



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE LAS CEPAS
DE ENTEROCOCCUS AISLADAS DE POZOL**

TESIS

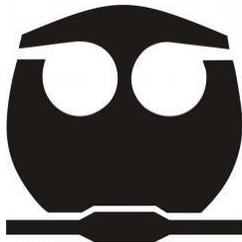
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ALDO ARIEL MINGUER URIBE

Director: Gloria Díaz Ruíz

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2024





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:

Presidente	Dra. Díaz Ruíz Gloria
Vocal	Dr. Ruíz Terán Francisco
Secretario	Lic. Mina Cetina Aleida
Suplente 1	Mtra. Cruces Martínez Ana Lilia
Suplente 2	Dr. Hernández Pérez Hugo Antonio

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 324, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Díaz Ruíz Gloria

SUPERVISOR TÉCNICO

Rodríguez Saavedra Carolina

SUSTENTANTE

Minguer Uribe Aldo Ariel

RECONOCIMIENTO

A la Facultad de Química, UNAM, por el apoyo con el proyecto PAIP 5000-9099.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de haber estudiado en la máxima casa de estudios, en mi alma mater, la Facultad de Química.

A mis padres, por su apoyo, confianza y amor incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. A mi hermano Alan por haberme guiado y asesorado en este camino

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por su distinguida ayuda, dedicación, tutoría e invitación para llevar a cabo este proyecto.

A la Lic. Aleida Mina Cetina, al Dr. Francisco Ruiz Teran y a la Mtra. Carolina Rodríguez Saavedra por compartir su tiempo, conocimientos e ideas en la realización de este trabajo.

A la facultad por haberme presentado a personas extraordinarias con las cuales compartí inolvidables momentos a lo largo de la carrera: Gaia, Jonathan, Betty, Gisel, Noemi, Andy; y a los que me acompañaron durante este viaje: Cynthia, Consuelo, Paulina, y sobretodo, gratitud a los que ya no están: Teodoro, amigo, te llevo en cada logro. Gracias a todos.



ÍNDICE

Índice de Figuras y tablas.....	8
Resumen.....	16
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares.....	12

Antecedentes

1. Antecedentes históricos.....	18
2. Alimentos fermentados.....	18
3. Pozol.....	20
3.1. Proceso de nixtamalización.....	20
3.2. Nixtamalización.....	20
3.3. Beneficios.....	21
3.4. Microbiología del pozol.....	21
4. Almidón.....	23
4.1.Generalidades.....	23
4.2. Almidón durante la nixtamalización.....	24
5. Enzimas.....	24
5.1.Hidrólisis enzimática.....	25
5.1.1. Enzimas amilolíticas.....	25
5.1.2. Endoenzimas.....	26
5.1.2.1. α -amilasa.....	26
5.1.3. Exoenzimas.....	27
5.1.3.1.Glucoamilasa.....	27
5.1.3.2. β -amilasa.....	27
5.1.4. Enzimas desramificantes.....	28
5.1.4.1. Pululanasa.....	28
5.1.4.2. Isoamilasa.....	28
6. Bacterias ácido lácticas.....	29
6.1.Generalidades de bacterias ácido lácticas.....	29

6.2. Clasificación.....	29
7. <i>Enterococcus</i>	30
7.1. Clasificación del género <i>Enterococcus</i>	31
7.2. Metabolismo de <i>Enterococcus</i>	31
7.3. Importancia del género <i>Enterococcus</i> en alimentos.....	31
 Materiales y métodos	
1. Reactivación de las cepas de <i>Enterococcus</i> previamente aisladas de pozol.....	33
2. Crecimiento de las cepas de <i>Enterococcus</i> en medio MRS/almidón 2%.....	34
3. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de extinción del yodo y DNS.....	35
4. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Enterococcus</i> en diferentes medios con carbohidratos.....	36
5. Separación de proteínas por medio de geles de acrilamida con ayuda de las tinciones de Coomasie y zimograma.....	37
 Resultados y discusión	
1. Reactivación de las cepas de <i>Enterococcus</i> previamente aisladas de pozol.....	43
2. Crecimiento de las cepas de <i>Enterococcus</i> en medio MRS/almidón 2%.....	44
3.1. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de extinción de yodo.....	51
3.2. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de reducción de azúcares por el método de DNS.....	53
4. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Enterococcus</i> en diferentes medios con carbohidratos.....	56
4.1 Evaluaciones de la actividad amilolítica extra e intracelular proveniente de fermentaciones, método de extinción del yodo.....	60
5. Electroforesis en gel de acrilamida para observación de la presencia de la enzima dentro y fuera de la célula.....	65
Conclusiones.....	71

Lista de abreviaturas.....	72
Anexo 1. Composición del medio MRS. Medios modificados con almidón y maltosa	73
Anexo 2. Curvas patrón usadas para cuantificación de sustratos por métodos fisicoquímicos (DNS y extinción de yodo).....	75
Anexo 3. Tablas correspondientes a la cinética de crecimiento de la cepa de <i>Enterococcus</i> en medios MRS con diferentes carbohidratos.....	78
Bibliografía.....	83

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Productos de la vía fermentativa de hexosas por bacterias ácido lácticas. (Waldir et. al., 2007)

Figura 2. Método usado para la reactivación de cepas de *Enterococcus sulfureus* A36202, *Enterococcus italicus* A17 y A40, previamente aisladas de pozol, en medios MRS y verificación de pureza. Creado con Biorrender.com

Figura 3. Método usado para la reactivación de cepas de *Enterococcus sulfureus* A36202, *Enterococcus italicus* A17 y A40, previamente aisladas de pozol, en medio MRS modificado con maltosa, almidón de papa y de maíz. Revelación con lugol. Creado con Biorrender.com

Figura 4. Método de DNS y extinción de yodo para determinar si la enzima amilasa es liberada al medio o se encuentra asociada a la célula por las cepas de *Enterococcus*. Creado con Biorrender.com

Figura 5. Esquema de fermentaciones de las cepas de *Enterococcus* en medios MRS modificados con diferentes carbohidratos. Creado con Biorrender.com

Figura 6. Método usado para la separación de proteínas por medio de geles de acrilamida para la observación de la enzima presente en el medio de caldos con medio MRS inoculados con cepas de *Enterococcus* A36202, A17 y A140. Creado con Biorrender.com

Figura 7. Comparación microscópica de la cepa *Streptococcus infantarius* 25124 (a) y la cepa *Enterococcus italicus* A17 (b) por medio de una tinción de Gram.

Figura 9. Halos de hidrólisis de almidón revelados con lugol en placas MRS/almidón al 2% de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus*, provenientes de la siembra en caldo MRS/almidón al 2%.

Figura 10. Comparación del crecimiento de la cepa 25124 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

Figura 11. Comparación de la reducción de los valores de pH durante la fermentación de la cepa 25124 en medio MRS con diferentes carbohidratos.

Figura 12. Comparación del crecimiento de la cepa A17 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

Figura 13. Comparación de la reducción de los valores de pH durante el crecimiento de la cepa A17 en medio MRS con diferentes carbohidratos

Figura 14. Comparación del crecimiento de la cepa A36202 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

Figura 15. Comparación de la reducción de los valores de pH durante el crecimiento de la cepa A36202 en medio MRS con diferentes carbohidratos

Figura 16. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. italius* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 17. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *S. infantarius* a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 18 Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 19. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 20. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 21. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Figura 22. Zimograma de actividad amilolítica de la cepa *Enterococcus sulfureus* A36202. Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. α : α amilasa. Sn1: Sobrenadante 1 de cepa A36, Sn2: Sobrenadante 2 de cepa A36, TCA1: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 1. TCA2: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 2.

Figura 23. Zimograma de actividad amilolítica de la cepa *Enterococcus sulfureus* A36202. Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. α : α amilasa. Sn1: Sobrenadante 1 de cepa A36, Sn2: Sobrenadante 2 de cepa A36, TCA1: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 1. TCA2: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 2.

Figura 24. Zimograma de actividad amilolítica sobrenadante y células de las cepas *E. sulfureus* A36202, *E. italicus* A17 y *E. italicus* A17. Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. PM: Marcador de peso molecular, α : α amilasa. SnA36: Sobrenadante de cepa A36, CA36: Concentrado de células de cepa A36, SnA17: Sobrenadante de cepa A17, CA17: Concentrado de células de cepa A17, SnA40: Sobrenadante de cepa A40, CA40: Concentrado de células de cepa A40

Figura 25. Gel obtenido para Coomassie para el sobrenadante y células de las cepas *E. sulfureus* A36202, *E. italicus* A17 y *E. italicus* A17 PM: Marcador de peso molecular, α : α amilasa. SnA36: Sobrenadante de cepa A36, CA36: Concentrado de células de cepa A36, SnA17 Sobrenadante de cepa A17, CA17: Concentrado de células de cepa A17, SnA40 Sobrenadante de cepa A40, CA40: Concentrado de células de cepa A40

Tabla 1. Concentración de bacterias en función del pH y del tiempo de fermentación (Díaz-Ruíz et al., 2003)

Tabla 2. Preparación de gel separador al 10% y gel concentrador al 4.0%

Tabla 3. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24 horas

Tabla 4. Observaciones macroscópicas de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) en placas MRS a las 24 horas a 37° C

Tabla 5. Observaciones microscópicas de los cultivos de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) en placas MRS incubadas a 37° C por 24 horas.

Tabla 6. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón de papa 2%, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24, 48 y 72 horas

Tabla 8. Observaciones macroscópicas de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS y MRS/almidón 2% en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C

Tabla 9. Observaciones macroscópicas de las colonias de cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS y MRS/almidón 2% en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C. Se reveló con lugol

Tabla 10. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón 2% de papa y MRS/maltosa 2%, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24 y 48 horas

Tabla 11. Observaciones macroscópicas de las siembras de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldo MRS/maltosa 2% en placas MRS/almidón de papa 2% y almidón de maíz 2% respectivamente a las 24 horas a 37° C

Tabla 12. Observaciones macroscópicas de las colonias de cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS y MRS/almidón 2% en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C. Se reveló con lugol

Tabla 13. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón 2% y MRS/maltosa 2%, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 48 horas

Tabla 14. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/maltosa 2%.

Tabla 15. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/almidón 2%

Tabla 16. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/maltosa 2%

Tabla 17. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/almidón 2%

Tabla 18. Resultados de la actividad amilolítica de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Tabla 19. Resultados de la actividad amilolítica de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/almidón 2% por el método de DNS.

Tabla 20. Resultados de la actividad amilolítica asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Tabla 21. Resultados de la actividad amilolítica asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Tabla 22. Composición del medio MRS (caldo y agar)

Tabla 23. Composición del medio MRS modificado con almidón (caldo y agar).

Tabla 24. Composición de caldo MRS modificado con maltosa

Tabla 25. Resultados obtenidos para la elaboración de la curva patrón para el método de DNS (Nielsen, 2003) a partir de una solución stock de dextrosa [20mg/ml]

Tabla 26. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tabla 27. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tabla 28. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS.

Tabla 29. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tabla 30. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tabla 31. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS

Tabla 32. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tabla 33. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tabla 34. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS.

Tabla 35. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempo (0, 3, 6, 9 y 24 horas) s en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tabla 36. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tabla 37. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tabla 38. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *E. italiucs* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tabla 39. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tabla 40. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

RESUMEN

El pozol es una bebida ácida, no alcohólica que se obtiene de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado, donde la fermentación es llevada a cabo gracias a la ayuda de microorganismos como mohos, levaduras y bacterias. Durante el proceso de elaboración de pozol, en la etapa de nixtamalización, la cantidad de azúcares solubles se reduce considerablemente, por lo que es necesaria la ayuda de diversos microorganismos que permitan hidrolizar el almidón remanente para la liberación de sustratos más sencillos que puedan ser aprovechados por la microbiota presente en el medio.

Estos microorganismos son llamados amilolíticos por su capacidad de hidrolizar el almidón y de aprovecharlo para su crecimiento. Dentro de los microorganismos amilolíticos presentes en el pozol tenemos al género *Enterococcus*, un género de BAL que permiten la fermentación de sustratos amiláceos. Estas bacterias amilolíticas realizan la hidrólisis del almidón y liberan azúcares solubles que son usados por microorganismos no amilolíticos como sustrato para su crecimiento, durante la fermentación.

En este trabajo, se evaluó la capacidad de distintas cepas de *Enterococcus*, previamente aisladas del pozol, para hidrolizar el almidón y poder desarrollarse en medios de cultivo con este carbohidrato como única fuente de carbono. Durante las fermentaciones con almidón y otras fuentes de carbono, se evaluó la actividad amilolítica y el crecimiento de las cepas. Finalmente, se realizó una SDS-PAGE y un zimograma para evidenciar la presencia de las amilasas producidas por las cepas de *Enterococcus*.

HIPÓTESIS

Debido a que las cepas de *Enterococcus* son predominantes en las diferentes etapas de la fermentación del pozol, entonces podrán crecer en un medio de cultivo con almidón y tendrán la capacidad de hidrolizarlo con las amilasas que liberen al medio de crecimiento o asociadas a las células.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de distintas cepas de *Enterococcus* previamente aisladas del pozol, para producir amilasas, hidrolizar el almidón y crecer en un medio de cultivo con almidón como sustrato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar cualitativamente, mediante la observación de halos de hidrólisis en medios de cultivo con almidón, la capacidad de las cepas de *Enterococcus* de crecer en dichos medios.
- Estudiar la capacidad de las cepas de *Enterococcus* para producir amilasas en medios de cultivo con maltosa y almidón como sustrato
- Medir parámetros como pH y densidad óptica para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria y de producción de las enzimas amilolíticas.
- Cuantificar la cantidad de azúcares reductores y almidón remanente durante la etapa de fermentación, con ayuda de métodos fisicoquímicos.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En México, país de grandes contrastes, tradiciones y gran diversidad cultural y biológica, contamos con alimentos muy variados, entre ellos, los alimentos fermentados tradicionales que se consumen hoy en día y que complementan la dieta de una gran parte de la población. Las bebidas y los alimentos indígenas fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de numerosos grupos indígenas de México desde la época prehispánica hasta la actual (Flores, 2008).

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México no alcohólicos de origen prehispánico el más importante es el pozol. Es un alimento tradicional de origen maya que forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México: chontales, choles, mayas, lacandonos, tzotziles o chamulas, tzetzales, zoques, mames y zapotecos, junto con la población mestiza. El nombre pozol es de origen náhuatl, pozolli, que quiere decir espumoso (Flores, 2008).

La historia del pozol comienza en la época prehispánica, donde los Mayas- Chontales, que habitaban en el estado de Tabasco, preparaban una bebida a base de maíz y cacao a la que llamaban pochotl; esta era muy consumida por los viajeros indígenas ya que es nutritiva, hidratante y ayuda a mitigar el hambre. Con el paso del tiempo, la bebida se extendió por el sureste de México y con la llegada de los españoles a territorio mexicano, el nombre pochotl se deformó a pozol. Según diversos escritos de la época colonial, los españoles denominaron al pozol como una bebida agria de los indios que los hacía resistentes al calor; además mencionaban que esta era fresca y de lo más sano. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

2. ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados son definidos como aquellos alimentos que han sido modificados de manera deseada y con ayuda de microorganismos y/o enzimas, cuyos productos se preparan a partir de materia cruda, mediante el cual se incluyen microorganismos específicos que proporcionan propiedades sensoriales como sabor, aroma,

aparición general y textura, además de que aumenta la vida de anaquel y la seguridad higiénica (Schneider et al. 2006).

Bioquímicamente, la fermentación es el proceso metabólico en el cual los carbohidratos y compuestos relacionados se oxidan parcialmente con la liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores de electrones finales son compuestos orgánicos producidos directamente a partir de la descomposición de los carbohidratos. En consecuencia, se produce una oxidación incompleta del compuesto original, y solo una pequeña cantidad de energía se libera durante el proceso. Los productos de fermentación consisten en algunos productos orgánicos, compuestos que son más reducidos que otros y que son precursores de metabolitos esenciales para la célula (Jay et al., 2005).

Durante la fermentación, los microorganismos transforman los componentes del alimento original produciendo ácidos orgánicos (láctico y acético), dióxido de carbono, alcohol, exopolisacáridos y metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas, entre otros dependiendo del fermento utilizado, además, se mejora el valor nutricional de los productos, ya que se ve favorecida la digestibilidad de las proteínas por la proteólisis llevada a cabo por los microorganismos iniciadores o aumenta la producción o biodisponibilidad de vitaminas (Ferreira et al., 2020). Dentro de los microorganismos probióticos estudiados, se encuentran aquellos que han sido encontrados en los alimentos fermentados; los alimentos fermentados, son aquellos producidos a través del crecimiento microbiano controlado y por la acción enzimática que estos llevan a cabo de los componentes del alimento (García et al., 2004; Dimidi et al., 2019).

Se cree que en el mundo existen cerca de 3 500 alimentos fermentados tradicionales. En México, se cree que existen más de 200 bebidas y alimentos fermentados. Dentro de las técnicas culinarias ancestrales que distinguen a la cocina mexicana se encuentran las fermentaciones a partir de ingredientes locales diversos: el maíz (*Zea mays*) del cual derivan alimentos como el atole agrio, pozol y tescüino, o a partir de la savia extraída de *Agave atrovirens* derivando el pulque (Quintero-Salazar et al., 2012).

3. POZOL

El pozol (del náhuatl *pozolli*, espumoso) es una bebida no alcohólica elaborada a base de maíz nixtamalizado fermentado que se consume desde la época prehispánica en la región Maya de nuestro país. Formaba parte de la dieta básica de los indígenas de dichas regiones (mayas, principalmente) (Rodríguez-Saavedra, 2018).

3.1. Proceso de elaboración

De acuerdo con Ulloa y col. (1983), la técnica de preparación del pozol, que se ha transferido de una generación a otra para el consumo familiar o a escala comercial pequeña, es la siguiente: El maíz, de preferencia blanco, se desgrana y se hierven entre 0.5 y 1 Kg de granos en 2 litros de agua con un puñado de cal (aproximadamente 1-3% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ p/v) durante aproximadamente 1 hora. Cuando los granos se hinchan y se pueden desprender fácilmente los pericarpios, se enfrían y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se les llama nixtamal. Se muelen en un molino metálico para obtener una masa martajada, que se moldea manualmente en forma de bolas. Éstas se envuelven en hojas de plátano para evitar su desecación y se fermentan de 1 a 14 días o más, dependiendo de las preferencias del consumidor.

