



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE POLISACÁRIDOS  
AISLADOS DE LA FERMENTACIÓN DEL POZOL**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**AIDÉ MARTÍNEZ MARTÍNEZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>DRA. MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE</b>	<b>FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ</b>	<b>FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA</b>	<b>INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>DR. FRANCISCO RUÍZ TERAN</b>	<b>FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>QA. ALEIDA MINA CETINA</b>	<b>FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM</b>

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en el Laboratorio C-034 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, CDMX. 04510, México.

### **ASESOR DEL TEMA**

**DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA** \_\_\_\_\_

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

**M. en C. JOCELIN RIZO VILLAGRANA** \_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTE:**

**AIDÉ MARTÍNEZ MARTÍNEZ** \_\_\_\_\_

## **FINANCIAMIENTO**

Este proyecto fue financiado por la UNAM, proyecto DGAPA IN 223917

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja, por haberme dado la oportunidad de unirme al grupo de trabajo. Por todo el apoyo brindado desde el inicio y hasta el final de esta investigación. Por todos sus conocimientos, consejos y motivación.

A la M.C Jocelin Marari Rizo Villagrana, por la enseñanza brindada, el apoyo académico y experimental para la realización de esta tesis. Por tu sabiduría y paciencia a lo largo de todo el trabajo de investigación.

Al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos, por el apoyo técnico y logístico que hizo posible el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta, por sus aportaciones, comentarios y apoyo brindado durante los seminarios.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán, por su contribución para el enriquecimiento y desarrollo de este proyecto.

Al H. Jurado revisor de esta tesis por todas sus aportaciones para la mejora de este trabajo.

Al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por otorgarme las facilidades para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Química, a la UNAM.

## INDICE

### *Abreviaturas*

### *Resumen*

<b>I)    <b>Introducción</b></b>	<b>1</b>
<b>II)   <b>Antecedentes</b></b>	
2.1 Alimentos fermentados	2
2.2 El pozol	4
2.3 Elaboración del pozol	5
2.4 Microbiología del pozol	7
2.5 El maíz y la nixtamalización	12
2.6 Polisacáridos del maíz	14
<b>III)   <b>Justificación</b></b>	<b>18</b>
<b>IV)   <b>Hipótesis</b></b>	<b>19</b>
<b>V)    <b>Objetivos</b></b>	<b>20</b>
<b>VI)   <b>Materiales y métodos</b></b>	
6.1 Descripción de la muestra	21
6.2 Cuantificación de los grupos microbianos	21
6.3 Aislamiento de microorganismos para la búsqueda de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica	21
6.4 Caracterización parcial de los aislados	22
6.5 Conservación de microorganismos con actividad glucósido-hidrolasa positiva	22
6.6 Índice de potencial enzimático	23
6.7 Medición de pH	23
6.8 Cuantificación de carbohidratos solubles totales	24
6.9 Cuantificación de carbohidratos reductores	24
6.10 Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica in vitro	25
6.11 Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica directamente de la masa	28
6.12 Extracción de DNA genómico	30
6.13 Integridad de DNA genómico	32
6.14 Pureza de DNA genómico	32

6.15 Identificación de los aislados mediante Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)	33
<b>VII) Resultados y discusión</b>	
7.1 Caracterización microbiológica del pozol, aislamiento y conservación de colonias con actividad positiva	34
7.2 Aislamiento de microorganismos con actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica	37
7.3 Caracterización microscópica y macroscópica de los aislados obtenidos de la fermentación del pozol con actividad positiva	43
7.4 Clasificación de los aislados mediante Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)	49
7.5 Cuantificación de fibra cruda, carbohidratos solubles totales y carbohidratos reductores	55
7.6 Determinación de la actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica in vitro y directamente de la masa del pozol	57
<b>VIII) Conclusiones</b>	62
<b>IX) Prospectivas</b>	63
<b>X) Bibliografía</b>	64
<b>XI) Anexos</b>	
A) Medios de cultivo	71
B) Determinación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico	72
C) Determinación de carbohidratos reductores por el método de DNS	73
D) Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica in vitro	75
E) Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica en la masa	79
F) Fundamento de la extracción de DNA genómico	80
G) Detección de actividad celulolítica y xilanolítica con rojo congo	81
H) Fundamento de la técnica de Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)	82
<b>Anexo 2</b>	
A) Codificación de los grupos morfotipos obtenidos de los aislados con actividad glucósido-hidrolasa	84

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
cm	Centímetro
g	Gramo
h	Hora
min	Minuto
ml	Mililitro
mg	Miligramo
nm	Nanómetro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D	Diámetro
DO	Densidad óptica
IP	Índice de Potencia
L	Litro
mA	Miliamper
mM	Milimolar
MM	Medio mínimo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
TAE	Tris-acetato-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Voltaje
UV	Ultravioleta
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl

2-ME	2-mercaptoetanol
ALAB	Bacterias lácticas amilolíticas
NALAB	Bacterias lácticas no amilolíticas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

## RESUMEN

El pozol es una bebida tradicional de origen Maya, ácida, refrescante, no alcohólica, que se prepara a partir de masa de maíz nixtamalizado. La sacarosa (principal azúcar soluble del maíz) se reduce de 2% a 0.1 - 0.7% en base seca después de la cocción alcalina, remojo y lavado de los granos durante la producción del nixtamal, por lo que se ha sugerido que esta concentración es insuficiente para mantener la gran abundancia y diversidad microbiana reportada para este alimento fermentado.

Durante muchos años se consideró que el almidón debía ser el principal carbohidrato utilizado por los microorganismos involucrados en la fermentación del pozol, sin embargo, a la fecha no se ha identificado actividad amilolítica en la masa y los microorganismos aislados han resultado ser poco amilolíticos comparados con otras bacterias amilolíticas aisladas también de alimentos fermentados amiláceos. Por otro lado, en el grupo de trabajo hemos observado que la masa que se usa para la producción del pozol no es homogénea ya que en ella se observa germen y remanentes de pericarpio por lo que se debe incluir entre los azúcares fermentables del pozol a la celulosa y la hemicelulosa.

Los resultados obtenidos demuestran que en la masa del pozol si existen microorganismos capaces de crecer en todos estos polisacáridos. Sin embargo, y en concordancia con lo observado con las amilasas, no se logró detectar actividad celulolítica o xilanolítica en la masa. En su conjunto los resultados sugieren que el almidón no es el único sustrato utilizado por los microorganismos durante la fermentación del pozol, como se pensó por mucho tiempo debido principalmente a la composición de la masa.

## I) INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida tradicional de origen Maya, ácida, refrescante, no alcohólica, que se prepara a partir de masa de maíz fermentado (Escalante et al., 2001). La fermentación del pozol ocurre de forma natural, ya que no se añade intencionalmente un inóculo, es llevada a cabo con la intervención de una microbiota compleja que se incorpora durante su elaboración, principalmente en la etapa de la molienda. Esta microbiota está conformada por diferentes grupos de bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Wacher, 1995).

Para la elaboración tradicional del pozol, los granos de maíz son hervidos en agua con cal, después son lavados con agua limpia y posteriormente frotados manualmente para remover el pericarpio. A este proceso se le conoce como nixtamalización y los granos obtenidos con este proceso se le conoce como nixtamal. Posteriormente el nixtamal es molido para obtener una masa y formar pequeñas bolas, las cuales son envueltas en hojas de plátano que se dejan fermentar a temperatura ambiente. La masa acidificada se suspende en agua para obtener una bebida refrescante (Díaz-Ruiz, 2003).

Después de la nixtamalización el principal carbohidrato presente es el almidón. Diversos estudios microbiológicos realizados hasta el momento indican que las bacterias lácticas están presentes en cuentas muy altas, siendo su concentración inicial en masas frescas de  $10^5$  -  $10^6$  UFC/g (Díaz-Ruiz, 2003). Entre estas se encuentran algunas bacterias lácticas capaces de crecer en almidón como única fuente de carbono, tal es el caso de *Streptococcus infantarius* ssp. *infantarius*, identificada como la especie dominante de esta fermentación. Particularmente interesante resulta el hecho que esta bacteria presenta un bajo rendimiento de actividad amilolítica en comparación con otras bacterias lácticas amilolíticas aisladas igualmente de alimentos fermentados amiláceos. En consecuencia, no se entiende cómo puede existir una microbiota tan diversa y abundante en la masa de pozol si las bacterias hasta ahora identificadas no hidrolizan eficientemente el principal carbohidrato de la masa.

Debido a esto, es necesario replantearse que además del almidón, la celulosa y el xilano procedentes del pericarpio del grano de maíz pueden ser aprovechados por los microorganismos para su crecimiento. Así, el objetivo general de este trabajo es determinar si existen microorganismos que puedan utilizar celulosa y xilano además de almidón como fuente de carbono durante la fermentación del pozol.

## II) ANTECEDENTES

### ▪ 2.1 Alimentos fermentados

La fermentación es una de las formas más antiguas de conservación de alimentos en el mundo, se lleva a cabo por la acción de microorganismos que convierten materias primas perecederas en alimentos o bebidas seguras, estables y apetecibles. Se puede describir como un cambio bioquímico, que es inducido por microorganismos a través del metabolismo anaeróbico o parcialmente anaeróbico de compuestos orgánicos como los carbohidratos o proteínas. Debido a la oxidación incompleta de moléculas orgánicas, se producen diferentes compuestos como ácidos y alcoholes que conllevan a una disminución del pH. Esta disminución de pH y la formación de diversos productos orgánicos inhiben el desarrollo de microorganismos indeseables en el alimento (Villéger et al., 2017).

Existe una amplia variedad de alimentos fermentados que se han originado a partir de diversos sustratos disponibles en todo el mundo. Algunos de los productos fermentados más populares provienen de la leche, cereales, tubérculos, frutas, verduras, carne y pescado (Steinkraus, 2002). Los alimentos generalmente son fermentados por comunidades microbianas que incluyen principalmente bacterias, levaduras y mohos (Villéger et al., 2017); cuyas enzimas, particularmente glucósido-hidrolasas, proteasas y lipasas hidrolizan los polisacáridos, proteínas y lípidos presentes en productos no tóxicos con sabores, aromas y texturas usualmente agradables para el consumidor.

La fermentación desempeña al menos las siguientes funciones en el procesamiento de los alimentos: (1) Conservación del alimento debido a la fermentación láctica, acética, alcohólica y/o alcalina; (2) Mejora de las cualidades organolépticas a través del desarrollo de una amplia diversidad de sabores, aromas y texturas; (3) Enriquecimiento de sustratos con vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos; (4) Disminución en los tiempos de cocción (Steinkraus, 2002).

En particular, los alimentos fermentados tradicionales se han preparado durante miles de años, y están estrechamente vinculados a la cultura y a las tradiciones. Son consumidos generalmente por pueblos indígenas con propósitos nutricionales, medicinales y religiosos. La mayoría de estos alimentos son poco conocidos y solo son consumidos en la región donde se producen, esto justifica el escaso conocimiento de los procesos microbianos y

enzimáticos responsables de la formación de estos productos (Lacerda, 2017; Villéger et al., 2017).

En México, los alimentos fermentados tradicionales forman parte de la dieta de muchos grupos étnicos. La mayoría de los alimentos se preparan a partir de maíz. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de alimentos tradicionales mexicanos elaborados a partir de este cereal.

Tabla 1. Ejemplos de alimentos fermentados tradicionales mexicanos elaborados a base de maíz (Wacher, 1995).

Nombre	Descripción	Estados en donde se consume
<b>Agua agria</b>	Bebida no alcohólica preparada con maíz molido, mezclado con agua y fermentado.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Ciudad de México, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca
<b>Atole</b>	Bebida no alcohólica preparada con masa de maíz nixtamalizada o de mazorcas tostadas.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Ciudad de México, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.
<b>Atole agrio</b>	Bebida no alcohólica, ácida, obtenida de maíz fermentado	Tabasco, Chiapas y Sur de Veracruz
<b>Cuaruapa</b>	Bebida alcohólica preparada con el zumo de la caña de maíz, puesto en infusión con “palo de timbre” ( <i>Acacia angustissima</i> ) y piloncillo	Puebla: Tehuacán.
<b>Charagua</b>	Bebida alcohólica a base de pulque rezagado, al cual se le añade almíbar, chile ancho y hojas de maíz tostados. Se calienta lentamente y se pone a fermentar.	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Ciudad de México, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Oaxaca.

<b>Ostoche</b>	Bebida alcohólica obtenida del zumo de caña de maíz, con pulque o piloncillo, o solamente jugo de caña de maíz, mezclado con agua y fermentado.	Ciudad de México, Estado de México.
<b>Sendechó</b>	Bebida, especie de cerveza preparada a partir de maíz germinado, secado, molido con chiles. La harina se mezcla con agua para formar un atole, que se hierva, se cuele, se enfría, se le añade el fermento y se deja fermentar. El fermento se prepara a partir de un sendechó anterior	Estado de México
<b>Tepache</b>	Bebida preparada con granos de maíz y piloncillo, dejándose fermentar con cierta cantidad de agua.	Veracruz, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas
<b>Tesgüino</b>	Bebida semejante a la cerveza, preparada al fermentar un atole de maíz germinado, molido y cocido con "catalizadores", que son fragmentos de plantas existentes en la región donde se elabora.	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas, Jalisco.

- 2.2 El pozol.

El pozol es una bebida de maíz, tradicional, refrescante, ácida, no alcohólica, fermentada y de origen Maya, que es consumida y producida en áreas urbanas y rurales del sureste de México. Durante la fermentación de la masa ocurren dos cambios esenciales: el desarrollo de un sabor ácido y el de un aroma característico que imparten al pozol sus propiedades refrescantes. Este alimento es consumido diluyendo la masa fermentada en agua al momento de ser ingerido, de manera que se toma como bebida. Forma parte importante de la dieta diaria de diferentes grupos étnicos entre los que destacan los chontales y choles de Tabasco; mayas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo; lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas; y zapotecos de Oaxaca (Ulloa, 1984; Wachter et al., 2000; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz, 2003).

Se tienen reportes de que este alimento ha sido utilizado con distintos fines aparte del alimenticio. Los indígenas lo utilizaban como ofrenda en sus ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz; en ocasiones era utilizado para controlar la diarrea u otras afecciones intestinales, incluso existen registros históricos en donde se indica que las bolas de pozol enmohecidas eran utilizadas por los antiguos mayas como cataplasma para prevenir o curar infecciones superficiales y heridas (Ulloa et al., 1984).

- 2.3 Elaboración del pozol.

Para la elaboración del pozol se pueden utilizar maíz blanco, amarillo o negro. Por lo general se suele ocupar grano de maíz maduro ya que elaborarlo con maíz tierno involucra el hecho de utilizar una mayor cantidad de cal durante la nixtamalización, trayendo como consecuencia una modificación en el sabor, además de que el producto resultante se acidifica más rápidamente y tiene como resultado modificaciones sensoriales (Cañas et al., 1993).

Las etapas involucradas originalmente en la elaboración del pozol son las siguientes:

- Limpieza del maíz: En esta primera etapa se elimina el material extraño y los granos podridos que pudieran dar mal aspecto al pozol.
- Nixtamalización: Consiste en la cocción de los granos en agua con cal (alrededor de 1%  $\text{Ca(OH)}_2$  peso/volumen) y su objetivo es lograr la separación del pericarpio del grano.  
La cal se puede agregar directamente sobre el maíz seco, al que después se le adiciona agua, o sobre la mezcla de maíz con agua. La cocción termina cuando el pericarpio se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos. El tiempo varía entre 60 y 120 minutos.
- Lavado de nixtamal: El lavado de nixtamal puede llevarse a cabo con agua de pozo, de río o potable. El objetivo de esta etapa es eliminar la cal y el pericarpio del grano. El maíz se lava varias veces y se frota con las manos hasta que el agua residual quede libre de turbiedad.

- Segunda cocción o reventado: Según Cañas et al., (1993), existen dos variantes del pozol: indígena y mestizo. Este último solo se diferencia del pozol indígena por la etapa adicional del reventado. Este paso consiste en cocer el nixtamal en agua hasta que el grano de maíz “revienta” y solo la llevan a cabo los productores mestizos. El tiempo de cocción varía entre 3 y 8 horas y el grado de reventado determina la consistencia final del pozol. A mayor tiempo de cocción, el pozol resultante tiene un mayor contenido de humedad.
- Remojo: Por lo general esta etapa dura toda la noche y su objetivo es aumentar la retención de humedad, para evitar que el maíz se seque durante la molienda.
- Molienda: Esta fase se lleva a cabo en molinos de mano, en donde los granos son sometidos a una molienda gruesa para reducir su tamaño. Es importante destacar que durante la molienda se observan focos potenciales de inoculación microbiana ya que los molinos de mano se desarmen con poca frecuencia para su limpieza. Aunque durante el lavado la cascarilla debería eliminarse, observamos que la masa resultante de la molienda contiene fragmentos de germen, residuos de pericarpio y endospermo (Rizo, 2015).
- Moldeado: Inmediatamente después de la molienda, la masa se moldea con la mano o sobre la mesa en forma de bolas. Durante la formación de la bola se utiliza agua para hidratar la masa. Tanto la manipulación de la masa, como el agua agregada son fuentes importantes de inóculo para la fermentación.
- Fermentación: Una vez amasado, el pozol se envuelve tradicionalmente en hojas del árbol de plátano para dejar fermentar a temperatura ambiente. La mayoría de los consumidores prefieren el pozol fresco, es decir, consumen el que se preparó el mismo día. Este pozol, aunque no es muy ácido, ya presenta cierto grado de fermentación ya que el tiempo que transcurre entre su preparación y su consumo, es suficiente para que las bacterias lácticas responsables de la acidificación alcancen su desarrollo. Algunas personas dejan fermentar el pozol hasta 8 o 9 días y lo consumen cuando ya presenta un notorio crecimiento superficial de mohos.

La masa fermentada resultante se suspende en agua y se bebe como una bebida refrescante. El pozol diluido en agua puede beberse solo o adicionado con sal,

azúcar, miel o diversas clases de chiles secos, que han sido tostados y molidos. En Tabasco añaden semillas de cacao molidas a la masa del pozol recién hecha, antes de que fermente; esta variedad de pozol es denominada chorote (Ulloa, et al., 1984).

- 2.4 Microbiología del pozol.

El pozol sufre una fermentación natural, es decir, no se añaden microorganismos a la masa, sino que actúan los que están presentes naturalmente en ella. Los microorganismos más importantes que participan en esta fermentación son las bacterias lácticas, que acidifican la masa, así como mohos y levaduras, que contribuyen con la producción de aromas y sabores.

El proceso de obtención del nixtamal elimina prácticamente todos los microorganismos, pero es sobre todo durante las etapas de la molienda, amasado y moldeado en donde se introducen grandes cantidades de microorganismos a la masa (Wacher, 1999).

Mediante técnicas tradicionales de cultivo y de métodos independientes de cultivo se ha reportado que las bacterias lácticas son el grupo predominante que conforma la microbiota del pozol y entre ellas, los géneros más abundantes son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weisella* (Wacher et al., 1993; Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 1999; Ben Omar., 2000; Escalante et al., 2001; Díaz-Ruiz., 2003).

Se ha descrito que al inicio de la fermentación se tiene un contenido de bacterias lácticas en masas frescas de  $10^5 - 10^6$  UFC/g, mesófilos aerobios de  $10^4 - 10^5$  UFC/g, enterobacterias de  $10^2 - 10^3$  UFC/g, levaduras de  $10^2 - 10^4$  UFC/g y mohos  $<10^3$  UFC/g; después de 30 h de fermentación a 28°C, se alcanzan niveles de  $10^9$  UFC/g de bacterias lácticas,  $10^6$  UFC/g de mesófilos aerobios,  $10^5$  UFC/g de enterobacterias,  $10^6$  UFC/g de levaduras y  $10^4$  UFC/g de mohos (Wacher, 1993; Steinkraus, 1995, Díaz-Ruiz., 2003). Los microorganismos que han sido aislados o identificados en pruebas moleculares (independiente del cultivo) en este alimento se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos aislados del pozol.

Hongos y levaduras	Bacterias no ácido lácticas	Bacterias ácido lácticas
<i>Alternaria tenuis</i>	<i>Acetobacter spp.</i>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Enterococcus sulfureus</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Agrobacterium azotophilum</i>	<i>Lactobacillus alimentarius</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Bacillus minimum</i>	<i>Lactobacillus coprophilus</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Hansenula fabianii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Monilia sitophila</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Mucor rouxianus</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	<i>Leuconostoc argentum</i>
<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas mexicana</i>	<i>Streptococcus infantarius</i>
<i>Penicillium italicum</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Weisella confusa</i>
<i>Penicillium lanosoviride</i>	<i>Sphingomonas spp.</i>	<i>Weisella paramesenteroides</i>
<i>Phialophora richardsiae</i>	<i>Xantomonas spp.</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>
<i>Rhizopus nigricans</i>		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
<i>Trichoderma viride</i>		
<i>Trichosporum cutaneum</i>		

Tomado de Leiva, 2018 (Recopilado de: Díaz et al. 2003, Escalante et al. 2001, Ben Omar y Ampe 2000, Ampe et al. 1999, Nuraida et al. 1995, Ulloa et al. 1987, Ulloa y Kurtzman 1975.)

- a) Microorganismos con actividad amilolítica en el pozol.

El estudio original de la fermentación del pozol sugería que la presencia de microorganismos amilolíticos era muy importante, ya que, siendo el almidón el principal sustrato para la fermentación, debían ser ellos los que después de hidrolizarlo liberarían azúcares solubles, que serían entonces utilizados como sustratos por los microorganismos no amilolíticos para su crecimiento (Rizo, 2012).

En un estudio realizado por Nuraida et al., (1995), se aislaron bacterias lácticas que podían hidrolizar el almidón en cajas. Además, se evaluó la capacidad de las levaduras y aislados de *Geotrichum candidum* de crecer en lactato o almidón como única fuente de carbono. El resultado que se obtuvo fue que poco más del 50% de las levaduras hidrolizó el almidón produciendo un halo alrededor de la colonia. Mientras que ninguna de las cepas de *Geotrichum* hidrolizó o creció en almidón, éstas se desarrollaron favorablemente en presencia de lactato. A pesar de que la mitad de las cepas de levadura presentaron actividad amilolítica considerable, no se sabe si las cepas aisladas son el mismo microorganismo ya que no se realizó una caracterización fenotípica o genotípica.

