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *J. Sci. Food. Agric.* **62**:77-82.
- Giraud E. y G. Cuny. 1997. Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene.* **198**:149-157.
- Guyot, J. P., M. Calderon y J. Morlon-Guyot. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T. *J. Appl. Microbiol.* **88**(1):176-182.
- Guyot, J. P. y J. Morlon-Guyot. 2001. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32, an amylolytic lactobacillus isolated from sour starch cassava fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **67**:217-225.
- Hammes W. P. y R. F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, p. 19-54. En: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed), The lactic acid Bacteria Volume 2. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
- Hardie J. M. 1986. Genus *Streptococcus*, p. 1043-1046. En: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams Wilkins, Baltimore.
- Hardie, J. M. y R. A. Whiley. 1995. The genus *Streptococcus*, p. 55-124. En: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), The lactic acid Bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Vol. 2. Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glasgow.
- Harrigan W. F. y M. E. McCance. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology, p.318. Academic Press Inc. LTD. London, Great Britain.

- **Hounhouigan D. J., M. J. R. Nout, C. M. Nago, J. H. Houben y F. M. Rombouts.** 1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawè, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Science Technol.* **18**:279-287.
- **Holzapfer W. H. y U. Schillinger.** 1991. The genus *Leuconostoc*, p. 1508-1534. En: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, Vol. II, 2nd edition. Springer-Verlar, New York.
- **Iwen, P. C., D. M. Kelly, J. Linder y S. H. Hinrichs.** 1996. Revised approach for identification and detection of ampicillin and vancomycin resistance in *Enterococcus* species by using Micro-Scan panels. *J. Clinical Microbiol.* **34**:1779-1783.
- **James J. A. y B. H. Lee.** 1995. Cultural conditions for production of glucoamylase from *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 499-505.
- **Jarvis G. N., A. Kurtovic, A. G. Hay y J. B. Russell.** 2001. The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:49-56.
- **Johansson, M. L., A. Sanni, C. Lönner y G. Molin.** 1995. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.* **25**:159-168.
- **Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura y T. Ezaki.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among the members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:406-408.
- **Lacks, S. A. y S. S. Springhorn.** 1980. Renaturation of enzyme after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* **255**:7467-7473.
- **Laemmli, U. K.** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.

- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. En: E. Stackebrandt and M. Goodfellow, (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley and Sons, Chechester, United Kingdom.
- Larsen, N., G. J. Olsen, B. L. Maidak, M. J. McCaughey, R. Overbeek, T. J. Macke, T. L. Marsh y C. R. Woese. 1993. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **21**:3021-3023.
- Lindgren, S. y O. Refai. 1984. Amyolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* **57**:221-228.
- Link, W., C. Dixhens, M. Singh, M. Schwall, y A. E. Melchinger. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**:27-32.
- Manachini P. L., S. H. Flint, L. J. H. Ward, W. Kelly, M. G. Fortina, C. Parini y D. Mora. 2002. Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint *et al.* 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou *et al.* 1998). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:945:951.
- Martínez-Murcia A. J. y M. D. Collins. 1990. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 73-84.
- Martínez-Murcia A. J. y M. D. Collins. 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**:69-74.
- Martínez-Murcia A. J., N. M. Harland y M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large- subunit rRNA derived trees. *J. Appl Bacteriol.* **74**:532-541.
- McClelland M., R. Jones, Y. Patel y Nelson M. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **15**:5985-6005.

- **Mercier P., L. Yerushalmi, D. Rouleau y D. Dochain.** 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **55**:111-121.
- **Miller, G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**:426-428.
- **Millière J. B., M. Michel F. Mathieu y G. Lefebvre.** 1994. Presence of *Carnobacterium* spp. in French surface mould-ripened soft-cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:264-269.
- **Morlon-Guyot, J., J. P. Guyot, B. Pot, I. Jacobe de Haut y M. Rimbault.** 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1101-1109.
- **Morlon-Guyot J., F. Mucciolo-Roux, R. Rodríguez-Sanoja y J. P. Guyot.** 2001. Characterization of the *L. manihotivorans* α -amylase gene. *DNA Sequence* **12(1)**:27-37.
- **Murado M. A., M. I. G. Siso, M. P. Gonzalez, M. I. Montemayor, L. Pastrana y J. Pintado.** 1993. Characterization of microbial biomasses and amyolytic preparations obtained from mussel processing waste treatment. *Bioresource Technol.* **43**:117-125.
- **Nakamura L. K. y C. D. Crowell.** 1979. *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentations. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**:531-540.
- **Nakamura, L. K.** 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:56-63.
- **Nuraida, L., C. Wachter y J. D. Owens.** 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:567-571.
- **Nwankwo, D., E. Anadu y R. Usoro.** 1989. Cassava fermenting organisms. *Mircen Journal.* **5**:169-179.

- **Olasupo N. A., D. K. Olukoya y S. A. Odunfa.** 1996. Studies on local strains of amylolytic *Lactobacillus* from Nigerian fermented foods. *Nahrung*. **40**:44-46.
- **Olympia M., Ono H., Shinmyo A. y Takano M.** 1992. Lactic acid bacteria in a fermented fishery product, "Burong Bangus". *J. Ferment. Bioeng.* **73**(3):193-197.
- **Olympia, M., H. Fukuda, H. Ono, Y. Kaneko, y M. Takano.** 1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda", and its amylolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **80**(2):124-130.
- **Osawa R., T. Fujisawa y L. I. Sly.** 1995. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate-degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:74-78.
- **Østergaard, A., P. K. B. Embarek, C. Wedell-Neergaard, H. H. Huss y L. Gram.** 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiol.* **15**:223-233.
- **Paladun-Müller, C., H. H. Huss y L. Gram.** 1998. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **46**:219-229.
- **Pandey A., P. Nigam, C. R. Soccol, V. T. Soccol, D. Singh y R. Mohan.** 2000. Advances in microbial amylases. Review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**:135-152.
- **Parés R. y A. Juárez.** 1997. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté, S. A. Barcelona, España.
- **Pirt S. J.** 1985. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- **Poyart C., G. Quesne y P. Trieu-Cout.** 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of "*Streptococcus infantarius* subsp. *colii*" 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.
- **Puspito H. y G. H. Fleet.** 1985. Microbiology of sayur asin fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 442-445.
 - **Raha, M., I. Kawagishi, V. Müller, M. Kihara y R. Macnab.** 1992. *Escherichia coli* produces a cytoplasmic α -amylase, Amy A. *J. Bacteriol.* **174**:6644-6652.
 - **Rio D.** 1999. Etude de la production, de la distribution et de la consommation du pozol dans le sud-est du Mexique (Villahermosa-Tabasco. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieures spécialisées (D.E.S.S.). Université de Montpellier II, 59 pp.
 - **Rivera Noriega A.** 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, 62 pp.
 - **Rodríguez-Sanoja R., J. Morlon-Guyot, J. Jore, J. Pintado, N. Juge y J. P. Guyot.** 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the c-terminal direct repeats in raw starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(8):3350-3356.
 - **Roissart de H. y F. M. Luquet.** 1994. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Vol. 1. Loriga, Chemin de Saint Georges, Uriage, France.
 - **Russek-Cohen E. y R. R. Colwell.** 1996. Numerical classification of microorganisms. *Molecular microbial ecology manual.* **3.2.1**:1-21.
 - **Sainz T., C. Wachter, J. Espinoza, D. Centurión, A. Navarro, J. Molina. A. Inzunza, A. Cravioto y C. Eslava.** 2001. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* **71**:169-176.
 - **Sanni, A., J. Morlon-Guyot y J. P. Guyot.** 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from