3.2. Nixtamalización

La nixtamalización del maíz consiste en la cocción de los granos en agua con cal y su objetivo es lograr la separación del hollejo (o cascarilla) del grano. La cantidad de cal necesaria, que los productores conocen por experiencia y miden por puños, es muy importante. Si es insuficiente, los indígenas califican al nixtamal resultante como "1ush", término que traducen como "nixtamal cocido sin cal o con poca cal. Si la cantidad es mayor a la necesaria, es necesario lavar muy bien el nixtamal (del azteca *nextli* que significa cenizas) para eliminar el exceso. Este lavado debe efectuarse antes de que transcurran 4 horas después del cocimiento, de lo contrario, el grano de maíz se impregna de cal, adquiere una tonalidad verde-azulosa y el sabor del pozol es picante. Una vez que esto sucede, ni el lavado más exhaustivo elimina el defecto. La cocción termina cuando el hollejo se puede eliminar fácilmente al frotar el grano con los dedos. Este tiempo varía entre 60 y 120 minutos (Wacher, 1993).

3.3. Beneficios

La fermentación en el pozol presenta ventajas como la mejora de la digestibilidad del sustrato, incremento en el valor nutrimental, inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y sus toxinas, así como la eliminación de sabores y texturas desagradables (Cañas et al, 1993, Phister et al, 2004; Wachter, 1995). El pozol también presenta beneficios medicinales como controlar las diarreas o para reducir la fiebre. Los mayas lo preparaban como cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales, de igual manera lo utilizaban como ofrenda en ceremonias relacionadas con el cultivo y la cosecha de maíz (Wacher, 1993).

3.4. Microbiología del pozol.

Las bacterias ácido lácticas (amilolíticas y no amilolíticas) tienen un papel muy importante en la fermentación del pozol, ya que la microbiota original proveniente de la masa de nixtamal es la encargada de iniciarla y llevarla a cabo. Sin embargo, durante el proceso de nixtamalización, esta microbiota es eliminada; y vuelve a haber fuentes de inóculo posteriores en la etapa de molienda y amasado. La inoculación incluye desde bacterias ácido láctico hasta bacterias indeseables (Wacher, 1995; Escalante et al, 2001; Illana et al, 2002). Durante la nixtamalización también se eliminan la mayor parte de mono y disacáridos de tal modo que el almidón queda como única fuente de carbono (Wacher, 1995).

Durante las primeras tres horas de iniciada la fermentación, *Lactococcus* y *Leuconostoc* parecen ser los géneros dominantes, especialmente en la periferia de la masa donde se encuentra en contacto con el oxígeno, debido a que estas cepas consumen el oxígeno disponible, permitiendo el desarrollo de los microorganismos anaerobios (Ben Omar y Ampe, 2000). Las cepas de *Lactobacillus*, que se encuentran en el centro, se consideran predominantes en esta fase (Ampe et al, 1998; Escalante, 2001; Illana et al, 2002).

Gracias a la investigación de Ulloa y Herrera, micólogos del Instituto de Biología, UNAM, se han descrito las levaduras y hongos que se llegan a desarrollar durante la etapa de fermentación. Dentro de las levaduras encontradas predominan los géneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveroyces*, *Hansenula* y *Trichosporon*. Entre los hongos destacan los géneros

Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Monila, Mucor, Rhizopus, Trichoderma, Geotrichum, Phialophora y Fusarium (Herrera, 2003).

Se han encontrado registros de la presencia de *E. coli* en la masa, así como de otras enterobacterias y bifidobacterias probablemente de origen fecal. La concentración de estas enterobacterias disminuye durante la fermentación, pero tiende a permanecer en una cuenta baja al final del proceso. también se da la resistencia bajo condiciones ácidas de bacterias como *Salmonella Typhimurium* y *Shigella flexneri*, (Humbolt y Guyot, 2008; Sainz et al, 2001).

Se ha descrito que las bacterias ácido lácticas constituyen del 90 al 97% de la microbiota activa del pozol. Especies del género *Streptococcus* abarcan del 25 al 50% de esta microbiota, seguidas del *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, así como bacterias del género *Leuconostoc* y *Weissella* (Ampe et al, 1999).

Durante el proceso de fermentación del pozol predominan bacterias lácticas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, a diferencia de otros alimentos fermentados con almidón en su composición, donde predominan bacterias de género *Lactobacillus* (Ampe et al, 1999; Ben Omar et al., 2000; Morlon-Guyot et al., 1998) De acuerdo con Díaz et al, 2003, las bacterias que presentan mayor actividad amilolítica son *Streptococcus bovis*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, donde destacan *S. bovis*, *S. macedonius*, *L. lactis* y *E. sulfureus* Estas bacterias lácticas amilolíticas son fundamentales en la fermentación de sustratos amiláceos. Esto es de mucha importancia debido a que durante la nixtamalización el contenido de glucosa, sacarosa y algunos carbohidratos biodisponibles disminuye a 0.1 a 0.7g (masa seca), con este bajo contenido de azúcares, algunos microorganismos no son capaces de proliferar y desarrollar en la masa (Díaz-Ruiz et al., 2003), por lo que el almidón representa una fuente de energía importante para microorganismos amilolíticos, ya que generaran azúcares para la proliferación del resto de la microbiota no amilolítica presente. De acuerdo con Díaz et al, 2003, el cambio en la concentración de microorganismos está ligado al descenso en el pH (Tabla 1), se reportó que al inicio de la fermentación, el 40% de las bacterias ácido lácticas son amilolíticas (BALA) y disminuye hasta 3% después de 72 horas, probablemente debido a que el pH (pH=7) en la masa nixtamalizada puede favorecer el crecimiento de BALA, y conforme el pH disminuye, la concentración de las mismas

también. Al final de la fermentación se encuentran principalmente bacterias lácticas no amilolíticas capaces de metabolizar mono y disacáridos con eficiencia y los derivados de la hidrólisis de almidón por BALA. (Díaz-Ruíz et al. 2003)

Tabla 1. Concentración de bacterias en el pozol, en función del pH y del tiempo de fermentación (Díaz-Ruíz et al., 2003).

Tiempo de fermentación (horas)	pH	Concentración (log UFC g ⁻¹ de materia seca)	
		BAL	BALA*
0	7.4	4.9	4.5
6	5.9	8.2	7.6
24	4.8	9.9	8.4
48	4.8	10.4	8.7
72	4.4	10.2	8.7

*BALA: Bacterias ácido lácticas amilolíticas

4. ALMIDÓN

4.1.Generalidades

El almidón es un polisacárido presente en la naturaleza de reserva energética predominante en raíces, plantas, tubérculos, cereales, semillas y en algunas frutas como plátanos (Vaclavik, 2002; Fennema, 2000). El almidón se sintetiza en los amiloplastos de las plantas superiores, en forma de estructuras discretas, llamadas gránulos. Estos gránulos, ubicados en los órganos de reserva de las plantas, están organizados en anillos alternados, llamados anillos de crecimiento, de zonas amorfas y semicristalinas de un radio de aproximadamente un 120-400 nm (Vermeylen et al, 2006).

El almidón está compuesto por cadenas de unidades de anhidro glucosa (D-glucosa) de seis carbonos. En el almidón los anillos de D-glucopiranososa se encuentran unidos por enlaces glucosídicos α (1→4) y α (1→6). Los gránulos de almidón están esencialmente

compuestos por dos polímeros de glucosa de diferente estructura: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero esencialmente lineal, mientras que la molécula de amilopectina es mucho más grande y ramificada (Fennema, 2000).

4.2. Almidón durante la nixtamalización

La nixtamalización retarda la gelatinización del almidón debido a la aparente interacción del calcio con el almidón, especialmente con la amilosa. El almidón de maíz alcanza un bajo grado de gelatinización por efecto de la nixtamalización, lo que contrasta con la creencia anterior de que el almidón de maíz se gelatinizaba completamente por efecto de la cocción alcalina que se lleva a cabo en dicho proceso. Posterior al cocimiento, el almidón se retrograda, es decir, se recristaliza o re asocia 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. Por otro lado, un nixtamal sobrecocido absorbe más agua debido a un mayor grado de gelatinización; una vez que este tipo de nixtamal es transformado en masa, ésta adquiere propiedades de pegajosidad y adhesividad que son indeseables en la producción de productos alimenticios (Mondragón et al, 2004; Méndez et al, 2008, Paredes-López, 2009).

5. ENZIMAS

Las enzimas son proteínas de estructura tridimensional compleja, que actúan sobre sustratos específicos, en condiciones concretas de temperatura, pH, humedad, presencia de activadores o inhibidores y concentración de sustrato (Bühler et al., 1998).

Son catalizadores biológicos muy eficaces, presentes en todos los sistemas vivos, los cuales aceleran en el organismo, hasta un millón de veces, diversas reacciones químicas que en condiciones normales sucederían lentamente o no se producirían (Bühler et al., 1998).

Las enzimas no se consumen durante las reacciones catalíticas y una vez terminada la reacción, estas vuelven a su estado original, razón por la cual la cantidad necesaria de enzimas es muy pequeña en proporción a la cantidad de sustrato (Bühler et al., 1998).

5.1.Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del almidón depende de la estructura granular del almidón, el tamaño y tipo de cristal, la relación amilosa amilopectina y el peso molecular promedio de dicha relación, además de los cuerpos proteicos y lipídicos y las condiciones de especificidad de la enzima (Sheukani et al, 2017).

La industria del almidón es una de las principales usuarias de amilasas para la hidrólisis y modificación de esta materia prima con el fin de obtener glucosa, maltosa y oligosacáridos, que pueden ser convertidos en jarabes de fructosa y dextrosa. La glucosa obtenida, también puede ser fermentada para producir etanol, aminoácidos y ácidos orgánicos (Kirk et al, 2002).

Para la conversión enzimática de almidones es necesario utilizar amilasas termoestables, ya que estas son adicionadas luego de un paso de gelatinización que requiere temperaturas entre 70 °C y 110 °C (Pandey et al, 2000).

5.1.1. Enzimas amilolíticas

Las enzimas amilolíticas están distribuidas ampliamente en la naturaleza. Ellas actúan hidrolizando uniones entre residuos de glucosa adyacentes. El tipo de unión hidrolizada, así como el producto final de la hidrólisis es característico de cada tipo enzima. El término amilasa fue usado originalmente para designar a las enzimas capaces de hidrolizar las uniones glicosídicas de amilosa, amilopectina, glucógeno y de sus productos de degradación (Fogarty, 1980).

La producción de una enzima, incluye dos etapas principales: la fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima, y la de recuperación y purificación en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso. En la

industria se utilizan más los preparados enzimáticos, pues la purificación de la enzima podría representar costos adicionales en la producción de alimentos. La calidad de la enzima está en función de la fermentación, pues esta influye directamente en la coloración, olor y estabilidad de la enzima (Guadarrama, 2015).

El paso donde se adicionan las amilasas en la industria alimentaria se conoce como liquefacción, y su objetivo es reducir la viscosidad de la solución mediante la hidrólisis parcial del almidón (Van Der Veen et al, 2006).

5.1.2. Endoenzimas

Hidrolizan la molécula de almidón realizando cortes internos reduciéndola rápidamente a fragmentos de cadenas de menor peso molecular. Dentro de esta categoría se encuentra la α -amilasa (Terebizink, 1998).

5.1.2.1. α -amilasa

La α -amilasa (α 1 \rightarrow 4-D-Glucano-glucohidrolasa), E.C.2.1, es una enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1 \rightarrow 4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa. La hidrólisis de la amilosa por parte de la α -amilasa resulta en su conversión total a maltosa y maltotriosa. Una segunda reacción, mucho más lenta, de la enzima sobre la maltotriosa produce glucosa y maltosa (Badui, 2006; Latorre, 2010).

Las α -amilasas son calcio-metaloenzimas que contienen en su estructura al menos 1 átomo de esta molécula. El calcio es necesario para la actividad catalítica de la enzima; además en presencia del catión la α -amilasa es más resistente a condiciones de pH y temperatura, tratamiento con urea o con proteasas, además de que su actividad depende de la presencia de iones cloruro. Esta enzima tiene importancia en la industria alimentaria como en cervecería, dulcería, cereales y panadería, y específicamente en la sacarificación maltogénica (Crueger, 1993; Terebizink, 1998).

La α -amilasa puede ser purificada de diferentes organismos como plantas, animales, hongos y bacterias; actualmente un gran número de α -amilasas bacterianas están disponibles

comercialmente y son las más utilizadas en las industrias, debido a que son considerados más estables a altas temperaturas (Monteiro de Souza, De Oliveira. 2010). Las bacterias del género *Bacillus* se consideran la fuente más importante de α -amilasas. Entre los hongos, los microorganismos del género *Aspergillus* son los principales productores de α -amilasas con aplicación industrial (Latorre, 2010).

5.1.3. Exoenzimas

Hidrolizan el almidón a partir de los extremos no reductores de la molécula generando productos de bajo peso molecular. Dentro de esta categoría se encuentra la glucoamilasa y la β -amilasa (Terebizink, 1998).

5.1.3.1. Glucoamilasa

La glucoamilasa, E.C. 3.2.1.3, es una glicoproteína que hidroliza fácilmente enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 y también algunos 1,3 de α -glucanos, generan como producto final glucosa y pequeñas cantidades de oligosacáridos a partir de los enlaces terminales no reductores de la cadena de almidón. No son capaces de hidrolizar completamente al almidón ya que necesitan la participación de una enzima de acción interna. Las glucoamilasas tienen un pH óptimo en 4,3 - 4,5, temperatura óptima cerca de 50 °C - 60 °C, además son estables por períodos prolongados (Arellano y Olmos, 1999; Sauer et al., 2000). Las glucoamilasas son de origen microbiano, producidas por varias especies de *Aspergillus* y *Rhizopus*, *Schwanniomyces*, y de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter* (Sánchez et al., 2005).

5.1.3.2. β -amilasa

Las β -amilasas son exoenzimas que atacan enlaces α -1 \rightarrow 4 glucosídicos en la parte externa de la cadena de almidón, la β -amilasa separa unidades de maltosa a partir de los extremos no reductores de esta por hidrólisis alterna de enlaces glucosídicos (Pedroza, 1999). Las β -amilasas atacan solo desde un extremo a la vez, y a causa de ello, son mucho menos efectivas que las α -amilasas (Baker, 1994).

Debido a que esta enzima está imposibilitada para hidrolizar los puntos ramificados α 1 \rightarrow 6 en la molécula de almidón, los productos finales de la acción sobre el sustrato son maltosa y dextrinas, formándose poca cantidad de maltotriosa y glucosa (Mariño, 1989). Destacan como productores de β -amilasa las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Clostridium* spp. (Pandey et al., 2000).

5.1.4. Enzimas desramificantes.

Hidrolizan los puntos de ramificación de la molécula, exclusivamente los enlaces α -1 \rightarrow 6. Las enzimas desramificantes se clasifican en dos grupos: desramificantes directas y desramificantes indirectas. Las desramificantes directas degradan la amilopectina y el glucógeno sin necesidad de un tratamiento previo con alguna otra enzima. Las desramificantes indirectas necesitan que el sustrato polimérico sea pretratado enzimáticamente antes de hidrolizar sus puntos de ramificación. La temperatura óptima de reacción de la enzima es de 45°C a 50°C y el rango de pH óptimo varía entre 5 y 11 (Terebizink, 1998).

5.1.4.1. Pululanasa

Las pululanases, E. C. 3.2.1.41, degradan los enlaces α -1,6 de glucógeno, amilopectina y pululano (polisacárido extracelular producido por *Aureobasidium pullulans*) (Okada et al., 1988). Las pululanases, generalmente, son producidas por plantas superiores y por microorganismos mesófilos tales como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Doman-Pytka, 2004).

5.3.4.2 Isoamilasa

La isoamilasa es una enzima desramificante indirecta que degrada la isomaltosa pero no así el pululano. Para poder actuar sobre un punto de ramificación, esta enzima necesita que las cadenas laterales a la unión α \rightarrow 1.6 no posean más de 2 o 3 residuos de glucosa. El pH óptimo de este tipo de enzimas varía entre 5,0 y 6,4 y la temperatura entre 40 y 52°C. (Terebizink, 1998).

Las isoamilasas se encuentran en bacterias, levaduras y plantas mientras que las pululanasas, generalmente, son producidas por plantas superiores y por microorganismos mesófilos tales como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Doman-Pytka, 2004).

6. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

6.1. Características generales de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Las BAL son ácido tolerantes, su pH de crecimiento se encuentra entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios en donde otras bacterias no soportarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramírez et al., 2011; Vázquez et al. 2009).

Para su proliferación se requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento, por lo que son medios complejos los necesarios para su crecimiento siendo algunos ejemplos la leche, vegetales, masa de cereales y carne (Ramírez et. al., 2011).

6.2. Clasificación de bacterias ácido lácticas

En base a los productos finales de metabolismo de las hexosas, las BAL se dividen en dos grupos: heterofermentativas y homofermentativas (Figura 1).

Las BAL heterofermentativas poseen la enzima fosfocetolasa, la cual convierte las hexosas a pentosas por la vía de hexosa monofosfato o de la pentosa, produciendo en ese proceso cantidades equimolares de lactato, cantidades significantes de productos como acetato, etanol y CO₂. Las BAL homofermentativas producen exclusivamente ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa. Estas bacterias poseen las enzimas

aldolasas y hexosas isomerasas, utilizando la vía Embden-Meyerhof-Parnas para producir dos moléculas de lactato por cada molécula de hexosa (Jay, 2005, Waldir et. al., 2007).