Díaz-Ruiz (2003), reportó que las bacterias lácticas amilolíticas presentan una cuenta inicial alta durante el inicio de la fermentación del pozol (4.5 log UFC/g de masa seca) y que estas aumentan hasta 8.4 log UFC/g de masa seca durante las primeras 24 h y permanecen constantes hasta las 72 h con 8.7 log UFC/g de masa seca. 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.

Dentro de las bacterias con mayor actividad amilolítica se aislaron las siguientes especies: *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus sulfureus* y *Streptococcus bovis* (actualmente *S. infantarius* ssp. *Infantarius*), el cual resultó ser la especie predominante durante la fermentación del pozol.

En este mismo estudio, se analizó la fermentación del almidón por *S. bovis* 25124 (*S. infantarius* ssp. *infantarius*) en medio MRS-almidón. En comparación con otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones amiláceas como el pozol, la cepa se caracterizó por tener un bajo rendimiento de amilasa relativo a la biomasa [ $139 \text{ U (g células secas)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ], una alta velocidad específica de crecimiento ( $0.94 \text{ h}^{-1}$ ) y una conversión eficiente de sustrato en biomasa [ $0.31 \text{ g biomasa (g sustrato)}^{-1}$ ] (Tabla 3), estas características explican la predominancia de esta cepa en la fermentación. Otra característica que se encontró fue

que las amilasas producidas por *S. bovis* 25124 liberan maltooligosacaridos, los cuales podrían ser utilizados por otras bacterias lácticas no amilolíticas, estos compuestos presumiblemente pueden servir como como fuentes de energía para especies no amilolíticas en la fermentación de este alimento y sostener la diversidad observada (Díaz-Ruiz 2003).

Tabla 3. Rendimientos metabólicos de diferentes bacterias lácticas amilolíticas aisladas de alimentos fermentados amiláceos (Tomado de Díaz-Ruiz, 2003).

Parámetro	<i>S. bovis</i> 25124 <sup>a</sup> ( <i>S. infantarius</i> <i>ssp.</i> <i>infantarius</i> )	<i>L. manihotivorans</i> 18010 <sup>b</sup>	<i>L. plantarum</i> A6 <sup>b</sup>	<i>L. fermentum</i> OgiE1 <sup>c</sup>
Azúcares totales consumidos (%)	25.5	45	Nd*	78
Y x/s (g g <sup>-1</sup> )	0.31	0.09 (0.15)	Nd (0.18)	0.1
Y amy/x (U g <sup>-1</sup> )	139	2400 (4900)	2300 (5700)	5400
μ (h <sup>-1</sup> )	0.94	Nd (0.36)	0.43 (0.41)	0.35

Donde:

Yx/s: Rendimiento del crecimiento relativo al sustrato

Yamy/x: Rendimiento de amilasa relativo a la biomasa

μ: Velocidad de crecimiento específica

\*Nd: No determinado

Los valores entre paréntesis están determinados a pH (6.5) controlado

a: Trabajo de (Díaz-Ruiz, 2003) b: Trabajo de (Guyot y col. 2000) c: Trabajo de (Calderón y col. 2001).

- b) Microorganismos con actividad xilanolítica en el pozol.

Dado que el almidón es el carbohidrato principal en el nixtamal, ha sido considerado que las bacterias lácticas amilolíticas (ALAB) son el grupo más relevante durante la fermentación y que proporcionan glucosa y malto-oligosacáridos para el crecimiento de la comunidad microbiana (Díaz-Ruiz, 2003). Considerando la gran cantidad de bacterias lácticas no amilolíticas (NALAB) presentes en la fermentación de pozol, y que la hemicelulosa está presente en este entorno, con mayor disponibilidad después del tratamiento químico-térmico asociado al proceso de la nixtamalización, el xilano puede ser

una fuente de carbono alternativo que sostenga este proceso de fermentación (López-Hernández et al., 2018).

En un estudio realizado por Flores Espinosa (1995), en el cual trabajó con 93 cepas previamente aisladas por Nuraida (1988) y Cañas (1991), se evaluó la capacidad de la fermentación de carbohidratos empleando el sistema API 50 CH. Asimismo, se determinó la capacidad de hidrolizar almidón y xilano en placa. En este estudio, el 21% del total de las cepas aisladas fueron capaces de crecer en almidón y solamente el 10% mostraron actividad amilolítica (es decir, presentaron halo de hidrólisis en placa después del revelado con lugol). Mediante el programa APILAB (Bio-Mérieux), se identificaron las siguientes especies: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus lactis*, *L. coprophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *L. plantarum*.

Cuando evaluó la capacidad de hidrólisis del xilano, encontró que, de las 93 cepas, el 60% lo podía hidrolizar claramente (es decir, hubo presencia del halo de hidrólisis en la placa). Por otra parte, se encontró que alrededor del 40-80% de las cepas fermentaban pentosas (L-arabinosa, ribosa, D-xilosa), lo que sugirió en este reporte que las bacterias lácticas pueden acidificar la masa a partir de la hemicelulosa del nixtamal. Sin embargo, hay que resaltar que estos números reportados pueden estar sobrestimados debido a que no se sabe si los aislados son diferentes especies o cepas.

Entre las especies identificadas como xilanolíticas se encuentran: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *Lactococcus raffinolactis*, *L. lactis*, *Lactobacillus coprophilus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus fermentum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, y *L. acidophilus*.

En otro estudio realizado por Flores González (2007), se encontró que *Lactococcus lactis* var *lactis* y *Lactococcus lactis lactis* presentaban actividad xilanolítica, además de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* como ya lo había demostrado anteriormente Flores Espinoza (1995). Recientemente, también se reportó que *Streptococcus bovis* 25124 (*S. infantarius* ssp. *infantarius*) presenta actividad arabinoxilanolítica (Cooper-Bribiesca et al., 2018).

En un estudio realizado por López-Hernández et al., (2018) se evaluaron distintas cepas de *Weissella* y la capacidad de utilizar xilano como fuente de carbono. Según los resultados, todas las cepas de *Weissella* evaluadas fueron capaces de metabolizar D-xilosa, glucosa, D-fructosa, D-manosa, sacarosa y D-maltosa y no fueron capaces de utilizar lactosa,

almidón, inulina o arabinosa como fuentes de carbono, además de que ninguna de ellas presentó actividad  $\alpha$ -glucosidasa. Se observó que todas las cepas de *Weissella* fueron capaces de crecer en hidrolizados de xilano. En particular se demostró que *W. confusa* L9 puede utilizar xilo-oligosacáridos como xilobiosa y xilotriosa, por lo que se considera que el xilano es un sustrato importante en la fermentación del pozol.

- 2.5 El maíz y la nixtamalización.

El maíz (*Zea mays*) es la base de la alimentación de la población mexicana. Se considera que es originario de América y se estima que su cultivo se inició hace 7,000 - 10 000 años según vestigios encontrados en el Valle de México (Arendt et al., 2013). La composición química del grano de maíz, y por ende su valor nutritivo dependen del genotipo, la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra (Loeza, 1991; Paredes et al., 2008). En la Tabla 4 se encuentra la composición química general del grano (Koehler, 2013).

Tabla 4. Composición química del grano de maíz.

Composición química del grano de maíz g/100g (Koehler, 2013)	
Humedad	11.3
Proteína (N x 6.25)	8.8
Lípidos	3.8
Carbohidratos	65
Fibra	9.8
Minerales	1.3

Las principales partes anatómicas del grano de maíz son: el pericarpio o cascara, endospermo, germen y la pilorriza (Figura 1).

El pericarpio o cáscara se caracteriza por un elevado contenido de fibra que está constituida fundamentalmente por hemicelulosa y celulosa. Se encuentran también minerales, proteínas y otros azúcares en menor proporción. El endospermo provee los nutrientes para el germinado de la semilla, por lo que cuenta con un alto contenido de almidón (87%) y

aproximadamente 8% de proteínas. Por su parte, el germen o embrión, se caracteriza por un elevado contenido de minerales (76%), proteínas (10%) y lípidos (5%). La piloriza es una estructura cónica de tejido inerte que une el grano y el carozo (comúnmente conocido como olote) y al igual que el pericarpio, está compuesta principalmente de celulosa y hemicelulosa (Benítez et al., 2006).

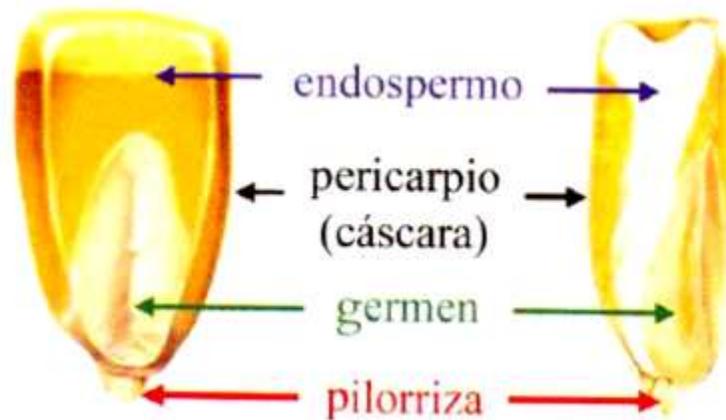


Figura 1. Esquema de la morfología del grano de maíz. Tomado de Benítez et al., 2006

La nixtamalización, del náhuatl *nextli*, cenizas, y *tamalli*, masa, es un proceso que se ha transmitido de generación en generación en Mesoamérica, y todavía se utiliza como en tiempos prehispánicos. Se trata de un tratamiento térmico-alcálico que consiste en hervir el grano de maíz en soluciones acuosas de hidróxido de calcio. Probablemente las antiguas culturas latinoamericanas emplearon este método con el fin de ablandar e hinchar el grano de maíz para facilitar la molienda; sin embargo, se sabe que algunos grupos étnicos como los tarascos molían el maíz con bicarbonato para prevenir la constipación y otros lo daban como alimento a los enfermos (Loeza, 1991; Paredes et al., 2008).

Durante la nixtamalización ocurren diferentes transformaciones dentro del grano de maíz. La cocción alcalina y el remojo disuelven las paredes celulares del pericarpio facilitando su separación, (debido al debilitamiento de los  $\beta$ -glucanos), esto hace que las paredes celulares y los componentes de la fibra de esta parte del grano se vuelvan frágiles facilitando su remoción.

Cuando el maíz nixtamalizado se muele pierde su estructura debido a que los componentes del grano fueron acondicionados por la cocción y el remojo. La masa resultante de la molienda consiste en fragmentos de germen, residuos del pericarpio y endospermo unidos por el almidón parcialmente gelatinizado, y por las proteínas y los lípidos emulsificados.

El tratamiento del almidón en condiciones alcalinas provoca la liberación de los gránulos de la matriz por la dispersión y desintegración del grano. Así se presenta una hinchazón y una destrucción parcial de los gránulos de almidón, debida a su hidratación y gelatinización. Se ha observado también que la nixtamalización, retarda la gelatinización del almidón debido a la aparente interacción del calcio con la amilosa. Otra observación que se tiene es que el almidón se retrograda, es decir, se recristaliza o reasocia para formar nuevas estructuras, durante el tiempo que el grano permanece en remojo. El proceso de la molienda libera al almidón del endospermo y reduce aún más su cristalinidad. Durante el enfriamiento de estos productos, el almidón se reasocia formando también complejos amilosa-lípidos (Paredes et al., 2008).

- 2.6 Polisacáridos del maíz.

Muchos polisacáridos diferentes juegan un papel importante en la estructura de los granos de maíz. Se ha encontrado que el pericarpio está compuesto de 70% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0.1% de lignina con base a peso seco. La hemicelulosa del pericarpio de maíz contiene 54% de xilosa, 33% de arabinosa, 11% de galactosa y 3% de ácido glucurónico. El almidón, ubicado en el endospermo es el principal carbohidrato (alrededor del 72%); los mono y disacáridos, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa representan del 1 al 3% en el grano (Boyer et al., 1987).

- a) Almidón.

El almidón se encuentra comúnmente en las semillas, raíces, tubérculos, frutos no maduros, tallos y hojas y se considera el principal carbohidrato de almacenamiento en las plantas superiores.

Estructuralmente, el almidón es un polímero de glucosa, constituida fundamentalmente por dos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina (Figura 2). La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. Esta molécula no es soluble

en agua, pero puede formar micelas hidratadas mediante puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal que desarrolla un color azul en presencia de yodo.

La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94 - 96% por enlaces  $\alpha$ -1,4 y con un 4 - 6% de puntos de ramificación  $\alpha$ -1,6. Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15 - 25 unidades de glucosa. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo produce un color rojizo violeta (Magallanes, 2017; Hernández-Medina, 2008).

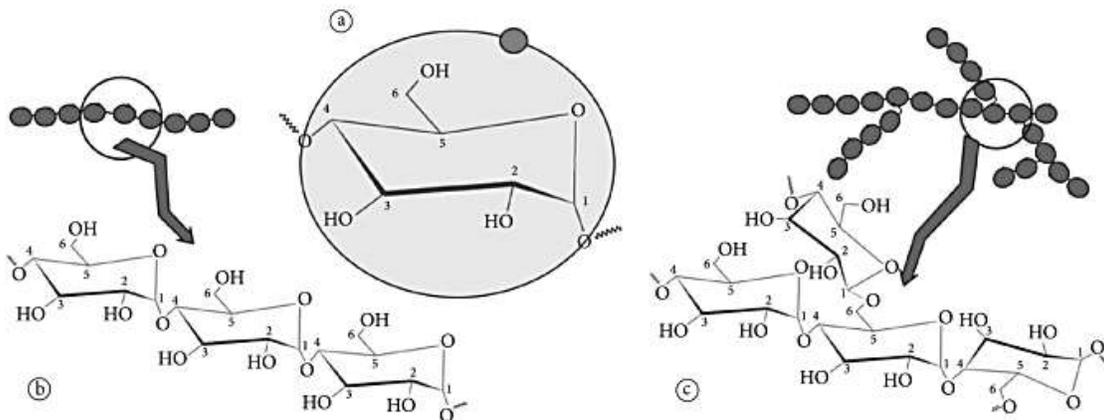


Figura 2. Diseño estructural básico de (a) unidades de glucosa, (b) amilosa y (c) amilopectina (Tomado de: Alcázar-Alay; Meireles.,2015).

- b) Celulosa.

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Es un componente ubicuo de las plantas vasculares, pero también se encuentra en muchas plantas inferiores incluyendo algunas algas. Asimismo, puede encontrarse en hongos y en algunas especies bacterianas. Es un material biodegradable, resistente e insoluble en agua. Es sintetizada en su mayoría por las plantas a través de la fotosíntesis, con una tasa de producción anual de  $7.2 \times 10^{11}$  toneladas. Se ha estimado que a pH neutro y en ausencia de enzimas la vida media de la celulosa es de millones de años indicando que la hidrólisis enzimática es clave en la degradación de este polímero (Kumar et al., 2015; Gutiérrez-Rojas et al., 2015; Suhas et al., 2016).

En términos químicos, la celulosa es un polímero lineal con fórmula molecular  $C_6H_{10}O_5$ , siendo la celobiosa su unidad fundamental; está compuesto por más de 14,000 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (Figura 3). Las cadenas de celulosa se asocian en fibrillas insolubles por puentes de hidrógeno, ayudando a mantener la rigidez de la celulosa (Suhas et al., 2016).

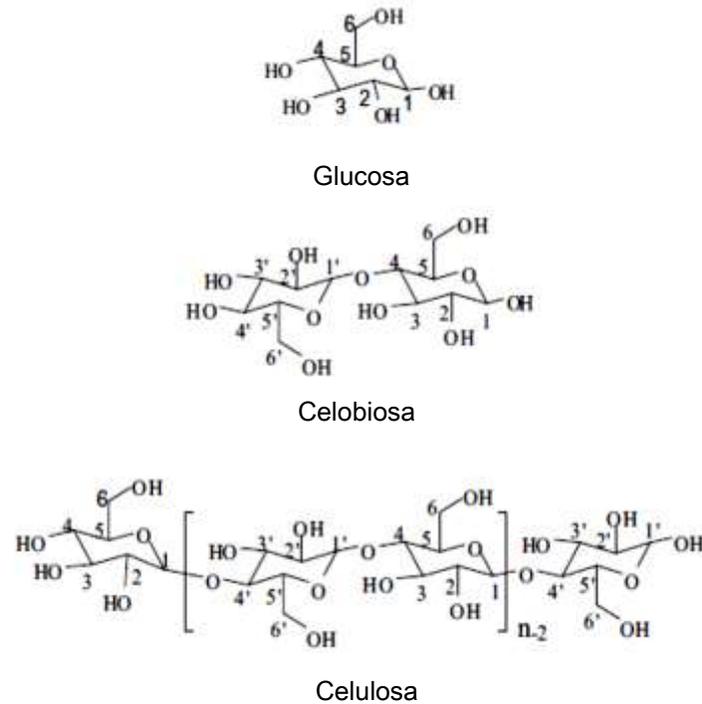


Figura 3. Estructura química de glucosa, celobiosa y celulosa. (Tomado de Suhas et al., 2016)

- c) Xilano.

El xilano es la hemicelulosa más abundante en la naturaleza y el polisacárido estructural principal en células vegetales. Se encuentra en las paredes celulares de las plantas en las cuales puede constituir más del 30% del peso seco.

Su estructura consiste en residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosil (xilosa) que están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, sin embargo, esta estructura es variable ya que la cadena base puede ser diversificado con otros azúcares formando heteropolisacáridos altamente ramificados (Bajpai, 2014).

Las ramificaciones pueden estar formadas por L-arabinofuranosa en las posiciones O-2, O-3 de residuos de D-xilosa y de D-ácido glucurónico o ácido 4-O-metil-D-glucurónico ligado a la posición O-2. El ácido ferúlico puede estar esterificado en la posición C (O)-5 de la arabinosa. Algunas características estructurales principales se observan en la Figura 4. El grado de la ramificación varía según la fuente de donde procede.

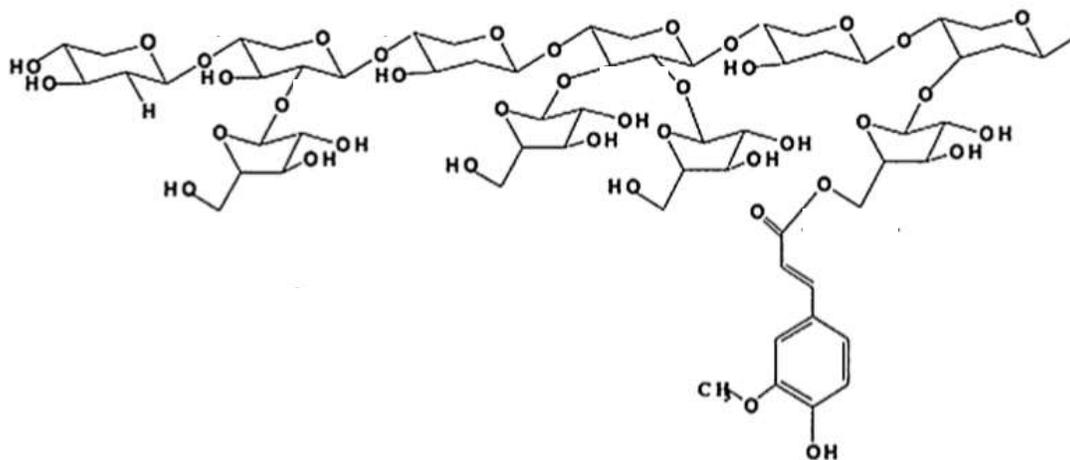


Figura 4. Estructura química del xilano. (Tomado de M. Mendis et al.,2016)

### **III) JUSTIFICACIÓN**

Durante muchos años se consideró que el almidón debía ser el principal carbohidrato utilizado por los microorganismos presentes en la fermentación del pozol, sin embargo, a la fecha no se ha identificado actividad amilolítica en la masa y los microorganismos aislados han resultado si acaso, ser poco amilolíticos.

Este hecho, aunado a la identificación de microorganismos xilanolíticos en la masa y la observación de pericarpio en la masa final, nos lleva a replantearnos las fuentes de carbono presentes en la fermentación y considerar que, además del almidón, la celulosa y el xilano procedentes del pericarpio del grano de maíz pueden ser aprovechados por los microorganismos para su crecimiento.

#### **IV) HIPÓTESIS**

Si en la masa nixtamalizada de maíz utilizada en la fabricación de pozol existen además de carbohidratos solubles, fibra insoluble, se aislarán además de microorganismos amilolíticos, microorganismos capaces de utilizar celulosa y xilano.

## V) OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar si existe utilización de celulosa y xilano, además del almidón durante la fermentación del pozol.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar microorganismos capaces de utilizar almidón, celulosa y xilano en la masa de pozol fermentada de cero a 48 horas.
- Establecer si existe actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica en la masa del pozol fermentado.

## VI) MATERIALES Y MÉTODOS

### ▪ 6.1 Descripción de la muestra.

Se adquirió masa de maíz nixtamalizado en dos locales distintos del Mercado Pino Suárez en Villahermosa, Tabasco. De cada local se adquirieron 12 bolas de masa de 150g, las cuales se mezclaron y homogenizaron, formando bolas de 300g. Las bolas de masa se envolvieron en hojas del árbol de plátano y se dejaron fermentar a 37°C en el laboratorio por 9, 24 y 48 h de manera independiente y por triplicado.

Con la finalidad de estandarizar el tiempo cero, el maíz nixtamalizado se molió en un molino manual en el momento de la compra e inmediatamente se enfrió en hielo para retardar el inicio de la fermentación. La manipulación de la muestra se realizó en todo momento con guantes para evitar la inoculación de microorganismos procedentes del manipulador.