- different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* **72**:53-62.
- **Santillana R.** 1995. Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de nixtamal y pozol. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.
 - **Satoh, E., Y. Niimura, T. Uchimura, M. Kozaki, y K. Komagata.** 1993. Molecular cloning and expression of two α -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(11):3669-3673.
 - **Satoh, E., T. Uchimura, T. Kudo y K. Komagata.** 1997. Purification, characterization and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing α -amylase from *Streptococcus bovis* 148. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12):4941-4944.
 - **Schillinger U., W. Holzapfel y O. Kandler.** 1989. Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**:48-55.
 - **Schleifer K. H.** 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:201-203.
 - **Schleifer K. H. y R. Kilpper-Bälz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31-34.
 - **Schleifer K. H. y R. Kilpper-Bälz.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**:1-19.
 - **Schlegel L., F. Grimont, M. D. Collins, B. Régnault, P. A. D. Grimont y A. Bouvet.** 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1425-1434.

- **Sen S. y S. L. Chakrabarty.** 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J. Ferment. Technol.* **62(3)**:407-413.
- **Sen S. y S. L. Chakrabarty.** 1986. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 isolated from vegetable wastes: purification and characterization. *J. Appl. Bacteriol.* **60**:419-423.
- **Simpson, C. y R. Russell.** 1998. Intracellular α -amylase of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **180(17)**:4711-4717.
- **Southern E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molec. Biol.* **98**:503-517.
- **Stamer J. R.** 1975. Recent developments in the fermentation of sauerkraut, p. 267-280. En: J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting (ed.), Lactic acid bacteria in beverages and food. Academic press, London.
- **Steinkraus K. H.** 1996. Handbook of Indigenous fermented foods, 232-246. 2a. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- **Stiles M. E y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Review article. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:1-29.
- **Tao, L., I. C. Sutcliffe, R. R. Russell, y J. J. Ferretti.** 1993. Cloning and expression of the multiple sugar metabolism (msm) operon of *Streptococcus mutans* in heterologous streptococcal hosts. *Infect. Immun.* **61(3)**:1121-1125.
- **Tanasupawat S., O. Shida, S. Okada y K. Komagata.** 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1479-1485.
- **Teuber M.** 1995. The Genus *Lactococcus*, 225-227. En: B. J. B. Wood y W. H. Holzapfel (ed.), The Genera of lactic acid bacteria II. Vol. II. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
- **Trejo-González A., A. Feria-Morales y C. Wild-Altamirano.** 1982. The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation, p. 245-263. En: R. E. Feeney y J. R. Whitaker (ed.), Advances in Chemical Series, No. 198, Modification of proteins. American Chemical Society.

- **Tsakalidou E., E. Zoidou, B. Pot, L. Wassill, W. Ludwig, L. A. Devriese, G. Kalantzopoulos, K. H. Schleifer y K. Kersters.** 1998. Identification of streptococci from Greek Kasserli cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:519-527.
- **Ueda K., T. Seki, T. Kudo, T. Yoshida y M. Kataoka.** 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.* **181**(1):78-82.
- **Ulloa M., T. Herrera y J. Taboada.** 1983. Mexican pozol, p. 226-233. En: K. H. Steinkraus (ed.), Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker, N. York.
- **Ulloa M., T. Herrera y P. Lappe.** 1987. Pozol. En: *Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista.* **16**:13-20.
- **van de Peer, Y., y R. De Wachter.** 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comp. Appl. Biosc.* **10**:569-570.
- **Vandamme P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters y J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2):407-438.
- **Vihinen M. y P. Mäntsälä.** 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **24**(4):329-418.
- **Wacher M. C., A. Cañas, P. E. Cook, E. Bárzana y J. D. Owens.** 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**:226-274.
- **Wacher, C., A. Cañas, E. Bárzana, P. Lappe, M. Ulloa y J. D. Owens.** 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* **17**:251-256.
- **Wallbanks S., A. J. Martínez-Murcia, J. L. Fryer, B. A. Phillips y M. D. Collins.** 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**:224-230.
- **Walker, G. J.** 1965. The cell bound α -amylase of *Streptococcus bovis*. *Biochem. J.* **94**:289-298.

- Wells J. E., D. O. Krause, T. R. Callaway y J. B. Russell. 1997. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**:237-243.
- Xiaodong W., G. Xuan y S. K. Rakshit. 1997. Direct fermentative production of lactic acid or cassava and other starch substrates. *Biotechnol. Lett.* **9**:841-843.
- Yumoto I. y K. Ikeda. 1995. Direct fermentation of starch to L (+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnol. Lett.* **17**:543-546.
- Zhang D. X. y M. Cheyran. 1991. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. *Biotechnol. Lett.* **13**:733-738.
- Zhang D. X. y M. Cheyran. 1994. Starch to lactic acid in a continuous membrane bioreactor. *Process Biochem.* **29**:145-150.

Anexo 1.**Determinación de la actividad amilolítica por el método de extinción del complejo almidón-yodo.**

La porción amilosa del almidón es responsable del color azul obtenido con yodo. Las unidades de glucosa en la cadena de amilosa están dispuestas en forma helicoidal de tal forma que 6 anillos piranosos forman una vuelta de la hélice. Las dimensiones internas de la espiral son tales que la interacción del yodo con la amilosa produce un complejo de inclusión helicoidal en el que la molécula del halógeno ocupa el centro de la cavidad de la estructura helicoidal (Fogarty, 1983). Se han propuesto diversas modificaciones al método original de Wohlgemuth reportado en 1908. Smith y Roe, en 1949, indicaron que bajo condiciones apropiadas de análisis se pueden obtener intensidades de color almidón-yodo proporcionales al tiempo de incubación y a la concentración de enzima utilizada.