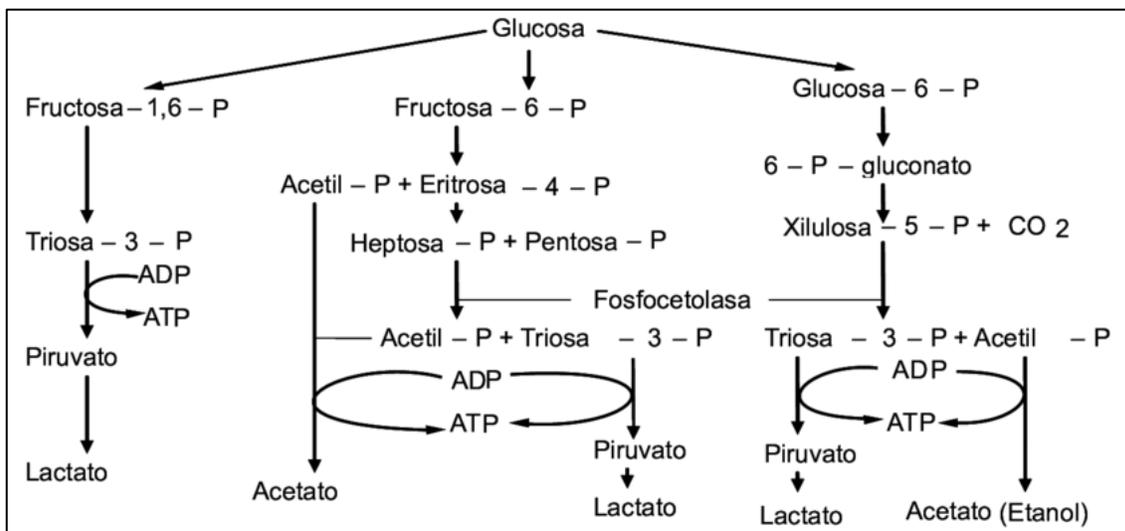


Figura 1. Productos de la vía fermentativa de hexosas por bacterias ácido lácticas. (Waldir et. al., 2007)

7. *ENTEROCOCCUS*

Los *Enterococcus* son bacterias Gram-positivas, de morfología esférica u ovoide que pueden presentarse solos, en pares o cadenas, son no esporulados, anaerobios facultativos, a partir de su metabolismo de azúcares se clasifican como bacterias homolácticas, es decir, el metabolismo de este grupo es a través de la ruta Embden- Meyerhof (glucólisis) de la cual se obtiene como producto principal ácido láctico. Presentan una temperatura de crecimiento óptimo de 35° C (10-45° C) y pueden resistir hasta los 60° C por 30 minutos por lo que son termotolerantes. Pueden crecer en medios que contienen 6.5% de NaCl, hidrolizan la esculina en presencia de 40% de sales biliares y son catalasa negativos. La pared celular de los enterococos contiene peptidoglucanos de Lisina-D-Asparagina (excepto *E. faecalis*) y de la membrana se derivan grandes cadenas de ácidos grasos en los que predominan cadenas lineales monoinsaturadas (Becerril, 2012; Lahtinen et al., 2012; Giraffa, 2014). Los enterococos son homofermentativos con respecto a las hexosas y heterofermentativos para las pentosas y algunos otros sustratos y, por tanto, podrían ser llamados heterofermentativos facultativos (Salminen et. al., 2004).

7.1. Clasificación

Se han propuesto más de 20 especies que conforman el género. De acuerdo con el análisis y secuenciación de la subunidad 16S del ARNr (Giraffa, 2014), dichas especies se han dividido de la siguiente forma:

- Grupo *E. faecium*: *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. villorum*, *E. canis*
- Grupo *E. avium*: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. gilvus*
- Grupo *E. gallinarum*: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*
- Grupo *E. dispar*: *E. asini*, *E. dispar*, *E. pallens*, *E. hermannienseis*, *E. canintestini*
- Grupo *E. saccharolyticus*: *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. saccharominimus* (*E. italicus*), *E. aquimarinus*
- Grupo *E. cecorum*: *E. cecorum*, *E. columbae*
- Grupo *E. faecalis*: *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. ratti*

7.2. Metabolismo de *Enterococcus*

La característica esencial del metabolismo de BAL es la eficiente fermentación de carbohidratos junto con la fosforilación a nivel sustrato. El ATP generado es subsecuentemente usado para la biosíntesis. Las BAL como grupo exhiben una enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos 11 relacionados. Generalmente, el producto final predominante es el ácido láctico (>50% de azúcar como carbono). Es evidente, sin embargo, que las BAL adaptadas a diversas condiciones tienen como consecuencia un cambio en su metabolismo. Esto puede dar lugar a productos finales muy diferentes. Anteriormente se mencionó que los *Enterococcus* llevaban a cabo la fermentación homoláctica, siguiendo la ruta de glicólisis o glucólisis si el carbohidrato degradado es la glucosa (Salminen et. al., 2004).

7.3. Importancia de los *Enterococcus* en alimentos.

La presencia de enterococos en alimentos tiene especial incidencia en los que son fermentados. En la actualidad, no existe un consenso sobre la cantidad de enterococos

permitida en los alimentos y la posible patogenicidad de las diferentes especies del género sigue en estudio. Actualmente, el género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, con *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus durans* como las especies más encontradas en alimentos (Giraffa, 2003).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios en los que se concluye que los enterococos tienen un importante papel en la maduración de quesos tradicionales elaborados a partir de leche de oveja, vaca y cabra, contribuyendo al desarrollo del sabor y aroma característico de dichos quesos. Su presencia se atribuye a su excepcional aptitud para sobrevivir y resistir ambientes desfavorables, así como a las fuentes de contaminación ambientales que hacen posible la colonización de alimentos crudos, tal es el caso de la leche y carne, y su multiplicación en esos productos durante la fermentación (Olvera, 2010).

En los alimentos, en especial la carne (res, cerdo) *E. faecalis* ha demostrado ser la especie predominante seguido de *E. faecium* y no están solamente asociados a carne cruda, también con alimentos procesados ya que, en algunos productos, donde la cocción es necesaria, los enterococos presentan una ventaja selectiva entre otras especies de BAL, pues son termo tolerantes. Del mismo modo en los quesos las dos especies ya mencionadas son las más frecuentemente aisladas de diferentes quesos seguidas por la especie *E. hirae* que también ha sido aislada de diversos quesos del mediterráneo europeo donde llevan a cabo el proceso de maduración (Franz et al., 1999).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. Reactivación de cepas y verificación de pureza.



Figura 2. Método usado para la reactivación de cepas de *Enterococcus sulfureus* A36202, *Enterococcus italicus* A17 y A40, previamente aisladas de pozol e identificadas mediante secuenciación de la región V1 del gen ribosomal 16S (Becerril, 2012), en medios MRS y verificación de pureza. Creado con Biorrender.com

Se llevó a cabo la siembra de cepas de *Enterococcus*; *Enterococcus sulfureus* A36202 y *Enterococcus italicus* A17 y A40, en viales que contienen caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) que previamente fueron aisladas del pozol (Díaz-Ruiz et al., 2003 y Becerril et al., 2009) y conservadas en ultracongelación (-40° C). La concentración final de los viales para la inoculación fue de 1% vol/vol. Fueron sembradas en agar MRS por agotamiento y fueron incubadas a 37° C por 24 horas para poder verificar su pureza a través de la observación macroscópica de las colonias, y microscópica de las células con ayuda de la tinción de Gram y de un microscopio (figura 2).

2. Crecimiento de las cepas de *Enterococcus* en el medio MRS/almidón 2%.

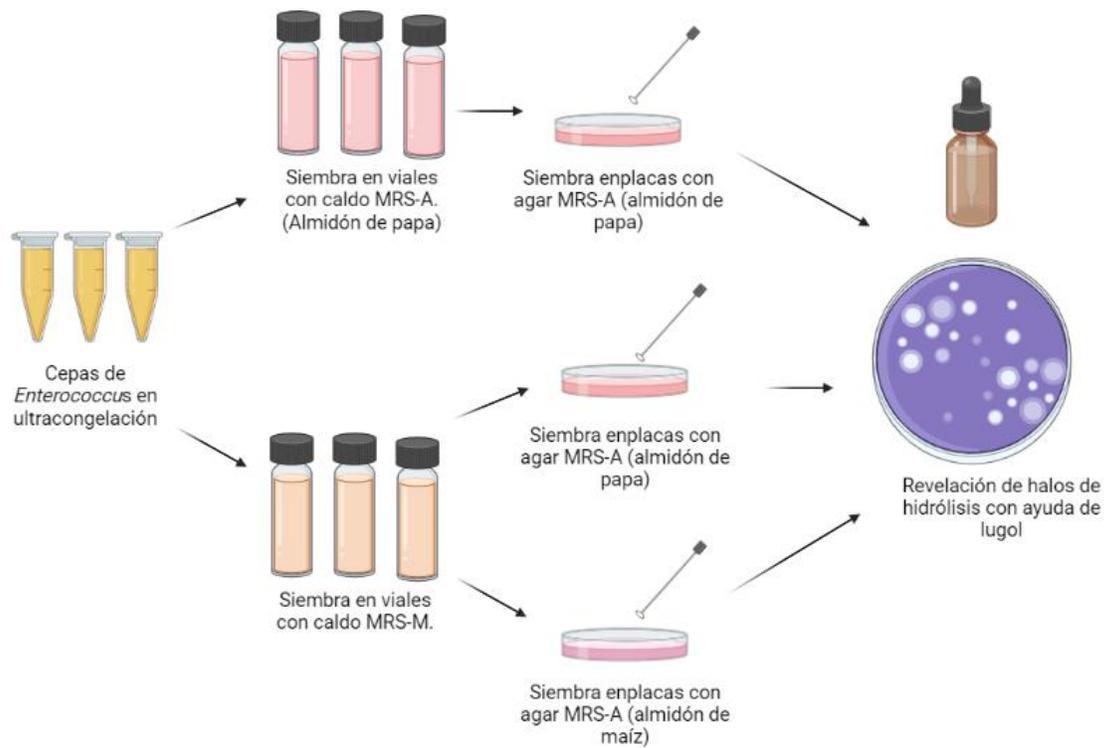


Figura 3. Método usado para la reactivación de cepas de *Enterococcus sulfureus* A36202, *Enterococcus italicus* A17 y A40, previamente aisladas de pozol, en medio MRS modificado con maltosa, almidón de papa y de maíz y observación de halos de hidrólisis de almidón. Revelación con lugol. Creado con Biorrender.com

Se inocularon las cepas de *Enterococcus* en viales que contienen caldo MRS, la siembra se llevó a cabo en medios MRS modificados con otros carbohidratos como el disacárido maltosa al 2% (MRS-M), o almidón al 2% (MRS-A), para poder poner en evidencia la influencia de estos carbohidratos sobre la actividad amilolítica. La concentración final de las cepas de *Enterococcus* en los viales para la inoculación fue de 1% vol/vol. Se sembraron en placas que contienen medio modificado con dos tipos de almidón; de papa y de maíz, para poder observar bajo que sustrato pudiera desarrollarse mejor. Fueron sembradas en agar MRS por agotamiento. Los viales y placas con medios modificados

fueron sembrados a 37° C por 24 horas. La revelación de los halos de hidrólisis se llevó a cabo con lugol para poder apreciar mejor los halos de hidrólisis (figura 3) (Fogarty, 1983).

3. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de extinción de yodo y DNS

Conociendo la influencia de maltosa y almidón en la actividad amilolítica, y sabiendo que el mejor almidón por ser más soluble es el de papa, se inocularon las cepas de *Enterococcus* en medio MRS, y posteriormente en medios MRS/maltosa 2% y MRS/almidón papa 2%. La concentración final de las cepas de *Enterococcus* en los viales para la inoculación fue de 1% vol/vol. Fueron incubados a 37° C por 24 horas.

De estos cultivos se separaron los sobrenadantes de las células con ayuda de la centrifuga, cuyas condiciones eran 4° C 10,000 rpm 10 minutos. Las células fueron suspendidas en buffer de fosfatos pH 6.8 0.1M. Para la preparación de este reactivo se requieren 255mL de NaH₂PO₄ 0.2M y 245mL de Na₂HPO₄ 0.2ml, todo esto aforado a 500mL. Se realizó el ensayo de actividad amilolítica mediante el método de extinción de yodo (Iturbe y Sandoval, 2013) y el método de cuantificación de azúcares reductores por DNS (Nielsen, 2003), para observar si los microorganismos liberan la enzima al medio o se encuentra asociada a la célula.

Para la elaboración del reactivo de DNS se mezclan 80mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada, se agregaron 150g de tartrato de sodio tetrahidratado. Calentar a 50° C y agitar constantemente. Finalmente agregar 5g de DNS y agitar, dejar enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Aforar a 500 mL y conservar en frasco ámbar. Las condiciones para la curva patrón siguen siendo pH de 6.6 y 37° C. Los resultados de la curva patrón pueden verse reflejados en la tabla 20 y la gráfica 26, las condiciones fueron pH de 6.6 y 37° C, se preparó una solución de glucosa 2mg/mL con buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8. Para la reacción de actividad amilolítica, se agregó 0.8 mL del buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8 a los tubos dentro del baño, se adiciono 0.1 mL de sobrenadante de células de su respectiva cepa a cada tubo. Se dejó llevar a cabo la reacción por 30 minutos (t₃₀), para la obtención del tiempo cero (t₀) se adiciono 0.1 mL de H₂SO₄ 2N colocándolo en baño de hielo. Una vez transcurridos los 30 minutos de la reacción enzimática, se hizo lo mismo con los tubos con

t30. A los tubos de reacción, se adicionaron 0.5 mL de la solución de sobrenadante de células y 0.5 mL reactivo de DNS, se colocaron a ebullición por 5 minutos y colocados posteriormente en un baño de hielo. Una vez enfriados se adicionaron 5mL de agua destilada a cada uno respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro para realizar las lecturas correspondientes a 540 nm (figura 4).

Para el método de extinción de yodo, las condiciones fueron pH de 6.6 y 37° C, se preparó una solución de almidón 1.5mg/mL con buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8 y se agregó 0.8 mL a los tubos dentro del baño, se adiciono 0.1 mL de sobrenadante concentrado de las células de su respectiva cepa a cada tubo. Se llevó a cabo la reacción por 10 minutos (t10) mientras que para la obtención del tiempo cero (t0) se adiciono 0.1 mL de H₂SO₄ 2N colocándolo en baño de hielo. Una vez transcurridos los 10 minutos se hizo lo mismo con los tubos t10. Una vez fríos, se adicionaron 0.1 mL de la solución de sobrenadante concentrado de células y 2.4 mL de la solución de yodo previamente preparada al 4%. Se midió la absorbancia a 600 nm (figura 4).

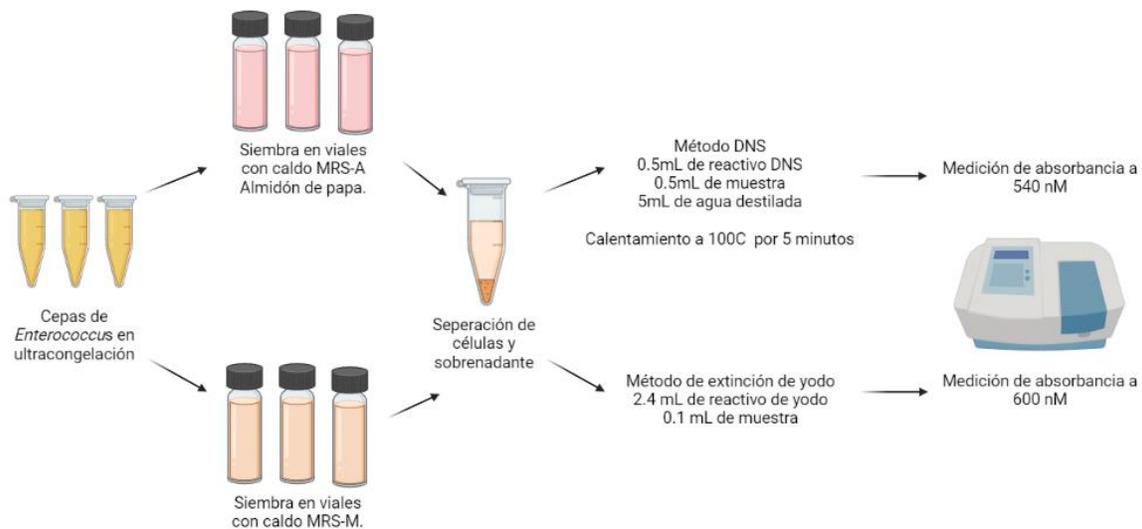


Figura 4. Método de DNS y extinción de yodo para determinar si la enzima amilasa es liberada al medio o se encuentra asociada a la célula por las cepas de *Enterococcus*. Creado con Biorrender.com

4. Cinética de crecimiento de las cepas de *Enterococcus* en diferentes tipos de carbohidratos

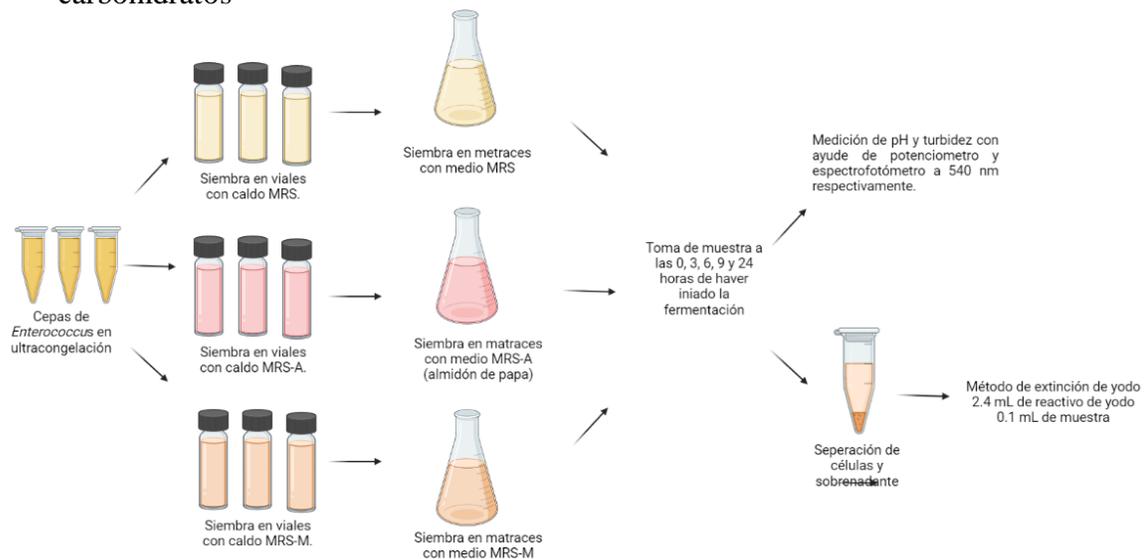


Figura 5. Esquema de fermentaciones de las cepas de *Enterococcus* en medios MRS modificados con diferentes carbohidratos. Creado con Biorrender.com

Se llevó a cabo la fermentación de las cepas de *Enterococcus* A36202, A17 y A40 en medios MRS modificados con diferentes carbohidratos. Los viales fueron incubados a 37° C por 24 horas. La concentración final de las cepas de *Enterococcus* en los viales y matraces para la inoculación fue de 1%. Se tomaron alícuotas de los diferentes medios a distintos tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) de haber iniciado la inoculación en el matraz (inicio de la fermentación) y se midió la absorbancia a 540nm y el pH; esto con la finalidad de tener un estimado de tiempo para observar cuando se podría producir la mayor cantidad de enzima en base a la turbidez del medio y el descenso del pH de este. Las alícuotas se guardaron en tubos Eppendorf y se conservaron en congelación.