### ▪ 6.2 Cuantificación de los grupos microbianos.

El conteo de bacterias lácticas, bacterias lácticas amilolíticas, enterobacterias, mesófilos aerobios, mohos y levaduras se realizó por triplicado. Para las bacterias lácticas se utilizó el medio MRS-glucosa, en el caso de las bacterias lácticas amilolíticas se utilizó MRS-almidón. Para el aislamiento de las enterobacterias se usó agar bilis rojo violeta glucosa (Oxoid CM 485), para los mesófilos aerobios agar cuenta en placa (Oxoid CM 325). Los mohos y levaduras se crecieron en agar papa dextrosa (Oxoid CM 139) acidificado con ácido tartárico al 10% para obtener un pH final de 5. Análisis realizados por la Dra. Gloria Díaz y la Biol. Ma. Teresa Flores (Facultad de Química, UNAM).

### ▪ 6.3 Aislamiento de microorganismos para la búsqueda de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica.

25 g de muestra se disolvieron en 225 ml de NaCl al 0.9 % y se realizaron las diluciones pertinentes para cada uno de los tiempos de fermentación y por triplicado. Para el aislamiento de bacterias se utilizaron dos medios: un medio mínimo (MM) con modificaciones mínimas (Malfliet et al., 2013) y un medio MRS (Díaz-Ruiz, 2003), cada uno

de ellos con la fuente de carbono a probar: almidón soluble (DIFCO®), carboximetilcelulosa (SIGMA®) o xilano de abedul (Birchwood SIGMA®) al 0.5% y se incubaron a 37°C por 24 h.

En el caso del aislamiento de hongos y levaduras, éste se realizó en medio para hongos con modificaciones mínimas (Okeke et al., 2015) con la fuente de carbono a probar: almidón soluble (DIFCO®), carboximetilcelulosa (SIGMA®) o xilano de abedul (Birchwood SIGMA®) al 0.5% y con cloranfenicol (34 µg/ml) para evitar el desarrollo de bacterias. Se incubaron a 37°C por 24 h y posteriormente se colocaron en cámara húmeda a temperatura ambiente para favorecer el desarrollo de los microorganismos. (La composición de los medios utilizados para el aislamiento de bacterias, así como hongos y levaduras se encuentra presente en el Anexo 1, apartado A).

De las colonias que crecieron en los medios de cultivo para bacterias y hongos, se seleccionaron al azar aquellas que presentaban características morfológicas distintas y nuevamente se sembraron por picadura. La determinación de la actividad celulolítica y xilanolítica se realizó mediante la prueba cualitativa de rojo congo (Teather y Wood, 1982), mientras que la actividad amilolítica fue revelada con yodo. Aquellas colonias que presentaban halos de hidrólisis fueron consideradas como colonias con actividad positiva.

#### ➤ 6.4 Caracterización parcial de los aislados.

Los aislados fueron descritos en términos de morfología colonial. De acuerdo a esto, se agruparon por morfología semejante y por tinción de Gram. Aquéllas que no presentaban homogeneidad en cuanto a la visualización al microscopio se aislaron nuevamente sembrando por estría y se verificó que las colonias obtenidas presentaran halos de hidrólisis en la placa.

#### ➤ 6.5 Conservación de microorganismos con actividad glucósido-hidrolasa positiva.

Los cultivos puros y con actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica se almacenaron a -70°C. Las bacterias se conservaron con 20% de glicerol como crioprotector, mientras que las levaduras y los hongos filamentosos se conservaron en microtubos con 10% de glicerol.

➤ 6.6 Índice de potencial enzimático.

Las bacterias fueron reactivadas en el medio de cultivo del cual inicialmente fueron aisladas (punto 6.3), para ello se inoculó 1 ml de medio de cultivo MRS ó MM con la fuente de carbono a probar con 1% de la cepa conservada en glicerol al 20%. Se incubó 24h a 29°C y se inocularon 2 µl del microorganismo activado en cajas de agar MRS o MM y se incubaron otras 24 h a 29°C. Las placas fueron reveladas con yodo para observar actividad amilolítica y con rojo congo para la actividad celulolítica y xilanolítica. La actividad se observa como un halo claro (hidrólisis) sobre fondo oscuro.

El índice de potencial enzimático se determinó midiendo el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de hidrólisis como se muestra en la Figura 5 y se expresó de la siguiente manera:  $IP = D \text{ halo} / D \text{ colonia}$  (Hernández-Mejía, 2007).

Dónde: IP: índice de potencial enzimático.

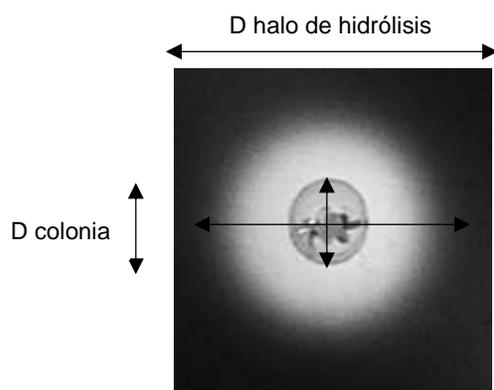


Figura 5. Ejemplo de la determinación del diámetro de hidrólisis y diámetro de la colonia con actividad glucósido-hidrolasa positiva.

➤ 6.7 Medición de pH.

2 g de muestra de pozol de cada uno de los tiempos de fermentación fueron macerados con hielo seco hasta la obtención de partículas finas y se suspendieron en 5 ml de agua destilada. Las muestras se agitaron en vórtex por cinco minutos y se dejaron reposar hasta la sedimentación de la masa. La medición de pH se realizó por triplicado y a temperatura ambiente con un potenciómetro de electrodo de vidrio (Corning 130) previamente calibrado con soluciones de pH 4, 7 y 10 (Rizo, 2015).

➤ *6.8 Cuantificación de carbohidratos solubles totales.*

La determinación de carbohidratos solubles totales se realizó mediante el método de Fenol-Sulfúrico. Para ello se pesaron 5 g de pozol de cada tiempo de fermentación (por triplicado) y se maceraron con hielo seco hasta la obtención de partículas finas.

La muestra macerada se colocó en tubos falcón de 50 ml y se agregaron 15 ml de agua destilada. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente por 30 minutos. Posteriormente se dejaron sedimentar por 30 minutos más. Pasado el tiempo de sedimentación, las muestras se filtraron con tela “organza”. El sobrenadante fue recuperado y colocado en tubos falcón estériles de 50 ml.

Para determinar la concentración de carbohidratos solubles totales, en tubos de vidrio de 5 ml se colocaron 3 µl de sobrenadante obtenido y se agregaron 497 µl de agua destilada para obtener un volumen final de 500 µl. Cada tubo fue adicionado con 300 µl de fenol al 5% y 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos con la mezcla de reacción se homogeneizaron en vórtex y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la absorbancia a 480 nm frente a un blanco de reactivos.

La curva de calibración utilizada se describe en el Anexo 1, apartado B.

➤ *6.9 Cuantificación de carbohidratos reductores.*

La determinación de carbohidratos reductores se realizó mediante el método de Miller (1959). Para este análisis, se utilizó la misma técnica citada en la determinación de carbohidratos solubles totales hasta la obtención del sobrenadante.

El sobrenadante obtenido se diluyó en una proporción 5:10 con agua destilada.

Para la determinación se tomaron 100 µl del sobrenadante diluido y se colocaron en microtubos de 1.5 ml por triplicado. A cada microtubo se le adicionó 100 µl de reactivo DNS y se agitaron en vórtex. Los microtubos se colocaron en agua hirviendo por 10 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada y se leyó la absorbancia a 550 nm frente a un blanco de reactivos.

La curva de calibración utilizada se describe en el Anexo 1, apartado C.

➤ *6.10 Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica in vitro.*

La determinación de la actividad *in vitro* se realizó sobre los extractos obtenidos utilizando el protocolo de extracción de proteínas descrito por Leiva (2018), con algunas modificaciones (Figura 6). La actividad se determinó mediante tres técnicas: Actividad en placa, DNS y yodo-yoduro (solo para la actividad amilolítica). En todos los casos, la medición se realizó por tiempo de fermentación y por triplicado.

a) *Determinación de actividad en placa.*

Para observar la actividad en caja, se disolvieron 2 g/L del sustrato a probar (almidón, celulosa o xilano) directamente en agua y se adicionó agar para formar una gel (15 g/L). A las tapas de las cajas Petri se pegaron microtubos con el propósito de dejar pequeños pozos al momento de retirar la tapa, y se dejó gelificar en condiciones de esterilidad y por triplicado.

En cada espacio formado se colocaron 10 µl de sobrenadante ST (obtenido de la extracción de proteínas, Figura 6) y un control negativo (buffer citrato - fosfato pH 5). Las placas se incubaron 24 h a 37°C. Para detectar la actividad xilanolítica y celulolítica las placas se revelaron con rojo congo 1% y la actividad amilolítica se reveló por sublimación de cristales de yodo. En el caso de observar un halo de hidrólisis este se toma como actividad glucósido-hidrolasa positiva.

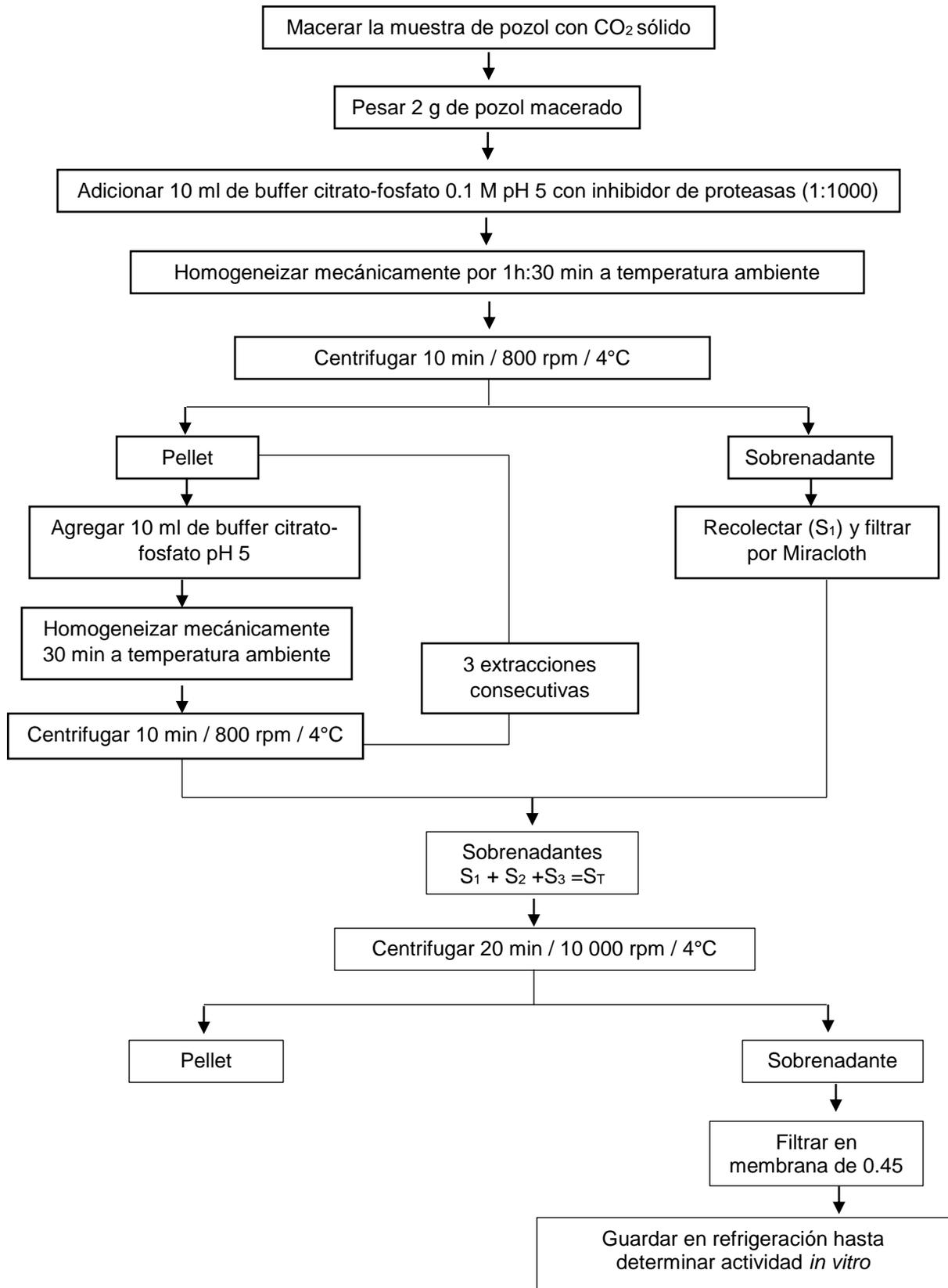


Figura 6. Esquema de extracción de proteínas del pozol para la determinación de la actividad *in vitro*

b) Método de azúcares reductores (DNS).

➤ Actividad amilolítica.

Preparación de stock: Se realizó un stock de almidón soluble de papa (Panreac) con una concentración de 12.5 g/L. El almidón fue colocado en un tubo falcón de 50 ml y se le adicionó buffer citrato-fosfato pH 5. La mezcla se agitó en vórtex y se disolvió calentando.

➤ Actividad celulolítica y xilanolítica.

Preparación de stock: Se realizó un stock de carboximetilcelulosa al 1%. La carboximetilcelulosa fue colocada en un tubo falcón de 50 ml y se adicionó buffer citrato-fosfato pH 5. La mezcla se solubilizó en agua hirviendo hasta obtener una solución translúcida. Este mismo procedimiento fue realizado para la preparación del stock de xilano de abedul.

Para la determinación de la actividad enzimática ya sea amilolítica, celulolítica y xilanolítica, 80 µl de solución stock de carbohidrato y 20 µl del sobrenadante ST (obtenido de la extracción de proteínas) fueron colocados en un microtubo de 1.5 ml por triplicado. La mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó 15 minutos / 37°C en el termomixer. Después, se agregaron 100 µl de reactivo DNS y el microtubo fue colocado en agua hirviendo por 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó 800 µl de agua destilada. Finalmente, la mezcla de reacción fue leída en el espectrofotómetro a 550 nm frente a un blanco de reacción.

Los blancos de reacción se prepararon de la siguiente manera: 80 µl de la solución stock de carbohidrato y 20 µl del sobrenadante ST fueron colocados en un microtubo de 1.5 ml. A continuación, se agregaron 100 µl de reactivo DNS y el tubo fue colocado en agua hirviendo por 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar en hielo y se adicionó 800 µl de agua destilada. La mezcla de reacción fue leída en el espectrofotómetro a 550 nm.

El ensayo se realizó también en condiciones de pH 7. En el Anexo 1 apartado D, se describen las curvas de calibración utilizadas para la determinación de la actividad *in vitro*.

c) *Determinación de actividad amilolítica por el método de yodo-yoduro.*

Para la determinación de la actividad amilolítica de la masa del pozol, se utilizó como sustrato almidón soluble de papa (Panreac) el cual forma un complejo en presencia del reactivo yodo-yoduro que absorbe a 620 nm.

Blanco: 80 µl de la solución stock de almidón (6 mg/ml) en buffer citrato-fosfato pH 5 fueron colocados en tubos de vidrio de 5 ml. Se agregó 10 µl de sobrenadante ST (obtenido de la extracción de proteínas) y 10 µl de ácido sulfúrico 2N, inmediatamente los tubos se colocaron en hielo con el fin de detener la reacción.

Muestras: 80 µl de la solución stock de almidón (6 mg/ml) en buffer citrato-fosfato pH 5 y 10 µl de sobrenadante ST fueron colocados en tubos de vidrio de 5 ml. Los tubos se incubaron 10 minutos a 37°C. Posteriormente se les agregó 10 µl de ácido sulfúrico 2N e inmediatamente los tubos se colocaron en hielo con el fin de detener la reacción.

A todos tubos se les añadió 2.4 ml de una disolución de yodo-yoduro al 4% (a partir de una solución de KI 15 g/L y I<sub>2</sub> 1.5 g/L) y se agitaron en vórtex hasta tener una mezcla homogénea. Finalmente se leyó la absorbancia a 620 nm.

Este ensayo se realizó también a pH 7. La curva de calibración utilizada se describe en el Anexo 1 apartado D.

➤ *6.11 Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica directamente de la masa.*

La extracción de proteínas para la detección de actividad amilolítica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rizo (2015). Para la detección de actividad celulolítica y xilanolítica se utilizó el mismo protocolo, pero con la adición de una α-amilasa comercial para tratar de liberar de la masa a las enzimas. El protocolo empleado se muestra en la Figura 7.

Después de haber obtenido los sobrenadantes, las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se dejaron correr a 20 mA hasta que el frente llegó al final del gel (Laemmli 1970).

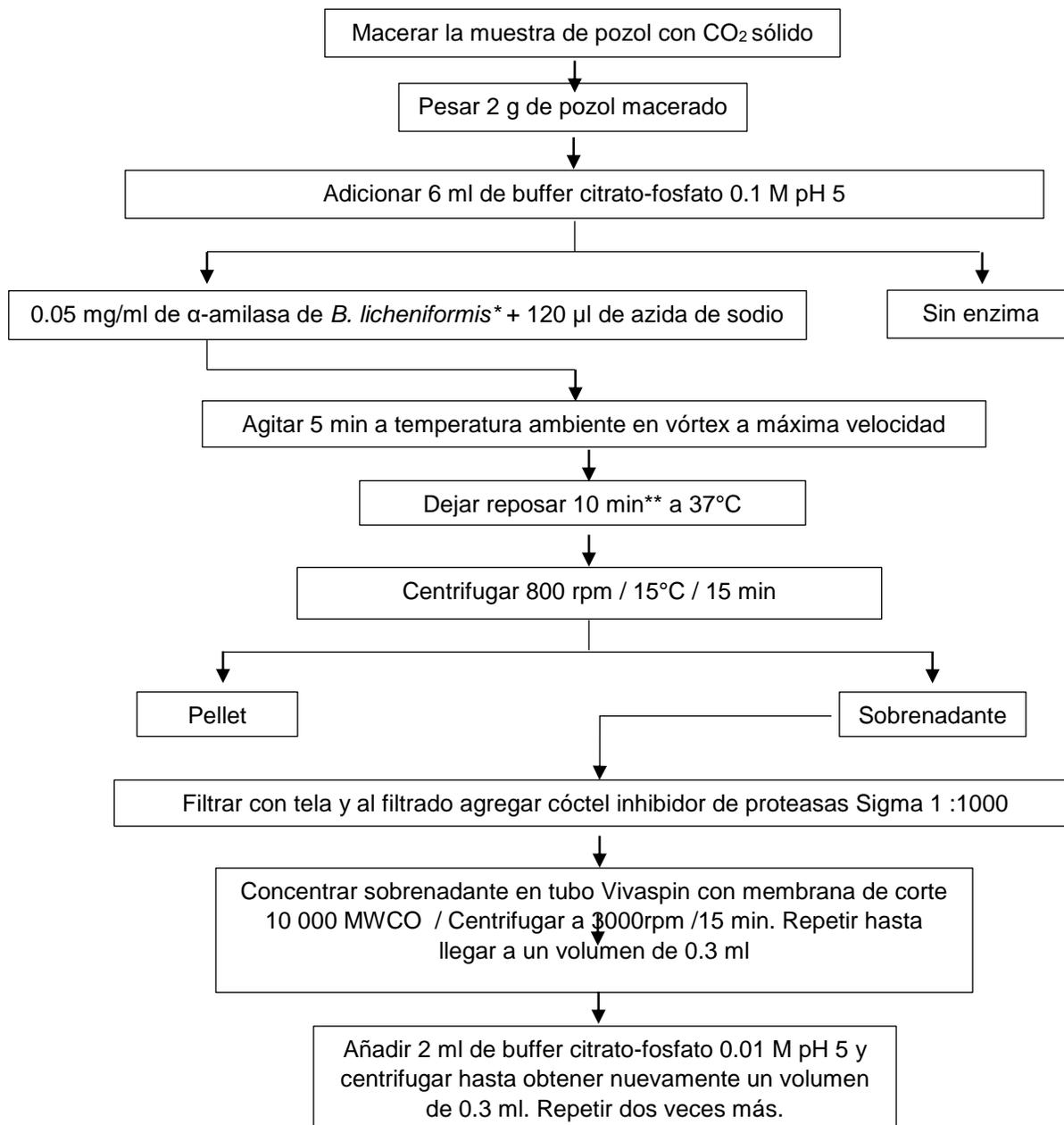


Figura 7. Esquema de extracción de proteínas del pozol para la determinación de la actividad en la masa

\* Concentraciones de enzima de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*: 0.05, 0.1 y 0.5 mg /ml de enzima (estas condiciones solo se utilizaron para la detección de la actividad celulolítica y xilanolítica).

\*\*Tiempo de incubación: 30 minutos, 3 y 24 horas

Una vez terminada la electroforesis, los geles se lavaron con buffer citrato-fosfato 10 mM, pH 5 y se incubaron por 12 horas a temperatura ambiente para la renaturalización de las proteínas.

Para la determinación de la actividad enzimática, se preparó una solución stock al 1% del sustrato a analizar (carboximetilcelulosa, xilano y almidón soluble) en buffer citrato-fosfato pH 5. El sustrato se incorporó al gel y se dejó incubando durante dos horas a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación los geles fueron revelados. En el caso de los geles con xilano y carboximetilcelulosa, estos se revelaron con rojo congo al 1%, mientras que para la detección de la actividad amilolítica se usó una disolución de yodo-yoduro al 4% (Teather y Wood, 1982).

#### ➤ 6.12 Extracción de DNA genómico.

La extracción de genómico se realizó para aquellos aislados que poseían características morfológicas distintas

##### a. Pre-inóculo.

En un microtubo de 1.5 ml se colocó 1 ml de medio de cultivo MRS líquido con la fuente de carbono a analizar al 0.5%. Los microtubos fueron inoculados con 1% del cultivo conservado en glicerol y se dejaron incubar a 29°C / 16 h.

##### b. Cosecha de células.

En tubos de vidrio estériles de 20 ml se colocó 10 ml de medio de cultivo y se inocularon al 1% con el pre-inóculo del paso anterior. Los tubos se incubaron a 29°C / 16 h.