En este trabajo la determinación de actividad amilolítica se realizó con la siguiente metodología:

Dentro de una celda desechable se agregaron 2.4 ml de la solución yodo-yoduro al 4%. Se agregó 0.1 ml de la muestra a analizar (siempre en hielo) y se agitó vigorosamente. Se leyeron los valores de absorbancia a 620 nm y se relacionaron con una curva patrón de almidón (en todos los casos se utilizó almidón soluble de papa Prolabo-Merck Eurolab). Los controles o blancos se trataron de misma forma. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos (Fórmula 1).

$$\text{Actividad amilolítica (U/ml)} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) \times 1/P \times 3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

Donde:

P = pendiente de la curva patrón de almidón (absorbancia a 620 nm vs. concentración de almidón en g/L).

Para confirmar la linealidad de la reacción en 30 min (el tiempo empleado para calcular la actividad amilolítica), se determinaron las concentraciones de almidón residual durante 60 min de reacción de una suspensión celular de *S. bovis* cepa 25124 (actividad amilolítica asociada a la célula) con una solución de almidón (12 g/L). La reacción se efectuó a 37°C y pH 5.8 (Figura 19).

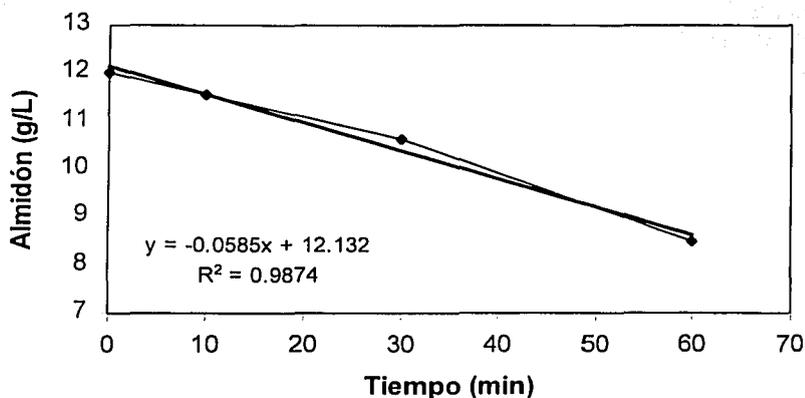


Figura 19. Hidrólisis de almidón por la amilasa de *S. bovis* cepa 25124.

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

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

G. Díaz-Ruiz,¹ J. P. Guyot,² F. Ruiz-Teran,¹ J. Morlon-Guyot,² and C. Wachter^{1*}

*Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, 04510 México D.F., México,¹ and
Unité R106 "Nutrition, Alimentation, Sociétés," Institut de Recherche pour le
Développement 34032 Montpellier Cedex 1, France²*

Received 2 December 2002/Accepted 17 May 2003

Pozol is an acid beverage obtained from the natural fermentation of nixtamal (heat- and alkali-treated maize) dough. The concentration of mono- and disaccharides from maize is reduced during nixtamalization, so that starch is the main carbohydrate available for lactic acid fermentation. In order to provide some basis to understand the role of amyolytic lactic acid bacteria (ALAB) in this fermented food, their diversity and physiological characteristics were determined. Forty amyolytic strains were characterized by phenotypic and molecular taxonomic methods. Four different biotypes were distinguished via ribotyping; *Streptococcus bovis* strains were found to be predominant. *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, and *Enterococcus sulfureus* strains were also identified. *S. bovis* strain 25124 showed extremely low amylase yield relative to biomass (139 U g [cell dry weight]⁻¹) and specific rate of amylase production (130.7 U g [cell dry weight]⁻¹ h⁻¹). In contrast, it showed a high specific growth rate (0.94 h⁻¹) and an efficient energy conversion yield to bacterial cell biomass (0.31 g of biomass g of substrate⁻¹). These would confer on the strain a competitive advantage and are the possible reasons for its dominance. Transient accumulation of maltotrioligosaccharides during fermentation could presumably serve as energy sources for nonamyolytic species in pozol fermentation. This would explain the observed diversity and the dominance of nonamyolytic lactic acid bacteria at the end of fermentation. These results are the first step to understanding the importance of ALAB during pozol fermentation.

Amyolytic lactic acid bacteria (ALAB) have been reported from different tropical amylaceous fermented foods, prepared mainly from cassava and cereals (e.g., maize and sorghum). Amyolytic strains of *Lactobacillus plantarum* have been isolated from African cassava-based fermented products (26), and the new ALAB species *Lactobacillus manihotivorans* (23) was isolated from cassava sour starch fermentations carried out in Colombia. ALAB have also been isolated from cereal-based fermented foods. Olympia et al. (27) characterized amyolytic strains of *L. plantarum* isolated from burong isda, a fermented food made from fish and rice in Philippines. Amyolytic strains of *Lactobacillus fermentum* were isolated for the first time from Benin maize sourdough (ogi and mawè) by Agati et al. (1). More recently, Sami et al. (30) described amyolytic strains of *L. plantarum* and *L. fermentum* strains in various Nigerian traditional amylaceous fermented foods.

The search for ALAB in fermented amylaceous foods has been justified by the high starch content of the raw material. Their role has yet to be elucidated since mono- and disaccharides, such as glucose and sucrose, which occur naturally in cereals and cassava, are readily available for lactic acid fermentation. The way the raw material is processed may determine the composition of the microbiota and, in particular, the occurrence of ALAB (14). For instance, during cassava processing for sour starch production, starch washing by sieving

under running water eliminates most of mono- and disaccharides leaving starch as the main substrate available (21), thus allowing ALAB (*L. manihotivorans*) to predominate (6).

In addition, pozol may offer another interesting example of the influence of processing conditions on microbial diversity. Pozol is a popular maize sourdough produced in urban and rural areas in Southeastern Mexico (34). Maize processing for pozol production involves a first step known as nixtamalization, which corresponds to the boiling of kernels in a lime suspension for ca. 1.5 h. The grains are then dehulled and washed. This water (called nexayote) is eliminated, the maize kernels (nixtamal) are ground, and the resulting dough is shaped into balls, wrapped in banana leaves, and left to ferment for several days. The main soluble sugar of maize is sucrose, which is present at a concentration of 2 g 100 g of the whole kernel⁻¹ on a dry weight basis (5). It is reduced to 0.1 to 0.7 g 100 g of dry dough⁻¹, after alkaline cooking, soaking, and washing to produce nixtamal (31). Thus, the question is raised as to how a low free sugar content might determine such rich microbial diversity and support a high number of lactic acid bacteria in pozol as reported by Wachter et al. (34) and Escalante et al. (12).