De estos cultivos se separaron los sobrenadantes de las células con ayuda de la centrifuga, cuyas condiciones eran 4° C 10,000 rpm 10 minutos. Las células fueron suspendidas en buffer de fosfatos pH 6.8 0.1M. Se realizó el método de extinción de yodo, al ser más preciso debido a la medición directa de la degradación de almidón presente en el medio, con el objetivo de observar si la enzima se encuentra en el medio o ligada a la célula.

5. Separación de proteínas por medio de geles de acrilamida con ayuda de las tinciones de coomasie y zimograma

Se puso en evidencia la presencia de la enzima amilasa producida por las cepas de *Enterococcus* con ayuda de una electroforesis en gel de acrilamida. Los compuestos que se usaron fueron:

-Acrilamida al 30%/Bis –acrilamida al 0.8%

Trabajar con guantes, cubre-bocas y lentes de seguridad. Para una solución de 100mL se tomaron 30g de cristales de acrilamida y 0.8g de cristales de bis-acrilamida. Se colocaron en un vaso de precipitados con 70mL de agua desionizada, se agitó con una barra magnética hasta completa disolución y se aforo a 100mL con agua desionizada. Se almacenó a 4° C

-Buffer Tris-HCL 4X (1.5M) pH 8.8 para gel separador.

Para 100ml de solución se pesaron 8.171g de tris base (Sigma) y 0.4g de SDS (Sigma); se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua desionizada y se agitó con una barra magnética hasta completa disolución. Posteriormente se ajustó el pH a 8.8 con HCL. Se aforó a 100mL con agua desionizada y se almaceno a 4° C.

-Buffer Tris-HCL 4X (0.65M) pH 6.8 para gel concentrador

Para 100ml de solución se pesaron 6.06g de tris base (Sigma) y 0.4g de SDS, se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua desionizada y se agitó con una barra magnética hasta completa disolución. Posteriormente se ajustó el pH a 6.8 con HCL. Se aforó a 100mL con agua desionizada y se almaceno a 4° C.

-Solución de persulfato de amonio al 10%

Para 10 mL de solución se pesó 1g de persulfato de amonio y se colocó en un tubo Falcón de 15mL. Se colocó el volumen necesario de agua desionizada para aforar a 10mL y se disolvió totalmente con ayuda de un vortex. Se hicieron alícuotas de 1.5mL en tubos Eppendorf y se utilizó inmediatamente.

-Buffer de Carga 4X

Cada muestra que se pretende correr en una electroforesis debe prepararse con las condiciones adecuadas para que las proteínas puedan migrar de la forma esperada. Por tanto, se usa un buffer de carga que contiene agentes desnaturizantes y reductores con el fin de mantener las condiciones del método (Laemmli, 1970), así como colorante para poder visualizar el frente de corrida. El buffer de carga contiene los siguientes reactivos:

- Buffer Tris-HCl 200 mM pH 6.8
- 0.05% de azul de bromofenol
- 40% de glicerol
- 8% de SDS
- 5% de β -mercaptoetanol

Para preparar 50mL de buffer se pesaron 1.2114g de tris base, se colocaron en un vaso de precipitados y se disolvieron en 35mL de agua desionizada con agitación constante. En el mismo vaso de disolución se colocaron 0.025g de cristales de azul de bromofenol, 20mL de glicerol (J.T. Baker ®) y 4g de SDS (Sigma-Aldrich®). La disolución se mantuvo en agitación hasta completa disolución y posteriormente se ajustó pH a 6.8 con HCl. Se aforó a 50mL con agua desionizada y almaceno a temperatura ambiente. Justo antes de usarse para realizar la electroforesis se tomó una alícuota de 1 mL y se colocaron 0.05mL de β -mercaptoetanol. La alícuota se almaceno a 4°C por no más de un mes.

Las muestras se prepararon colocando 3 partes de muestras de proteína con 1 parte de buffer de carga 4x. Por tanto, para preparar 40 μ L de muestra para electroforesis se tomaron 30 μ L de muestra de proteína y 10 μ L de buffer de carga 4x. Se agitó vigorosamente y después se incubo a 88°C durante 8 minutos para romper las interacciones débiles en las proteínas y asegurar su desnaturización. Finalmente se cargaron 20 μ L de muestra preparada en cada pozol del gel.

-Buffer de Carga 10X

Para que la migración de proteínas se lleve a cabo a través del gel es necesario proporcionar el medio por el cual la carga eléctrica puede fluir del ánodo al cátodo en la cámara de electroforesis. Para ello se usa el buffer de electrodos, que contiene iones y glicina, así

como SDS para mantener las condiciones desnaturalizantes del sistema. Las concentraciones de los reactivos del buffer de electrodos 10 veces concentrado (10x) son:

- Tris base 250mM
- Glicina 1920 mM
- 1% de SDS

Para preparar 500mL de buffer se pesaron 72.06g de glicina y se colocaron lentamente en un vaso de precipitados con 300mL de agua desionizada en agitación contante. Hasta la completa disolución de la glicina se colocaron 15.1425g de tris base y finalmente 5g de SDS. Al disolverse completamente se aforó a 500mL y se almacenó a temperatura ambiente.

Para realizar la electroforesis se hizo una dilución 1x del buffer, para lo cual se tomaron 50mL del buffer 10x y se llevaron a 500mL de agua desionizada. Esta nueva solución se colocó en la cámara electroforesis.

-TCA al 100%

Para 1L de solución, colocar 800mL de agua destilada en un vaso de precipitado y agregar 100g de TCA y disolver. Aforar a 1L y almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio.

PROCEDIMIENTO:

Se reactivaron las cepas *E. sulfureus* A36202 y *E. italicus* A17 y A40 en medio MRS, tal como se describió en la sección 1. Se incubaron a 37° C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se llevó a cabo el pase con 2.5mL del cultivo anterior a un matraz con 250mL con medio MRS/almidón 2%; las condiciones de incubación fueron las mismas. La concentración final de las cepas de *Enterococcus* en los viales y matraces para la inoculación fue de 1%. El cultivo se centrifugó a 20,000 rpm por 20 minutos a 4° C para separar el sobrenadante de las células. Se tomaron alícuotas tanto de sobrenadante como de células y se colocaron en microtubos. Para la concentración de las proteínas se ocuparon dos métodos.

Método de concentración con TCA-acetona

La precipitación con TCA se realizó con la adición de 250 µL de reactivo de TCA al 100% por cada mililitro de muestra, se dejó incubar en hielo por 30 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Método de concentración con dispositivo Amicon

Se colocaron 15ml de inóculo en tubos Amicon, centrifugándolos por 1 hora a 7,500rpm. El volumen final de proteína obtenido por este método fue de 1 a 2mL.

Tabla 2. Preparación de gel separador al 10% y gel concentrador al 4.0%

Reactivo	Gel separador (acrilamida al 10%)	Gel concentrador (acrilamida al 4.0%)
	Volumen para 2 geles	Volumen para 2 geles
Acrilamida 30%/ Bis-acrilamida 0.8%	4.1 mL	0.99mL
Agua desionizada	3.81mL	2.625mL
TrisHCL 4x pH 8.8	2mL	-
TrisHCL 4x pH 6.8	-	1.66mL
Persulfato de amonio 10%	300µL	75µL
TEMED	20µL	10µL
Total	10mL	10mL

La electroforesis se llevó a cabo en un tiempo de 90-120 minutos.

Una vez que se realizó la electroforesis, se lavaron los geles para zimograma: 10 minutos con agua destilada, se desecha y se lava 10 minutos con buffer de fosfatos 1 M pH 6.8. Esto se repite tres veces. Hasta terminar estos lavados, se sumerge en una solución de almidón al 10% y se incuba a 37° C toda la noche.

Para desteñir el gel con Coomassie, se desechó la solución y se lavó exhaustivamente con agua destilada hasta observar la desaparición de color azul presente en el gel y las bandas queden completamente reveladas (Figura 6).

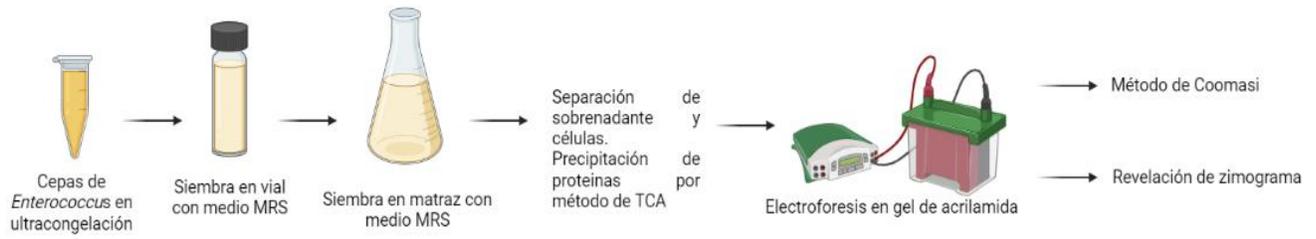


Figura 6. Método usado para la separación de proteínas por medio de geles de acrilamida para la observación de la enzima presente en los caldos con medio MRS inoculados con cepas de *Enterococcus* A36202, A17 y A140. Creado con Biorrender.com

Resultados y discusión.

1. Reactivación de cepas y verificación de pureza.

Se verificó la viabilidad y pureza de las cepas de *Enterococcus*: *E. sulfureus* A36202 y *E. italicus* A40 y A17 (Díaz-Ruiz et al., 2003 y Becerril et al., 2009). En todo el trabajo se utilizó una cepa control positivo de actividad amilolíticas: *Streptococcus infantarius* 25124 (Díaz-Ruiz et al., 2003) (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24 horas

Cepa	Turbidez
A36202	+++
A40	++
A17	++
25124	++++

Tabla 4. Observaciones macroscópicas de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) en placas MRS a las 24 horas a 37° C

Cepas	Observaciones
25124	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento.
A17	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento.
A40	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento.
A36202	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento.

Todas las cepas presentaron una turbidez homogénea, con precipitado blanco y sin nata en la superficie. Se verificó la pureza de las cepas por medio de tinción de Gram (Tabla 5) (Figura 2).

Tabla 5. Observaciones microscópicas de los cultivos de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) en placas MRS incubadas a 37° C por 24 horas.

Tinción	Observaciones
25124	Presencia de cocos Gram (+), agrupados en diplococos, racimos, sarcinas y tétradas. Homogeneidad en el tipo de célula. Los cocos se presentaban más achatados.
A17	Presencia de cocos Gram (+), agrupados en diplococos y racimos. Homogeneidad en el tipo de célula
A40	Presencia de cocos Gram (+), agrupados en cadenas largas. Homogeneidad en el tipo de célula
A36202	Presencia de cocos Gram (+), conglomerados sin formación. Homogeneidad en el tipo de célula

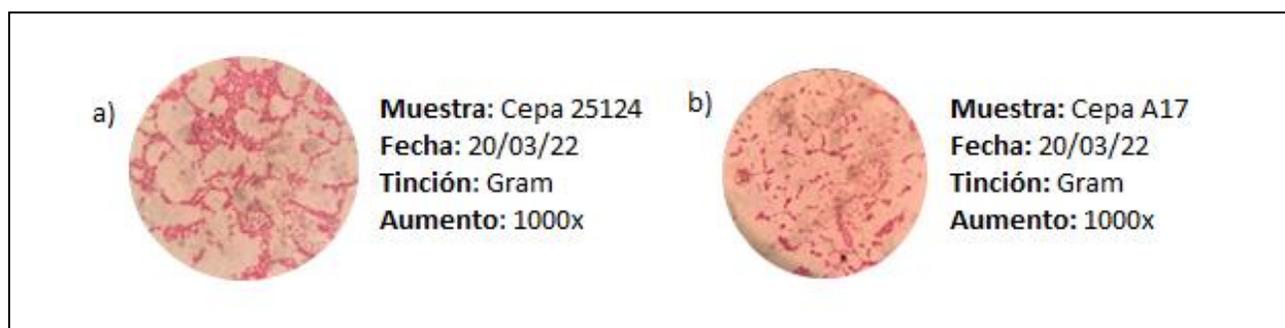


Figura 2. Comparación microscópica de la cepa *Streptococcus infantarius* 25124 (a) y la cepa *Enterococcus italicus* A17 (b) por medio de una tinción de Gram.

De acuerdo con Parra, 2010; la morfología de cocos y bacilos sin agrupación definida, no esporulados y Gram (+), coincide con las características de las cepas de estudio así como las de control.

2. Crecimiento de las cepas de *Enterococcus* en medio MRS/almidón 2%.

Se usó una cepa como control positivo de actividad amilolítica (*S. infantarius* 25124) al igual que un control negativo (sin inocular) para apreciar mejor los cambios en la turbidez que pudiese presentar el medio como consecuencia del crecimiento de las bacterias. Los

caldos inoculados se incubaron hasta por 72 horas y se observó el siguiente crecimiento para los medios MRS/almidón 2% y MRS/maltosa 2% (tablas 6 y 7).

Tabla 6. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón de papa 2%, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24, 48 y 72 horas

Cepa	Turbidez a 24 horas	Turbidez a 48 horas	Turbidez a 72 horas
A36202	++	+++	+++
A40	+	+	+
A17	++	++	+++
25214	++++	++++	++++
Control C (-)	-	-	-

Se llevó a cabo la siembra en medio sólido MRS modificado con almidón al 2%, de las cepas obtenidas en la siembra en viales con caldo MRS (tabla 5) y MRS/almidón 2% (tabla 6). La observación fue realizada las 24 y 48 horas para poder observar una evolución en el crecimiento de las colonias.

Tabla 8. Observaciones macroscópicas de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS y MRS/almidón 2% en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C

Cepas	Placas MRS/almidón 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS	Placas MRS/almidón 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/almidón 2%
25124	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. Se puede observar una zona clara alrededor del crecimiento y las colonias.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. Se puede observar una zona clara alrededor del crecimiento y las colonias.

A17	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.
A40	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño puntiforme, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño puntiforme, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.
A36202	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño grande, sin pigmento. Presento ligeras zonas claras alrededor de las colonias.

Se observó el crecimiento de las cepas de *Enterococcus* en el medio sólido MRS modificado con almidón al 2%, de los cultivos reactivados en caldo MRS, MRS/almidón 2% y MRS/maltosa 2%. Se utilizó lugar para una mejor observación de los halos de hidrólisis de almidón. La observación fue realizada las 24 y 48 horas, ya que algunas de las cepas crecieron poco a las 24h (tabla 9).

Tabla 9. Observaciones macroscópicas de las colonias de cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS y MRS/almidón 2% en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C. Se reveló con lugol

Cepa	Placas MRS/almidón 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS	Placas MRS/almidón 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/almidón 2%
------	--	---

25124	Presentó grandes halos de hidrólisis alrededor de las colonias, el crecimiento y el medio	Presentó grandes halos de hidrólisis alrededor de las colonias, el crecimiento y el medio
A17	No presentó ningún tipo de halo de hidrólisis en colonias o crecimiento	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y el crecimiento
A36202	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y el crecimiento	Presentó grandes halos de hidrólisis alrededor de las colonias y crecimiento
A40	No presentó ningún tipo de halo de hidrólisis en colonias o crecimiento	No presentó ningún tipo de halo de hidrólisis en colonias o crecimiento

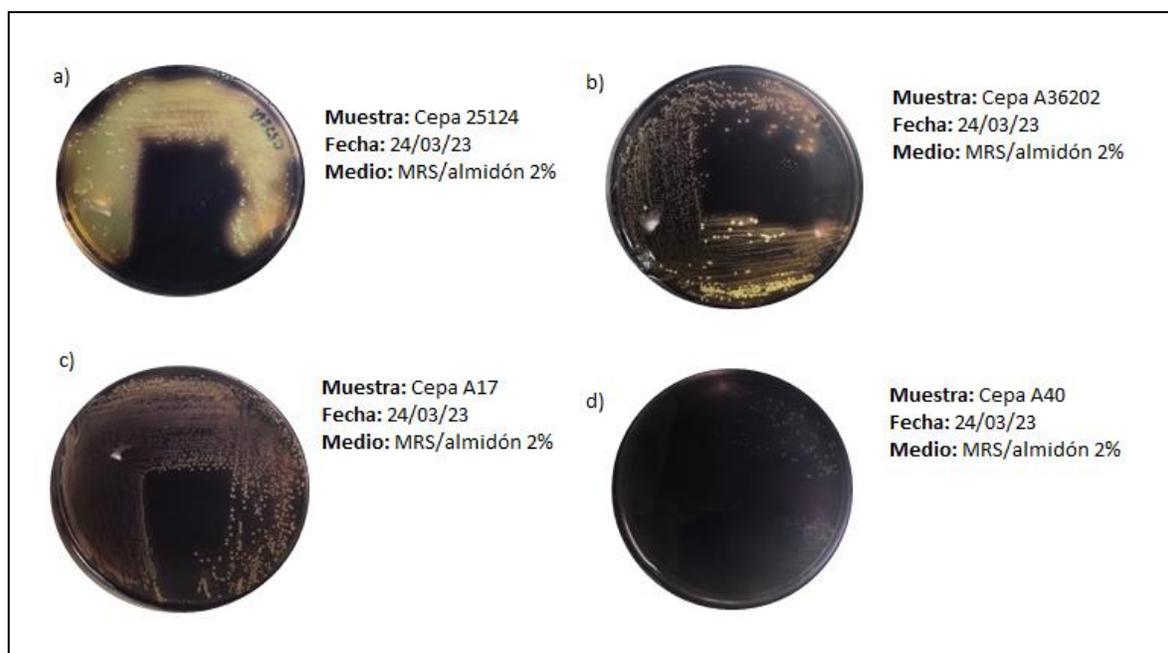


Figura 9. Halos de hidrólisis de almidón revelados con lugol en placas MRS/almidón al 2% de las cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus*, provenientes de la siembra en caldo MRS/almidón al 2%.

La revelación con lugol permitió corroborar que se puede inducir y mejorar la actividad amilolítica de algunas cepas de *Enterococcus* como *E. sulfureus* A36202 y *E. italicus* A17 mediante la reactivación en un medio MRS con almidón.

Se llevó a cabo la siembra de las cepas de *Enterococcus* en medio MRS/almidón de maíz 2% a partir de las siembras obtenidas en caldo MRS/maltosa 2% ya que fue de los carbohidratos donde más rápidamente se desarrollaron los microorganismos, para corroborar si los microorganismos aprovechan mejor el almidón de maíz, que es menos soluble (tabla 10).

Tabla 10. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón 2% de papa y MRS/maltosa 2%, donde +++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 24 y 48 horas

Cepa	Viales MRS/almidón 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS		Viales MRS/maltosa 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS	
	Turbidez a 24 horas	Turbidez a 48 horas	Turbidez a 24 horas	Turbidez a 48 horas
A36202	++	++	+++	+++
A40	+	+	++	++
A17	++	++	+++	+++
25124	+++++	+++++	-	+++

Las cepas presentaron mayor crecimiento de acuerdo con lo mostrado en la tabla 10, cuando son acondicionados en un medio con maltosa, más que en almidón. Para comprobar el efecto sobre la actividad amilolítica se realizó la siembra en agar modificado con almidón de papa al 2%; dicha siembra únicamente fue de los cultivos en MRS/maltosa 2%. (Tabla 11).

Tabla 11. Observaciones macroscópicas de las siembras de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldo MRS/maltosa 2% en placas MRS/ almidón de papa 2% y almidón de maíz 2% respectivamente a las 24 horas a 37° C

Cepas	Placas MRS/almidón de papa 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/maltosa 2%	Placas MRS/almidón de maíz 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/maltosa 2%
25124	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño mediano, sin pigmento. Se puede observar una zona opaca alrededor del crecimiento y las colonias.
A17	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presentó halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presentó halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.
A40	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño puntiforme, sin pigmento. Presento ligeras zonas opacas alrededor de las colonias.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.
A36202	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.	Crecimiento de un solo tipo de colonia de forma circular, de tamaño pequeño, sin pigmento. No presento halo de hidrólisis visible alrededor de colonias o en zona de crecimiento.

Posteriormente, las placas se revelaron con lugol, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 12).

Tabla 12. Observaciones macroscópicas de las colonias de cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (control) provenientes de caldos MRS maltosa en placas MRS/almidón 2% a las 24 horas a 37° C. Se reveló con lugol

Cepa	Placas MRS/almidón papa 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/maltosa 2%	Placas MRS/almidón maíz 2% inoculadas con cepas provenientes de caldo MRS/maltosa 2%
25124	Presentó grandes halos de hidrólisis alrededor de las colonias, el crecimiento y el medio.	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias, el crecimiento y el medio
A17	No presentó ningún tipo de halo de hidrólisis en colonias o crecimiento	Presento pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y el crecimiento.
A36202	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y crecimiento	No presentó ningún tipo de halo de hidrólisis en colonias o crecimiento
A40	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y crecimiento	Presentó pequeños halos de hidrólisis alrededor de las colonias y crecimiento

La cepa *E. italicus* A40 tuvo mejor crecimiento y mayor actividad amilolítica al activarse en el medio MRS-maltosa que en el medio MRS-almidón. La cepa *E. sulfureus* A36202 más versátil, al crecer y tener actividad amilolítica al activarse en glucosa, maltosa y almidón.

En cuanto al tipo de almidón, las cepas de *Enterococcus* mostraron afinidad a un tipo de almidón más soluble, en este caso el de papa; sin embargo, dos de las tres cepas evaluadas, A40 y A127, mostraron también actividad amilolítica en el agar MRS con almidón de maíz. Lo mismo se observó para la cepa control. Esto podría ser una ventaja para las cepas evaluadas, en la fermentación natural del pozol, en donde hay presencia de almidón de maíz.

3.1. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de extinción de yodo.

Los cultivos usados para el análisis de la actividad amilolítica extra e intracelular fueron las cepas de *Enterococcus* A17, A40 y A36202 así como de un control positivo de *Streptococcus infantarius* 25124, crecidos en viales con caldo MRS/ almidón de papa 2% y MRS/maltosa 2% por 48h. (Tabla 13).

$$\text{Actividad amilolítica (U/mL)} = \left(3 \frac{(\text{Abst}0 - \text{Abst}10)}{0.1856}\right)$$

Tabla 13. Escala arbitraria de turbidez por cada vial de caldo MRS/almidón 2% y MRS/maltosa 2%, donde ++++ indica una turbidez completa y homogénea. Incubado a 37° C por 48 horas

Cepa	Caldo MRS/maltosa 2%	Caldo MRS/almidón papa 2%
A17	++++	+++
A40	++++	+++
A36202	-	++++
25124	++++	++++

La cepa A36202 no mostró crecimiento en medio MRS/maltosa 2% por lo que puede deberse a una falta de inóculo o condiciones de incubación.

Tabla 14. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/maltosa 2%. Método de extinción del yodo.

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t10)	Actividad amilolítica (U/mL)
A17	0.5665	0.543	0.37
A40	0.582	0.575	0.113
25124	0.590	0.449	2.23

Tabla 15. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/almidón 2%

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t10)	Actividad amilolítica (U/mL)
A17	1,610	1.4655	2.43
A40	1.576	1.379	3.18
A36202	1.5495	1.2465	4.89
25124	1.5735	0.9355	10.31

Tabla 16. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/maltosa 2%

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t10)	Actividad amilolítica (U/mL)
A17	0.5645	0.553	0.105
A40	0.6	0.592	0.13
25124	0.5245	0.515	1.29

Tabla 17. Resultados de la actividad amilolítica (U/mL) asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* provenientes de caldo MRS/almidón 2%

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t10)	Actividad amilolítica (U/mL)
A17	0.574	0.566	0.13
A40	0.589	0.577	0.193
A36202	0.575	0.475	0.1535
25124	0.5485	0.4685	1.6

3.2. Ensayo de actividad amilolítica intracelular y extracelular. Método de reducción de azúcares por el método de DNS

Los resultados de la evaluación extracelular de las cepas se pueden ver en la tabla 18 y 19, mientras que para las células en las tablas 20 y 21; la ecuación que se usó para el cálculo de yodo activado es la siguiente.

$$\text{Carbohidratos reductores por minuto (mg/mL)} = \left(\frac{(\text{Abst}30 - \text{Abst}0) + 0.1683}{0.1773} / 30 \right)$$

Tabla 18. Resultados de la actividad amilolítica de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t30)	T30 – t0	Carbohidratos reductores (mg/mL)/min
A17	0.0025	0.0535	0.05	0.01256
A40	0.0075	0.0585	0.051	0.01275
25124	0.137	0.3255	0.1885	0.0384

Tabla 19. Resultados de la actividad amilolítica de los sobrenadantes de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/almidón 2% por el método de DNS.

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t30)	T30 – t0	Carbohidratos reductores (mg/mL)/min
A17	0.0025	0.049	0.0465	0.012
A40	0.017	0.0715	0.0545	0.0134
A36202	0.01	0.041	0.031	0.009
25124	0.149	0.294	0.145	0.0384

Tabla 20. Resultados de la actividad amilolítica asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t30)	T30 – t0	Carbohidratos reductores (mg/mL)/min
A17	0.014	0.0295	0.0155	0.006
A40	0.0265	0.040	0.0135	0.0057
25124	0.0105	0.012	0.0015	0.006

Tabla 21. Resultados de la actividad amilolítica asociada a las células de los cultivos de cepas de *Enterococcus* expresado en (mg/mL) /min provenientes de caldo MRS/maltosa 2% por el método de DNS.

Cepa	Absorbancia a 600 nm (t0)	Absorbancia a 600 nm (t30)	T30 – t0	Carbohidratos reductores (mg/mL)/min
A17	0.0085	0.016	0.0075	0.0046
A40	0.0115	0.019	0.0075	0.00457
A36202	0.0445	0.0446	0.0001	0.0034
25124	0.095	0.0605	0.0155	0.003

La hidrólisis de almidón con ayuda de enzimas sirve para obtener diversos productos que incluyen dextrinas y polímeros progresivamente más pequeños, compuestos por unidades de glucosa (Gupta et al., 2003). Estos últimos deben ser hidrolizados por otras enzimas para poder obtener glucosa, que posteriormente deberá ser oxidada por el reactivo de DNS; esto explica los resultados similares por cepas entre sobrenadante y células para este análisis.

Los resultados de la actividad amilolítica asociada a la célula, del control, cepa 25124, tanto con el método DNS como con el método de extinción de yodo fueron menores a los reportados previamente (Díaz-Ruiz et al. 2003). También se observó que las cepas de

Enterococcus evaluadas mostraron baja actividad amilolítica asociada a la célula, con ambos métodos.

Los resultados de actividad amilolítica asociada a la célula con el método de extinción de yodo también mostraron que las cepas tienen poca actividad amilolítica y fueron muy similares entre las cepas evaluadas, de acuerdo con las tablas 14-17. Probablemente los microorganismos evaluados liberan la enzima hacia el medio de crecimiento para optimizar la hidrólisis del almidón, generando sustratos más fáciles de metabolizar por otros microorganismos o incluso para ellos mismos. Como sabemos, el método de extinción de yodo nos brinda una cuantificación más directa de la degradación del almidón, por lo que se utilizó este método en la siguiente parte experimental

4. Cinética de crecimiento de las cepas de *Enterococcus* en diferentes tipos de carbohidratos

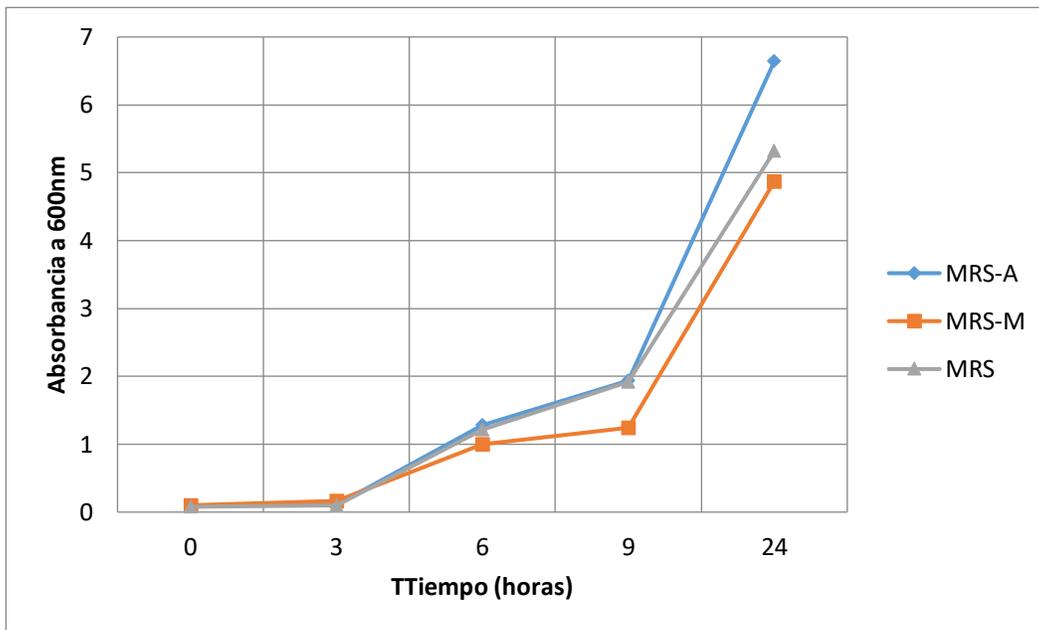


Figura 10. Comparación del crecimiento de la cepa 25124 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

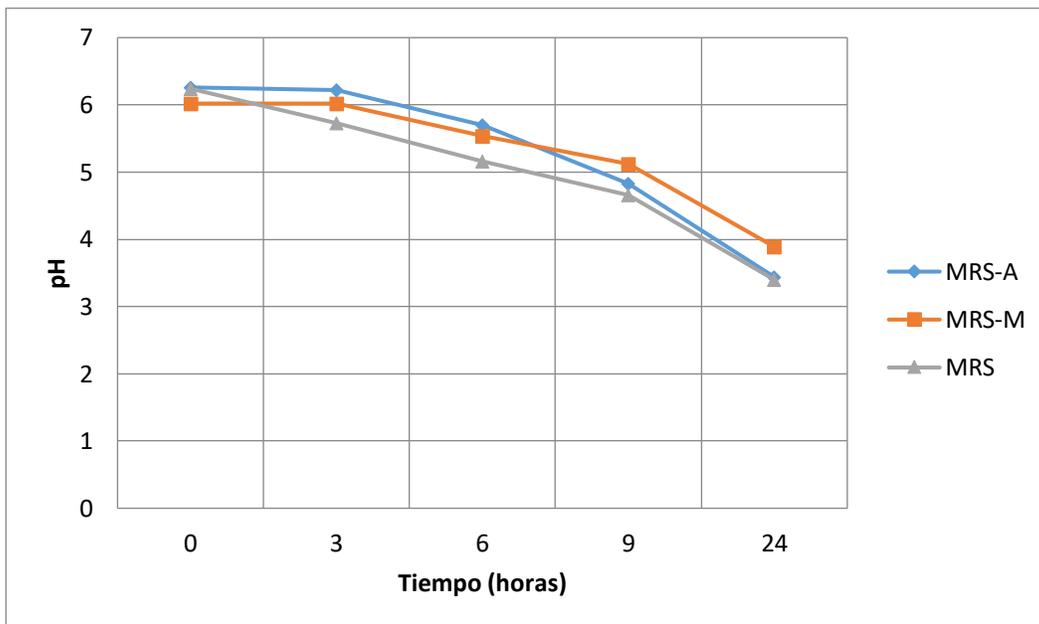


Figura 11. Comparación de la reducción de los valores de pH durante la fermentación de la cepa 25124 en medio MRS con diferentes carbohidratos.

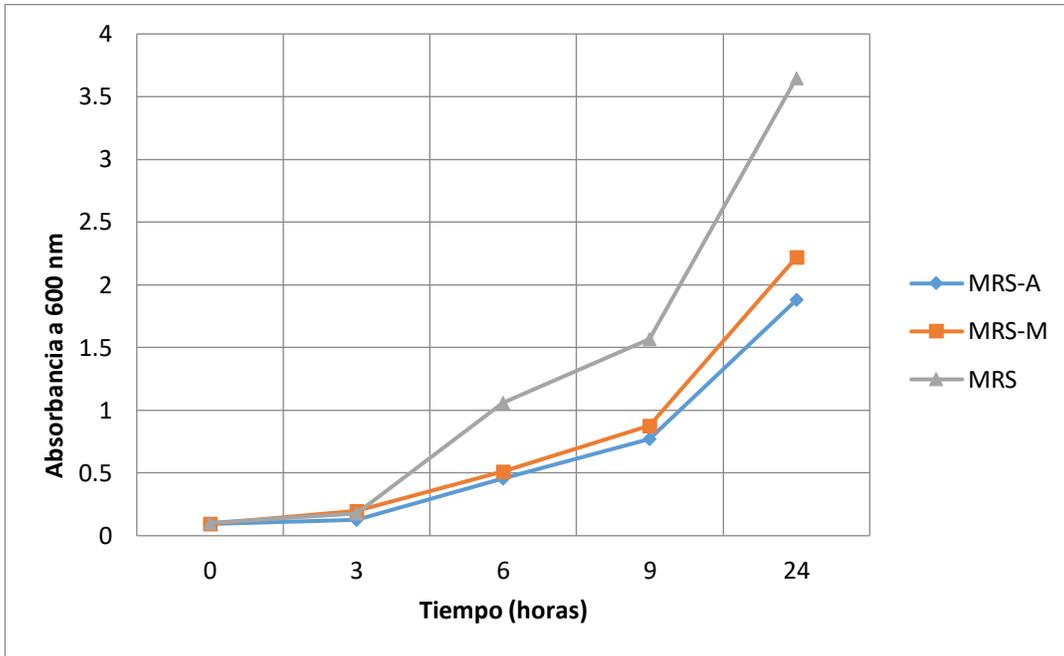


Figura 12. Comparación del crecimiento de la cepa A17 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

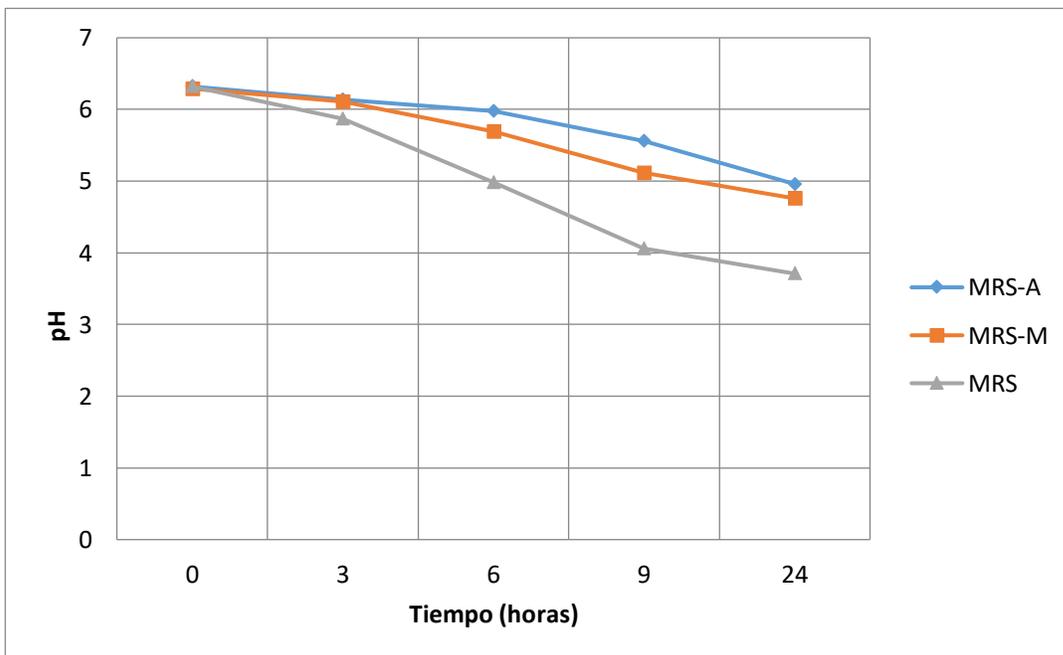


Figura 13. Comparación de la reducción de los valores de pH durante el crecimiento de la cepa A17 en medio MRS con diferentes carbohidratos

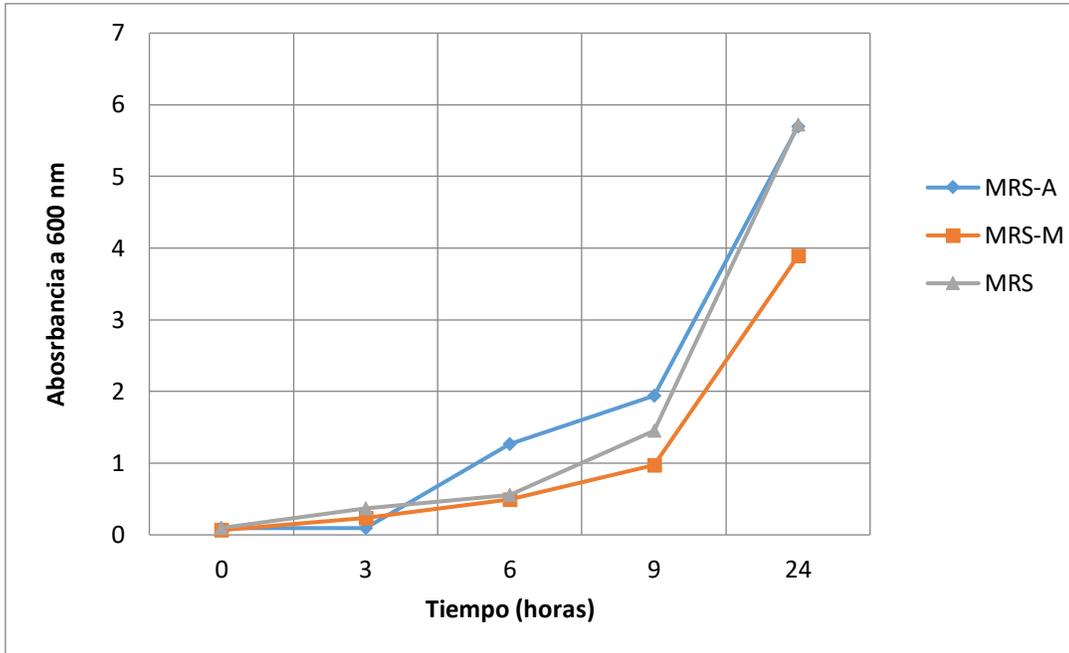


Figura 14. Comparación del crecimiento de la cepa A36202 en medio MRS con diferentes carbohidratos en su composición medido a una absorbancia de 600nm a diferentes tiempos

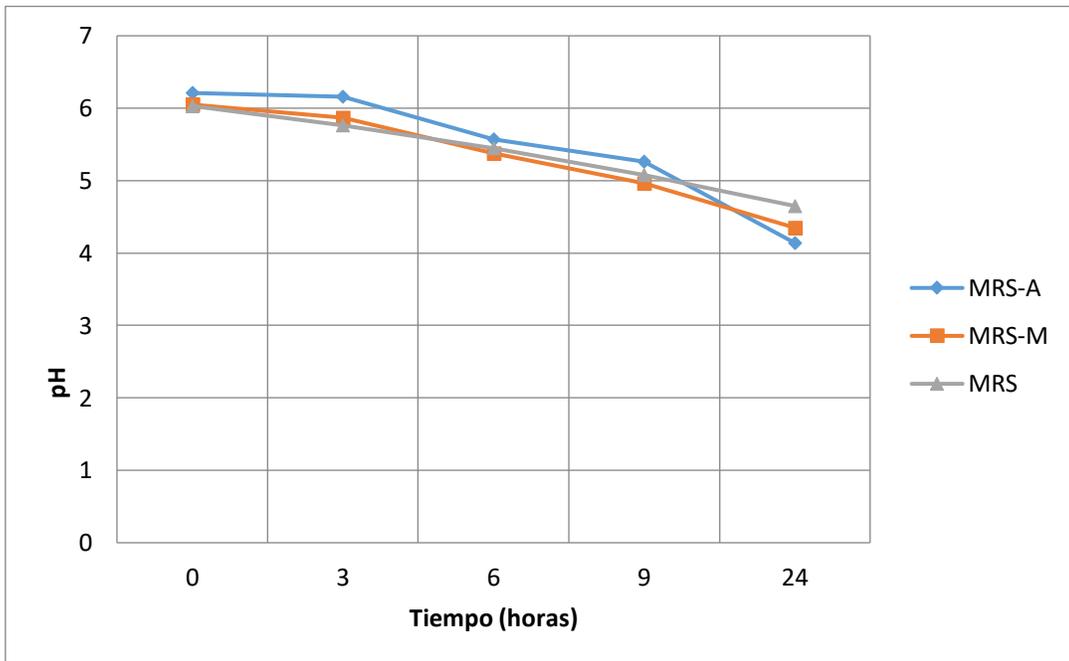


Figura 15. Comparación de la reducción de los valores de pH durante el crecimiento de la cepa A36202 en medio MRS con diferentes carbohidratos

Para la cepa control 25124 se puede ver un óptimo aprovechamiento de los carbohidratos; como sabemos, esta cepa tiene una alta capacidad de metabolizar e hidrolizar el almidón, dando como producto mayor cantidad de dextrinas que de glucosas (Díaz Ruiz et al. 2003), es por esto que en la figura 11, aunque presentó el mayor crecimiento en medio modificado con almidón, el valor que brindo de pH no es el más bajo. Además de que, de acuerdo con Díaz Ruiz et al. (2003), ocurre una lenta hidrólisis de almidón por parte de la amilasa al disminuir el pH del medio, por lo que el valor alto en cuanto al crecimiento en medio MRS modificado con almidón, probablemente se dio por el aprovechamiento de más sustratos presentes en el medio, y no únicamente del almidón, y por eso el valor de pH que brindan todos los medios es constante entre ellos.

La cepa A17 mostró similares resultados cuando creció en el medio con maltosa y almidón, esto debido, probablemente a que la cepa de *E. italicus* aparentemente aprovecha mejor los sustratos de los medios, siendo la glucosa el mejor carbohidrato en el cual se puede desarrollar.

Comparando los resultados obtenidos para la cepa *Enterococcus sulfureus* A36202 reportados por Díaz Ruiz, 2003, donde se indica que dicha cepa tiene un óptimo nivel de actividad amilolítica de 30° a 37° C se puede observar de igual manera un aprovechamiento constante y uniforme de los carbohidratos presentes en los medios, al igual que en el control. Estas condiciones son similares a la incubación del pozol en Villahermosa Tabasco (Díaz-Ruiz, et al 2003). Como se ha visto, esta cepa ha sido la que presenta mayor versatilidad y aprovechamiento de los sustratos para su óptimo crecimiento.

4.1 Evaluaciones de actividad amilolítica extra e intracelular proveniente de fermentaciones (método de extinción el yodo).

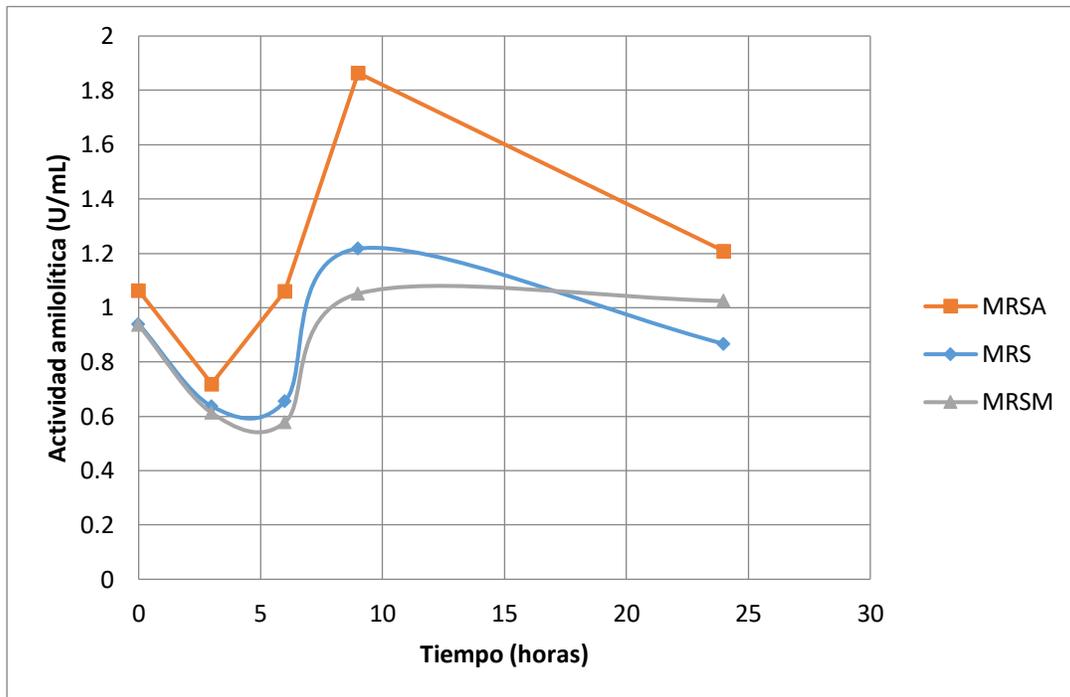


Figura 16. Actividad amilolítica (U/mL) registrada en los sobrenadantes de la cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos.

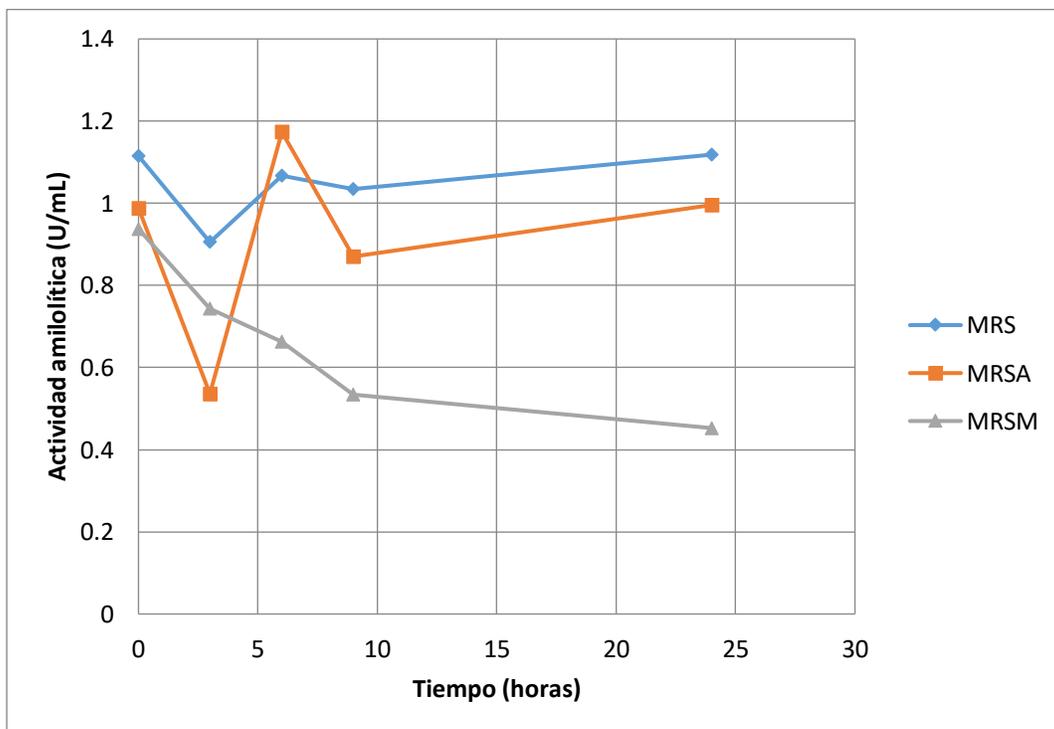


Figura 17. Actividad amilolítica (U/mL) registrada en los sobrenadantes de la cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas), en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos.

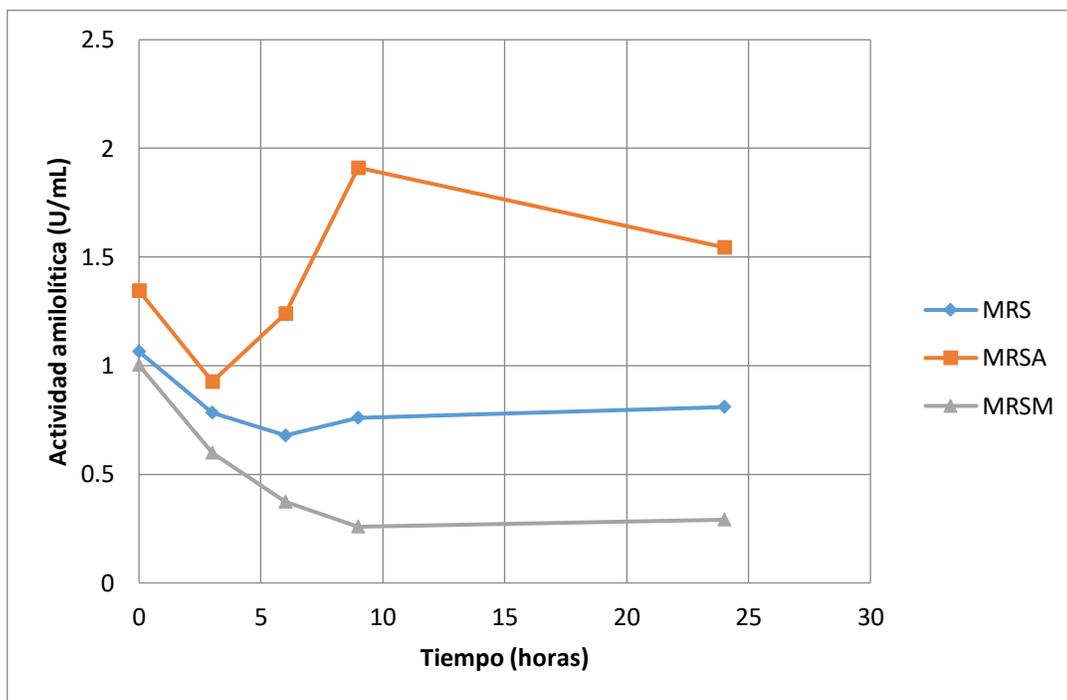


Figura 18 Actividad amilolítica (U/mL) registrada en los sobrenadantes de la cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en el medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

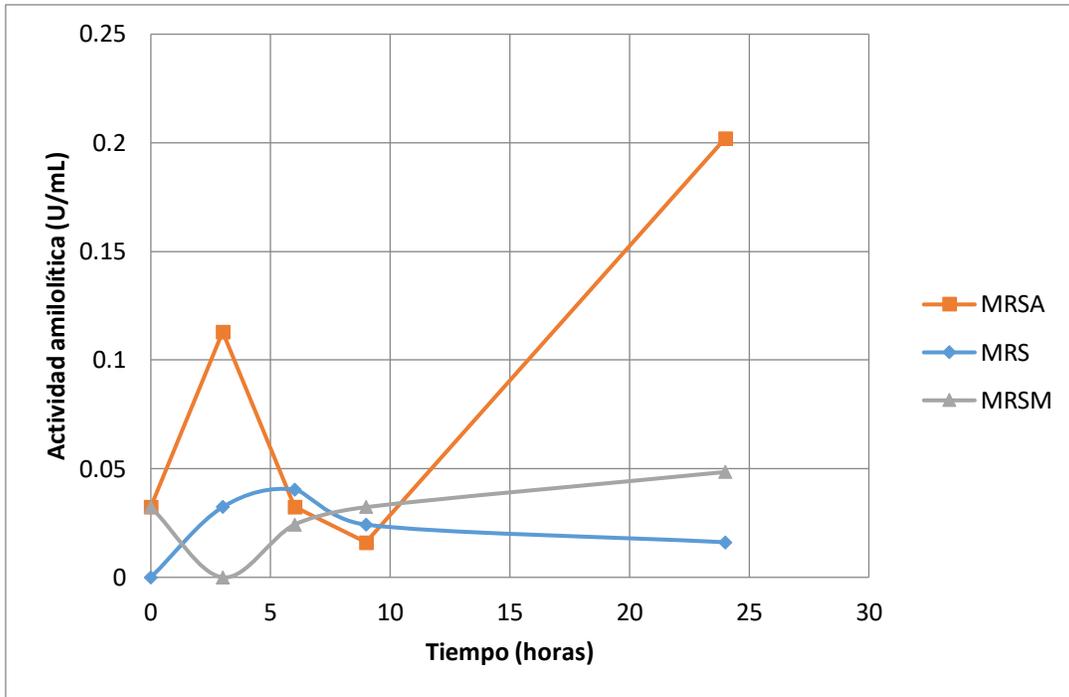


Figura 19. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

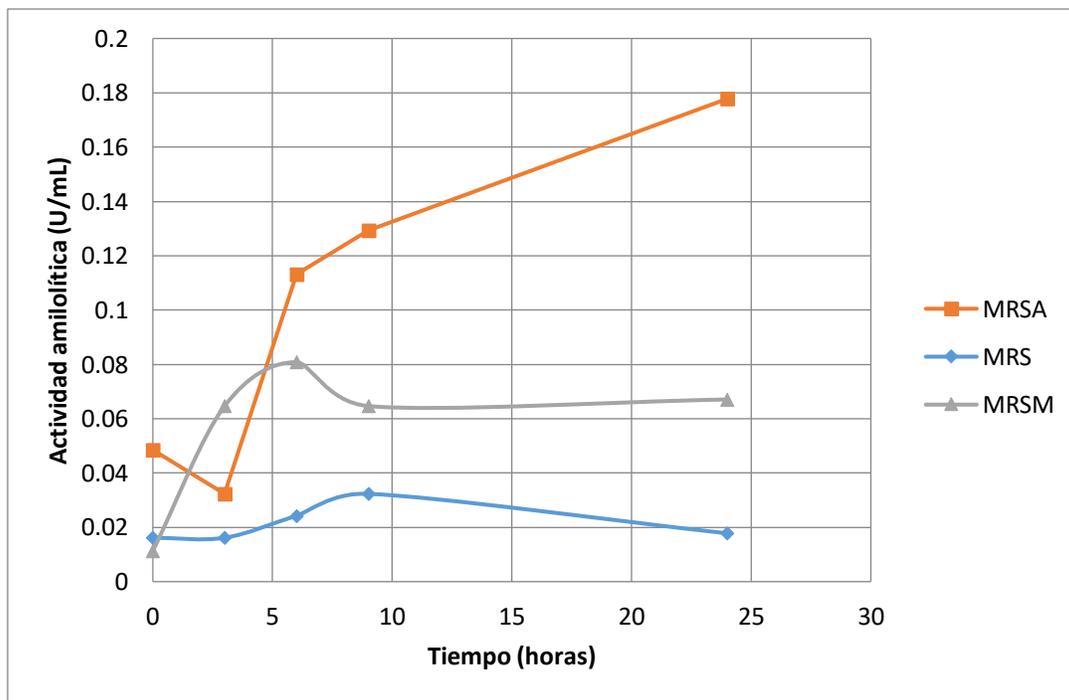


Figura 20. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de la cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

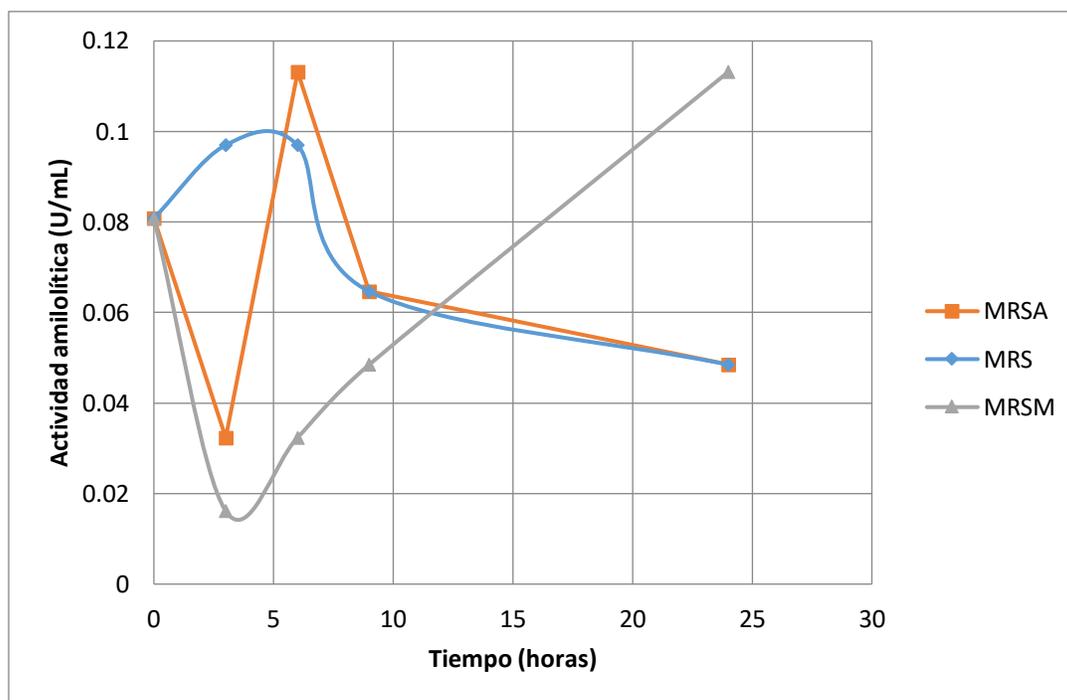


Figura 21. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Ambas cepas de *Enterococcus*, A36202 y A17 presentaron mayor actividad en el sobrenadante cuando provenían de un medio modificado con almidón, mientras que cuando los medios tenían glucosa o maltosa como carbohidrato principal, la actividad fue menor y con tendencia similar a lo largo del tiempo evaluado, se puede ver que a las 9 horas se tuvo la actividad amilolítica máxima.