##### c. Extracción de ADN genómico.

c.1) Centrifugar los 10 ml de cultivo a 10,000 rpm/ 20 min/ 15°C.

c.2) Lavar dos veces las células con 5 ml de H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Resuspender las células en el agua y centrifugar a 10,000 rpm. Descartar el agua y repetir este proceso.

c.3) Resuspender el pellet formado en 1 ml de buffer TE (Anexo 1, apartado F) con lisozima 20 mg/ml. Agitar suavemente (invirtiendo los tubos lentamente) e incubar a 37°C / 30 minutos.

c.4) Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm/ 15 min y descartar el sobrenadante.

- c.5) Resuspender el pellet en 600 µl de buffer TE. Agregar 70 µl de TEN (Anexo 1, apartado F) y 35 µl de SDS al 20%.
- c.6) Homogeneizar la mezcla por inversiones lentas e incubar a 37°C / 30 minutos. (Agitar suavemente los tubos cada 10 minutos).
- c.7) Eliminar el debris celular agregando 180 µl de NaCl 5M e incubar en hielo durante 2 horas.
- c.8) Centrifugar 20 minutos / 15°C a 10,000 rpm.
- c.9) Recuperar la fase acuosa y agregar un volumen igual de fenol - cloroformo (1:1). Agitar suavemente por inversión durante 5 minutos. Posteriormente centrifugar 5 min /10,000 g
- c.10) Recuperar la fase acuosa y agregar un volumen igual de cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). Agitar suavemente durante 5 minutos. Posteriormente centrifugar 5 minutos /10,000 g
- c.11) Recuperar la fase acuosa y agregar 2.2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos.
- c.12) Mezclar los tubos por inversiones y almacenar a -20°C / 24h.
- c.13) Centrifugar 20 minutos a 4°C / 13,000 rpm.
- c.14) Decantar suavemente el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol al 70% para eliminar las sales.
- c.15) Centrifugar 20 minutos a 4°C / 13,000 rpm.
- c.16) Eliminar el sobrenadante y secar el pellet a 55°C
- c.17) Solubilizar el pellet en 100 µL de buffer TE o de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.
- c.18) Agregar 2 µl de RNAsa 10 µg/ml e incubar 30 minutos a 55°C.
- c.19) Agregar 2 µl de proteinasa K 0.04 µg/µl e incubar 30 minutos a 55°C.
- c.20) Llevar a un volumen de 500 µl con H<sub>2</sub>O milliQ o con TE.
- c.21) Agregar un volumen igual de fenol - cloroformo y agitar suavemente durante 5 minutos. Posteriormente centrifugar 5 minutos /10,000 g.

c.22) Recuperar la fase acuosa y agregar un volumen igual de cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). Agitar suavemente durante 5 minutos. Posteriormente centrifugar 5 minutos /10,000 g

c.23) Recuperar la fase acuosa. Precipitar con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y con 2.2 volúmenes de etanol absoluto. Almacenar a -20°C durante toda la noche

c.24) Centrifugar 20 minutos a 4°C / 13,000 rpm.

c.25) Decantar suavemente el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µl de etanol al 70%

c.26) Centrifugar 20 minutos a 4°C 13,000 rpm.

c.27) Eliminar el sobrenadante y secar el pellet a 55°C

c.28) Resuspender el pellet con 60 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril y guardar en refrigeración.

➤ *6.13 Integridad de DNA genómico.*

Se verificó la integridad del DNA genómico mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X (Anexo 1, apartado F). En el gel se cargaron 2 µl de muestra junto con el buffer de carga (Anexo 1, apartado F) y las muestras se dejaron correr a 10 V/cm. Terminada la corrida, el gel se colocó cuidadosamente en una solución de bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de DNA genómico en un transiluminador de luz UV.

➤ *6.14 Pureza de DNA (Zárate et al., 2009).*

Una vez que se obtuvo el DNA genómico se verificó la pureza por espectrofotometría. Los anillos heterocíclicos de los nucleótidos hacen que los ácidos nucleicos absorban luz ultravioleta (UV) a 260 nm. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobrestimaciones de la concentración de ácidos nucleicos. El máximo de absorbancia de las proteínas se encuentra en  $\lambda \sim 280$  nm, por lo que es posible estimar el grado de impurezas a partir del cociente  $A_{260}/A_{280}$ .

➤ 6.15 RAPD (Amplificación aleatoria de DNA polimórfico).

Se realizó el RAPD de los aislados obtenidos de cada fuente de carbono para comprobar que fueran diferentes entre ellos. De esta manera, 50 ng de genómico obtenido de la extracción de DNA fueron utilizados para hacer la reacción. Las condiciones y el ciclo de amplificación se muestran a continuación:

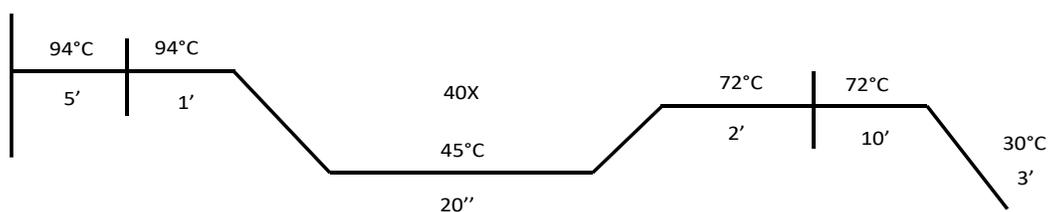
Tabla 5. Condiciones de la amplificación.

Componente	Concentración final de los reactantes
*Taq Buf + KCl-MgCl <sub>2</sub>	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3.5 mM
dNTP's (10mM)	0.2 mM
Primer M13b (100 μM)	1 μM
*Taq DNA pol (5U/ μl)	0.5 U
DNA (50 ng)	50ng
Volumen final por reacción	12.5 μl

\*Taq polimerasa de Fermentas

Secuencia del primer M13b: 5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'

Ciclo de amplificación:



Al término de la reacción, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2.5% y las muestras se dejaron correr a 80 V por 2 h: 30 min. Posteriormente, para visualizar las bandas obtenidas, el gel fue teñido con bromuro de etidio y colocado en un transiluminador de luz UV.

## VII) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

- 7.1 Caracterización microbiológica del pozol, aislamiento, purificación y conservación de aislados con actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica.

Se caracterizó una muestra de masa de maíz nixtamalizada procedente de la Ciudad de Villahermosa (Tabasco), la cual se dejó fermentar por 0, 9, 24 y 48 h a 37°C de manera independiente y por triplicado. Se monitorearon tiempos de fermentación cortos ya que se ha observado que la mayor disminución de pH ocurre durante las primeras 9 horas, lo que sugiere una actividad metabólica importante durante este tiempo de fermentación (Rizo, 2015; Leiva, 2018).

Este estudio mostró que desde el tiempo cero del proceso de fermentación, se tienen cuentas altas de los distintos grupos microbianos de  $10^4 - 10^7$  UFC/g masa de pozol (Figura 8), resultados que coinciden con lo reportado previamente (Wacher et al., 1993; Ampe et al., 1999; Díaz-Ruiz., 2003). La mayoría de los microorganismos presentes en los granos de maíz utilizados para elaborar el pozol son eliminados durante la cocción alcalina para producir el nixtamal, sin embargo, durante su procesamiento tiene lugar la inoculación de la masa, por lo que los microorganismos presentes en este tiempo, son los inoculados de diversas fuentes como la manipulación, el contacto de la masa con diferentes superficies, y de manera principal por las etapas del remojo y la molienda del grano (Wacher et al., 1993; Steinkraus, 1995).

La fermentación comienza con una cuenta de bacterias lácticas de  $7.1 \times 10^7$  UFC/g de masa de pozol. Conforme avanza el tiempo de fermentación la concentración de bacterias lácticas aumenta, siendo las 24 h donde se tiene una cuenta máxima de  $10.1 \times 10^{10}$  UFC/g de masa, aunque después de este tiempo su concentración disminuye hasta  $8.7 \times 10^9$  UFC/g de masa de pozol. En la Figura 8 se observa que este grupo microbiano es el predominante ya que supera en número al resto de los demás grupos microbianos.

Las cuentas de bacterias lácticas obtenidas concuerdan con los trabajos realizados anteriormente, en el que mediante la utilización de métodos tradicionales de cultivo así como por métodos moleculares, se ha descrito que estos microorganismos están presentes

en cuentas altas ( $10^8 - 10^{10}$  UFC/g de masa de pozol) y que son los más abundantes comparados con el resto de la microbiota que se encuentra involucrada en la fermentación del pozol (Wacher et al., 1993; Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 1999; Escalante et al., 2001).

Las bacterias lácticas son el grupo microbiano más importante, ya que estas crecen rápidamente durante las primeras horas de fermentación acidificando la masa. La acción de estas bacterias es relevante, debido a que la acidez es una característica sensorial importante de esta bebida, lo que le confiere al mismo tiempo un sabor especial a la masa.

Asimismo, la formación de ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas durante el proceso de fermentación reduce el pH, inhibiendo así el crecimiento de microorganismos de descomposición que pudieran alterar la calidad del producto y de patógenos que pudieran causar enfermedades a quien consuma el pozol (Kohajdová et al., 2007). Se cree que el efecto antimicrobiano es resultado de la acción de los ácidos orgánicos que interfieren con el mantenimiento del potencial de membrana e inhiben el transporte activo (Blandino et al., 2003).

Los mesófilos aerobios presentaron una cuenta inicial de  $6.6 \times 10^6$  UFC/g de masa de pozol. Su concentración máxima fue a las 24 h con una cuenta de  $9.3 \times 10^9$  UFC/g de masa de pozol (Figura 8).

En el caso de las enterobacterias, al inicio de la fermentación se presenta una cuenta de  $4.9 \times 10^4$  UFC/g de masa de pozol y a las 9 h se tiene la concentración máxima con  $6.7 \times 10^6$  UFC/g masa de pozol, aunque después de este tiempo la cuenta disminuye. A pesar de la reducción de la cuenta microbiana de estos microorganismos, se observa en la Figura 8 que este grupo se encuentra presente en todo el proceso de la fermentación. Si la producción de ácido durante una fermentación láctica es baja, o si el pH no disminuye lo suficiente, origina que la microbiota que debió inhibirse pueda desarrollarse (Giraffa, 2004). Durante las primeras etapas de la fermentación del pozol, los hongos y levaduras presentan cuentas bajas ( $4.3 \times 10^4$  UFC/g de masa), sin embargo, se observa un rápido crecimiento después de las 9 h de fermentación, siendo a las 48 h en donde se detecta la cuenta más alta ( $7.7 \times 10^7$  UFC/g de masa). La tendencia observada en este trabajo es similar a lo reportado por Díaz-Ruiz (2003), en el que se tiene un crecimiento notable después de las

9 h de fermentación y en la cual, aún después de 48 h el crecimiento de este grupo microbiano persiste. La contribución de mohos y levaduras puede ser la producción de aromas y sabores (Wacher, 1999).

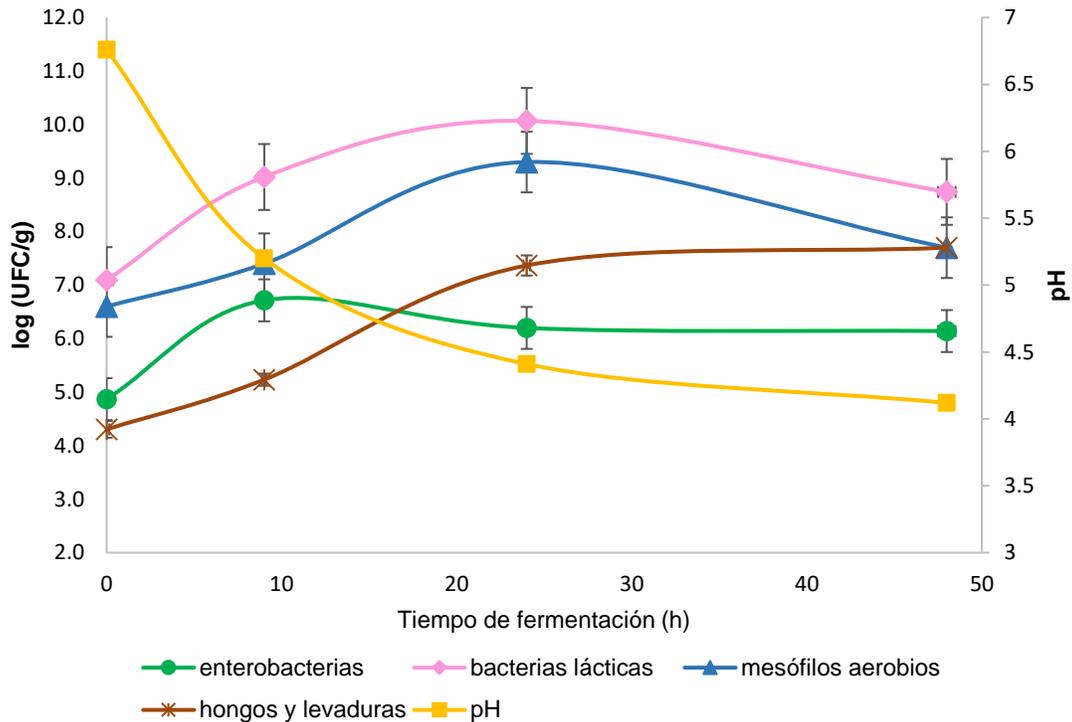


Figura 8. Cuantificación de los grupos microbianos durante la fermentación del pozol. Estudio realizado por la Dra. Gloria Díaz y la Biol. Ma. Teresa Flores (Facultad de Química, UNAM).

El pH del medio se redujo de 6.76 a 5.2 en solo 9 horas de fermentación, hasta un valor final de 4.12 a las 48 horas (Figura 8). Esta disminución es debida a la producción de ácido láctico (150 a 200  $\mu\text{mol/g}$  de peso húmedo) como producto principal y ácido acético (30.4  $\mu\text{mol/g}$  de peso húmedo) como producto secundario (Ampe et al., 1999; Ben Omar, 2000).

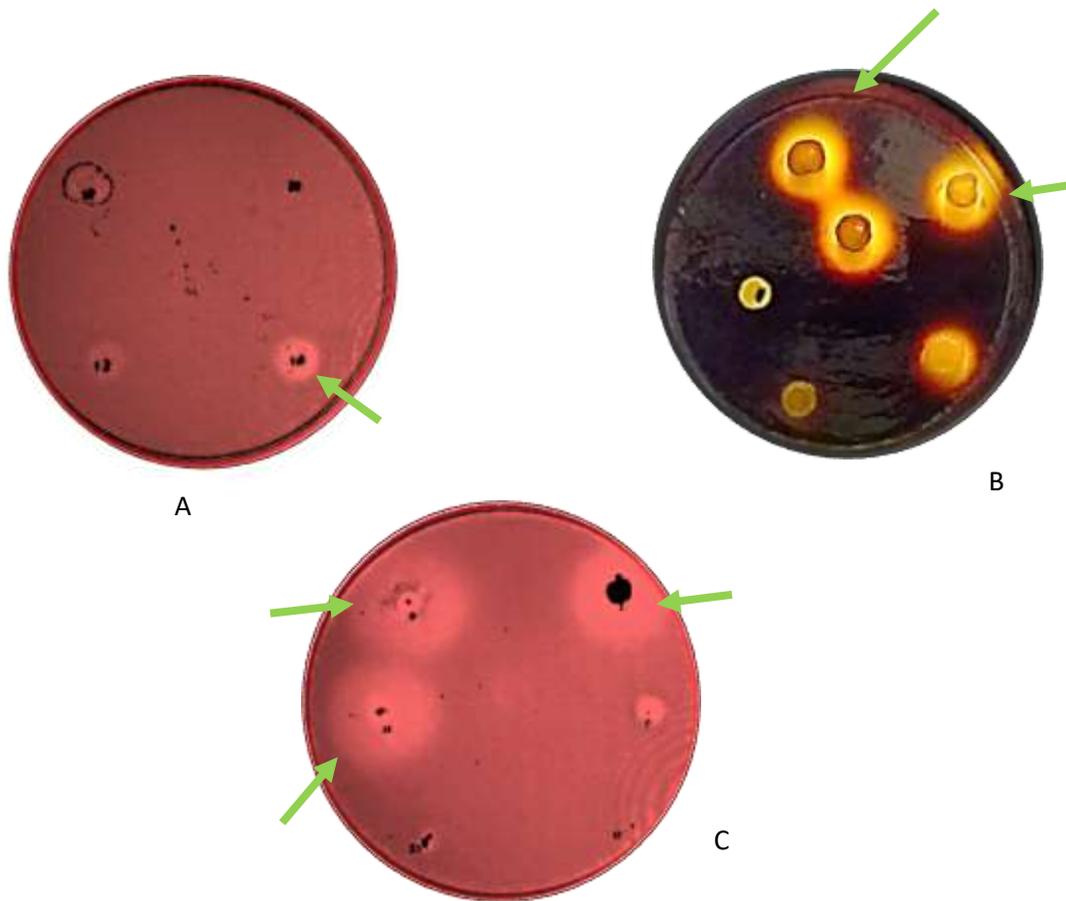
El tratamiento de los granos con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  durante la nixtamalización provoca que el pH inicial de la masa este cerca de la neutralidad, lo que probablemente permita que se desarrollen microorganismos sensibles a los ácidos antes de que se produzca ácido láctico (Ampe et al., 2000).

La existencia de un consorcio entre bacterias y levaduras es muy común en este tipo de fermentaciones amiláceas. Se cree que las levaduras proporcionan vitaminas y otros factores de crecimiento a las bacterias lácticas, mientras que las bacterias lácticas producen ácidos orgánicos que disminuyen el pH, lo que favorece el crecimiento de las levaduras (Lacerda et al., 2017).

➤ 7.2 Aislamiento de microorganismos con actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica.

El principal azúcar soluble del maíz es la sacarosa, el cual está presente en una concentración de 2% del grano entero en peso seco. Esta concentración se reduce a 0.1 - 0.7% después de la cocción alcalina, remojo y lavado para producir el nixtamal (Santillana, 1995; Díaz-Ruiz, 2003). Esto supone que el almidón debe ser el principal carbohidrato disponible para la fermentación; sin embargo, debido a que aún quedan remanentes de pericarpio en la masa del pozol, la celulosa y el xilano pueden ser fuentes de carbono alternativos para el crecimiento de los microorganismos.

Para comprobar que la microbiota presente en el pozol es capaz de utilizar otras fuentes de carbono además de almidón, se realizó un aislamiento en medios de cultivo con el carbohidrato a analizar (carboximetilcelulosa y xilano al 0.5%). Los microorganismos aislados fueron agrupados por sus características morfológicas distintivas y nuevamente se sembraron por picadura para determinar su actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica, según fuera el caso. Para detectar la actividad amilolítica se utilizó yodo con el fin de teñir el almidón e identificar las zonas de hidrólisis como halos claros en el fondo oscuro, las actividades celulolítica y xilanolítica fueron reveladas con rojo congo (Teather et al., 1981). Aquéllas colonias que mostraron halos de hidrólisis fueron consideradas con actividad glucósido-hidrolasa positiva, un ejemplo de algunas de estas colonias (en el caso de bacterias) puede observarse en la Figura 9.



*Figura 9. Ejemplo de colonias con: A) actividad xilanólítica. B) actividad amilolítica. C) actividad celulolítica. La presencia de actividad puede observarse como un halo de hidrólisis sobre el fondo oscuro.*

De la muestra de pozol analizada se aislaron un total de 70 colonias que presentaron actividad glucósido-hidrolasa, de las cuales 16 resultaron ser xilanolíticas, 20 amilolíticas y 34 celulolíticas.

En la Tabla 6 se muestra el número de colonias que presentaron actividad por tiempo de fermentación. Es importante mencionar que en los distintos medios de cultivo utilizados hubo crecimiento de colonias, sin embargo, en la Tabla 6 solo se presentan aquellas colonias que fueron seleccionadas con base en sus diferentes características morfológicas macroscópicas (color, forma, textura), estas características se encuentran descritas en las Tablas 9, 10 y 11

Tabla 6. Colonias con actividad glucósido-hidrolasa positiva aisladas del pozol.

Medio de cultivo con fuente de carbono (0.5%)	Tiempo de fermentación (h)				Total de aislados positivos
	0	9	24	48	
MRS almidón	2	3	3	4	12
MM almidón	3	3	2	0	8
MRS xilano	4	7	3	1	15
MM xilano	0	0	0	1	1
MRS carboximetilcelulosa	7	5	10	1	23
MM carboximetilcelulosa	5	2	1	3	11

En particular se ha demostrado que *S. bovis* (*S. infantarius* ssp. *infantarius*) es la bacteria láctica amilolítica más importante, además, recientemente se ha observado que esta bacteria, la cepa 25124, presenta actividad arabinoxilanolítica por lo que sus actividades podrían tener un gran impacto en la fermentación del pozol (Díaz-Ruiz, 2003, López-Hernández et al., 2018; Cooper et al., 2018).

Díaz- Ruiz (2003), propone que los maltooligosacáridos acumulados resultantes de la actividad amilolítica de *S. infantarius* ssp. *infantarius* y otros ALAB pueden servir como fuentes de energía para las bacterias lácticas no amilolíticas (NALAB). No obstante, otra explicación puede ser que los NALAB pueden metabolizar fuentes de carbono alternativos disponibles en la masa, esto debido a una mayor disponibilidad de hemicelulosa (xilano) después de la nixtamalización de los granos de maíz (López-Hernández et al., 2018).

Con base en lo mencionado anteriormente y de los resultados mostrados en la Tabla 6, se puede afirmar que en la masa del pozol existen microorganismos capaces de hidrolizar polisacáridos como celulosa y xilano además del almidón. Es posible que las actividades encontradas se relacionen con la presencia de pericarpio remanente en la masa.