Research on the physiology of nondairy lactic acid bacteria and, in particular, members of the amyolytic group is necessary in order to determine their ecological significance in natural fermentations of amylaceous substrates, to develop new processes, and to improve existing techniques on a more rational basis by using specific starters.

The purpose of the present study was to determine the diversity of ALAB during pozol fermentation and their main

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, 04510 México D.F., México. Phone: 52-55-56-22-53-15. Fax: 52-55-56-22-53-15. E-mail: wacher@servidor.unam.mx.

physiological characteristics in order to understand their role in this food ecosystem.

MATERIALS AND METHODS

Sample description. Two freshly ground nixtamal dough samples (A and B) were purchased at Villahermosa market (Tabasco, Mexico). Each sample was divided into 100-g portions, wrapped in banana leaves, and incubated at 30°C for 7 days.

Enumeration of lactic acid bacteria and ALAB. First, 25 g dough was added to 225 ml of 0.1% peptone water; all further 10-fold dilutions were prepared in this diluent. Lactic acid bacteria and ALAB were enumerated on duplicate, surface-inoculated plates of MRS agar (CM361; Oxoid, Ltd., Hampshire, England) and MRS agar with 1.5% soluble starch (J. T. Baker, Mexico City, Mexico) instead of 2% glucose, respectively. Water contents of pozol doughs were measured by determining loss in weight after being dried at 80°C for 24 h, and counts were expressed as the log CFU/g of dry dough⁻¹. Randomly selected colonies were checked by conducting a Gram stain and catalase reaction. For ALAB, colonies with clear hydrolysis zones after being flooded with Gram iodine solution were considered.

Isolation of ALAB. ALAB were isolated from MRS-starch replica plates by picking at random colonies with different diameters of hydrolysis zones. The strains recovered were purified further by streaking them onto MRS-starch medium. They were tested for Gram stain and catalase reaction. Pure cultures were stored at -70°C on glass beads with 20% glycerol as cryoprotectant (13).

Determination of the metabolic pathway. Cells were cultured for 18 h in 10 ml of MRS broth (0881-17-5; Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Cultures were centrifuged (10 min at 15,300 × g and 4°C), and the supernatants were filtered through a 0.22- μ m-pore-size membrane filter (Millipore). The filtrates were analyzed on a Waters (Milford, Mass.) 515 liquid chromatograph equipped with a hydrogen loaded ion exchange column (Bio-Rad Aminex HPLX-8711, 300 by 7.8 mm). The mobile phase was 6 mM H₂SO₄ with a flow rate of 0.8 ml min⁻¹ at 65°C. A Waters 2410 refractive index detector was used. Noninoculated MRS broth served as a control. Homofermentative or heterofermentative pathways were established by determination of end-fermentation products, i.e., lactate or an equimolar mixture of lactate and ethanol-acetate, respectively.

Biochemical identification. Carbohydrate fermentation profiles were done on API 50CH (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions.

Ribotyping. Overnight cultures were diluted in fresh MRS broth and incubated for 4 h at 30°C. The cells were harvested by centrifugation (10 min, 4,480 × g, 4°C) and washed twice in sterile TS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 25% [wt/vol] sucrose). The cells were then suspended in TS buffer to obtain an absorbance value of 3 at 600 nm. The cell suspension was treated with lysozyme (100 mg ml⁻¹) for 1 h at 37°C. Agarose blocks containing the extracted DNA were prepared and digested with *Eco*RI endonuclease (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the method of McClelland et al. (20). Standard electrophoresis of the DNA samples was performed in a large electrophoresis cell (30 by 20 cm) with 1% (wt/vol) agarose gel with TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetate, 2 mM EDTA [pH 8]) at 4 V cm⁻¹ and 10°C for 15 h. DNA was transferred to nylon membranes (Hybond-N+; Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) by the alkaline method according to the instructions provided by the manufacturer. The probe used for hybridization was a combination of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments of each of the 15136, 15125, and 25421 isolates. Primers 27i (5'-AGAGTTTGTATCTMTCGGCTCAG-3') and 354r (5'-CTGCTGCSYCCCGTAG-3') were used (17). The amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 11 min and 30 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 30 s at 50°C, and elongation at 72°C for 30 s. A final extension was carried out at 72°C for 7 min. Amplification products were cleaned (Wizard DNA Clean-Up System; Promega). The amplified product was then labeled with digoxigenin (DIG)-dUTP by using the DIG labeling kit supplied by Roche (Meylan, France). Hybridization and detection experiments were performed with a DIG detection kit (Roche, Meylan, France), according to the instructions provided by the manufacturer. Hybridization band profiles were evaluated for the presence or absence of common unique bands, and a matrix was constructed. It was analyzed by using the TREECON v1.2 program (33). The analysis includes calculation of similarity distance by using the procedure of Link et al. (19), construction of the tree topology by using UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages), and generation of the phenogram.

Determination of 16S rRNA gene sequences. A fragment of the 16S rRNA gene (corresponding to positions 30 to 1521 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene) was amplified by PCR with conserved primers close to the 3' and 5' ends of the gene. The PCR products were directly sequenced (a single strand) by using

a *Taq* dye-deoxy terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) and an automatic DNA sequencer (model 373; Applied Biosystems). Identifications were based on a partial sequence (corresponding to positions 30 to 338 of the *E. coli* 16S rRNA gene) or a nearly full sequence (corresponding to positions 30 to 1521 of the *E. coli* 16S rRNA gene) comparisons. The closest known relatives were determined by performing database searches at GenBank by using the BLAST program.

Starch fermentation by *S. bovis* strain 25124; growth conditions. Cultures were grown in 1-liter flasks with 800 ml of MRS medium (9) with soluble potato starch (20 g liter⁻¹; Prolabo-Merck Eurolab) instead of glucose, inoculated with 25 ml of 12 h precultures grown in MRS-starch medium at 30°C. Fermentation broth was sampled every 30 min. The fermentation was performed in triplicate.