Para la cepa control, se observó actividad amilolítica en el sobrenadante y asociada a las células. La presencia de maltosa en el medio no tuvo gran impacto en la actividad amilolítica medida, si bien es cierto que lo utiliza bien, de acuerdo con los resultados que se

tienen del API 50CH, que mostraron que la cepa es capaz de utilizar almidón, maltosa y glucosa (Díaz-Ruiz et al. 2003). En general, la actividad amilolítica asociada a la célula fue baja o escasa en las cepas evaluadas y no se observó un efecto al aumentar el tiempo de incubación de la cepa en las diferentes fuentes de carbono.

5. Electroforesis en gel de acrilamida para detectar la presencia de la enzima dentro y fuera de la célula.

Se usó como control positivo a la α -amilasa de *B. subtilis* (Sigma.Aldrich) ®. En los geles, se aplicaron las proteínas obtenidas por el método de tubos Amicon y la precipitación con TCA. Para esta sección únicamente se trabajó con el sobrenadante del medio de la cepa A36, ya que, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente, de las cinéticas de crecimiento y su posterior evaluación de actividad amilolítica por el método de extinción de yodo, las cepas de *Enterococcus* expulsan la proteína (amilasa) al medio donde se encuentren. Se utilizó un volumen inicial de 250ml de medio de cultivo y una repetición reduciendo el volumen del medio de cultivo a 25 mL, con el fin de concentrar la proteína aún más. Para la tinción de los geles se usó el método Coomasie.

Por último, se preparó un cultivo aún más concentrado de las cepas de 10 ml de volumen con el fin de concentrar más la cantidad de proteína que pudiese tener; durante esta repetición se trabajaron con las células y el sobrenadante de las 3 cepas de *Enterococcus* para observar si la enzima se encuentra ligada a la célula o es expulsada al medio. Se usó el método Coomasie en esta sección. Los resultados obtenidos se pueden ver en las figuras 22, 23 y 24 para el zimograma y para Coomasie se encuentran en la figura 25.

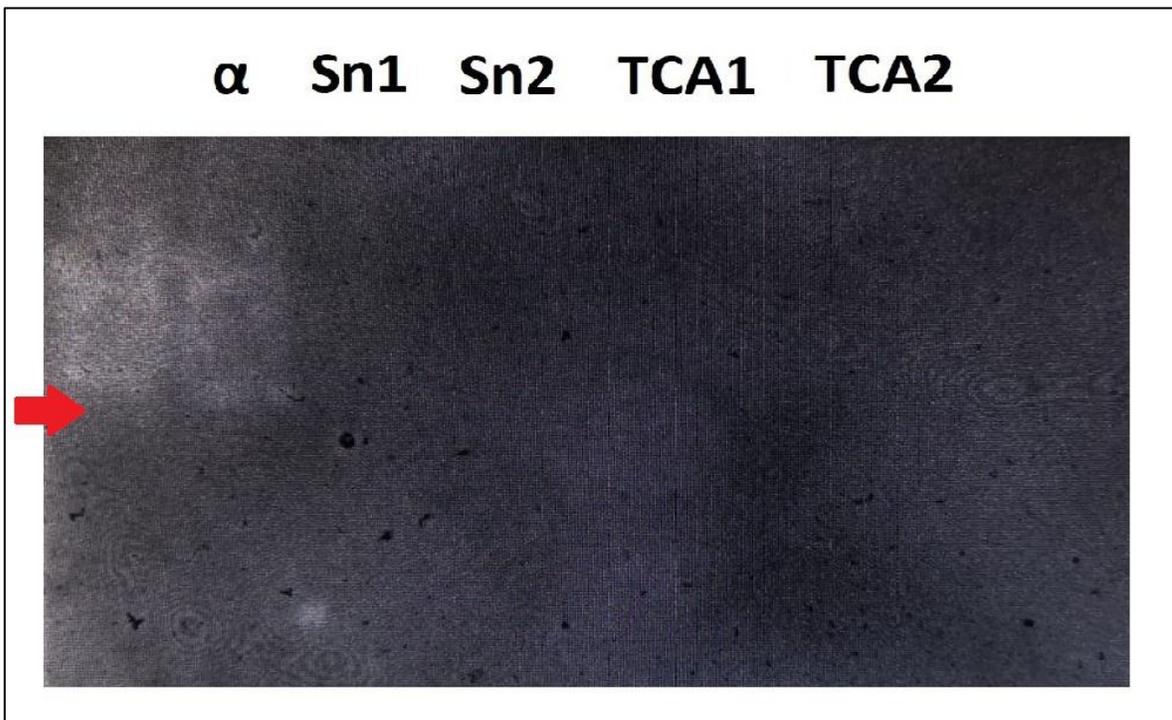


Figura 22. Zimograma de actividad amilolítica de la cepa *Enterococcus sulfureus* A36202.

Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. α: α amilasa. Sn1: Sobrenadante 1 de cepa A36, Sn2: Sobrenadante 2 de cepa A36, TCA1: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 1. TCA2: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 2.

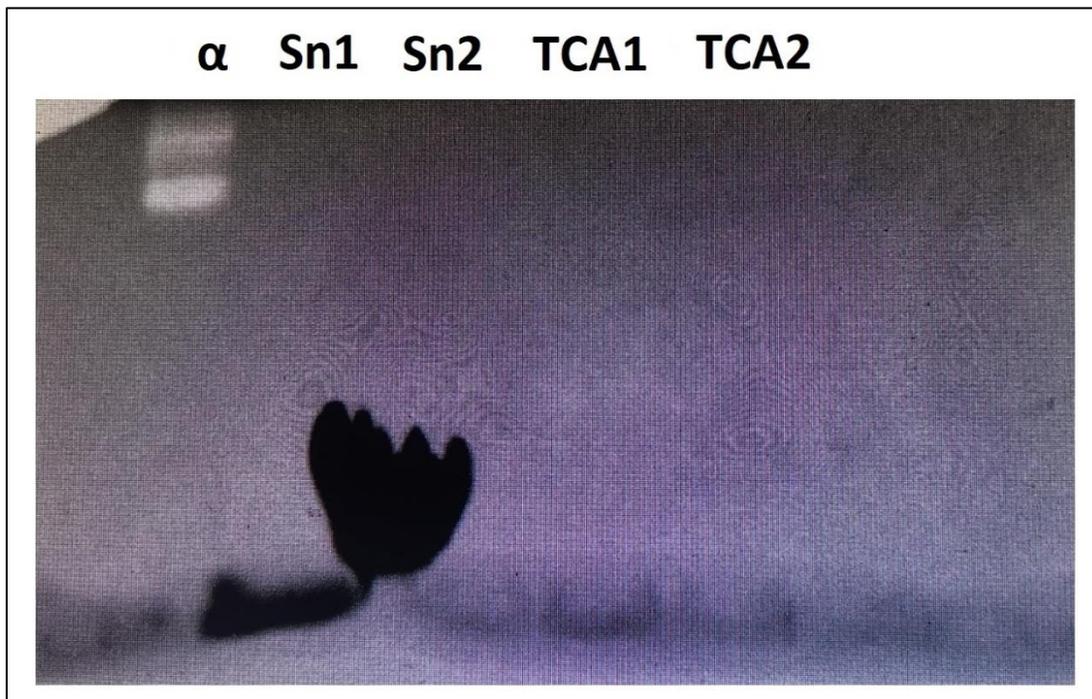


Figura 23. Zimograma de actividad amilolítica de la cepa *Enterococcus sulfureus* A36202.

Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. α : α amilasa. Sn1: Sobrenadante 1 de cepa A36, Sn2: Sobrenadante 2 de cepa A36, TCA1: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 1. TCA2: Precipitación por el método de TCA de la cepa A36 repetición 2.



Figura 24. Zimograma de actividad amilolítica sobrenadante y células de las cepas *E. sulfureus* A36202, *E. italicus* A17 y *E. italicus* A17. Incubado en solución de almidón al 1% a 37° C por 24 horas. PM: Marcador de peso molecular, α: α amilasa. SnA36: Sobrenadante de cepa A36, CA36: Concentrado de células de cepa A36, SnA17 Sobrenadante de cepa A17, CA17: Concentrado de células de cepa A17, SnA40 Sobrenadante de cepa A40, CA40: Concentrado de células de cepa A40



Figura 25. Proteínas presentes en los sobrenadantes y células de los cultivos de las cepas *E. sulfureus* A36202, *E. italicus* A17 y *E. italicus* A17. La tinción se realizó con Coomassie.

PM: Marcador de peso molecular, α : α amilasa. SnA36: Sobrenadante de cepa A36, CA36:

Concentrado de células de cepa A36, SnA17 Sobrenadante de cepa A17, CA17:

Concentrado de células de cepa A17, SnA40 Sobrenadante de cepa A40, CA40:

Concentrado de células de cepa A40

De acuerdo con la figura 23, únicamente fue detectada la α -amilasa que se utilizó como control (carril 1). En ninguno de los carriles en donde se cargaron los sobrenadantes concentrados de *E. sulfureus* A36202 (Sn 1, Sn2, TCA1 y TCA2) se observaron bandas de actividad amilolítica. Dado que las posibles amilasas presentes podrían encontrarse en muy baja concentración en el medio debido a que las cepas de interés no estén produciendo la enzima en una cantidad que pueda degradar de manera completa al almidón, y por lo tanto no sería perceptible.

Recordemos que en el pozol se cuenta con la presencia de otros microorganismos con mayor actividad amilolítica que pueden generar sustratos más sencillos y que pudieran ser aprovechados por los *Enterococcus* presentes, ayudando a la proliferación de este y otros microorganismos.

Conclusiones

-La cepa *Enterococcus sulfureus* A36202 es la cepa con mayor adaptación a medios modificados y óptimo aprovechamiento de sus sustratos, arrojando resultados similares a la cepa control.

-En general, se puede mejorar el aprovechamiento del almidón cuando las cepas de *Enterococcus* son previamente inoculadas en medios MRS modificados con maltosa.

-Las cepas de *Enterococcus* pueden aprovechar más el almidón cuando más soluble sea este.

-Las cepas *Enterococcus italicus* A17 y A40 presentan una mejora en la actividad amilolítica cuando estos provienen de medios MRS modificados.

-La actividad amilolítica de las cepas de *Enterococcus* evaluadas es baja y se dificulta su detección en geles SDS-PAGE.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
BAL	Bacterias ácido lácticas
BALA	Bacterias ácido lácticas amilolíticas
Ca(OH) ₂	Hidróxido de calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EPS	Exopolisacáridos
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
Medio MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe
Medio MRS-M	Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado con maltosa
Medio MRS-A	Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado con almidón
mg	miligramo
μL	microlitro
mL	milímetro
NaOH	Hidróxido de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sodio
nm	nanómetro
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil-sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N'-N'-tetrametiletildiamida
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

ANEXO 1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO MRS Y MEDIOS MODIFICADOS CON ALMIDÓN Y MALTOSA.

El Caldo M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (Britania, 2021).

Preparación de caldo: Suspender 55,25 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 ó 2 minutos para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

Preparación de agar: Suspender 68,25 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante 1 ó 2 minutos para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles.

Tabla 22. Composición del medio MRS (caldo y agar)

Formulación para preparación de 1L de caldo MRS.		Formulación para preparación de 1L de agar MRS	
Peptona	10.0g	Peptona	10.0g
Extracto de carne	10.0g	Extracto de carne	10.0g
Extracto de levadura	5.0g	Extracto de levadura	5.0g
Glucosa	20.0g	Glucosa	20.0g
Fosfato dipotásico	2.0g	Fosfato dipotásico	2.0g
Acetato de sodio	5.0g	Acetato de sodio	5.0g

Citrato de amonio	2.0g	Citrato de amonio	2.0g
Sulfato de magnesio	0.2g	Sulfato de magnesio	0.2g
Sulfato de manganeso	0.05g	Sulfato de manganeso	0.05g
-	-	Agar	15.0g

Para la preparación de medios modificados de MRS con diferentes carbohidratos, se tomaron los reactivos por separado en las cantidades descritas a continuación. La elaboración del caldo y del agar fue la misma que se describe anteriormente.

Tabla 23. Composición del medio MRS modificado con almidón (caldo y agar).

Formulación para preparación de 1L de caldo MRS modificado con almidón.		Formulación para preparación de 1L de agar MRS modificado con almidón	
Peptona (BD-DIFCO)®	10.0g	Peptona (BD-DIFCO)®	10.0g
Extracto de carne (BD-DIFCO)®	10.0g	Extracto de carne (BD-DIFCO)®	10.0g
Extracto de levadura (BD-DIFCO)®	5.0g	Extracto de levadura (BD-DIFCO)®	5.0g
Almidón	20.0g	Almidón	20.0g
Fosfato dipotásico (Sigma.Aldrich) ®	2.0g	Fosfato dipotásico (Sigma.Aldrich) ®	2.0g
Acetato de sodio (Sigma.Aldrich) ®	5.0g	Acetato de sodio (Sigma.Aldrich) ®	5.0g
Citrato de amonio (Sigma.Aldrich) ®	2.0g	Citrato de amonio (Sigma.Aldrich) ®	2.0g
Sulfato de magnesio (Sigma.Aldrich) ®	0.2g	Sulfato de magnesio (Sigma.Aldrich) ®	0.2g
Sulfato de manganeso (Sigma.Aldrich) ®	0.05g	Sulfato de manganeso (Sigma.Aldrich) ®	0.05g
-	-	Agar (BD-Difco)®	15.0g

Tabla 24. Composición de caldo MRS modificado con maltosa

Formulación para preparación de 1L de caldo MRS modificado con maltosa.	
Peptona (BD-DIFCO)®	10.0g
Extracto de carne (BD-DIFCO)®	10.0g
Extracto de levadura (BD-DIFCO)®	5.0g
Maltosa (Sigma.Aldrich)®	20.0g
Fosfato dipotásico (Sigma.Aldrich)®	2.0g
Acetato de sodio (Sigma.Aldrich)®	5.0g
Citrato de amonio (Sigma.Aldrich)®	2.0g
Sulfato de magnesio (Sigma.Aldrich)®	0.2g
Sulfato de manganeso (Sigma.Aldrich)®	0.05g

ANEXO 2. CURVAS PATRÓN USADAS PARA CUANTIFICACIÓN DE SUSTRATOS POR MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS (DNS Y EXTINCIÓN DE YODO).

Tabla 25. Resultados obtenidos para la elaboración de la curva patrón para el método de DNS (Nielsen, 2003) a partir de una solución stock de dextrosa [20mg/ml]

Concentración de glucosa (mg/ml)	Absorbancia a 540 nm (1)	Absorbancia a 540 nm (2)	Promedio
0	0	0	0
0.4	0.161	0.167	0.164
0.8	0.385	0.394	0.3985
1.2	0.543	0.586	0.5645
1.6	0.707	0.694	0.7005
2.0	0.850	0.922	0.886

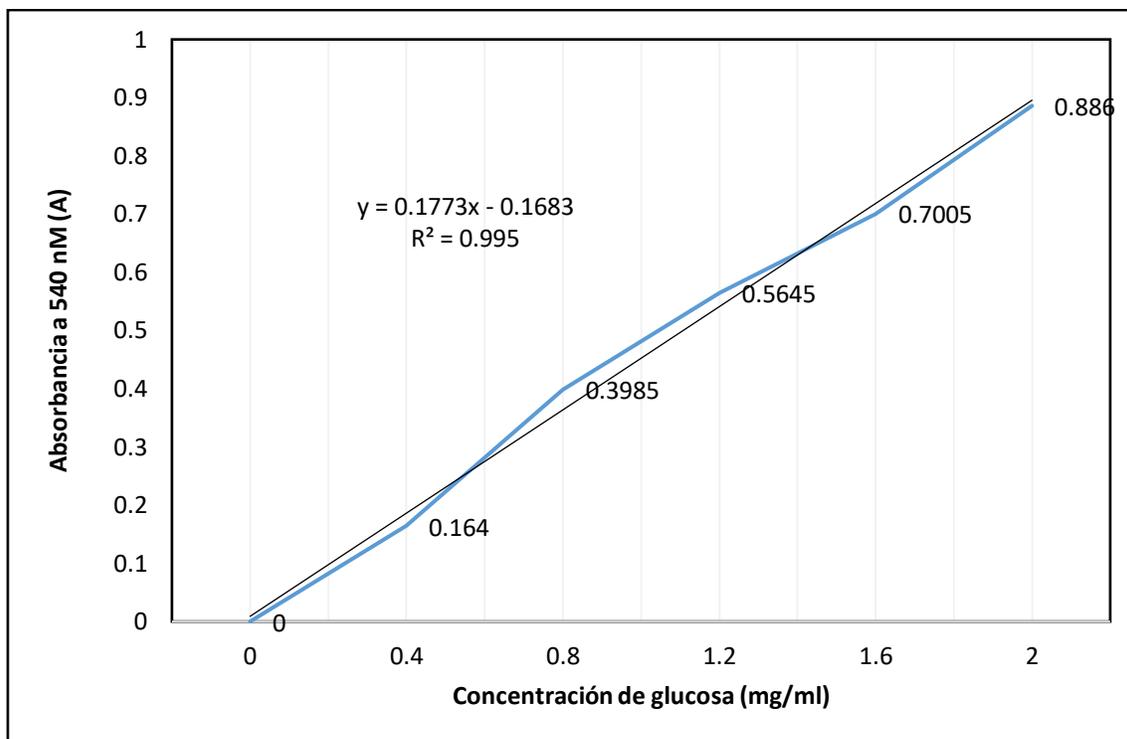


Imagen 1 Curva patrón para la determinación de carbohidratos reductores por el método DNS (Nielsen, 2003).

Tabla 26. Resultados obtenidos para la elaboración de la curva patrón para el método de extinción de yodo (Iturbe y Sandoval, 2013) a partir de una solución stock de almidón de papa [20mg/ml].

Concentración de almidón soluble (mg/ml)	Absorbancia a 600nm (1)	Absorbancia a 600 nm (2)	Promedio
0	0	0	0
0.4	0.183	0.191	0.187
0.8	0.433	0.359	0.396
1.2	0.614	0.549	0.5815
1.6	0.777	0.712	0.7445
2.0	0.930	0.925	0.9275

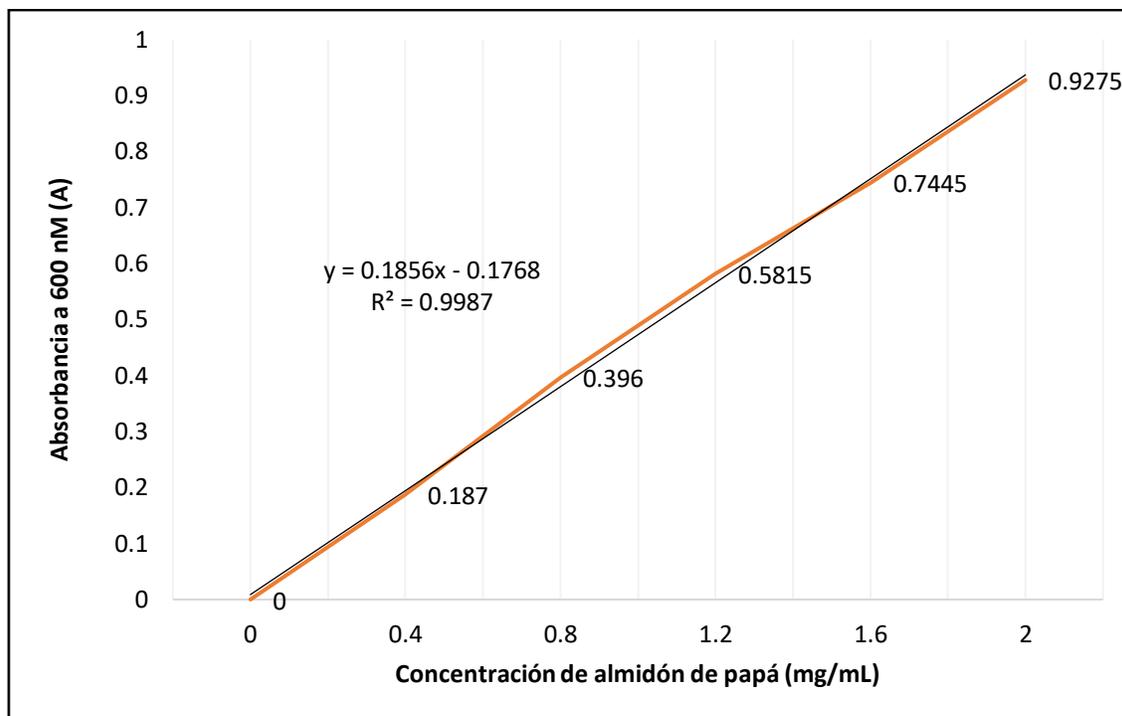


Imagen 2 Curva patrón para la determinación de almidón soluble por el método de extinción de yodo. (Iturbe y Sandoval, 2013)

ANEXO 3. TABLAS CORRESPONDIENTES A LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *ENTEROCOCCUS*

-Cepa 25124

Tabla 26. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.089	6.26
3	0.108	6.22
6	1.28	5.7
9	1.94	4.83
24	6.64	3.44

Tabla 27. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.101	6.02
3	0.163	6.02
6	0.999	5.54
9	1.242	5.12
24	4.87	3.89

Tabla 28. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa 25214 durante 24h en el medio MRS.

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.078	6.24
3	0.097	5.73
6	1.219	5.16
9	1.917	4.66
24	5.32	3.4

-Cepa A17

Tabla 29. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.094	6.32
3	0.126	6.14
6	0.457	5.98
9	0.77	5.56
24	1.88	4.96

Tabla 30. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.096	6.29
3	0.197	6.11
6	0.513	5.69
9	0.878	5.12
24	2.22	4.76

Tabla 31. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A17 durante 24h en el medio MRS

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.103	6.32
3	0.179	5.87
6	1.062	4.98
9	1.57	4.06
24	3.65	3.71

-Cepa A36202

Tabla 32. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS/almidón 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.094	6.21
3	0.096	6.16
6	1.263	5.57
9	1.94	5.26
24	5.7	4.14

Tabla 33. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS/maltosa 2%

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.097	6.03
3	0.37	5.76
6	0.56	5.45
9	1.456	5.08
24	5.72	4.65

Tabla 34. Resultados obtenidos en la medición de pH y del crecimiento (absorbancia a 600nm) de la cepa A36202 durante 24h en el medio MRS

Tiempo (horas)	Densidad óptica a 600 nm	pH
0	0.097	6.03
3	0.37	5.76
6	0.56	5.45
9	1.456	5.08
24	5.72	4.65

Tabla 35. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	0.939729	1.063637	0.935351
3	0.63675033	0.719762	0.61213167
6	0.65509	1.059938	0.578229
9	1.217204	1.863794	1.051317
24	0.86663	1.20786	1.024687

Tabla 36. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	1.115302	0.98722426	0.9375
3	0.905172	0.53636167	0.74354
6	1.06681	1.1735133	0.662716
9	1.034483	0.87094443	0.533405
24	1.118334	0.996121	0.452586

Tabla 37. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por sobrenadante de cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	1.0646552	1.344652	1.002155
3	0.781897	0.926266	0.59806
6	0.678879	1.240101	0.371767
9	0.759698	1.91151	0.258621
24	0.80819	1.543695	0.290948

Tabla 38. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *E. italicus* A17 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	0	0.032328	0.032328
3	0.032328	0.113147	0,032328
6	0.040409	0.032328	0.024246
9	0.024246	0.016164	0.032328
24	0.016164	0.202047	0.048491

Tabla 39. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por células de cepa *S. infantarius* 25124 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	0.016164	0.048491	0.0113147
3	0.016164	0.032328	0.064655
6	0.024246	0.113147	0.080819
9	0.032328	0.12931	0.064655
24	0.01778	0.177802	0.06708

Tabla 39. Actividad amilolítica (U/mL) registrada por cepa *E. sulfureus* A36202 a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en medio MRS modificado con diferentes carbohidratos

Tiempo (horas)	Glucosa	Almidón	Maltosa
0	0.080819	0.080819	0.080819
3	0.096983	0.032328	0.016164
6	0.096983	0.113147	0.032328
9	0.064655	0.064655	0.048491
24	0.048491	0.048491	0.113147

BIBLIOGRAFÍA

Ampe, F., Ben Omar, M., Guyot, JP., 1998. *Recovery of total microbial RNA from lactic acid fermented foods with a high starch content*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 27, 270-274

Arellano-Carbajal, F., & Olmos-Soto, J. 1999. Enzimas amilolíticas microbianas. Biotecnología, 4, 115.

Badui, D. 1999. Química de los alimentos. 3ra edición. Ed. Addison Wesley Longman de México, SA de CV. pp.350

Badui, D. 2006. Química de los alimentos. 4ta edición. Ed. Addison Wesley Longman de México, SA de CV. Pp.716

Baker, C. 1994. Curso conservación de papel de archivos, Conservación de los objetos de papel. Centro Nacional de Conservación y Restauración. Santiago de Chile.

Belitz H y Grosch W. 1985. Química de los Alimentos, 2da Edición. Mallorca. Editorial Acribia Zaragoza.

Ben Omar, N., Ampe, F. 2000. *Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol*. Applied and Environmental Microbiology. 69, 3664-3673.

Burne, A.R., Bessen, E.D., Broadbent, R.J., Claverys, J.P., 2007. *The seventh International Conference on the genetics of streptococci, lactococci, and enterococci*. Journal of Bacteriology 1209-1218

Britania Lab. 2021. [En línea]. *M.R.S. Caldo*. Disponible en https://www.britaniainlab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd4f4357a.pdf

(Último acceso 24 de abril, 2023)

Becerril Luis Antonio, Teresita Sainz, Ma. Teresa Flores, Gloria Díaz Ruiz, Carmen Wachter. *Tipificación de cepas de Streptococcus y de Enterococcus aisladas del pozol*. Póster. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, Acapulco, Guerrero, México. 21 - 26 de junio 2009.

Becerril, L.A. 2012 Tipificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus* spp y *Enterococcus* spp. Aisladas de pozol procedente de Villahermosa Tabasco México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Bühler M, Limper J, Müller A, Schwarz G, Simon O, Sommer M and Spring W. *Las enzimas en la nutrición animal*. Alemania: Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernahrung e.V. (AWT), Roonstrabe 5. 53175, 1998.

Cañas, U., Bárzana, G.E., Owens, J.D., Wachter, C. 1993. *La elaboración de pozol en los altos de Chiapas*. Ciencia. 44, 219-229

Carrera, J. 2002. Módulos de biotecnología. Enzimas industriales. Universidad del Cauca. 1ra edición.

Crueger W y Crueger A. 1993 Enzimas. En: Manual de Microbiología Industrial. Acribia, España. 213-245

Díaz-Ruiz G. 2003. *Fermentación del almidón por bacterias amilolíticas aisladas del pozol*. Tesis de doctorado. Distrito Federal. Universidad Nacional Autónoma de México. 86.

Díaz-Ruiz G., Guyot J. P., Ruiz-Terán F., Morlon J., y Wachter C. 2003. *Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a*

functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. Applied and Environmental Microbiology. 69(8): 4367-4374. ISSN: 1098-5336

Dimidi, E., Cox, R., Rossi, M., Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*.11(8), 1806.

Doman-Pytka M., Bardowski, J. 2004. *Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. Crit. Rev. Microbiol. 30: 107-121.*

Escalante, A., Wachter, C., Farres, A., 2001. *Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology. 64, 21-32*

Fenemma, R. 2000. *Química de los Alimentos*. Ed. Acribia SA. Zaragoza España. Pp 1258

Ferrari A., Vinderola G., Weill R. (2020). *Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura*. Primera edición. Buenos Aires. 17- 408.

Flor, R. E. 2008. [En línea] *Pozol, una bebida fermentada de México* Cienciorama Recuperado de <http://www.cienciorama.unam.mx/#!titulo/177/?pozol--una-bebida-fermentada-tradicional-de-mexico> (Último acceso 25 de abril, 2023)

Fogarty, W, M. 1983. Microbial amylases. En W. M. Fogarty, *Microbial Enzymes and biotechnology*. London: Applied Science Publishers. 1-92

Fogarty, M. W. Kelly, C. T. 1980. *Amylases, amyloglucosidase and related glucanases. Economic Microbiology Vol.5. Academic Press London*

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol. 47: 1–24.*

García- Alonso A, Jiménez-Escrig A, Martín-Carrón N, Bravo L, Saura-Calixto F. 1998. *Assessment of some parameters involved in the gelatinization and retrogradation of starch. España, Madrid. Food Chemistry* 66: 181-187.

García, M., Quintero, R., López-Munguía, A., (2004). *Biología Alimentaria*. Ciudad de México: editorial LIMUSA.

Giraffa G. (2014). Enterococcus. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1: 674-679

Guadarrama A, Orozco J, Morales M. 2015. *Obtención de α -amilasa a partir de Aspergillus oryzae*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. CIII-24.

Gupta, R., Gigras, P., Mohaptra, K., Kumar, V., Chauhan, B. (2003). *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*. *Process Biochemistry*, 1599-1616.

Herrera-Suarez, T. 2003. *Impresiones de un breve recorrido de la memoria a través de más de medio siglo en la UNAM*. Coordinación de la Investigación Científica Universidad Nacional Autónoma de México.

Humbolt C. y Guyot J.P. 2008. *Other Fermentations, Ed. Cocolin, Ercolini D. Molecular Techniques in the microbial Ecology of fermented foods*. Springer. 208-226

Illana, O.V., Wachter, C., Le Borgne, S., López, M .A., 2002. *Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A Leuconostoc citreum strain isolated from pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 28, 101-103

Iturbe, F., Sandoval, J., 2011. *Análisis de Alimentos. Fundamentos y técnicas*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México

Jay, J. Loessner, M. y Golden, D. 2005. *Modern Food Microbiology*, Editorial Springer. Séptima edición, New York, USA.

Kirk, O., Borchert, T.B., Fulsang, C.C. 2002. *Industrial Enzyme applications*. Curr Opin Biotechnol. 13, 345-51

Lahtinen S, Ouwehand A, Salminen S, Wright V.A. (2012). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. 4 Ed. CRC Press.

Latorre, G.L. 2008. Análisis estructural y modificación funcional de la glucosamina de *Saccharomyces cerevisiae* Var. Diastaticus. Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica I Biología Molecular. 22-26

Mariño, R. 1989. Selección de cepas de *Aspergillus niger* para la producción de amilosa. Trabajo de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Monteiro de Souza, P. De Oliveira. P. 2010. *Application of Microbial α -Amilase in industry*. *Brasilian journal of microbiology*. 850-861.

Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacobe de Haut., Raimbault, M. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. A new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1101-1109

Nielsen S., S., 2003. *Food Analysis Laboratory Manual*; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA

Okada, S., Yokobayashi, K., Sakano, Y., Kitahata, S. 1988. *Debranching Enzymes. En Handbook of amylases and related enzymes*. Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press plc. Oxford, England .125-142.

Olvera García, Myrna Elena. (2010). "Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por *Enterococcus* sp.". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México

Pandey, A., Nigam, P. Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. *Advances in microbial amylases*. *Biotechnol Appl Biochem*, 31, 135-152.

Paredes López, O., Guevara Lara, F., & Bello Pérez, L. A. (2010). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*, 92(092). Recuperado a partir de <https://www.revistas.unam.mx/index.php/cns/article/view/14831>

Pedroza, A. 1999. Producción de amilasa termoestable a partir de *Thermus* sp. Tesis de Maestría. Pontificia Iniversidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. 18-19

Phister, G.T., O'Sullivan, J.D., McKay, L.L., 2004. *Identification of Bacylisin, Chlorotetainem, and Iturin A produced by Bacillus sp. Strain CS93 isolated of pozol, a Mexican fermented Maiz dough*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 36, 41-47

Quintero-Salazar, B., Bernáldez, A., Dublán-García O., Barrera V., Favila, H. (2012). Consumo y conocimiento actual de una bebida fermentada tradicional en Ixtapan del Oro, México: la sambumbia. *Alteridades*. 22(44), 115-129.

Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Armando, J., Romero F., 2011. *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y efectos en salud*. Revista Fuentes. Universidad Autónoma de Nayarit.

Rizo Villagrana, J. M. 2012. *Enzimas amilolíticas del pozol. Aproximación proteómica*. Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez Saavedra, Carolina. (2018). "Estudio de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 aislada del pozol". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/173845>

Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centurión D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A., Eslava. 2011. *Survival and characterization of Escherichia coli strains in a typical Mexican acid-fermented food*. International Journal of Food Microbiology 71. 169-176

Salminen, S. von Wright, A. Ouwehand, A., 2004. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos.

Sánchez, C. P., Mejía, C. E., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L. M., Zapata, N., & Gómez, M. 2005. *Estudio de cepas nativas amilolíticas*. Vitae, 12(2).

Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., & Svensson, B. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1543(2), 275-293.

Schevkani, K., Singh, N., Bajaj, R., Kaur, A. 2017. *Wheat starch production, structure, functionality and applications- a review*. International Journal of Food Science and Technology. 38-58.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (21 de junio 2019) [En línea] *Pozol, una bebida comestible*. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/pozol-una-bebida-comestible> (Último acceso: 03 de mayo 2023)

Terebizink, M. R. 1998. *Alfa-amilasa de Aspergillus pruzae: estudios de producción por fermentación en sustrato sólido, purificación y estabilización*. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. 1987. *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*, Ciudad de México; Serie de investigaciones sociales.

Ulloa, M. 1974. *Mycoflorak sucesion in pozol from Tabasco, México*. Boletín Sociedad Mexicana de Micología

Vázquez N.S.M., Suarez H., Zapata S. 2009. *Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne*. Revista chilena de Nutrición. 64-71

Vermeulen R, Derycke V, Delcour JA, Goderis B, Reynaers H, Koch MH. J. 2006. *Gelatinization of Starch in Excess Water: Beyond the Melting of Lamellar Crystallites. A Combined Wide- and SmallAngle X-ray Scattering Study*. *Biomacromolecules*. 7, 2624-2630.

Waldir, E., Mojmír, R., Karel M., Quillama E., Egoavi E. 2007. *Producción de ácido láctico por Lactobacillus plantarum L10 en cultivos batch y continuo*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Wacher, M.C., 1995. Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.