El hecho de haber encontrado una mayor cantidad de microorganismos capaces de hidrolizar celulosa y xilano en comparación con el almidón, concuerda con lo reportado por Flores Espinosa (1995), quien encontró que alrededor del 60% de las cepas aisladas de

una muestra de pozol hidrolizaban claramente el xilano. Además, según lo reportado por López-Hernández et al., 2018, se ha encontrado que *Weissella confusa* L9 (aislada también del pozol) no puede crecer con almidón como única fuente de carbono. Por lo tanto, estos resultados muestran una evidencia directa de que el xilano y la celulosa (descrito por primera vez) actúan como fuentes de carbono y energía para la microbiota que se está desarrollando en la masa de pozol fermentado.

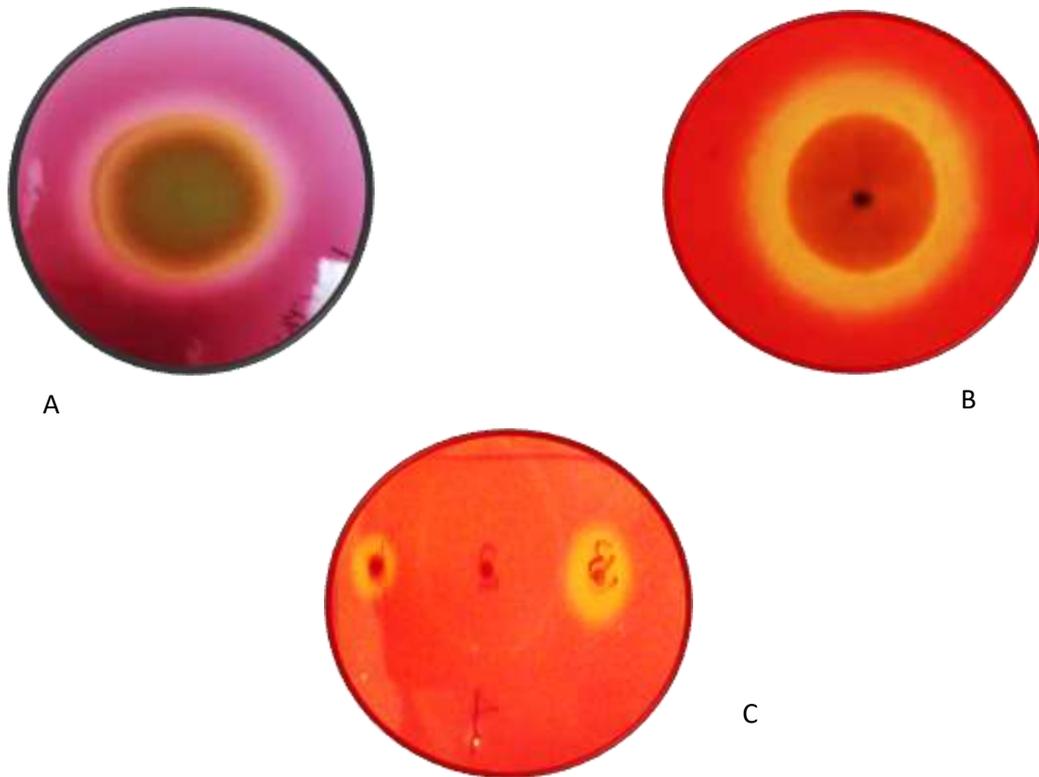
El aislamiento de levaduras y hongos filamentosos, se realizó en un medio selectivo para el crecimiento de estos microorganismos (la composición del medio se encuentra en el Anexo 1, apartado A). Se obtuvieron un total de 51 colonias con actividad glucósido-hidrolasa, de las cuales 24 presentaron actividad amilolítica, 24 actividad celulolítica y 3 actividad xilanolítica, los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Levaduras y hongos filamentosos aislados del pozol con actividad glucósido-hidrolasa positiva.

Fuente de carbono 0.5%	Tiempo de fermentación (h)								Total de aislados positivos	
	0		9		24		48		HF	L
	HF	L	HF	L	HF	L	HF	L		
Almidón	4	2	0	4	0	2	4	8	8	16
Xilano	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
Carboximetilcelulosa	4	0	0	0	5	0	7	8	16	8

HF: Hongo Filamentoso; L: Levadura

De manera similar a las bacterias, en la Tabla 7 solo se muestran la cantidad de levaduras y hongos filamentosos seleccionados en base a sus características morfológicas distintivas. Algunas de las colonias que presentaron actividad enzimática pueden observarse en la Figura 10. Cabe mencionar que el trabajo con hongos no se continuó en esta tesis.



*Figura 10. Ejemplo de colonias filamentosas y levaduriformes con: A) actividad amilolítica. B) actividad celulolítica, C) actividad xilanolítica. La presencia de actividad puede observarse como un halo de hidrólisis sobre el fondo oscuro.*

Diversos investigadores ya habían reportado acerca del aislamiento de hongos filamentosos y levaduras presentes en las diferentes etapas de la fermentación del pozol. Ulloa (1974), había detectado que algunos mohos de la superficie de la bola de pozol presentaban actividad amilolítica pero las levaduras no mostraban actividad, y sugirió que esta actividad no era significativa en la fermentación. Nuraida et al., (1995) encontró que poco más de la mitad de levaduras que logró aislar podrían hidrolizar el almidón en caja, sin embargo, estas levaduras podrían ser la misma especie ya que no se hicieron estudios para tratar de identificar a estos microorganismos. Ampe et al., (1999) no logró aislar ningún hongo ni levadura capaz de hidrolizar el almidón, por lo que concluye que las BAL amilolíticas juegan un papel importante en la disponibilidad de carbono de este sustrato.

De acuerdo con los resultados obtenidos, este es el primer trabajo en donde se reporta sobre el aislamiento de hongos y levaduras capaces de hidrolizar celulosa y xilano,

sustratos provenientes del pericarpio del grano de maíz. El rol que presentan estos microorganismos durante la fermentación puede ser de vital importancia en el desarrollo de la comunidad bacteriana.

La posible función de este tipo de microorganismos en este tipo de fermentaciones amiláceas es la degradación de los carbohidratos, producción de compuestos aromáticos, inhibición de mohos productores de micotoxinas (por competencia de nutrientes), producción de enzimas degradadoras de polisacáridos (celulasas, xilanasas y pectinasas), además algunos de ellos pueden tener propiedades probióticas (Kohajdová et al., 2007).

En comparación con las bacterias, los hongos filamentosos y levaduras resultaron ser las colonias con mayor número de aislados que presentaron actividad amilolítica, aunque se sugiere hacer una caracterización genotípica de estos aislados para comprobar si se trata de microorganismos diferentes y no sean el mismo aislado.

En la naturaleza se ha encontrado actividad celulolítica en una gran variedad de bacterias y hongos. Sin embargo, no todas son capaces de hidrolizar la celulosa completamente. Los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de la materia orgánica en general y de la celulosa en particular, para lo cual producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas esenciales para soportar su crecimiento, ya sea como saprófitos o como patógenos. La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungi; se ha reportado en hongos anaerobios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* y *Anaeromyces*, y en hongos aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trameres*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los hongos pertenecientes al *Phylum Ascomycota* dominan, tanto en abundancia como en actividad, la comunidad microbiana responsable de la descomposición de residuos celulósicos. En el caso del pozol, han sido descritos géneros como *Neurospora*, *Schizophyllum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*, (Ulloa, 1974; Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

- 7.3 Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados obtenidos de la fermentación del pozol con actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica.

Los aislados obtenidos de la fermentación del pozol que presentaron actividad glucósido-hidrolasa se clasificaron en grupos con base en sus características macroscópicas y microscópicas.

El estudio microscópico tras la tinción de Gram revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. En cuanto a las características macroscópicas, la morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar para la diferenciación de los microorganismos. En este paso de identificación, es muy importante el aislamiento para la obtención de un cultivo puro. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de forma, textura, borde, color y a veces por su tamaño (Fernández Olmos et al., 2010).

En el caso de los aislados con actividad amilolítica, el resultado que se obtuvo fue que en todas las etapas de la fermentación se aislaron morfotipos con morfología cocoide, algunos ejemplos se pueden ver en la Figura 11. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Díaz-Ruiz (2003), en el que encontró una mayor cantidad de microorganismos con forma cocoide y pocos con forma bacilar. Esto difiere 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 et al., 1995). La mayor parte de las cepas de bacterias lácticas con actividad amilolítica aisladas de alimentos fermentados pertenecen al género *Lactobacillus* (Morlon-Guyot et al., 1998; Sanni et al., 2002; Díaz-Ruiz., 2003).

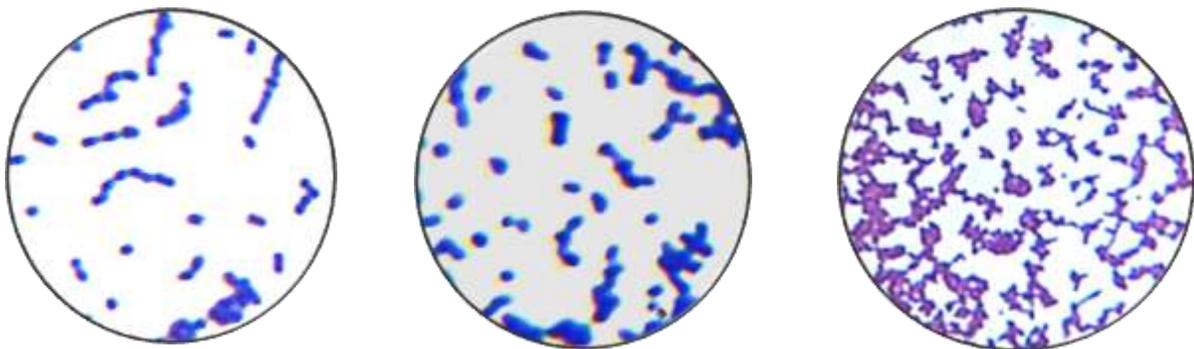


Figura 11. Ejemplo de agrupación microscópica de algunos aislados con actividad amilolítica.

De las colonias que presentaron actividad amilolítica, se hicieron diez grupos, de los cuales el grupo A1 presentó la mayor cantidad de morfotipos (8). Las características que comparten estos aislados se encuentran en la Tabla 8. En el Anexo 2, se presentan los códigos de los morfotipos que presentan cada uno de los grupos.

Tabla 8. Clasificación de colonias con actividad amilolítica aisladas de la fermentación del pozol (observaciones realizadas en medio de cultivo MRS-almidón).

Grupo	Índice de Potencia (IP)	Tinción de Gram	Agrupación	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
<b>A1</b>	1.5-3	Positivo	Racimos, tétradas y estreptococos	Circular	Entero	Plana	Seca: anillo viscoso	Anillo blanquecino; interior opaco
<b>A2</b>	2.4	Positivo	Cocos asociados en racimos	Circular	Ondulado	Elevada	Viscoso	Beige
<b>A3</b>	1.4	Positivo	Diplococos	Circular	Entero	Plana	Viscoso	Rosa claro
<b>A4</b>	1.8	Positivo	Cocobacilos	Puntiforme	Entero	Plano	Viscoso	Blanco
<b>A5</b>	3	Positivo	Cocos de cadena larga	Circular	Ondulado	Plana	Butirosa	Amarillo claro
<b>A6</b>	2.0-2.5	Positivo	Cocos de cadena larga	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Blanco /opaco
<b>A7</b>	2.0	Positivo	Diplococos y cocos únicos	Circular	Ondulado	Elevada	Butirosa	Blanco
<b>A8</b>	2.0	Positivo	Cocos únicos y Cocos de cadena larga	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Amarillo claro
<b>A9</b>	2.4	Positivo	Cocos en cadena	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Blanco
<b>A10</b>	2.1	Positivo	cocos únicos y Cocos de cadena larga	Rizoide	Lobulado	Plana	Seca	Blanquecino

*Grupo A1: 8 morfotipos; Grupo A6: 2 morfotipos; Grupos A2, A3, A4, A5, A7, A8, A9 y A10: 1 morfotipo*

El grupo A6 presentó dos morfotipos que compartían las mismas características tanto macroscópicas como microscópicas. El resto de los grupos muestran rasgos únicos que las hace diferentes a las demás agrupaciones (Tabla 8).

Otra de las características que se evaluaron fue el índice de potencia (IP), el cual se define como la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia (Hernández-Mejía, 2007). El valor del IP es un resultado arbitrario y no determina el potencial enzimático de un aislamiento para la producción de la enzima en fermentación sólida o líquida (Chan Cupul et al., 2016). En este trabajo, este valor sirvió para conocer de manera cualitativa cual es el aislado que presenta una mayor actividad de hidrólisis en placa.

De este modo, de manera arbitraria se estableció lo siguiente:

IP: 1.0-1.9 presenta baja actividad de hidrólisis en placa

IP: 2.0-2.9: presenta actividad media de hidrólisis en placa

IP: > 3 presenta una alta actividad de hidrólisis en placa.

La mayoría de los grupos obtuvieron un IP mayor a 2, por lo que se puede decir que presentan una actividad amilolítica media (Tabla 8). De los grupos analizados el morfotipo A5 presentó el mayor IP.

Los aislados que presentaron actividad celulolítica también fueron clasificados con base en sus características macroscópicas y microscópicas. A pesar de que ya existen reportes en donde se ha descrito acerca del aislamiento de microorganismos con actividad amilolítica y xilanolítica, este es el primer trabajo en donde se describe acerca de microorganismos con actividad celulolítica aislados del pozol.

Particularmente en este caso al volver a activar los aislados conservados en glicerol para determinar el IP, aproximadamente el 50% de las colonias perdieron actividad, es decir, cuando se creció el aislado en medio con carboximetilcelulosa y se reveló la placa con rojo congo las colonias que inicialmente presentaban actividad celulolítica ya no mostraban el halo de hidrólisis. En este sentido, se obtuvieron 10 grupos de las colonias que aun conservaban la actividad. Las características observadas se encuentran en la Tabla 9.

Cabe mencionar que también hubo pérdida de actividad de algunos aislados que inicialmente presentaban actividad amilolítica y xilanolítica, sin embargo, estos no fueron abundantes comparados con aquellos aislados con actividad celulolítica.

Tabla 9. Clasificación de colonias con actividad celulolítica aisladas de la fermentación del pozol (observaciones realizadas en medio de cultivo MRS-carboximetilcelulosa).

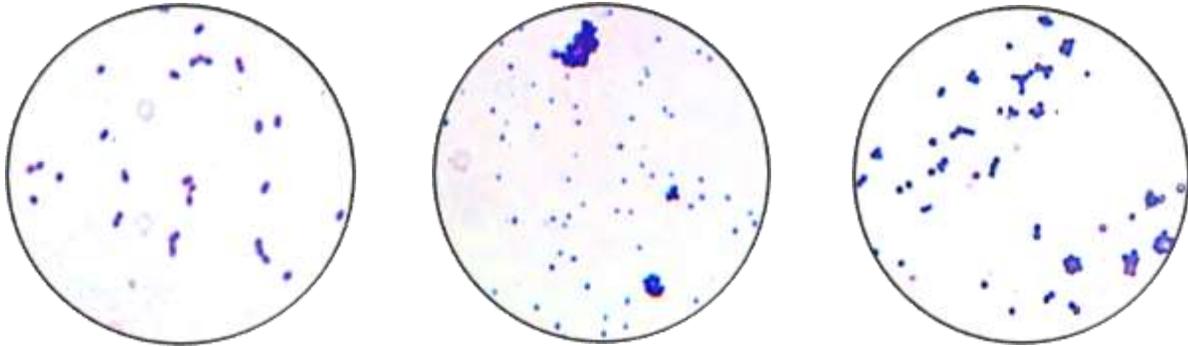
Grupo	Índice de potencia (IP)	Tinción de Gram	Agrupación	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
C1	1.28	Negativo	Diplococos, Cocos de cadena larga y cocos únicos	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Beige
C2	1.1	Positivo	Cocos únicos	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Amarillo claro
C3	1.22	Positivo	Cocos únicos	Circular	Entero	Plana	Seca	Translucido
C4	1.28	Negativo	Cocos únicos y diplococos	Circular	Entero	Plana	Seca	Translucido
C5	1.22 - 1.33	Positivo	Cocos únicos	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Beige
C6	1.21-1.71	Negativo	Cocos únicos y diplococos	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Beige
C7	1.12 - 1.5	Negativo	Cocobacilos	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Beige
C8	1.2 - 1.5	Positivo	Cocobacilos	Circular	Entero	Plana	Butirosa	Beige
C9	1.1	Positivo	Cocobacilos	Circular	Ondulado	Plana	Butirosa	Beige
C10	1.1	Positivo	Cocos únicos, diplococos y sarcinas	Circular	Entero	Plana	Seca	Beige

*Grupos C5, C6 y C8: 3 morfotipos; Grupos C7: 2 morfotipos; Grupos C1, C2, C3, C4, C9 y C10: 1 morfotipo.*

La pérdida de actividad de algunos de los aislados después de su almacenamiento ya sea celulolítico, amilolítico o xilanolítico podría indicar que tal vez estos genes pudieran estar contenidos en plásmidos (Díaz Ruiz, 2003). Olympia 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, ya que se han aislado algunas variantes que carecen de actividad amilolítica cuando la bacteria se cultiva en glucosa (Morlon-Guyot y col. 2001).

Los morfotipos con actividad celulolítica muestran una morfología mayoritaria con agrupaciones cocoide y cocobacilos, algunos ejemplos de estas morfologías se señalan en la Figura 12.



*Figura 12. Ejemplo de agrupación microscópica de algunos aislados con actividad celulolítica.*

El IP de todos los grupos estuvieron en el rango de 1.1 - 1.7. Cuando se tiene un gran número de aislados con actividad glucósido-hidrolasa u otro tipo de actividad enzimática, la determinación del IP es una herramienta fácil y rápida que permite seleccionar aislados productoras de enzima. Sin embargo, es necesario realizar una evaluación cuantitativa en fermentación líquida para determinar la actividad real de la enzima (Chan Cupul et al., 2016).

En cuanto a los aislados que presentaron actividad xilanolítica, estas se clasificaron en 9 grupos. Las características tanto microscópicas como macroscópicas que presentan estos morfotipos se encuentran en la Tabla 10. Estos aislados a diferencia de los que presentaron actividad amilolítica y celulolítica presentaron diversas morfologías microscópicas como cocos, bacilos y cocobacilos (Figura 13).

Tabla 10. Clasificación de colonias con actividad xilanolítica aisladas de la fermentación del pozol (observaciones realizadas en medio de cultivo MRS-xilano).

Grupo	Índice de potencia (IP)	Tinción de Gram	Agrupación	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
X1	1.12 -1.5	Negativo	Cocos y diplococos	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Beige
X2	1.22	Positivo	Bacilos de cadena larga	Circular	Crenado	Elevada	Butirosa	Amarillo claro
X3	1.25	Negativo	Cocos	Circular	Crenado	Elevada	Seca - firme	Amarillo
X4	1.09 - 1.25	Positivo	Cocos y diplococos	Circular	Crenado	Elevada	Seca	Blanco
X5	1.83	Positivo	Cocos y diplococos	Circular	Filamentoso	Plana	Seca	blanco-opaco
X6	1.36	Positivo	Cocobacilos en cadena	Rizoide	Ondulado	Rugosa	Seca	Blanco
X7	1.4	Negativo	Cocos y estreptococos	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Beige
X8	1.14	Positivo	Cocos	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Beige
X9	1.2	Positivo	Cocos	Circular	Crenado	Plana	Seca	Amarillo claro

*Grupo X1: 3 morfotipos; Grupos X4 y X7: 2 morfotipos; Grupos X2, X3, X5, X6, X8 y X9: 1 morfotipo.*

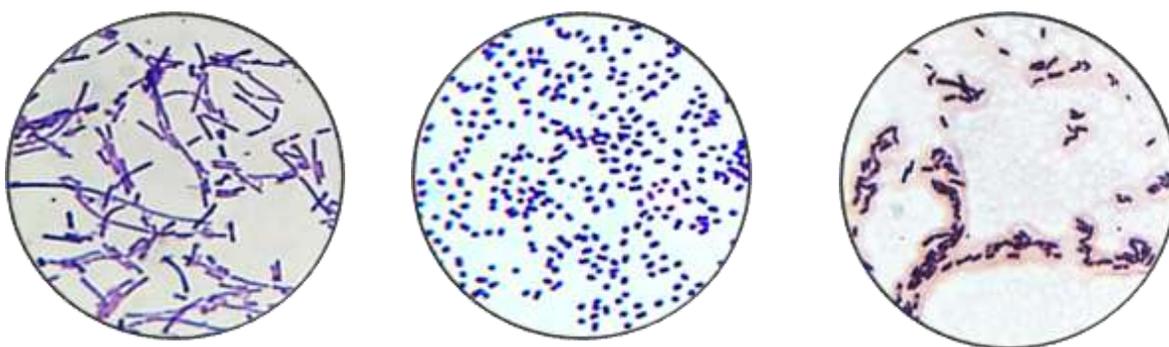


Figura 13. Ejemplo de agrupación microscópica de algunos aislados con actividad xilanolítica.

El IP de los grupos se encontró dentro del rango de 1.1 - 1.8, que al igual que los morfotipos con actividad celulolítica, la hidrólisis en placa se considera baja, según al parámetro establecido de acuerdo a la clasificación de la intensidad de actividad en placa.

➤ 7.4 Caracterización de los aislados mediante Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD).

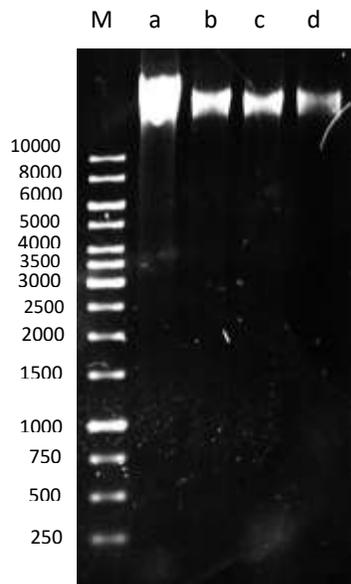
Con el fin de determinar si los aislados clasificados en los diferentes grupos morfotipos son similares o distintos, se eligió al azar un aislado de cada grupo y se realizó una caracterización por RAPD, (Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico). Cabe aclarar que el RAPD se realizó solo en aquellos aislados que aún conservaban la actividad glucósido-hidrolasa

- Extracción de DNA.