Biomass estimation and growth parameters. A calibration curve between the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) and the cell dry weight was established for the strain. The biomass concentration was determined by measuring the OD₆₀₀ with Spectronic Genesys 5 spectrophotometer (Milton Roy) and related to dry weight measured after two washing and centrifugation cycles, followed by a drying step at 80°C for 24 h. The maximum specific growth rate was estimated during exponential growth phase by linear regression of the ln(OD₆₀₀) versus time. Product and growth yields relative to substrate (Y_{lac} and Y_{glc}, respectively) were calculated as the slope of the linear regressions of either lactic acid or biomass versus residual substrate. Lactic acid and amylase yields from biomass (Y_{lac/bio} and Y_{amyl/bio}, respectively) were calculated in a similar manner by plotting the product versus the biomass. All calculations were made with data obtained during the corresponding exponential growth phase. Specific rates of lactic acid or amylase production (q_{lac} and q_{amyl}, respectively) and substrate consumption (q_s) were calculated as indicated by Pitt (29): q_s = Y_{lac} · μ ("p" for production, i.e., lactic acid or amylase) and q_s = μ Y_{lac}.

Analytical methods. Cells were removed by filtering the medium through a membrane filter (0.22- μ m pore size; Millipore). To quantify lactic acid, filtrates were analyzed on a Perkin-Elmer 250 liquid chromatograph equipped with a hydrogen loaded ion-exchange column (Bio-Rad Aminex HPLX-8711, 300 by 7.8 mm) and a Perkin-Elmer 30 refractive index detector (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.). The mobile phase was 0.01 N H₂SO₄ with a flow rate of 0.6 ml min⁻¹ at 50°C. L-Lactate (L-2250; Sigma) was used as standard. Hydrolysis products from starch fermentation were examined by high-performance liquid chromatography by using a Prodigy 5 ODS 2 C₁₈ column (250 by 4.6 mm; Phenomenex) with the refractive index detector. The products were eluted with water at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹ and a column temperature of 35°C. G2 (maltose) to G7 (maltotriose) were used as standards (Sigma). Total and reducing sugars were determined by the methods of Dubois et al. (11) and Miller (22), respectively. The residual starch content was determined by measuring the iodine-starch complex color (24). Glucose and maltose were determined by using a commercial enzymatic test (product 1113950; Boehringer, Mannheim, Germany).

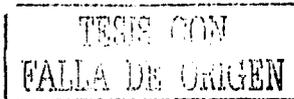
Amylase activity. To detect cell-bound amylase activity, the cultures (10 ml) were harvested by centrifugation (15 min at 27,200 × g and 4°C); the cell pellets were washed and suspended in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). Cell-bound amylase activity was assayed at pH 6.8 and 37°C by measuring the iodine-complexing ability of starch as described by Agati et al. (1). One enzyme unit was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 10 mg of starch in 30 min.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for the partial 16S rRNA gene sequences of strains 25124, 15430, A12203, A45201, A57206, A57103, A56203, A45212, and A36202 reported in the present study are AY184231 to AY184239.

RESULTS

Enumeration and isolation of ALAB. The initial concentration of lactic acid bacteria was 4.9 log CFU/g of dry dough⁻¹ (Table 1). This concentration increased to 9.9 log CFU/g of dry dough⁻¹ after 24 h and was kept approximately constant for 72 h of fermentation. The initial number of ALAB was high (4.5 log CFU/g of dry dough⁻¹). This level increased during the first 24 h of fermentation to 8.4 log CFU/g of dry dough⁻¹ and remained constant until 72 h (8.7 log CFU/g of dry dough⁻¹). The pH value decreased from 7.4 to 4.8 in 24 h and to 4.4 in 72 h (Table 1).

A total of 257 strains of ALAB were isolated from both samples at different fermentation times. Rod and coccoid morphology were observed at all times. Strains isolated from sam-



121

TABLE 1. Concentrations of lactic acid bacteria and ALAB, and pH values during pozol fermentation at 30°C^a

Fermentation time (h)	pH	Concn (log CFU g of dry weight ⁻¹) of:	
		ALAB	Lactic acid bacteria
0	7.4	4.5	4.9
6	5.9	7.6	8.2
24	4.8	8.4	9.9
48	4.8	8.7	10.4
72	4.4	8.7	10.2

^a Values are the means of two independent fermentations (samples A and B). pH values varied from 0.2 to 1.6 U, and log CFU g of dry weight⁻¹ values varied from 0.1 to 0.6 U.

ple B showed larger hydrolysis diameters (2 to 18 mm) on MRS-starch medium than those from sample A (1 to 9 mm). A starch hydrolysis zone of 7 mm in diameter was evident in a large number of strains (Fig. 1). The largest starch hydrolysis zones (9 to 18 mm) were observed in strains isolated at 24 h in sample B. Similar results were obtained for sample A.

The 40 most amylolytic strains (those with starch hydrolysis diameters larger than 9 mm) were further characterized by using a combination of phenotypic and molecular taxonomic approaches. All strains were homofermentative, since they produced only lactic acid from glucose.

Evaluation of diversity of ALAB by ribotyping and 16S rRNA gene sequence analysis. Two clusters and two lines (lines are one-strain clusters) were distinguished by ribotyping (Fig. 2). Cluster 1a included 22 isolates (19 from sample B and 3 from sample A) that merged at a similarity level of 54%. Cluster 1b included 1 isolate from sample B and 13 isolates from sample A that merged at 54% similarity. A line (L1)

included one isolate from sample A that merged at 32% similarity. Two isolates from sample A merged at a similarity level of 49% (cluster 2), and a line (L2) with an isolate from sample A merged at a similarity level of 10%.

16S rRNA genes of strains from the main clusters were partially sequenced (positions 30 to 338 of the *E. coli* 16S rRNA gene). Strains 15430, 25124, A56203, and A57103 from group 1a and strains A57206 and A12203 from group 1b were tentatively identified as *S. bovis*, since they showed similarity coefficients of between 99 and 100% with this species, but was also close to *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. Strain A45201 (a line between clusters 1b and 2) showed 100% similarity with *S. macedonicus*, whereas strain A45212 (group 2) showed 99% similarity with *L. lactis*. Strain A36202 full sequence (positions 30 to 1521 of the *E. coli* 16S rRNA gene) showed 98% similarity to *E. sulfureus* (Fig. 2), but its identity would have to be confirmed, since many different enterococcal species display <1% sequence divergence (10).

Biochemical identification of ALAB. From API 50CH strips, all strains fermented D-glucose, D-fructose, D-mannose, N-acetylglucosamine, esculin, salicin, maltose, sucrose, glycogen, and starch. Sugars with variable fermentation profiles are presented in Table 2. None of the other sugars tested were fermented. Most strains from ribotyping clusters 1a and 1b shared the same biochemical profile, with the exception of trehalose fermentation, which was negative for most strains from cluster 1a and positive for most strains from cluster 1b. Strains from both lines and cluster 2 showed variations in α -methyl-D-glucoside, amygdalin, arbutin, cellobiose, D-turanose, melibiose, glycerol, β -gentobiose, galactose, and D-raffinose compared to clusters 1a and 1b.