La aplicación de cualquier técnica molecular comienza con la extracción de DNA; el hecho de tener datos confiables y reproducibles depende en gran medida de la obtención de un DNA integro y puro.

Todos los aislados obtenidos de la muestra de pozol que presentaron actividad glucósido-hidrolasa positiva fueron crecidos en el medio de donde fueron aislados para posteriormente realizar la extracción del material genético.

Las observaciones que se realizaron al microscopio antes de realizar la extracción de DNA fueron determinantes para verificar que las colonias se encontraban puras, asegurando de este modo tener resultados confiables durante la realización de la técnica de RAPD. Una vez que se obtuvo el material genético de todos los aislados, se observó la integridad del DNA genómico en un gel de agarosa al 0.8%.



*Figura 14. Integridad de DNA genómico. Gel de agarosa al 0.8% que muestra el DNA genómico extraído de algunos aislados con actividad amilolítica.*

a: 10.0.1.1  
 b: 7.9.1.1  
 c: 7.24.1.1  
 d: 9.48.2.1

El gel de agarosa que se presenta en la Figura 14 es representativo de las extracciones de DNA genómico y se pueden apreciar como bandas definidas por arriba de las 10,000 pb. La integridad del DNA es un parámetro importante que se debe de cuidar al realizar la extracción del material genético. Estas bandas estrechas que se encuentran cercanas al pozo en donde se cargó la muestra, evidencia que el DNA se encuentra integro. Si el DNA estuviera fragmentado se observaría un barrido a lo largo de todo el carril. El hecho de tener DNA fragmentado implica la dificultad de la amplificación de los productos de PCR afectando la reproducibilidad de las técnicas utilizadas (Alejos et al., 2014)

- Concentración y pureza del DNA.

Una vez que se corroboró que el DNA genómico extraído se encontraba integro, se cuantifico la concentración obtenida y se determinó la pureza mediante espectrofotometría.

En general se obtuvieron valores de DO (260/280) aproximadamente de 1.8 por lo que se puede decir que la pureza del DNA extraído fue adecuada, ya que la literatura indica que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación  $A_{260}/A_{280} > 1.6$ . Un valor  $A_{260}/A_{280} < 1.6$  indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Con base en los resultados de absorbancia obtenidos se hicieron diluciones para obtener 1 unidad de DNA (50ng/ $\mu$ L), ajustando así la cantidad de DNA genómico en todas las muestras para que los productos amplificados mediante la técnica de RAPD pudieran ser comparables.

- Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD)

El análisis de los aislados mediante la técnica de RAPD sirvió como herramienta para poder corroborar si los grupos morfotipo eran similares o distintos, según la fuente de carbono de donde fueron seleccionados. El hecho de solo haber tomado en cuenta las características macroscópicas y microscópicas de los aislados para poder clasificarlos por grupos, puede resultar ambiguo ya que algunos grupos presentaron o compartieron características muy cercanas. Por ejemplo, en la Tabla 10, los grupos X1 y X7 presentaron características macroscópicas similares y lo único que los diferenció fue la agrupación microscópica, aunque en ambos esta fue una agrupación cocoide (X1: cocos y diplococos; X2: cocos y estreptococos), por lo que el análisis de una caracterización macroscópica o microscópica no resulta contundente sobre la diferenciación de estos microorganismos.

Se decidió utilizar esta técnica molecular debido a las ventajas que presenta, la principal de estas que no se requiere de un conocimiento previo de la secuencia de DNA del organismo bajo estudio, requiere de pequeñas cantidades de DNA (10-100 ng por reacción), además de que es rápida y simple (Power, 1996; Ibrahim et al., 2010).

Es importante mencionar que en la técnica de RAPD se deben mantener condiciones de reacción estrictamente consistentes para lograr perfiles reproducibles (Ibrahim et al., 2010). Se ha observado que el número, reproducibilidad e intensidad de las bandas puede verse afectado por algunos parámetros como la concentración de DNA, la temperatura de alineamiento, la longitud y secuencia del primer, así como la concentración de sales (Roldán et al., 2014). Los resultados obtenidos de la caracterización de los morfotipos a partir de esta técnica se pueden apreciar en las figuras siguientes.

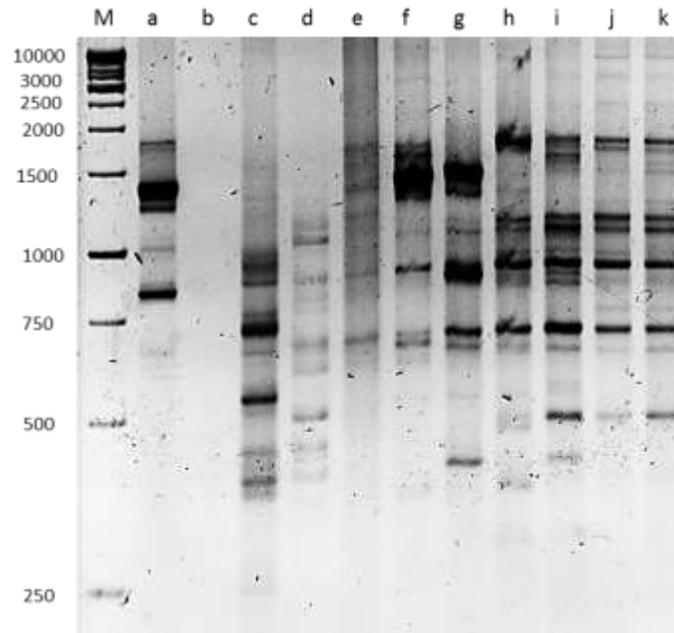


Figura 15. Productos de la reacción de RAPD de los aislados con actividad amilolítica. Donde: M: marcador de peso molecular 1Kb; a) A5 (3.0.1.1); b) A6 (10.0.1.1); c) A8 (7.9.1.1); d) A3 (11.24.2.1); e) A9 (6.24.1.1); f) A4 (9.24.2.1); g) A2 (8.24.2.1); h) A1 (5.0.2.1); i) A1 (5.48.2.1); j) A1 (9.48.2.1); k) A10 (7.24.1.1). La nomenclatura utilizada se describe en el Anexo 2.

En el caso del RAPD obtenido de los aislados con actividad amilolítica (Figura 15) el patrón de bandeo obtenido de los morfotipos con actividad amilolítica difiere entre ellos (carriles a, c, d, e y f). La resolución de la técnica de RAPD es la identificación a nivel de especie y en ocasiones hasta cepas (Vandamme et al., 1996), por lo que se asume que estos serían microorganismos de al menos distintas cepas o sino especies. También se observa que los carriles h, i, j y k, presentan un perfil de bandeo semejante, especialmente j y k, por lo que pudieran ser la misma especie. Comparando estos datos con los obtenidos mediante la caracterización macroscópica y microscópica, h, i, y j, se agruparon en el mismo morfotipo pero K se acomodó en un grupo distinto, aunque todas las bacterias son cocos Gram +, las colonias que formaron eran diferentes (en el caso de k), lo que indica que la clasificación morfológica no es suficiente. Esto mismo sucede en el caso de las muestras con actividad celulolítica (Figura 16), en el que los carriles c, e, f, h, i, presentan bandas similares pero las características fenotípicas reportadas en la Tabla 9 son distintos y aislados que fueron agrupados en el mismo morfotipo, muestran patrones de amplificación RAPD completamente diferentes. Sin embargo, lo que claramente se observa es que existen microorganismos distintos que son capaces de hidrolizar la celulosa, ya que la mayoría de

los morfotipos analizados en el gel presentan un patrón de bandeo diferente (carriles a, b, c, d, g, j, k). Cabe mencionar que los aislados A7 y C3 no fueron analizados en los RAPD's debido a que durante las resiembras estos aislados perdieron la actividad que habían mostrado en un inicio.

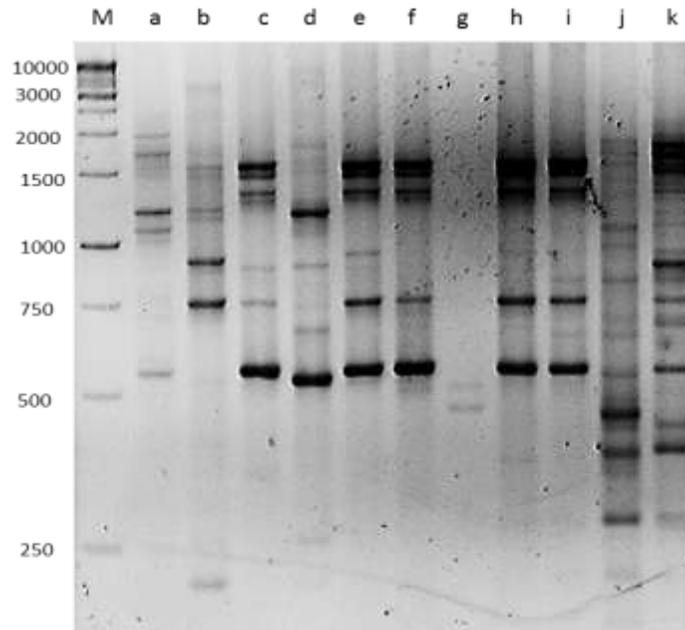


Figura 16.. Productos de la reacción de RAPD de los aislados con actividad celulolítica. Donde: M: marcador de peso molecular 1Kb; a) C5 (9.0.2.3); b) C7 (19.24.2.3); c) C6 (2.48.1.3); d) C10 (1.48.1.3); e) C2 (3.0.2.3); f) C8 (22.24.2.3); g) C5 (2.9.2.3); h) C1 (2.0.2.3); i) C4 (6.0.2.3); j) C6 (1.0.1.3); k) C9 (10.9.1.3). La nomenclatura utilizada se describe en el Anexo 2.

En el caso del gel obtenido de las muestras con actividad xilanolítica (Figura 17), se observan que en los carriles a y b, se presentan pocas bandas y estas son muy sutiles. Como se mencionó anteriormente que el DNA genómico de todas las muestras se estandarizó a 50 ng para llevar a cabo la reacción, esta concentración no pudo haber inhibido la amplificación. Aunque no se puede dejar de lado que el RAPD, al estar basado en PCR, puede presentar limitaciones en cuanto a su sensibilidad, la no amplificación es en sí misma un resultado.

Al igual que lo observado con el RAPD realizado a los aislados celulolíticos, los patrones de bandeo generados para los microorganismos xilanolíticos son distintos, por lo que más de un solo tipo de microorganismo pudiera ser activo en la degradación de este carbohidrato.

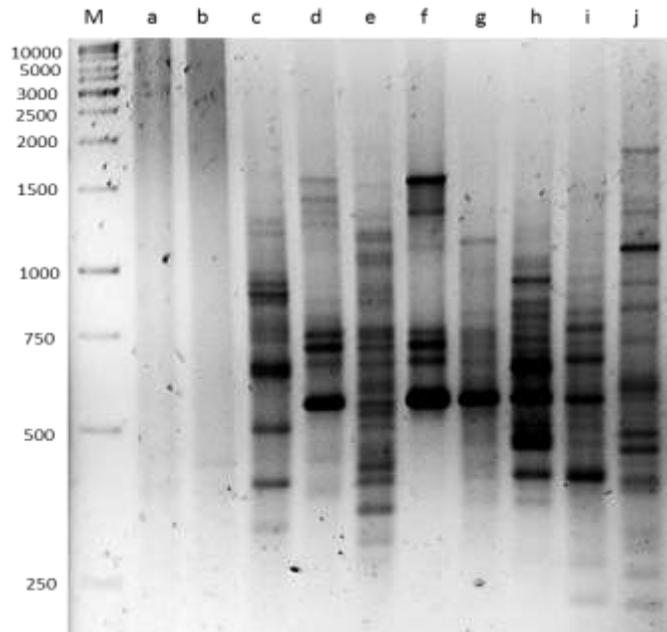


Figura 17. Productos de la reacción de RAPD de los aislados con actividad xilanolítica. Donde M: marcador de peso molecular 1Kb; a) X1 (2.0.2.2); b) X2 (3.0.2.2); c) X3 (4.0.2.2); d) X4 (2.9.2.2); e) X1 (3.9.2.2); f) X1 (6.9.2.2); g) X6 (9.9.2.2); h) X7 (3.24.2.2); i) X8 (5.24.2.2); j) X9 (3.48.1.2). La nomenclatura utilizada se describe en el Anexo 2.

El análisis de RAPD ha demostrado ser un método efectivo para discriminar entre bacterias, especies de animales y plantas ya que genera patrones de bandas de ADN específicas (Kaur et al., 2017). También ha sido utilizado para la discriminación de LAB en alimentos y productos fermentados (Chao et al., 2008; Schillinger et al., 2003).

Como ya se había mencionado anteriormente, en el pozol existe una gran diversidad de microorganismos involucrados durante la fermentación, sin embargo estos tendrían que identificarse por métodos moleculares para determinar que especies están conformando esta microbiota. A partir de los datos obtenidos de la técnica por RAPD, en el caso de la hidrólisis de polisacáridos (celulosa, xilano y almidón, analizados en este trabajo) se propone que existen diferentes microorganismos que pudieran actuar conjuntamente en la hidrólisis de estos sustratos ya que la mayoría de los patrones de bandeos obtenidos son diferentes, sin embargo, estos resultados requieren ser validados mediante la identificación molecular de las cepas.

➤ 7.5 Cuantificación de fibra cruda, carbohidratos solubles totales y carbohidratos reductores.

Otra aproximación para evaluar el consumo de los polisacáridos insolubles, como celulosa y xilano, es el estudio de las concentraciones de fibra cruda.

- Fibra cruda.

El pericarpio cubre las estructuras internas del grano de maíz y representa aproximadamente el 5% del peso total del grano. Esta estructura se caracteriza por un alto contenido de fibra cruda que consiste principalmente en hemicelulosa, celulosa y lignina (Gutiérrez-Cortez et al., 2010; Singh et al., 2017). Durante la cocción alcalina de los granos de maíz, la hemicelulosa y las fracciones de lignina en el pericarpio se vuelven solubles, pasando al nejayote (Gutiérrez et al., 2006), pero el resto queda en la masa. Así mismo el almidón que es gelatinizado se retrograda al enfriarse la masa, convirtiéndose en fibra que también queda en la masa del pozol.

En la Figura 18 se puede observar que al inicio de la fermentación el contenido de fibra cruda en la masa del pozol es de 2.44%. Sin embargo, después de las 9 h se observa un descenso con respecto a la concentración inicial. Al final de la fermentación la cantidad de fibra cruda alcanza un valor de 0.79%.

A pesar de que la celulosa y la hemicelulosa no pierden su integridad durante el proceso de la nixtamalización, ya que estos polisacáridos no se descomponen sino hasta alcanzar temperaturas entre 285 y 340 °C, las fibras de celulosa y hemicelulosa quedan expuestas como consecuencia de la eliminación de la capa de pericarpio (González et al., 2004; Gutiérrez-Cortez, 2010), esto permite que estos polisacáridos junto con alguna fracción del almidón, puedan ser utilizados por los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación del pozol.

El hecho de que se detecte una disminución en el contenido de la fibra cruda presente en la masa del pozol, indica que existen microorganismos capaces de hidrolizar el almidón, la celulosa y la hemicelulosa (xilano), liberándose malto-, xilo- y celo-oligosacáridos solubles que pueden ser utilizados por otros microorganismos como fuente de carbono. Lo que indica que los morfotipos con actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica aislados pueden estar activos en la muestra analizada.

- Carbohidratos solubles totales.

En este trabajo se consideró como carbohidratos solubles totales, los azúcares que se solubilizaban al disolver la masa, en la cual no solo se están cuantificando carbohidratos solubles, como sacarosa o fructosa, que se sabe disminuyen hasta niveles cerca de 0.1-0.7% después de la nixtamalización, sino también oligosacáridos como xilo-oligosacáridos, celo-oligosacáridos, malto-oligosacáridos y almidón soluble (Calderón et al., 2013). Se encontró que al inicio de la fermentación la concentración de carbohidratos totales es de 5.78% (Figura 18).

Después de las 9 horas de fermentación se observa una disminución de la concentración de carbohidratos solubles totales, lo cual coincide con lo reportado por Leiva (2018) en el que también detecta una disminución en este tiempo de fermentación. En ambos casos se observó que en este tiempo se observa el mayor crecimiento de microorganismos, los que seguramente estarían consumiendo los carbohidratos solubles disponibles, lo que además se refleja en la disminución del pH. Posteriormente la cantidad de estos carbohidratos solubles aumenta, probablemente debido a la liberación de azúcares solubles por la acción de las enzimas sobre la fibra cruda presente en la muestra.

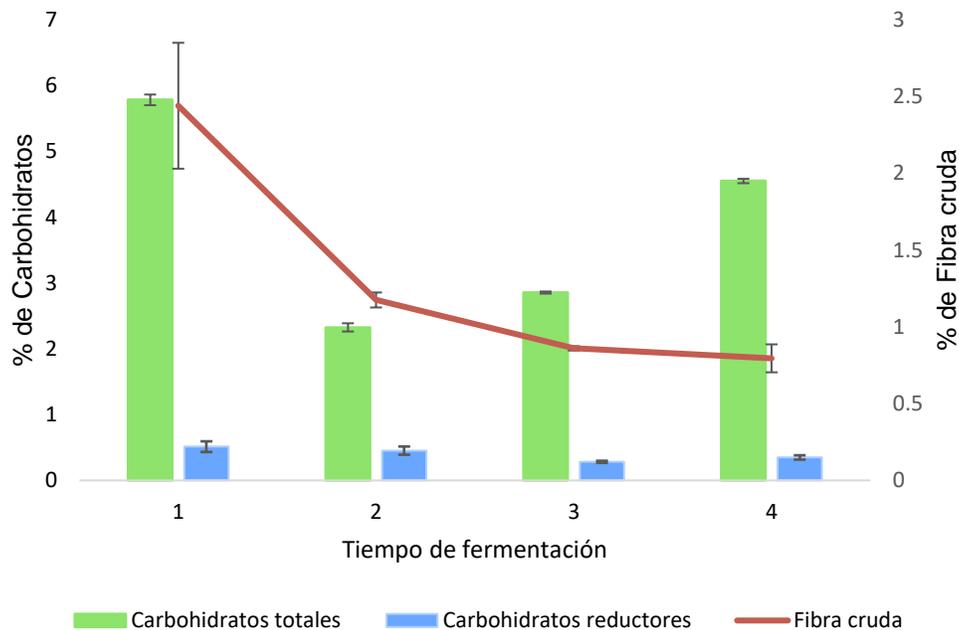


Figura 18. Cuantificación del contenido de carbohidratos solubles totales, carbohidratos reductores y fibra cruda en muestra de pozol fermentado por 48h. Los datos presentados se encuentran reportados en base seca.

- Carbohidratos reductores.

En la Figura 18 se puede observar que la cantidad inicial de carbohidratos reductores al inicio es de 0.51%, la cantidad de azúcares disminuye muy ligeramente a lo largo de la fermentación lo que sugiere que al mismo tiempo que consumen los azúcares reductores, se están generando nuevos probablemente a partir de almidón, celulosa y xilano (Leiva, 2018, Díaz-Ruiz, 1996).

- 7.6 Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica *in vitro* y directamente de la masa de pozol.

Todos los estudios realizados hasta el momento se habían enfocado en la determinación de la actividad amilolítica (y recientemente también la actividad xilanolítica) de los microorganismos aislados de la masa del pozol, tal es el caso de *S. infantarius* ssp. *infantarius*. Sin embargo, y como se mencionó, las ALAB presentes en esta fermentación son débilmente amilolíticas si se comparan con otras bacterias lácticas aisladas de fermentaciones semejantes (Díaz-Ruiz, 2003), por lo que se cree que las bacterias involucradas en esta fermentación pueden estar aprovechando otras fuentes de carbono.

Por otro lado, pocos han sido los estudios en donde se ha tratado de buscar la actividad enzimática directamente de la masa y los resultados obtenidos de estas investigaciones no han sido exitosos ya que nunca se ha podido encontrar la actividad (en estos casos la actividad amilolítica) directamente de la masa de pozol fermentado (Ampe et al., 1999; Rizo, 2012). Además, no se cuenta con algún trabajo acerca de la determinación de actividad celulolítica y xilanolítica directamente de la masa.

El hecho de que aún queden remanentes de pericarpio en la masa del pozol y correlacionando los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica, en donde se encuentran microorganismos capaces de hidrolizar la celulosa y el xilano, así como los resultados obtenidos de la cuantificación de la fibra y de los carbohidratos solubles totales y reductores, conducen a buscar la actividad xilanolítica y celulolítica *in vitro* y directamente de la masa fermentada.

- Actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica *in vitro*.

Para detectar la actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica *in vitro* se siguió el método propuesto por Leiva (2018) para la extracción de proteínas con modificaciones mínimas. Este método permite la extracción de células de microorganismos, mediante lavados sucesivos de la masa. Los sobrenadantes obtenidos fueron los utilizados para la determinación de la actividad mediante la técnica de DNS, además de la técnica de yodo-yoduro (solo en el caso de la actividad amilolítica) y mediante la determinación de la actividad en placa.

A pesar de que se realizaron diversas mediciones, no se lograron detectar las actividades buscadas utilizando la técnica de DNS en ninguno de los tiempos de fermentación analizados (0, 9, 24 y 48 horas) ni en las condiciones probadas. En el caso de la actividad amilolítica, los resultados obtenidos indican una actividad muy baja, resultados que caen dentro del rango de la desviación estándar por lo que no pudieron considerarse como actividad. La actividad celulolítica no dio resultados ya que las mediciones fueron mayores en la reacción del blanco en comparación con la reacción enzimática. Finalmente, la actividad xilanolítica tampoco pudo detectarse debido a que las absorbancias medidas de la reacción enzimática resultaron ser mucho menores a las absorbancias obtenidas de la curva de calibración (datos no mostrados).