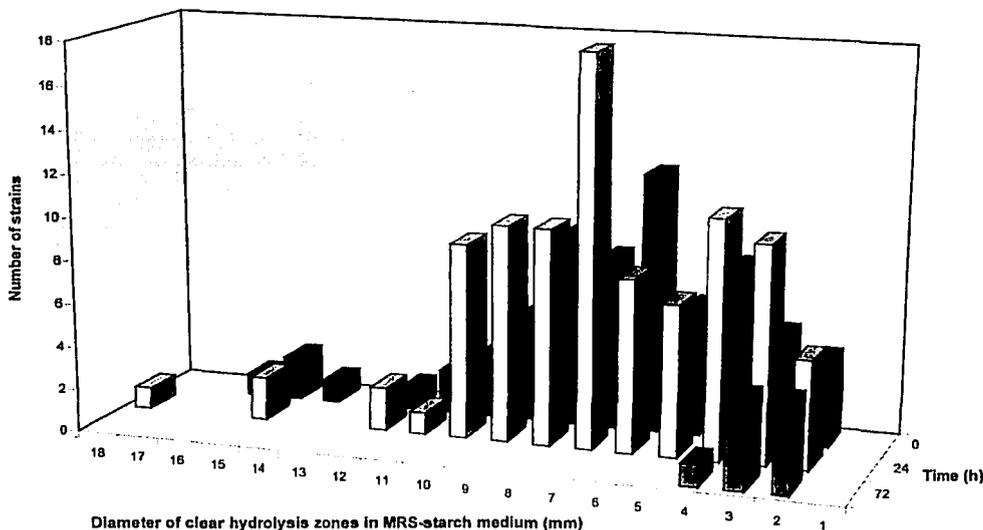


FIG. 1. Distribution of hydrolysis diameters in MRS-starch medium of ALAB isolated from pozol (sample B) at different fermentation times.

122

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE 2. Carbohydrate fermentation profiles of ALAB from pozol (samples A and B)

Strain	Fermentation ^a of:													Cluster no. ^b
	GLY	RIB	GAL	MDG	NAG	AMY	ARB	CEL	MEL	TRE	RAF	GEN	TUR	
15133	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15136	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15430	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15220	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	1a
15431	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
A46116	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1a
25245	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25318	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
25109	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15124	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25113	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25148	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25139	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25233	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25421	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
25137	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15125	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15414	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
25124	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1a
15312	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1a
A56203	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	1a
A57103	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	1a
A57206	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1b
A45208	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A37103	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A37202	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A36111	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A12203	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	1b
A56101	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1b
A56201	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
15319	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1b
A46112	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1b
A46113	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	1b
A47212	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A56208	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	1b
A56202	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	1b
A45201	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	L1
A45226	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	2
A45212	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	2
A36202	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	L2

^a +, Fermentation; -, no fermentation; Abbreviations: GLY, glycerol; RIB, ribose; GAL, galactose; MDG, α -methyl-D-glucoside; NAG, N-acetyl glucosamine; AMY, amygdalin; ARB, arbutin; CEL, cellobiose; MEL, melibiose; TRE, trehalose; RAF, D-raffinose; GEN, β -gentobiose; TUR, D-turanose.

^b Cluster numbers correspond to those obtained by ribotyping (Fig. 2).

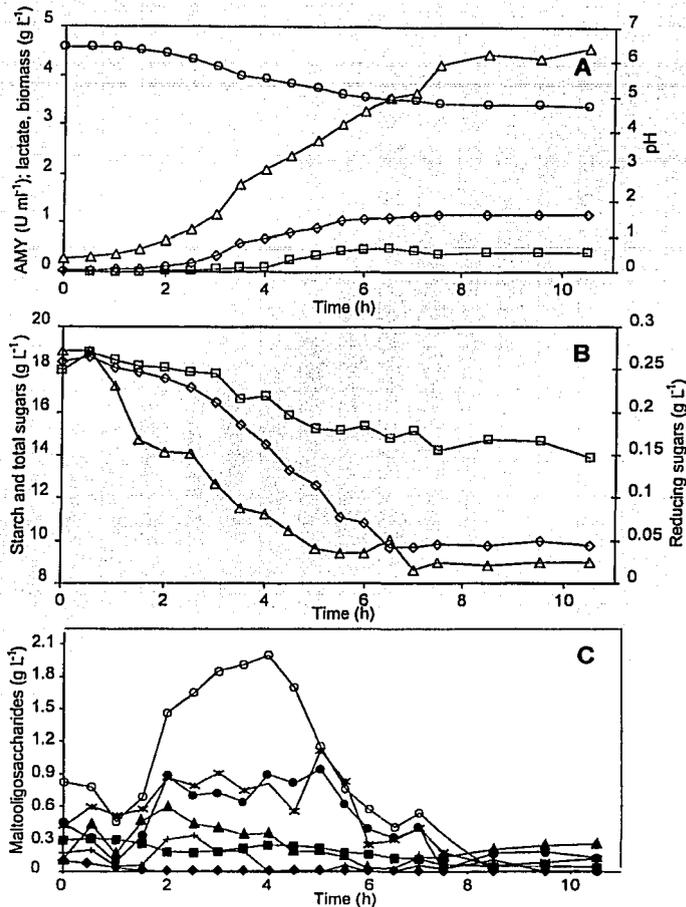
mentation, as has been shown previously by classical culture methods (25, 34) and culture-independent methods (2, 12). Because of the low concentration of sugars remaining in maize after nixtamalization (0.1 to 0.7 g of sucrose 100 g of dry nixtamalized dough⁻¹) (31), starch must be an important substrate for lactic fermentation. Forty percent of lactic acid bacteria present in the initial dough were amyolytic, and this ratio decreased to 3% after 72 h of fermentation (Table 1). The high initial concentration of ALAB indicates their importance during pozol fermentation, mainly during the first 24 h, when a high number of ALAB with a 7- to 18-mm hydrolysis zone diameter on agar plates were present. This suggests that conditions such as high initial pH values (7.4) could have favored the growth of bacteria with higher amyolytic activity. In contrast, a relatively high number of nonamyolytic lactic acid bacteria were observed at the end of fermentation that might be explained by an efficient use of mono- and disaccharides

initially present and other sugars made available from starch hydrolysis by ALAB.