En el caso de la actividad amilolítica, los resultados obtenidos de esta investigación concuerdan con lo ya reportado por Rizo (2012) en el que no logra encontrar actividad enzimática en una muestra fermentada por 24 h a una temperatura de 36 °C y 50 °C en un rango de pH de 3.5 - 5. Sin embargo, en este mismo estudio se detectó actividad de 0.71 U/ml (7.1 U/g de pozol) a pH 5 y temperatura de 36 °C en un tiempo de fermentación de 360 horas, por lo que el tiempo de fermentación puede ser un factor para la búsqueda de estas actividades.

Buscando reportes acerca de la determinación de la actividad celulolítica y xilanolítica obtenida de la extracción de proteínas de masa de pozol fermentado, no se encontró ningún estudio que abordara sobre estas actividades, pero se encontraron trabajos que principalmente se centran en la investigación de la actividad en microorganismos aislados de este alimento.

Flores González (2007) monitoreó la capacidad xilanolítica asociada a la célula y en el sobrenadante de una cepa aislada del pozol reportada como *Lactococcus lactis* var. *lactis*; sin embargo, la actividad presente en las células y el sobrenadante fue tan baja que no pudo ser detectada por la reacción de DNS, lo cual según se menciona, indica una actividad menor a 150  $\mu$ moles/ml, por lo que propone entonces utilizar otras metodologías como el HPLC para monitorear la aparición de los carbohidratos productos de la hidrólisis del xilano.

Sin embargo *S. infantarius* ssp. *infantarius* muestra una clara actividad xilanolítica, además de actividades de  $\beta$ -arabinosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y acetil-xilan-esterasa (Cooper-Bribiesca et al., 2018).

La actividad enzimática *in vitro* también se determinó de manera cualitativa mediante la incubación del sobrenadante en placas de agar con el sustrato a analizar a 37°C / 24 h (ver materiales y métodos y Anexo 1, apartado D). La actividad xilanolítica, no pudo observarse al revelar la placa con rojo congo después del tiempo de incubación en ninguna de las muestras ni en los tiempos de fermentación analizados. La actividad amilolítica tampoco se detectó utilizando esta técnica después de revelar la placa con yodo (datos no mostrados). Solamente se pudo encontrar actividad celulolítica en las muestras de pozol fermentadas por 48 h. Los resultados se encuentran en la Tabla 11. Estos resultados son preliminares, por lo que se sugiere realizar nuevamente las mediciones para verificar que exactamente se está llevando a cabo la hidrólisis de este sustrato durante este tiempo de fermentación. Un ejemplo del halo producido en placa puede verse en la Figura 19.

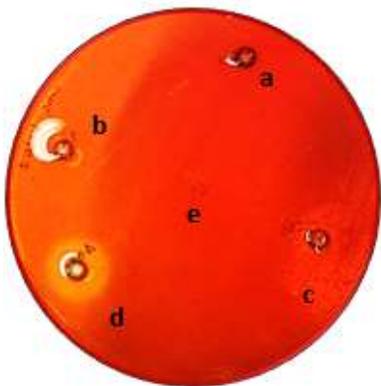


Figura 19. Ejemplo de placa con actividad celulolítica del sobrenadante obtenido de una muestra de pozol. a: 0h de fermentación; b: 9h de fermentación; c: 24 h de fermentación y d: 48 h de fermentación con actividad positiva; e: control negativo buffer citrato-fosfato pH 5.

Tabla 11. Halo de hidrólisis producido por los sobrenadantes de las muestras de la fermentación del pozol, en placa con carboximetilcelulosa 0.2% como sustrato.

Tiempo de fermentación (h)	Diámetro de halo de hidrólisis (cm) producido en placa con carboximetilcelulosa 0.2%		
	Bola 1	Bola 2	Bola 3
0	-	-	-
9	-	-	-
24	-	-	-
48	1.3	1.5	0.8

El símbolo (-) indica que no hubo actividad enzimática en los tiempos de fermentación analizados.

En la Tabla 11 se observa que los microorganismos que producen un halo de hidrólisis son aislados en la etapa final de la fermentación. Estos resultados concuerdan con el hecho de que se lograron encontrar una mayor cantidad de microorganismos que presentan actividad celulolítica durante las 48 h de fermentación, así como una mayor cantidad de hongos y levaduras aislados en este tiempo.

Debido a que no se encontró la actividad en los tiempos anteriores a las 48 h de fermentación, se puede sugerir que los microorganismos al comienzo de este proceso pueden estar utilizando almidón soluble, que al ser hidrolizado libera azúcares que son utilizados por microorganismos no amilolíticos. Esta conjetura se basa en el estudio de Díaz-Ruiz (2003) en el cual encuentra que durante las primeras 24 h de fermentación hay un alto número de ALAB, mientras que al final de la fermentación descienden las cuentas de este grupo microbiano y comienzan a aumentar las NALAB.

- Actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica directamente de la masa de pozol fermentado.

Desde un punto de vista microbiológico, la masa de pozol es un sistema que se caracteriza por un pH bajo, altas concentraciones de carbohidratos, limitación de oxígeno y con altos números de bacterias lácticas en comparación con los hongos y levaduras (De Vuyst et al., 2014). El maíz, que es la materia prima fundamental para la elaboración de este alimento fermentado presenta cantidades importantes de compuestos de reserva: lípidos, carbohidratos y proteínas. Durante la nixtamalización del maíz, el almidón (carbohidrato principal en el grano) sufre cambios estructurales que incluyen: la gelatinización parcial,

retrogradación y entrecruzamiento, lo que interfiere con la detección de las proteínas de los microorganismos que fermentan el pozol. Estos cambios aumentan la complejidad de la extracción, debido a que el almidón parcialmente gelatinizado tiende a formar redes que atrapan a las proteínas (Cárdenas et al., 2014; Rizo, 2015).

A pesar de todas estas limitaciones, Rizo (2015), diseñó una metodología para la obtención de proteínas activas, es decir bajo una condición suave que no inactivara las enzimas (ver Materiales y Métodos, Anexo 6.11).

En ninguno de los casos analizados se logró detectar la actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica directamente de la masa, ya que al revelar los geles no se apreciaban bandas que indicaran la presencia de la actividad enzimática (datos no mostrados).

Ampe et al., (1999) ya había buscado la actividad amilolítica a partir de suspensiones de pozol, sin embargo, tampoco pudo encontrar dicha actividad. Rizo (2012) buscó también la actividad amilolítica en la masa del pozol y esta tampoco pudo ser detectada en un zimograma.

## VIII) CONCLUSIONES

La masa del pozol fermentado es un sistema complejo en el que se encuentran involucrados diversos componentes que permiten el crecimiento de los microorganismos. Constantemente diversos autores habían sugerido que el almidón es el principal sustrato utilizado por la microbiota que se desarrolla durante la fermentación de este alimento, sin embargo, en este estudio se comprobó que existen microorganismos en la masa (bacterias lácticas, levaduras y hongos filamentosos) con capacidad de hidrolizar polisacáridos como la celulosa y el xilano, lo que sugiere que el almidón no es el único carbohidrato que se consume durante la fermentación,

Mediante la técnica de azúcares reductores (DNS), el método de yodo-yoduro y los zimogramas no fue posible detectar la actividad celulolítica, xilanolítica y amilolítica de la microbiota de la masa. Probablemente esto pueda deberse a que durante la nixtamalización, el almidón presenta cambios estructurales (gelatinización parcial, retrogradación y entrecruzamiento) que al formar redes atrapan a las proteínas impidiendo su detección.

## **IX) PROSPECTIVAS**

Caracterizar macroscópicamente y microscópicamente a los hongos y levaduras aislados de esta fermentación.

Realizar la identificación de los microorganismos aislados mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S y 18S

Identificar las bacterias y hongos con mayor actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica y caracterizar sus amilasas, celulasas y xilanasas.

## X) BIBLIOGRAFÍA.

- Alejos, L., Aragón, M., Cornejo, A. (2014). *Extracción y purificación de ADN*. En: Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., Rocha, M. (eds). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), 1-26
- Ampe, F., Ben, O. N., Guyton, J. P. (1999). *Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough*. The Society for Applied Microbiology, 87, 131-140
- Arendt E., Zannini E. (2013). *Maize*. En: *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and nutrition, Number 248, 67-104
- Bajpai Pratima. (2014). *Xylanolytic Enzymes*. Wyman Street, Waltham. Elsevier Inc.
- Ben, Omar., Ampe, F. (2000). *Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol*. Applied and Environmental Microbiology, 66 (9), 3664-3673
- Benítez C.G., Perea, H.P. (2006). *El maíz: origen, composición química y morfológica*. Materiales Avanzados, 7, 15–20
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C. (2003). *Cereal-based fermented foods and beverages*. Food Research International, 36, 527–543
- Boyer, C. D., J. C. Shannon. 1987. *Carbohydrates of the kernel*. En: S. A. Watson., P. E. Ramstad (eds). *Corn: Chemistry and Technology*. The American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, Minnesota U. S. A. 253. 272
- Cañas, A., Barzana, E., Owens, J., Wachter, C. (1993). *La elaboración del pozol en Los Altos de Chiapas*. Ciencia - Academia de la Investigación Científica, 44 (2), 219- 229
- Calderón Villagómez, H., Guzmán Aguirre, S., Iturbe Chiñas, F., Ramírez Orejel J., Sandoval Guillen B. *Banco de protocolos*. UNAM. Facultad de Química, 2013
- Cárdenas, C., Barkla, B.J., Wachter, C., Delgado-Olivares, L., Rodríguez-Sanoja, R. (2014). *Protein extraction method for the proteomic study of a Mexican traditional fermented starchy food*. Journal of Proteomics, 111, 139–47

- Chan Cupul, W., Heredia, G., Rodríguez, R. (2016). *Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del Estado de Veracruz, México*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32 (3) 339-351
- Chao, S.H., Tomii, Y., Watanabe, K., Tsai Y-Ch. (2008). *Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu*. *International Journal of Food Microbiology* 123, 134–141
- Cooper-Bribiesca, B., Navarro-Ocaña, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar-Osorio, G., Rodríguez-Sanoja, R., & Wachter, C. (2018). *Lactic Acid Fermentation of Arabinoxylan From Nejayote by Streptococcus infantarius ssp. infantarius 25124 Isolated From Pozol*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–10.
- Damelin, L. H., Dykes, G. A., von Holy, A. (1995). *Biodiversity of lactic acid bacteria from food-related ecosystems*. *Microbios*, 83, 13-22
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H., Weckx, S. (2014). *Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform?* *Food Microbiology*, 37, 11-29
- Díaz-Ruiz G. (1996). *Metabolismo de carbohidratos de una bacteria láctica aislada del pozol*. Tesis para optar el grado de Maestra en Ciencias de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-135
- Díaz-Ruiz G. (2003). *Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol*. Tesis para optar el grado de Doctora en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-143
- Erlandson, K., Delamarre, S., Batt, C. (2001). *Genetic evidence for a defective xylan degradation pathway in Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4),1445-52
- Escalante, A., Wachter, C., Farrés, A. (2001). *Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 21 – 31
- Fernández-Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz, J., Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. EIMC, 1-52
- Flores. M. (1995). *Caracterización fisiológica de las bacterias lácticas aisladas del pozol*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1-78

- Flores. A. (2007). *Estudio de bacterias lácticas xilanolíticas aisladas del pozol. Identificación por medio de ARDRA*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1-81
- Giraffa G. (2004). *Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation*. FEMS Microbiology Reviews 28: 251-260
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J.M., Sánchez-Sinencio, F. (2004). *Physicochemical changes in the hull of corn grains during their alkaline cooking*. Food Chemistry, 52, 3831–3837
- Gutiérrez, E., Rojas- Molina, I., Pons-Hernández, J., Guzmán, H., Aguas-Angel, B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios-Fonseca, A., Herrera, G., Rodríguez, M. (2006). *Study of Calcium Ion Diffusion in Nixtamalized Quality Protein Maize as a Function of Cooking Temperature*. Cereal Chemistry, 84(2), 186–194
- Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Rojas, A., Arjona, J.L., Cornejo-Villegas, M.A., Zepeda-Benítez, Y., Velázquez-Hernández, R., Ibarra-Alvarado, C., Rodríguez-García, M.E. (2010). *Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process*. Journal of Cereal Science, 51 81–88
- Gutiérrez-Rojas, I., Nubia Moreno, N., Montoya, D. (2015). *Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos*. Revista Iberoamericana de Micología, 32(1), 1–12
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater B. (1992). *Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology*. Molecular Ecology (Mini-Review), 1, 55-63
- Hernández-Medina, M., Torruco, J., Chel, L., Betancur, D. (2008). *Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México*. Ciencia e Tecnología de Alimentos, Campinas, 28 (3), 718-726
- Hernández-Mejía, N. (2007). *Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Químico de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1-134
- Huey, B., Hall, J. (1989). *Hypervariable DNA Fingerprinting in Escherichia coli: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13*. Journal of Bacteriology, 171 (5), 2528-2532
- Ibrahim, A., Mohammad, B., Haseeb, K., Ahmad, Al Farhan., Ali, Al.H., Al Homaidan, B., Mohammad, Al. S., Mohammad, S. (2010). *A Brief Review of Molecular*

*Techniques to Assess Plant Diversity* . International Journal of Molecular Sciences, 11, 2079-2096

- Koehler, P., Wieser, H. (2013). *Chemistry of Cereal Grains. En: Gobbetti, M; Gänzle, M (eds). Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 11-46
- Kohajdová, Z., Karovičová, J. (2007). *Fermentation of cereals for specific purpose*. Journal of Food and Nutrition Research, 46 (2), 51-57
- Kaur, J., Lee, S., Park, Y-S., Sharma, A. (2017). *RAPD analysis of Leuconostoc mesenteroides strains associated with vegetables and food products from Korea*. Food Science and Technology, 7, 383 - 388
- Kumar, M., Turner, S. (2015). *Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms*. Phytochemistry, 112, 91–99
- Lacerda, C., Freitas, R. (2017). *Technological and nutritional aspects of indigenous Latin America fermented foods*. Current Opinion in Food Science, 13, 97–102
- Lacks, S. A., Springhorn, S., (1980). *Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecil sulfate*. Journal of Biological Chemistry. 255: 7467-7473
- Leiva C. (2018). *Aproximación proteómica a la fermentación del pozol*. Tesis para optar el grado de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1-78
- Loaeza. N. (1991). *Efecto de la nixtamalización en la fermentación del pozol*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1-96
- López-Hernández, M., Rodríguez-Alegría, M., López-Munguía, A., Wachter, C. (2018). *Evaluation of xylan as carbon for Weissella spp., a predominant strain in pozol fermentation*. Food Science and Technology, 89, 192-197
- Malfliet, S., Justé, A., Crauwels, S., Willems, K., De Cooman, L., Lievens, B., Aerts, G. (2013). *Assessing the xylanolytic bacterial diversity during the malting process*. Food Microbiology, 36, 406-415
- Magallanes-Cruz, P., Flores-Silva, P., Bello-Perez, L. (2017). *Starch Structure Influences Its Digestibility: A Review*. Journal of Food Science, 82 (9), 2016-2023
- Miller, L. G., (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry, 31, 426-428.

- Morlon-Guyot, J., Guyot, JP., Pot, B., Jacobe de Haut, I., Raimbault, M. (1998). *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 1101-1109.
- Morlon-Guyot J., Mucciolo-Roux, F., Rodríguez-Sanoja, R., Guyot, JP. (2001). *Characterization of the L. manihotivorans a-amylase gene*. *DNA Sequence*, 12, (1), 27-37.
- Nielsen S. (2003) *Food Analysis Laboratory Manual*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Nirmal, K., Krishna, M., Samsudeen, Minoo, Suraby, Anupama, K; Ritto, P. (2014). *Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques*. En: Besse P (ed). *Molecular Plant Taxonomy*. Humana Press. 191-210
- Nuraida, L., Wachter, C., Owens, D. (1995). *Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 567-571
- Nielsen, S., *Food Analysis*. Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1998
- Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., Takano, M. (1995). *Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda", and its amylolytic enzyme*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (2),124-130
- Okeke, B., Hall, R., Nanjundaswamy, A., Sue Thomson, M., Deravi, Y., Sawyer, L., Prescott, A. (2015). *Selection and molecular characterization of cellulolytic–xylanolytic fungi from surface soil-biomass mixtures from Black Belt sites*. *Microbiological Research*, 175, 24–33
- Paredes, L. O., Guevara, L. F., Bello, P. L. (2008). *La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz*. *Ciencias*, 92, 60-70
- Power, E. (1996). *RAPD typing in microbiology-a technical review*. *Journal of Hospital Infection*, 34, 247-265
- Rizo, J. (2012). *Enzimas amilolíticas del pozol. Aproximación Proteómica*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1-88

- Rizo, J. (2015). *Estudio proteómico de las hidrolasas del pozol*. Tesis para optar por el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1-115
- Rodríguez, R (1991). *Influencia de diferentes sustratos como inductores o represores del sistema celulolítico de Cellulomonas flavigena*. *Proteómica*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Biología . Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1-89
- Roldan, A., Berruecos, J., Arredondo, R., Valencia, J. (2014). *Uso del método RAPD en la detección de polimorfismos genéticos en ovinos*. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 31, 467-492
- Sanni, A., Morlon-Guyot, J., Guyot, JP. (2002). *New efficient amylase producing strains of Lactobacillus plantarum and L. fermentum isolated from different Nigerian traditional fermented foods*. *International Journal of Food Microbiology*, 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 para optar el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Schillinger, U., Yousif, N., Sesar, L., Franz, C. (2003). *Use of Group-Specific and RAPD-PCR Analyses for Rapid Differentiation of Lactobacillus Strains from Probiotic Yogurts*. *Current Microbiology* Vol. 47, pp. 453–456
- Steinkraus, K.(ed.) (1995). *Handbook of Indigenous Fermented Foods* 2d ed. USA. p. 776
- Steinkraus, K.H. (2002). *Fermentations in World Food Processing*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 1, 23-32
- Singh, N., Kaur, A., Shevkani, K.(2014). *Maize: Grain Structure, Composition, Milling, and Starch Characteristics*. *En: Chaudhary et al. (eds.), Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Springer India, 65-76
- Suhas., Gupta, V.K., Carrott, P.J.M., Singh, R., Chaudhary, M., Kushwaha, S. (2016). *Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent*. *Bioresource Technology*, 216, 1066-1076
- Teather, R., Wood, P. (1982). *Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (4), 777-780
- Ulloa, M. (1974). *Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 8, 17-48.

- Ulloa, M., Herrera, T. (1984) *Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache*. Anales del Instituto de Biología. UNAM, (53), 145-163
- Villéger, R., Cachon, R., Urdaci, M. (2017). *Fermented Foods. Microbiology, Biochemistry and Biotechnology*. En: Ray, C., Montet, D (eds). *Fermented Foods. Part II: Technological Interventions*. CRC Press. Taylor & Francis Group.1-20
- Wachter, C., Cañas, A., Cook, P.E., Barzana, E., Owens, J.D.(1993). *Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 269-274
- Wachter, C. (1995). *Estudios sobre la microbiología del pozol*. Tesis para optar el grado de Doctora en Ciencias Químicas (alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1-194
- Wachter, C. (1999). *El pozol*. Cuadernos de nutrición. 22 (3), 125-27
- Wachter, C., Cañas, A., Barzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., Owens J. D. (2000). *Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentation*. Food Microbiology, 17, 252-256
- Zárate, P., Jiménez, C., Badillo, J., Garibay, C., Oliver, M. (2009). *Manual del laboratorio de Biotecnología Molecular*. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Departamento de Bioprocesos. Academia de Biotecnología.

XI) ANEXO 1

A) *Medios de cultivo.*

a) Medio MRS.

<b>Producto</b>	<b>Cantidad g/L</b>
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Fuente de carbono	0.5
Citrato de amonio	2.17
Acetato de sodio tri-hidratado	5
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	0.207
Sulfato de manganeso	0.056
Fosfato de potasio dibásico	2.62

b) Medio mínimo.

<b>Producto</b>	<b>Cantidad g/ 100 ml</b>
Fosfato dibásico de potasio	0.7
Fosfato monobásico de potasio	0.3
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	0.01
Peptona de caseína	0.5
Fuente de carbono	5

c) Medio selectivo para hongos y levaduras.

<b>Producto</b>	<b>Cantidad g/L</b>
Fosfato monobásico de potasio	2
Sulfato de amonio	1.2
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	0.5
Cloruro de calcio	0.1
Sulfato ferroso hepta-hidratado	0.003
Extracto de levadura	0.2
Fuente de carbono.	0.5
Cloranfenicol: 34 mg/ml	

*B) Determinación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico.*

Este método se basa en la destrucción de los carbohidratos por calor y ácido a temperaturas altas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continua el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que se condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos oscuros o coloridos productos de la condensación de compuestos fenólicos (Nielsen, 1998).

a) Curva de glucosa.

Se partió de una concentración de 1 mg/ml de glucosa (J.T. Baker) en 10 ml de agua destilada. La curva de calibración se preparó de acuerdo a la Tabla siguiente:

Tabla 1 . Curva de calibración a partir de glucosa para la determinación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico.

<b>Concentración de glucosa (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Stock de glucosa (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Volumen de agua (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
10	5	495
20	10	490
30	15	485
40	20	480
<b>50</b>	25	475

A cada tubo se le agregó 300 µl de fenol al 5%, se mezcló perfectamente y después se adicionó 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se homogeneizaron en vórtex y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la absorbancia a 480 nm frente a un blanco de reactivos.

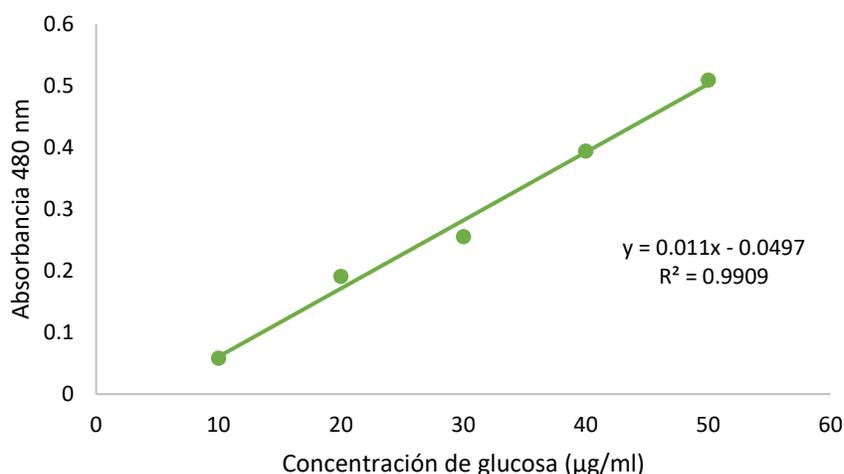


Figura 1. Curva de calibración a partir de glucosa para la determinación de carbohidratos solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico.

### C) Determinación de carbohidratos reductores por el método de DNS.

La determinación de carbohidratos reductores se realizó mediante el método de Miller (1959), el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicilato cuando la temperatura se eleva en medio básico. El producto de la reacción es de color naranja-amarillento y posee un máximo de absorbancia a 575 nm.

#### a) Curva de glucosa.

Se partió de una concentración de 1mg/ml de glucosa (J.T. Baker) en 10 ml de agua destilada. La curva de calibración se preparó de acuerdo a la siguiente Tabla:

Tabla 2. Curva de calibración a partir de glucosa para la determinación de carbohidratos reductores por el método de DNS.

<b>Concentración de glucosa (mg/ml)</b>	<b>Stock de glucosa (μl)</b>	<b>Volumen de agua (μl)</b>
0.1	10	90
0.2	20	80
0.4	40	60
0.8	80	20
1	100	-

A cada tubo se le agregó 100 μl de reactivo DNS y se agitaron en vórtex. Los tubos se hirvieron por 10 minutos en un baño de agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 1ml con agua destilada, para ser leídos a 550nm.

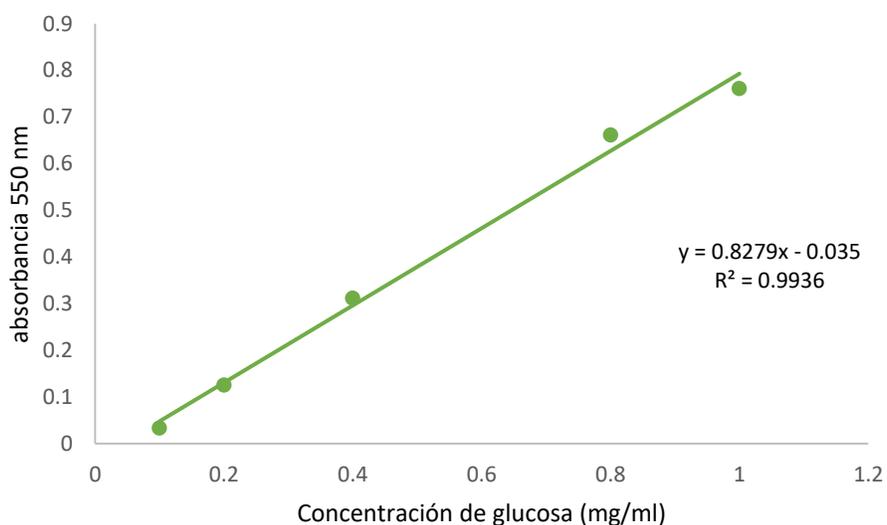


Figura 2. Curva de calibración a partir de glucosa para la determinación de carbohidratos reductores por el método de DNS.

D) *Determinación de actividad amilolítica, xilanolítica y celulolítica in vitro.*

- *Método de azúcares reductores (DNS).*

a) *Curva de glucosa.*

Se partió de una concentración de 1mg/ml de glucosa (J.T. Baker) en 10 ml de agua destilada. La curva estándar se preparó de acuerdo a la siguiente Tabla:

Tabla 3. Curva de calibración a partir de glucosa para determinar la actividad amilolítica *in vitro* por el método de DNS.

<b>Concentración de glucosa (μmol/ml)</b>	<b>Stock de glucosa (μl)</b>	<b>Volumen de agua (μl)</b>
0.556	10	90
1.111	20	80
2.222	40	60
4.444	80	20
5.556	100	-

A cada tubo se le agregó 100 μl de reactivo DNS y se agitaron en vórtex. Los tubos se hirvieron por 10 minutos en un baño de agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 1ml con agua destilada, para ser leídos a 550nm.

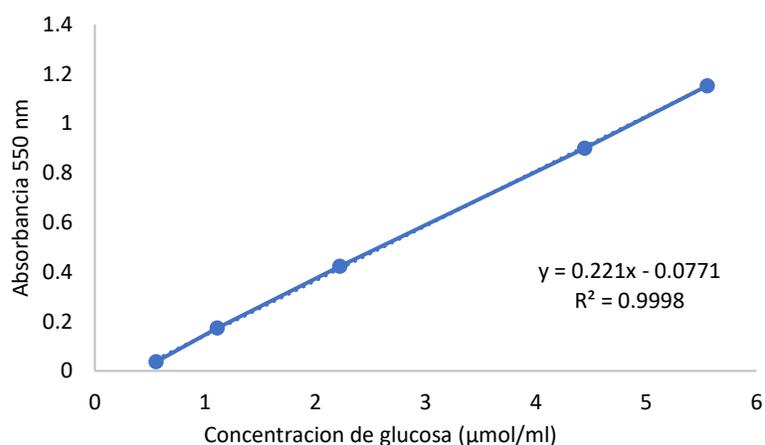


Figura 3. Curva de calibración a partir de glucosa para la determinación de actividad amilolítica por el método de azúcares reductores con DNS.

La actividad amilolítica se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcares reductores por mililitro por minuto (Rizo, 2012).

b) Curva de xilosa.

Se partió de una concentración de 1 mg/ml de xilosa (SIGMA) en 10 ml de agua destilada. La curva estándar de preparo de acuerdo a la siguiente Tabla:

Tabla 4. Curva de calibración a partir de xilosa para determinar la actividad xilanolítica *in vitro* por el método de DNS

Concentración de xilosa (μmol/ml)	Stock de xilosa (μl)	Volumen de agua (μl)
0.666	10	90
1.332	20	80
2.664	40	60
5.239	80	20
6.661	100	-

A cada tubo se le agregó 100 μl de reactivo DNS y se agitaron en vórtex. Los tubos se hirvieron por 10 minutos en un baño de agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 1 ml con agua destilada, para ser leídos a 550 nm.

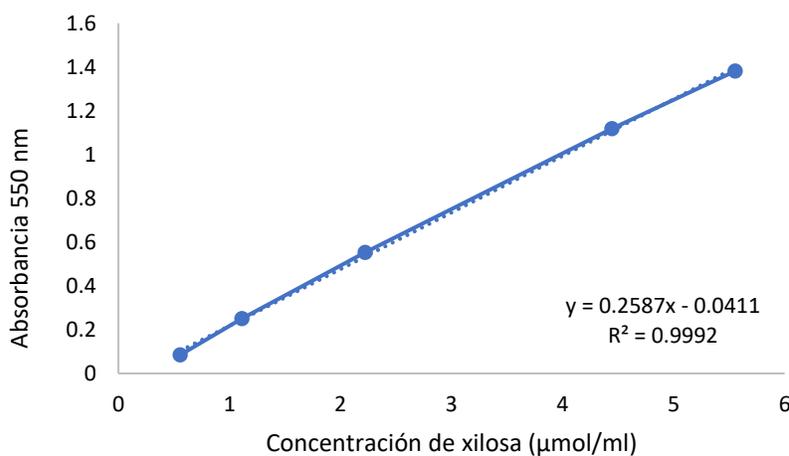


Figura 4. Curva de calibración a partir de xilosa para la determinación de actividad xilanolítica por el método de azúcares reductores con DNS.

La actividad xilanolítica se define como  $\mu\text{mol}$  de xilosa liberada por mililitro por minuto (Rodríguez, 1991).

c) Curva de celobiosa.

Se partió de una concentración de 1mg/ml de celobiosa (MERCK) en 10 ml de agua destilada. La curva estándar se preparó de acuerdo a la siguiente Tabla.

Tabla 5. Curva de calibración a partir de celobiosa para determinar la actividad celulolítica *in vitro* por el método de DNS

Concentración de celobiosa (mg/ml)	Stock de celobiosa ( $\mu\text{l}$ )	Volumen de agua ( $\mu\text{l}$ )
0.292	10	90
0.585	20	80
1.170	40	60
2.339	80	20
2.924	100	-

A cada tubo se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de reactivo DNS y se agitaron en vórtex. Los tubos se hirvieron por 10 minutos en un baño de agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 1ml con agua destilada, para ser leídos a 550nm.

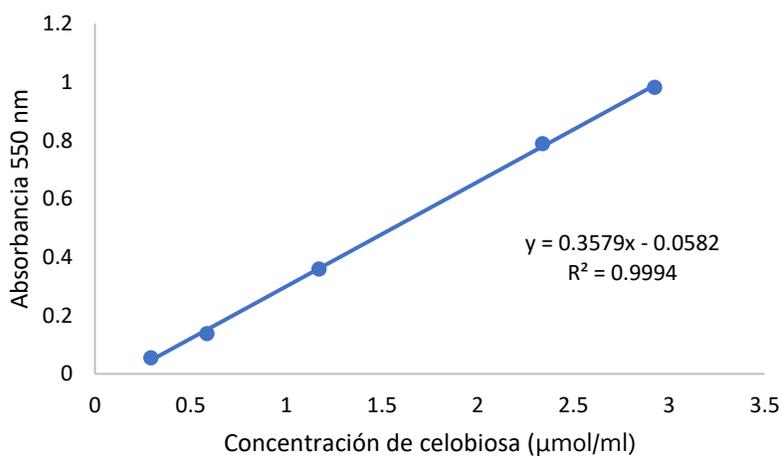


Figura 5. Curva de calibración a partir de celobiosa para la determinación de actividad celulolítica por el método de azúcares reductores con DNS.

La actividad celulolítica se define como  $\mu\text{mol}$  de celobiosa liberada por mililitro por minuto (Rodríguez, 1991)

- Método de yodo- yoduro (solo en el caso de la actividad amilolítica).

El almidón reacciona químicamente con el yodo para producir un color azul oscuro cuando las moléculas de yodo se insertan en los huecos de la espiral de la molécula de la amilosa. Si el almidón se hidroliza en maltosa y glucosa no se desarrolla ningún color debido a que desaparece la espiral. Esta ausencia de color es asociada con la hidrólisis del almidón.

a) Curva de almidón.

Se partió a partir de una concentración de 6 mg/ml de almidón soluble de papa (Panreac) en buffer citrato-fosfato pH 5.

Tabla 6. Curva de calibración a partir de almidón soluble para determinar la actividad amilolítica por el método de yodo-yoduro.

<b>Tubo</b>	<b>Concentración de almidón mg/ml</b>	<b>Buffer citrato-fosfato pH 5 (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Stock de almidón (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
1	0.54	91	9
2	0.96	84	16
3	1.92	68	32
4	2.88	52	48
5	3.84	36	64
6	4.80	20	80
7	6.0	-	100

A cada tubo se le agregó 2.4 ml de yodo-yoduro 4%. La boca del tubo se cubrió con parafilm y se agitó en vórtex hasta tener una mezcla homogénea. Finalmente, la absorbancia se midió a 620 nm.

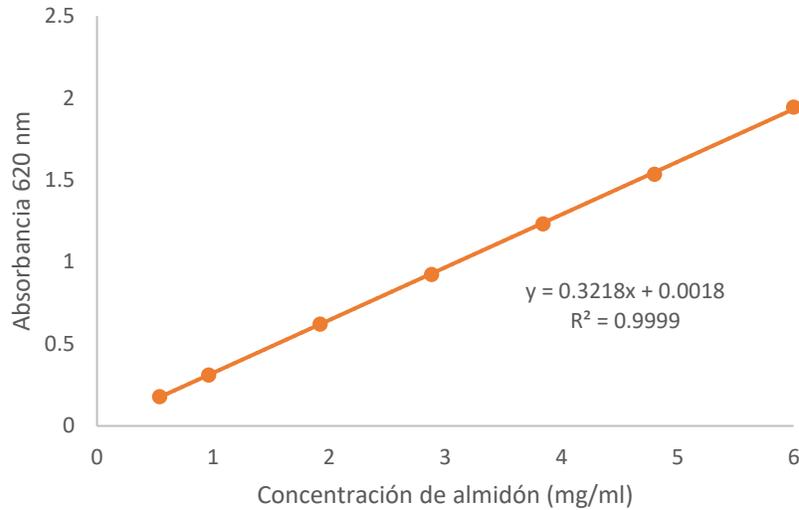


Figura 6. Curva de calibración a partir de almidón soluble para la determinación de actividad amilolítica por el método de yodo-yoduro.

La actividad se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\frac{DO\ blanco - DO\ muestra * \frac{1}{P} * T}{10\ minutos}}{m}$$

Donde:

1/P: es el inverso de la pendiente de la curva estándar de almidón

T: 30 minutos

m: 0.48 g de almidón

Una unidad de enzima está definida como la cantidad de enzima que permite la hidrólisis de 10mg de almidón en 30 minutos (Lacks et al., 1980).

#### E) Determinación de actividad amilolítica, celulolítica y xilanolítica en la masa.

En este sistema las proteínas se solubilizan en el buffer de carga (H<sub>2</sub>O bidestilada, 10% Glicerol, 10 %SDS, 5% 2-Mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). El detergente SDS se une a las proteínas proporcionándoles carga negativa, por lo cual migran del polo

negativo que se encuentra en la superficie del buffer al polo positivo, en la parte inferior del sistema, evitando la formación de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas. El 2-Mercaptoetanol (2-ME) presente reduce los puentes disulfuro. La mezcla se lleva a ebullición a 95°C durante 5 minutos para permitir la completa desnaturalización de las proteínas.

#### F) Extracción de DNA genómico (Alejos et al., 2014).

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de DNA y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El DNA está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal.

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al DNA una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al DNA en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el DNA precipite (Sambrook et al., 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del DNA le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nasón 1965, Travaglini 1973, Sambrook et al., 1989, Sinden 1994).

En las preparaciones, son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobrestimaciones de la concentración de ácidos nucleicos. El máximo de absorbancia de las proteínas se encuentra en  $\lambda \sim 280 \text{ nm}$ , por lo que es posible estimar el grado de impurezas a partir del cociente  $A_{260}/A_{280}$ . La presencia de proteínas en la muestra hará que el cociente  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280}$  sea menor que el esperado para ácidos nucleicos puros.

Para el DNA doble hebra en soluciones de alta pureza se espera  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ , y para ARN,  $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ .

Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos, sales caotrópicas o fenol.

- Soluciones para extracción de ADN genómico

<b>Buffer TE</b>
(Tris-HCL 1M/ EDTA 0.5 M pH 8)
1000 ml Tris-HCL 1M
200 $\mu$ l EDTA 0.5 M

<b>Solución TEN</b>
0.1 M NaCl
10 mM Tris-HCL pH 8
1 mM EDTA 0.5 M (pH 8)

<b>Buffer TAE 50X (1L)</b>
Tris base (242 g, 40 mM)
Ácido acético glacial (57.1 ml, 20 mM)
EDTA 0.5 M, pH 8 (100 ml, 1 mM)
H <sub>2</sub> O (Aforo hasta 1 L)

<b>Buffer de carga 6X para DNA</b>
0.25% azul de bromofenol
0.25% cianol FF de xileno (a 4°C)
30% glicerol

#### G) Detección de actividad celulolítica y xilanolítica con rojo congo.

- 1.- Cubrir la placa con reactivo rojo congo 0.1%. Agitar cinco minutos y posteriormente quitar el excedente.
- 2.- Añadir NaCl 1M a la placa y agitar por cinco minutos. Quitar el excedente.
- 3.- Añadir ácido acético glacial 1% y agitar por cinco minutos. Quitar el excedente.
- 4.- Observar a contraluz y registrar observaciones. Un halo de hidrólisis se considera como actividad positiva.

#### H) RAPD (Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico).

El método de Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico propone la utilización de cebadores arbitrarios para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma mediante la técnica de PCR. Se ha utilizado ampliamente para la identificación genética de distintas especies, debido a que esta técnica es simple, rápida y permite el análisis de un gran número de marcadores genéticos, utilizando pequeñas cantidades de DNA, sin el requerimiento de la clonación, secuenciación o alguna otra forma de caracterización del genoma (Roldan et al., 2014).

El RAPD emplea un único cebador, corto y de secuencia arbitraria, generalmente de 10pb con una composición entre 50 y 80% de Guanina-Citosina y sin secuencias palindrómicas. En la etapa de alineamiento, el cebador se alinea con la secuencia complementaria presente en el DNA molde, pero es necesario que otro iniciador con la misma secuencia arbitraria se alinee con la cadena opuesta en una orientación y distancia adecuada (la máxima distancia de inserción entre los dos iniciadores debe ser igual o menor a las 2,500 pb) para que un fragmento sea amplificado.

Se utilizan ciclos de hibridación del cebador a baja temperatura para amplificar un conjunto de fragmentos genómicos. Al utilizar bajas temperaturas de alineamiento se espera que el cebador se alinee en una gran cantidad de lugares en la cadena de DNA, permitiendo amplificar un número de fragmentos (1 a 10 o más), durante la misma reacción.

Tras la amplificación, los fragmentos se separan por su tamaño mediante electroforesis en gel. De esta forma, en cada PCR se amplifica un conjunto de fragmentos distribuidos aleatoriamente por el genoma del individuo analizado. La separación mediante electroforesis genera un patrón multibanda, característico. Si entre dos individuos existe polimorfismo, es decir variación en la secuencia, en alguna de las zonas de unión del cebador empleado, este polimorfismo puede resultar en un fallo de amplificación de alguno de los fragmentos y producir un patrón multibanda diferente entre ambos individuos. También las inserciones y deleciones entre sitios de unión del cebador resultan en la amplificación de fragmentos de tamaño diferencial (Nirmal et al., 2014).

El número, reproducibilidad e intensidad de las bandas puede verse afectado por algunos parámetros tales como la concentración de DNA, la temperatura de alineamiento, la longitud y secuencia del cebador y la concentración de sales. Cada cebador de longitud idéntica

pero de distinta secuencia, presenta un patrón de bandeo diferente en el mismo DNA. (Roldan et al., 2014).

- Descripción de primer M13b

El primer M13b (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3') utilizado en esta técnica, procede del genoma del bacteriófago M13. Se ha observado que las sondas de DNA derivadas de las regiones de M13 desde las bases 1833 a 1894 y desde las bases 2283 a 2401 detectan secuencias de minisatelites hipervariables en seres humanos y otros organismos. Estas regiones son parte de la proteína de cubierta del gen III M13 y contienen 4 y 9 copias, respectivamente, de una repetición de 15 pares de bases, esto hace posible que el uso de la secuencia de repetición en tándem permita la detección de una variación considerable de distintas cepas (Huey et al., 1989).

## ANEXO 2.

Las colonias aisladas, seleccionadas con base a su capacidad celulolítica, xilanolítica y amilolítica se codificaron de acuerdo a la nomenclatura siguiente:

**Numero de colonia. Tiempo de fermentación. Tipo de medio utilizado. Fuente de carbono**

<i>Tipo de medio utilizado:</i>
1: Medio mínimo
2: Medio MRS

<i>Tipo de fuente de carbono:</i>
1: Almidón
2: Xilano
3: Carboximetilcelulosa

Ejemplo: 5.0.2.1; Donde:

5: Numero de colonia: 5

0: Tiempo de fermentación: 0 horas

2: Tipo de medio utilizado: Medio MRS

1: Fuente de carbono utilizado: Almidón

Aquellos aislados que conservaron la actividad glucósido-hidrolasa aun después del almacenamiento, se clasificaron en grupos morfotipo. En las tablas siguientes se presentan los diferentes grupos obtenidos para cada sustrato en donde se señala los aislados que conforman cada uno de estos.

Tabla 1. Grupos morfotipos obtenidos de los aislados con actividad amilolítica.

Grupo	Aislados que presentan características similares con base a sus características macroscópicas y microscópicas.
A1	5.0.2.1; 7.0.2.1; 22.9.2.1; 23.9.2.1; 25.9.2.1; 5.48.2.1; 6.48.2.1; 9.48.2.1
A2	8.24.2.1
A3	11.24.2.1
A4	9.24.2.1
A5	3.0.1.1
A6	4.0.1.1; 10.0.1.1
A7	2.9.1.1
A8	7.9.1.1

<b>A9</b>	<b>6.24.1.1</b>
<b>A10</b>	<b>7.24.1.1</b>

Tabla 2. Grupos morfotipos obtenidos de los aislados con actividad celulolítica.

<b>Grupo</b>	<b>Aislados que presentan características similares con base a sus características macroscópicas y microscópicas.</b>
<b>C1</b>	<b>2.0.2.3</b>
<b>C2</b>	<b>3.0.2.3</b>
<b>C3</b>	<b>5.0.2.3</b>
<b>C4</b>	<b>6.0.2.3</b>
<b>C5</b>	<b>9.0.2.3; 2.9.2.3; 4.24.2.3</b>
<b>C6</b>	<b>3.9.2.3; 1.0.1.3; 2.48.1.3</b>
<b>C7</b>	<b>19.24.2.3; 20.24.2.3</b>
<b>C8</b>	<b>22.24.2.3; 2.24.2.3; 2.48.2.3</b>
<b>C9</b>	<b>10.9.1.3</b>
<b>C10</b>	<b>1.48.1.3</b>

Tabla 3. Grupos morfotipos obtenidos de los aislados con actividad xilanolítica.

<b>Grupo</b>	<b>Aislados que presentan características similares con base a sus características macroscópicas y microscópicas.</b>
<b>X1</b>	<b>2.0.2.2; 3.9.2.2; 6.9.2.2</b>
<b>X2</b>	<b>3.0.2.2</b>
<b>X3</b>	<b>4.0.2.2</b>
<b>X4</b>	<b>2.9.2.2; 7.9.2.2</b>
<b>X5</b>	<b>4.9.2.2</b>
<b>X6</b>	<b>9.9.2.2</b>
<b>X7</b>	<b>3.24.2.2; 1.48.2.2</b>
<b>X8</b>	<b>5.24.2.2</b>
<b>X9</b>	<b>3.48.1.2</b>