Diversity of ALAB. An integrated vision of the role and the diversity of ALAB in pozol, together with their main physiological characteristics, is reported in this investigation. All of the 40 amyolytic isolates were homofermentative lactic acid bacteria. Frequently, ALAB isolated from foods belong to the genus *Lactobacillus* and are commonly homofermentative such as *L. manihotivorans* (23) or facultative heterofermentative such as *L. plantarum* (16, 26, 27). Strictly heterofermentative ALAB strains have also been isolated, such as *Leuconostoc mesenteroides* from Nigerian ogi (16), *Leuconostoc* sp. from fish silage (18), and *L. fermentum* from fermented maize dough (mawe and ogi) (1).

From the API 50CH profiling results, all ALAB isolated from pozol were able to ferment sucrose, maltose, glucose, and fructose, which are the main soluble sugars of maize (5), re-

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



TRIPS CON
 FALLA DE ORIGEN

FIG. 3. Fermentation of starch by *S. bovis* strain 25124 at 30°C without pH control. (A) Biomass (\blacktriangleright), lactate (Δ), amylase activity (\square), and pH values (\circ); (B) total sugars (\square), reducing sugars (Δ), and starch (\diamond); (C) glucose (\blacklozenge), maltose (\blacksquare), G3 (\blacktriangle), G4 (\circ), G5 (\ast), G6 (\bullet), and G7 ($+$). The results are the means of three independent replicates. Variation coefficients were lower than 10% except for biomass (0.5 to 44%), lactate (0.2 to 25%), and maltose (5.3 to 47%).

flecting adaptation to their habitat. Furthermore, all ALAB (except strain A36202) were able to ferment raffinose, an α -galactoside contained in cereals and legumes that is responsible for digestive disorders.

The isolates belong to the closely related *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Lactococcus* genera, with *S. bovis* as the dominant species during fermentation. Ribotyping and fermentation profiles indicate strain diversity among pozol isolates belonging to the group *S. bovis*. The presence of *S. bovis* in pozol sourdoughs has previously been detected by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints and molecular probes (3), but the organism was not isolated. *S. bovis* comprises strains capable of growth in the presence of 6.5% NaCl and at

pH 9.6, and some strains are thermotolerant (15). Considering these properties, alkaline cooking of maize to prepare nixtamal would have contributed in selecting these bacteria. However, high survival rates could not be expected, since rapid inhibition of growth of this species linked to pH fall has been reported (15). This could account for the decrease in overall ALAB population at the end of pozol fermentation; however, strains belonging to *S. bovis* species were isolated throughout pozol fermentation, despite the increasing acid conditions. These results seem to contradict previous studies (2, 3) that showed an intense denaturing gradient gel electrophoresis band corresponding to *S. bovis* over the entire period of 96 h of pozol fermentation, which accounted for 50% of the total active

TABLE 3. Yields and metabolic quotients for *S. bovis* 25124, *L. manihotivorans* 18010ST, *L. plantarum* A6, and *L. fermentum* OgiE1

Parameter ^a	Value ^b obtained for:			
	<i>S. bovis</i> 25124 ^c	<i>L. manihotivorans</i> 18010 ST	<i>L. plantarum</i> A6 ^d	<i>L. fermentum</i> OgiE1 ^e
Total sugar consumed (%)	25.5	45	ND	78
$Y_{s/n}$ (g g ⁻¹)	0.31	0.09 (0.15)	ND (0.18)	0.1
$Y_{lac/n}$ (g g ⁻¹)	0.78	0.71 (0.67)	ND (0.84)	0.33
$Y_{lac/s}$ (g g ⁻¹)	2.56	7.89 (4.47)	ND (4.7)	3.3
$Y_{amy/n}$ (U g ⁻¹)	139	2,400 (4,900)	2,300 (5,700)	5,400
μ (h ⁻¹)	0.94	ND (0.36)	0.43 (0.41)	0.35
q_{lac} (g of cell dry wt ⁻¹ h ⁻¹)	2.4	ND (1.0)	3.1 (3.0)	1.1
q_s (g of cell dry wt ⁻¹ h ⁻¹)	3.0	ND (2.4)	ND (2.3)	3.5
q_{amy} (U g of cell dry wt ⁻¹ h ⁻¹)	130.7	ND (1,764)	989 (2,337)	1,890

^a $Y_{s/n}$, growth yield relative to substrate; $Y_{lac/n}$, lactic acid yield relative to substrate; $Y_{lac/s}$, lactic acid yield relative to biomass; $Y_{amy/n}$, amylase yield relative to biomass; μ , maximum specific growth rate; q_{lac} , specific rate of lactic acid production; q_s , specific rate of substrate consumption; q_{amy} , specific rate of amylase production.

^b Fermentation values obtained at a controlled pH (6.0) are given in parentheses. ND, not determined.

^c As determined in this study.

^d Guyot et al. (14).

^e Calderon et al. (7).

microbiota. These data could have been overestimated since the authors of that study emphasized that their results could be biased by the techniques used to determine relative abundance of species and by possible comigration of fragments from different species (3). However, a high DNA concentration is not contradictory with low plate counts, since the growth ability of the species could have been altered by pH conditions developed during fermentation, leading to viable but nonculturable cells. Another aspect that cannot be neglected is the potential presence of higher pH microenvironments (maintained after the alkali treatment) that could explain *S. bovis* survival in the acidified dough.

Three other species of ALAB were found: *S. macedonicus*, *L. lactis*, and *E. sulfureus*. To our knowledge, ours is the first report of the amylolytic *S. macedonicus* and *E. sulfureus* strains. *S. macedonicus* was isolated from Greek Kasserli cheese (32). *L. lactis* has been reported previously in pozol (3, 12, 25), a starch-fermenting *L. lactis* subsp. *lactis* strain was isolated from the Thai product plaasom (28). Most of the ALAB isolated from other cereal- or cassava-based fermented foods belong to the genus *Lactobacillus* (1, 16, 30). In comparison to African cereal-based fermented foods, pozol thus appears to be a food ecosystem in which other types of ALAB have developed. The absence of *Lactobacillus* among the most amylolytic of the lactic acid bacteria in pozol might be linked to conditions imposed by process conditions (i.e., alkaline cooking).

Starch fermentation by *S. bovis*. Unlike starch fermentation by *L. manihotivorans* and *L. fermentum* Ogi E1 (14, 7), starch is only poorly hydrolyzed by the dominant species *S. bovis*, and a high concentration of total sugars remains at the end of fermentation. Poor starch hydrolysis could be explained by the low level of amylase produced but, as shown for *L. manihotivorans* and *L. fermentum* Ogi E1, even at low amylase activity starch can be completely degraded (14, 7). Furthermore, the difference between total sugar and reducing sugar concentrations, together with the low concentration of low-molecular-weight maltooligosaccharides indicates that higher-molecular-weight dextrans were produced.

In the present study, the main strain was characterized by a low yield of lactic acid relative to biomass ($Y_{lac/n}$), an extremely low amylase yield relative to biomass ($Y_{amy/n}$), and a specific rate of amylase production (q_{amy}) (Table 3) and by a high

specific growth rate and biomass yield ($Y_{s/n}$). These characteristics are very different from those described for ALAB such as *L. manihotivorans* or amylolytic strains of *L. plantarum* and *L. fermentum* (Table 3). *Streptococcus* strains isolated from bovine rumen grew faster than other lactic acid bacteria on a wide variety of mono- and disaccharides, with specific growth rates higher than 1.5 h⁻¹ (4). In particular, *S. bovis* JB1 presented higher specific growth rate on starch (1.98 h⁻¹) than on maltose (1.38 h⁻¹) (8). The specific growth rate determined for the pozol *S. bovis* strain (0.94 h⁻¹) could give it a competitive advantage over the other nonamylolytic lactic acid bacterium species of pozol. In addition, although substrate consumption and lactate production parameters are in the classical range observed for other ALAB (Table 3), a relatively high value of $Y_{s/n}$ indicates efficient energy conversion into biomass, which would also confer an additional competitive advantage, in spite of a very low efficiency in starch hydrolysis and total sugar consumption. Nevertheless, a low tolerance at acidic pH of *S. bovis* strains will also have to be taken into account to explain the dynamics of microbial populations.

Since early and drastic reduction in the content of mono- and disaccharides in nixtamal, microbial diversity and the high bacterial concentration reported in pozol cannot be supported by these carbohydrates. However, the presence of ALAB from the first stage of the fermentation could explain the diversity of microbial population through trophic relationships. Based on the specific properties and intrinsic limitations of *S. bovis* strains, it can be assumed that the major role of *S. bovis* could be to provide low-molecular-weight maltooligosaccharides to the nonamylolytic microflora during the early steps of nixtamal dough fermentation. This assumption opens new fields of investigations on the microbial ecology of starchy fermented foods.

ACKNOWLEDGMENTS

G.D.-R. acknowledges CONACYT (México) for providing a personal Ph.D. grant, PAEP UNAM for financial support through doctoral projects 103313 and 202309, and IRD, Montpellier, France, for short research stays.

We thank Judith Espinosa and Dora Centurión from UJAT, Tlaxcala, Mexico, for providing samples and laboratory facilities during field studies and Rocío Santillana for technical assistance. We are

126

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

grateful to Matthew D. Collins and Paul A. Lawson for help with 16S rRNA gene sequencing of the strains.

REFERENCES

1. Aguil, V., J. P. Guyot, J. Morlon-Guyot, P. Talamond, and D. J. Hounhouigan. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* 85:512-520.
2. Ampe, F., N. Ben Omar, C. Moizan, C. Wachter, and J. P. Guyot. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5464-5473.
3. Ben Omar, N., and F. Ampe. 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough Pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3664-3673.
4. Bond, D. R., B. M. Tsai, and J. B. Russell. 1998. The diversion of lactose carbon through the tagatose pathway reduces the intracellular fructose 1,6-bisphosphate and growth rate of *Streptococcus bovis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:600-605.
5. Boyer, C. D., and J. C. Shannon. 1987. Carbohydrates of the kernel, p. 253-272. *In* S. A. Watson and P. E. Ramstad (ed.), *Corn: chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minn.
6. Brabet, C., D. Dufour, M. Rimbault, and J. Giraud. 1996. Improving cassava sour starch quality in Colombia, p. 241-246. *In* D. Dufour, G. M. O'Brien, and R. Best (ed.), *Cassava flour and starch*. CIAT, Cali, Colombia.
7. Calderon, M., G. Loiseau, and J. P. Guyot. 2001. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sour-dough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterofermentative fermentation of starch. *J. Appl. Microbiol.* 90:508-516.
8. Cotta, M. A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:772-776.
9. De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Shurpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
10. Devriese L. A., and B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, p. 327-367. *In* B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (ed.), *The lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, vol. 2*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
11. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
12. Escalante, A., C. Wachter, and A. Farrés. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64:21-31.
13. Feltham, R. K. A., A. K. Power, P. A. Pell, and P. H. A. Sneath. 1978. A simple method for storage of bacteria at -76°C. *J. Appl. Bacteriol.* 44:313-316.
14. Guyot, J. P., M. Calderon, and J. Morlon-Guyot. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T. *J. Appl. Microbiol.* 88:176-182.
15. Hardie, J. M., and R. A. Whitley. 1995. The genus *Streptococcus*, p. 55-124. *In* B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (ed.), *The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria, vol. 2*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
16. Johansson, M. L., A. Sanni, C. Lönnér, and G. Molin. 1995. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.* 25:159-168.
17. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
18. Lindgren, S., and O. Refn. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. *J. Appl. Bacteriol.* 57:221-228.
19. Link, W., C. Dixhens, M. Singh, M. Schwall, and A. E. Melchinger. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:27-32.
20. McClelland, M., R. Jones, Y. Patel, and M. Nelson. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 15:5985-6005.
21. Mestres, C., and X. Rouau. 1997. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *J. Sci. Food. Agric.* 74:147-155.
22. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
23. Morlon-Guyot, J., J. P. Guyot, B. Pot, I. Jacobe de Haut, and M. Rimbault. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1101-1109.
24. Nakamura, L. K. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31:56-63.
25. Nuraida, L., C. Wachter, and J. D. Owens. 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:567-571.
26. Nwankwo, D., E. Anadu, and R. Usaro. 1989. Cassava fermenting organisms. *Mircen J.* 5:169-179.
27. Olympia, M., H. Fukuda, H. Ono, Y. Kaneko, and M. Takano. 1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda," and its amylolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80:124-130.
28. Østergaard, A., P. K. B. Embarek, C. Wedell-Neergaard, H. H. Huss, and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiol.* 15:223-233.
29. Pirt, S. J. 1985. *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
30. Sanni, A., J. Morlon-Guyot, J. P. Guyot. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 53-62.
31. Santillana, R. 1995. Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta eficiencia para el análisis químico de mixtamal y pozol. MSc. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico.
32. Tsakalidou, E., E. Zoldou, B. Pot, L. Wassili, W. Ludwig, L. A. Devriese, G. Kalantzopoulos, K. H. Schellefer, and K. Kersters. 1998. Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:519-527.
33. van de Peer, Y., and R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10:569-570.
34. Wachter, C., A. Cañas, E. Bórzana, P. Lappe, M. Ullon, and J. D. Owens. 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol.* 17:251-256.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN