



**Benemérita  
Universidad Autónoma de Puebla**

---

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL  
XOCOATOLE Y AISLAMIENTO DE CEPAS  
AMILOLÍTICAS A PARTIR DE SU PROCESO DE  
ELABORACIÓN”**

**TESIS PROFESIONAL**

**Que para obtener el Título de:  
Licenciatura en Ingeniería en Alimentos**

**Presenta:**

**Ana Paola Sánchez Vizcaíno**

**Director de Tesis:**

**Dra. María del Carmen Guadalupe Avelino Flores**

**Puebla, Pue. Julio 2021**

## Agradecimientos

A la BUAP por todo el apoyo brindado

A la Doctora Ma. Del Carmen Avelino Flores, por toda la paciencia y apoyo, a mis sinodales por sus palabras y recomendaciones, así como a todos los maestros y compañeros que formaron parte de mi formación

A la señora Hortencia Gonzales Falcón, la cual nos brindó información muy importante para la creación de esta tesis.

Y para acabar de toda mi familia, a mis papás Rafael y Yolanda, que sin ellos no hubiera logrado este proyecto, a mis hermanas, a Sofi y a Victor Santos, un gran compañero.

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO III OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO IV HIPÓTESIS.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPITULO V MARCO TEORICO .....</b>	<b>11</b>
<b>5.1 ALIMENTOS Y BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES.....</b>	<b>11</b>
<b>5.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ALIMENTOS .....</b>	<b>15</b>
<i>pH.....</i>	<i>16</i>
<i>Color.....</i>	<i>16</i>
<i>Actividad de agua.....</i>	<i>16</i>
<i>Densidad.....</i>	<i>17</i>
<i>Sólidos suspendidos.....</i>	<i>17</i>
<i>Acidez titulable.....</i>	<i>17</i>
<i>Determinación de humedad.....</i>	<i>17</i>
<i>Cenizas.....</i>	<i>18</i>
<i>Extracto etéreo.....</i>	<i>18</i>
<i>Fibra .....</i>	<i>18</i>
<i>Azúcares reductores.....</i>	<i>19</i>
<i>Proteínas .....</i>	<i>19</i>
<b>5.3 MAÍZ .....</b>	<b>20</b>
<b>5.4 ALMIDÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>5.5 AMILASA .....</b>	<b>22</b>
<b>5.6. MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD AMIOLÍTICA .....</b>	<b>24</b>
<b>5.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<i>Tinción de Gram.....</i>	<i>26</i>
<i>Pruebas bioquímicas .....</i>	<i>26</i>
<b>5.8. EXTRACCIÓN DE ENZIMAS .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO VI METODOLOGÍA .....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 DIAGRAMA DE TRABAJO.....</b>	<b>30</b>
<b>6.2 TOMA DE MUESTRA.....</b>	<b>31</b>
<b>6.3 REALIZACIÓN DE ENTREVISTA .....</b>	<b>31</b>
<b>6.4 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y QUÍMICO PROXIMAL .....</b>	<b>31</b>
<b>6.5 PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD AMIOLÍTICA A PARTIR DEL AGUA DE REMOJO.....</b>	<b>40</b>
<b>6.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPITULO VII RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>7.1 ENTREVISTA SOBRE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL XOCOATOLE .....</b>	<b>47</b>

<b>7.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y QUÍMICO PROXIMAL .....</b>	<b>48</b>
<b>7.3 PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD AMILOLÍTICA A PARTIR DE AGUA DE REMOJO .....</b>	<b>61</b>
<i>Aislamiento de cepas y Purificación.....</i>	<i>61</i>
<i>Caracterización macroscópica y microscópica.....</i>	<i>62</i>
<i>Aislamiento y purificación de cepas con mayor actividad amilolítica .....</i>	<i>66</i>
<i>Pruebas bioquímicas .....</i>	<i>69</i>
<i>Prueba de lugol.....</i>	<i>74</i>
<i>Potencia amilolítica .....</i>	<i>76</i>
<b>7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....</b>	<b>76</b>
<i>Pruebas colorimétricas para detectar presencia de amilasa.....</i>	<i>77</i>
<b>CAPITULO VIII CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>85</b>
<b>FUENTES DE CONSULTA.....</b>	<b>86</b>

## **CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las bebidas fermentadas tradicionales contienen gran historia y vale la pena ser conocidas y difundidas por ser componentes de nuestro patrimonio cultural (Vargas, 2005). Los alimentos fermentados se han consumido en México desde épocas prehispánicas (Vargas & Escamilla, 2007).

En México, se cree que existen más de 200 bebidas y alimentos fermentados (Lappe Oliveras, 2003) pero, solo algunos han sido estudiados y no siempre con la misma profundidad, entre estos destacan el pulque y el pozol (Sánchez et al., 2005).

Algunas bebidas tradicionales han trascendido en el tiempo y espacio y continúan siendo objeto de estudio por su importancia socioeconómica e industrial, como el caso del tequila y el mezcal, (Lozano, 1997); por su importancia histórica, como el pulque, (Goncalves, 1990; Soberón, 1998 & Cervantes, 2007); o por su importancia alimenticia y cultural, como el pozol y el tescüino (Taboada, 1997). Sin embargo, se soslayan las bebidas fermentadas con o sin alcohol, que se siguen produciendo, sobre todo en las comunidades indígenas de nuestro país, cuya preparación es local y su importancia regional. (Sánchez et al., 2005). Un ejemplo de estas es el Xocoatole, bebida tradicional de Molcaxac Puebla, México

Actualmente existe una pérdida de cultura alimentaria y baja educación sobre una alimentación nutritiva y más natural. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018 a nivel nacional, en 2018 el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2%, porcentaje que en 2012 fue de 71.3 por ciento (INEGI, 2018). El desdeño de las raíces y cultura alimentaria ha hecho que se releguen cultivos nativos tradicionales y parcialmente la base alimentaria basada en el maíz y sus derivados, por harinas de trigo, refrescos y productos industrializados (Leyva & Pérez, 2015).

Existen diversidad de alimentos fermentados que aún se realizan de forma tradicional, algunos están en peligro de desaparecer debido a su poca difusión o características sensoriales poco llamativas, sin embargo, constituyen un valioso tesoro cultural de los pueblos indígenas o rurales; muchos de estos alimentos también pueden ser nutrimentalmente completos o poseer propiedades funcionales benéficas para los consumidores. Las fermentaciones tradicionales incluyen etapas en el proceso de elaboración en donde los microorganismos que realizan la fermentación son los mismos que de origen se encuentran en el alimento, son cepas nativas en ocasiones desconocidas, pero con un alto potencial industrial y biotecnológico, ya sea como inóculos para la realización de procesos de fermentación en condiciones más favorables o bien como fuente de metabolitos y enzimas de interés.

Por otro lado, en la industria alimentaria existen productos obtenidos de la hidrólisis del almidón como lo son la glucosa, el jarabe de maíz, fructosa, etc., los cuales pueden ser obtenidos por reacción química ácida de nitrilos, provocando residuos y subproductos no deseados; o por medio de enzimas, las cuales poseen mayores ventajas con respecto a las reacciones químicas, además de actuar a bajas concentraciones y son fáciles de inactivar (Salcedo et al., 2009).

Se estima que las enzimas destinadas al procesamiento de alimentos y bebidas captan alrededor de 40% del mercado global y que dentro de este sector al menos 45% están destinados a la modificación de carbohidratos particularmente, aquellas destinadas a la transformación de almidón. Se calcula que la industria de los detergentes capta alrededor del 30% del mercado, la industria textil y la industria del papel entre el 10 y 12% del mercado respectivamente y el resto del mercado se divide en aplicaciones diversas para industria química farmacéutica y biológica (Rodríguez & Castillo, 2014).

Por tanto, la autora del presente trabajo de investigación, se hace la siguiente pregunta de investigación

¿La caracterización fisicoquímica y microbiológica del “Xocoatole”, puede ayudar a la conservación cultural y alimentaria, de bebidas fermentadas autóctonas de México y generar procesos industriales verdes, mediante el uso de enzimas microbianas?

## **CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN**

En México aproximadamente del 50-55% de los alimentos consumidos son importados, lo que trae como consecuencia un menor consumo de los productos consumidos en el país (Sánchez et al., 2014). Dentro de los alimentos se encuentran las bebidas tradicionales, las cuales son muy variadas debido a la diversidad que existe en el país, tanto cultural como en biodiversidad. Algunas bebidas han sobrevivido al paso del tiempo, como lo son el pozol, tepache, pulque, debido a su importancia cultural y nutricional. Además de las características nutricionales, es posible que aporten una aplicación o beneficio biotecnológico, ya que al ser bebidas fermentadas tradicionalmente, se trata de microorganismos nativos, los cuales podrían ser fuente de subproductos de interés para la industria, como lo son las enzimas. Solo algunos alimentos y bebidas fermentados no alcohólicos han sido estudiados en cuanto a composición química valor nutrimental y microbiota nativa como por ejemplo, el pozol.

La demanda de enzimas transformadoras de almidones es grande; la utilidad de conocer microorganismos autóctonos capaces de producir enzimas con mayor potencia de hidrólisis podría ayudar a la industria alimenticia y al medio ambiente pues los procesos serían menos tardados y más “limpios”. Por lo que las bebidas o alimentos fermentados tradicionales pueden ser nuevas fuentes para la obtención de microorganismos con potencial industrial y biotecnológico.

Por lo anteriormente descrito, en este trabajo de investigación científica experimental se pretende la caracterización fisicoquímica del alimento tradicional fermentado Xocoatole elaborado en la comunidad de Molcaxac del Progreso, Puebla, México y el aislamiento, purificación y caracterización de microorganismos presentes durante su proceso de elaboración, que tengan capacidad amilolítica con aplicación biotecnológica. La importancia de estudiar, caracterizar y rescatar

el consumo de dichos alimentos se hace necesaria desde el punto de vista tanto cultural como nutricional.

Además, el presente trabajo de investigación, tiene alto valor teórico, por ser pionero en el estudio del xocoatole, tiene alto grado de aplicabilidad y reproducibilidad metodológica, así como aporte industrial e impacto social, cultural y ambiental, lo que JUSTIFICA ampliamente su realización.

## **CAPÍTULO III OBJETIVOS**

**Objetivo General.** Caracterizar fisicoquímicamente el Xocoatole, fermentado de maíz elaborado en la comunidad de Molcaxac del Progreso, Puebla, México y purificar cepas microbianas con capacidad amilolítica presentes durante su proceso de elaboración.

Objetivos específicos

1. Conocer el proceso de elaboración del Xocoatole, mediante la entrevista a la persona que lo prepara acerca de su modo de elaboración.
2. Determinar las principales características fisicoquímicas del Xocoatole
3. Obtener un cepario de microorganismos amilolíticos presentes en la microbiota del Xocoatole durante el proceso de remojo del maíz
4. Realizar pruebas cualitativas de la actividad amilolítica para las cepas microbianas de mayor interés.

## **CAPÍTULO IV HIPÓTESIS**

El “Xocoatole” es un alimento tradicional fermentado de maíz, cuyas características fisicoquímicas deberán responder a un alimento fermentado con producción de ácidos, disminución de pH y como principal componente agua y los componentes del maíz.

Debido a la composición principal del maíz azul por aproximadamente 80% de almidón, podrían presentarse microorganismos amilolíticos capaces de usar el almidón como fuente de carbono mediante la producción de enzimas amilasas.

## CAPÍTULO V MARCO TEORICO

### 5.1 Alimentos y bebidas fermentadas tradicionales

Dentro de la alimentación humana existe un elemento de vital importancia en el acto del comer y beber. El beber a lo largo de la historia se ha destacado por su uso social, ritual, medicinal, alimenticio, entre otros, lo que ha derivado en la presencia y creación de diversas bebidas dentro de la historia y la cultural de nuestro país.

En México dos de los pilares importantes dentro de la alimentación son el maguey y el maíz, este último siendo de gran importancia. Estas dos plantas han sido consideradas las más trascendentales dentro del periodo de asentamiento de los primeros grupos sedentarios (Bustos, 2017).

A lo largo de la historia y culturas de los asentamientos humanos en nuestro país se han desarrollado diferentes variedades de alimentos y bebidas fermentadas tradicionalmente tales como:

*Tepache*: La palabra tepache deriva del náhuatl cuyo significado es “bebida de maíz martajado”, esta bebida es consumida y localizada principalmente en la ciudad de México, sin embargo, existen otras variedades en zonas aledañas como lo son: Hidalgo, Puebla, Morelos, San Luis Potosí, Oaxaca, Jalisco y Nayarit. Antiguamente la preparación del tepache se atribuía a la época prehispánica, en su origen esta bebida era preparada básicamente con maíz, en la actualidad dentro de su elaboración se adicionan otros ingredientes como la piña, la manzana y la naranja (Bustos, 2017). De los microorganismos que provocan la fermentación del tepache se han identificado las bacterias *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens* y *Candida inconspicua* (Herrera, 2007).

*Pulque*: Esta bebida tradicional mexicana es producida por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenida a partir de diferentes especies de maguey. Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central. El proceso inicia por una fermentación en el maguey en donde se encuentran diversos microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos. Estos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en el aguamiel. El proceso de fermentación puede durar de 12 a 48 horas a 25°C (Cervantes, 2008).

El pulque es consumido por diversas razones, una de ellas es por su alto contenido nutrimental principalmente proteínas y vitaminas del complejo B, esto atribuido por los microorganismos que lo caracterizan, con énfasis a las levaduras, en donde la más común es *Saccharomyces cerevisiae*, pero también se desarrollan en esta bebida varias especies de los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* y *Torulopsis*. De las bacterias más constantes son *Lactobacillus buchneri*, *Lenoconostoc mesenteroides* y *Zymomonas mobilis*. Debido a la presencia de estos microorganismos, el pulque tiene propiedades curativas, considerando que puede mejorar la flora intestinal evitando el desarrollo de bacterias patógenas (Herrera, 2007).

*Tesgüino*: El tesgüino, bebida fermentada cuya elaboración es a partir de maíz germinado o nixtamalizado que es molido y añadido con azúcar o piloncillo, en donde el inóculo inicial para comenzar la fermentación es tesgüino viejo. Durante la fermentación se desarrollan diversos microorganismos que le confieren a la bebida sabor, olor y consistencia característico. Las bacterias que se desarrollan en el Tesgüino son diversas especies de los géneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, las levaduras más frecuentes son *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefasciens* y otras especies del género *Candida* (Herrera, 2007). Lo consumen grupos étnicos del norte y noreste de México, como

los yaquis y pinas de sonora; los tarahumaras de Chihuahua; los Guarijios de Chihuahua y Sonora; los tepehuanos de Durango; los Huicholes de Jalisco (García, 2015).

*Pozol*: Existen referencias muy antiguas sobre esta bebida tradicional, las más detalladas provienen posteriores a la colonia, estas referencias describen que las mujeres indígenas remojaban y cocían el maíz en cal para retirar el hollejo, después lo molían en un metate y hacían bolas de maíz de diferente tamaño para dárselas a los que iban a trabajar al campo, a los caminantes y a los viajeros. Para su consumo disolvían la bola de maíz en agua y aunque la bola se fermentaba se consumía dándole un sabor agrio o acedo. Los pueblos Yucatecos consideraban al pozol como un alimento fundamental. Por ello solían llenar la boca de sus muertos con una porción que sería utilizada por el difunto como bebida y comida a lo largo de su viaje a la otra vida (Sepúlveda, 2015).

El diccionario de medicina tradicional de la UNAM define a la palabra pozol como “espumoso”. Esta bebida es considerada como una de las más importantes después del pulque por su gran contenido nutricional. Su preparación se encuentra primordialmente entre los grupos étnicos del sur y sureste del país (Bustos, 2017).

Los microorganismos han sido muy estudiados, predominan las bacterias ácido lácticas y bacterias fijadoras de nitrógeno en particular *Agrobacterium azotophilum*, lo que favorece la síntesis de proteínas que mejoran la calidad nutritiva del producto fermentado, en relación con la masa sin fermentar (Herrera, 2007)

*Axokot*: El axokot es una bebida tradicional que es preparada y consumida por los nahuas de la sierra norte de Puebla, México, esta bebida es elaborada con maíz nixtamalizado y una pasta de cal y axokotxihuit. Su consumo está determinado por eventos rituales, ceremonias y fiestas.

Dentro de esta bebida de acuerdo a Sánchez et al., 2010, se encuentra una amplia microbiota, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *C. tirobutyricum* y *S. cerevisiae*.

## **Xocoatole**

En México existen muchas variedades de alimentos y bebidas a base de maíz así como de maíz fermentado a las cuales se les puede atribuir este nombre en su originalidad náhuatl o español, siendo las diferencias básicamente debidas a la forma de preparación. La palabra Xocoatole, proviene del náhuatl “Xocoatolli” cuyo significado es atole agrio.

Analizando algunos ejemplos. El atole agrio es preparado con masa agria mezclada con maíz blando y molido, la masa agria, que actúa como fermento, es preparada con maíz negro hecho masa y fermentada durante 4 ó 5 días. Ya servido se le agrega sal y chile; en ocasiones es usado como purgante (Hernández, 1942). Los mazatecos, indígenas del norte del estado de Oaxaca, utilizan esta bebida en fiestas, por lo general relacionadas con la iglesia como son casamientos y bautizos y aún en los funerales. En este lugar el atole agrio a veces es combinado con frijoles antes de ser servido (Hausen, 1946). El pozol se prepara a partir de bolas de masa fermentada a la que se le agrega agua al momento de tomar. El tesgüino se fermenta a partir de maíz germinado que se muele al momento de preparar la bebida, además de que se produce una fermentación alcohólica. Existe la creencia que la habilidad de generar una buena fermentación se asocia con el color del maíz; entre los nahuas de Chicocuac de Juárez se decía que el maíz rojo se tenía que cocinar rápidamente, porque por el color si no se utilizaba rápidamente se agriaba. El maíz nixtamalizado tarda más tiempo en fermentarse que el maíz no nixtamalizado. En las comunidades donde el atole agrio se prepara con el maíz negro (Ixtenco, Hueyapan) se nota que prevalece el uso de maíz no nixtamalizado. Por otro lado, alrededor de Cuetzalan, Puebla, donde el maíz criollo negro no se da en sus tierras de clima cálido, es más

común usar el maíz amarillo o blanco en una preparación nixtamalizada (Nieto & Vásquez, 1993). Entre los mazahuas del Estado de México, la fermentación es una preparación característica de su cocina como el Zeende, fermentación ligeramente alcohólica de maíz. Los purépechas de Michoacán siguen preparando una bebida que se llama Xarhi Kamata, que es un atole agrio con masa fermentada de maíz morado. (Mora, 2013).

Los mazatecos de Oaxaca, también hacen un atole agrio salado y servido con cacahuates o chile, a su vez hecho con maíz tierno. Una preparación semejante existe en Quintana Roo y Yucatán, el a'ak-sa'a o atole nuevo que se hace con granos de elote, molidos y reposados toda la noche, después cocidos y mezclados con sal o azúcar y servidos con chile (Alaya, 2019).

Específicamente se le llama o conoce como Xocoatole o atole agrio a una bebida elaborada de maíz negro o morado, hecho como un atole normal pero puesto a reposar para provocar una fermentación natural y espontánea, de ahí su sabor agrio.

Esta bebida es común en las regiones de origen nahua como en el estado de México, Tlaxcala, Puebla, etcétera (Ulloa & Cruz, 1973).

Además, es comúnmente consumido en la celebración de semana santa, pues su color y sabor recuerdan a la sangre de cristo, al vino dentro del ritual de la eucaristía o al color morado de la temporada.

El atole agrio, trata de una fermentación láctica que genera una bebida ácida sin propiedades embriagantes. Esta bebida la diferencia de otras por varias características como el hecho de si el maíz es nixtamalizado o no nixtamalizado, dejado al fogón por uno o dos días, variedad de maíz etc. (Johnson, 2019).

## **5.2 Propiedades Físico-químicas de los alimentos**

La composición química de los alimentos es muy importante, ya que debido a ésta es la calidad nutricional de los mismos y se derivan ciertas características sensoriales, el análisis químico proximal permite conocer la cantidad aproximada de los principales componentes del alimento y comprende la determinación de porcentajes de humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos solubles y proteína en los alimentos (Barquero, 2012). Algunas de las propiedades físico-químicas de los alimentos son:

### **pH**

El pH es una medida de la acidez o basicidad de una solución. El pH es la concentración de iones o cationes hidrógeno [H<sup>+</sup>] presentes en determinada sustancia en solución acuosa. La sigla significa "potencial de hidrógeno" (Sepúlveda, 2015).

### **Color**

La importancia del color como una característica de valoración física y de calidad en los alimentos hace necesario disponer de métodos objetivos de medición que permitan la obtención de valores comparables y reproducibles. El color es afectado por muchos factores, tales como la iluminación, el observador, el espectro, la presencia de pigmentos o las propias características de superficie, tamaño, textura y brillo de la muestra analizada (Rettig, 2014).

### **Actividad de agua**

El agua es, quizás, el factor individual que más influye en la alterabilidad de los alimentos. Se ha demostrado que alimentos con el mismo contenido de agua se alteran de forma distinta, por lo que se deduce que la cantidad de agua no es por sí sola una herramienta indicativa del deterioro de los alimentos.

De este hecho surge el concepto de  $a_w$ , que indica la fracción del contenido de humedad total de un producto que está libre y en consecuencia, disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo diversas reacciones químicas que afectan a su estabilidad (Ferrer, 2008).

### **Densidad**

La densidad está definida como el cociente entre la masa y el volumen de la sustancia que se trate. Esta propiedad depende de la temperatura, por lo que al medir la densidad de una sustancia se debe considerar la temperatura a la cual se realiza la medición.

Si se desea determinar con mayor precisión la densidad de una sustancia líquida es común utilizar un picnómetro, es un instrumento sencillo cuya característica principal es la de mantener un volumen fijo al colocar diferentes líquidos en su interior (Bolaños, 2010).

### **Sólidos suspendidos**

El término "sólidos" se refiere a la materia sólida suspendida o disuelta en agua. Los sólidos pueden alterar el sabor del agua y provocar una reacción fisiológica desagradable momentánea en el consumidor.

La determinación del contenido de sólidos totales se basa en la evaporación total de una muestra de agua. Separando por filtración el material suspendido, se puede conocer por diferencia, el contenido de este último y del material disuelto. (NMX-F-527-1992).

### **Acidez titulable**

La acidez titulable es un análisis que mide la concentración de ácidos totales en un alimento el cual se determina mediante la titulación de ácidos intrínsecos con una base estándar. La importancia de este análisis radica en que es un parámetro que impacta en el sabor del alimento, además de ser un predictor del pH (Catrin, 2017).

### **Determinación de humedad**

La determinación de humedad en los alimentos es de suma importancia, ya que un elevado contenido de ésta influye en la velocidad de multiplicación de los microorganismos, provocando su descomposición y por lo tanto la pérdida de la calidad sanitaria (Caffet et al., 2008).

La pérdida de peso observada representa la humedad de la muestra y el peso obtenido corresponde a los sólidos totales. Se utiliza en alimentos con alto contenido acuoso y en aquellos que no se descomponen a altas temperaturas.

Este método se basa en que al añadir arena o gasa, se incrementa la superficie de contacto y la circulación del aire en la muestra, favoreciéndose así la evaporación durante el tratamiento térmico (NOM-116-SSA1-1994).

### **Cenizas**

La definición de ceniza hace referencia al residuo inorgánico del proceso de ignición u oxidación total de la materia orgánica de un alimento. Las muestras secas no requieren ninguna preparación, mientras que las de gran cantidad de humedad requieren el secado de la muestra (Nielsen, 2010).

### **Extracto etéreo**

Es conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con éter etílico (ésteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ceras, ácidos grasos libres) (MacFaddin, 2003).

Para esta determinación el método estándar es usando un equipo soxhlet, el método soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el alimento (NMX-F-089-S-1978).

### **Fibra**

La fibra ayuda a eliminar el exceso de sustancias alimenticias necesarias para el organismo, contribuye a aumentar el volumen del contenido intestinal y a facilitar algunas funciones digestivas (Britania, 2015).

Este método se basa en la digestión ácida y alcalina de la muestra obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que con calcinación posterior y restando las mismas se determina la fibra cruda (NMX-F-090-S-1978).

### **Azúcares reductores**

Un azúcar reductor es aquél que tiene un grupo aldehído o un grupo alfa hidroxiketona libre (Prescott, et al., 2002).

El método descrito es el volumétrico de Lane-Eynon que se basa en la determinación del volumen de una disolución de la muestra, que se requiere para reducir completamente un volumen conocido del reactivo alcalino de cobre. El punto final se determina por el uso de un indicador interno, azul de metileno, el cual es reducido a blanco de metileno por un exceso de azúcar reductor (NMX-F-312-1978).

### **Proteínas**

Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, juegan un papel central en el metabolismo celular; por su importancia en las funciones biológicas, así como su valor nutricional. El método más común para determinarlas es el de Kjeldahl (Badui, 2006).

El método Kjeldahl sirve para la determinación de nitrógeno orgánico, se basa en una volumetría ácido-base. El procedimiento es directo, emplea un aparato de destilación Kjeldahl.

Se lleva a cabo la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en  $SO_2$ , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoníaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido clorhídrico, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión (NMX-F-068-S-1980).

### **5.3 Maíz**

El maíz (*Zea mays*) originario de México, ha sido uno de los principales productos alimenticios de los habitantes de las zonas rurales de México y de otros países latinoamericanos; las peculiaridades del maíz en lo que se refiere a distribución, métodos de cultivo, sistemas de almacenamiento y preparación de alimentos, explican muchos rasgos característicos de éstos pueblos que han tenido como eje principal de su civilización la utilización de dicha planta (Bertran, 2010).

El maíz se ha convertido en uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. En el entorno nacional, la producción del maíz grano en México agrícola 2015 creció 6.1% para totalizar 24.69 millones de toneladas. La producción mundial se concentra en cinco países: Estados Unidos, que participa con el 37% del total; China con alrededor de 21%; Brasil, con una participación cercana a 8% y con menores participaciones se encuentra la Unión Europea y Argentina (USDA, 2015)

Éste cereal es ante todo una fuente de energía; tiene muy pocas proteínas y vitaminas. La porción seca del grano consta aproximadamente de 77% de almidón y 2% de azúcar, 9% de proteínas, 5% de materias grasas, 5% de pentosanas y 2 % de cenizas. El contenido de proteínas y grasas varía mucho según la clase de maíz, oscilando en el caso de las proteínas entre 5 y 15%. Unas 3/4 partes del total de sustancias minerales están concentradas en el embrión, distribuyéndose el resto en el endospermo exterior. El maíz es muy pobre en calcio, pero, al igual que otros cereales, es sumamente rico en fósforo y potasio. Su contenido en magnesio y sodio es muy pequeño; en cambio, se encuentran en el grano importantes cantidades de hierro (FAO, 1993).

### **5.4 Almidón**

El almidón después de la celulosa, es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial, se encuentra en los cereales, tubérculos y en algunas frutas como polisacáridos de reserva energética.

El almidón es el principal componente del maíz y las propiedades fisicoquímicas y funcionales de este polímero están estrechamente relacionadas con su estructura (Agama et al., 2012). Aproximadamente 86 a 89% del endospermo del maíz es almidón organizado en partículas discretas (gránulos), cuya morfología, tamaño y características moleculares son propias a su especie (Agama et al., 2005).

Desde el punto de vista químico el almidón es una mezcla de dos polisacáridos muy similares; la amilosa y la amilopectina; el primero es producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha(1, 4)$  que establecen cadenas lineales y tienen la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal en la que cada hélice consta de seis moléculas de glucosa. Por su parte la amilopectina se diferencia en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular a la de un árbol, las ramas están unidas al tronco central por medio de enlaces  $\alpha$ -D-(1, 6) cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Los almidones contienen aproximadamente 17-27% de amilosa y el resto de amilopectina.

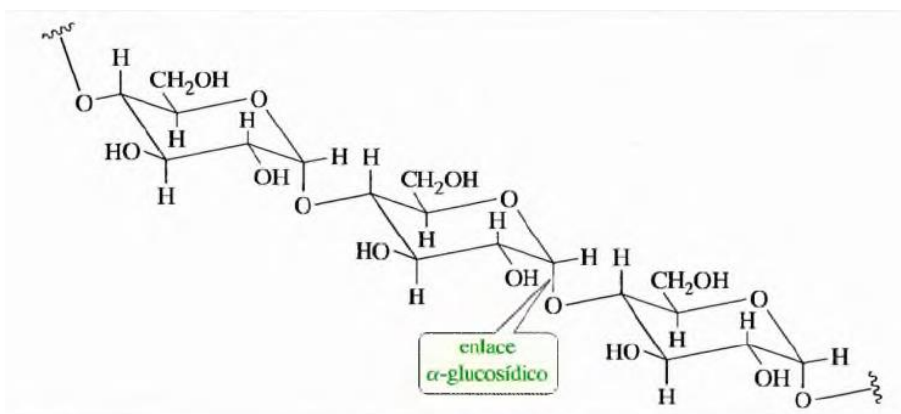


Figura 1 Estructura de la amilosa. Tomada de I. G. Wade (2004) Química Orgánica. España. Pearson Educación S. A

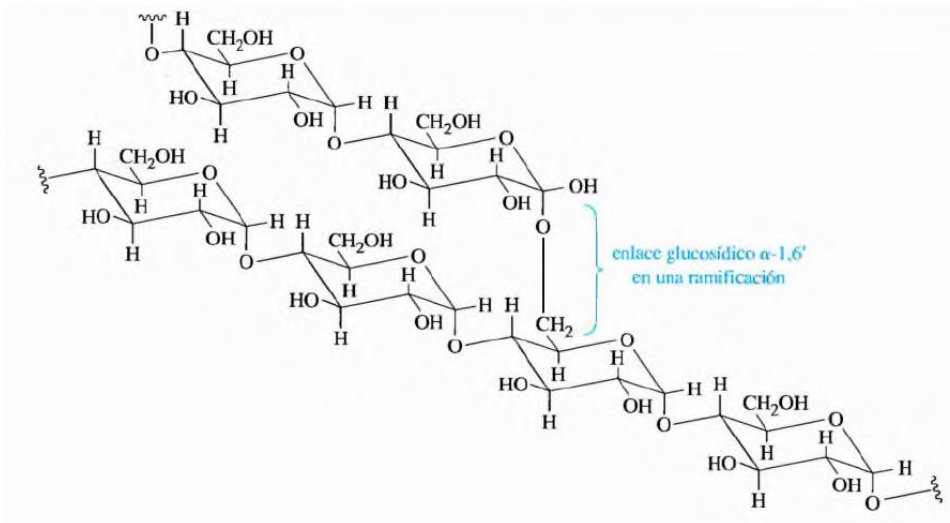


Figura 2 Estructura de la amilopectina, tomada de I. G. Wade (2004) Química Orgánica. España. Pearson Educación S. A

El yodo reacciona con la amilosa y genera un fuerte color azul característico, debido al complejo que se establece entre una molécula de éste con cada 7-8 unidades de glucosas, aparentemente el complejo almidón-yodo se establece por la inclusión del  $I_2$  en la hélice del mismo (Badui, 2006).

Un azúcar reductor es un término químico para un azúcar que actúa como agente reductor y puede donar electrones a otra molécula. Especialmente un azúcar reductor es un tipo de carbohidrato o azúcar natural que contiene un grupo aldehído o cetona libre (COMINTEC, 2017). Por tanto, al tener el almidón la estructura antes mencionada, no es un azúcar reductor.

### 5.5 Amilasa

Las proteínas enzimáticas regulan el metabolismo al actuar como catalizadores, agentes químicos que aceleran en forma selectiva las reacciones químicas en la célula (Campbell. & Reece, 2005).

Las amilasas son enzimas con múltiples dominios que muestran baja identidad global en las secuencias. Se clasifica como hidrolasa, es decir, la acción específica de estas enzimas es degradar moléculas catalizando la hidrólisis de enlaces éter (glucosídicos), degradando a oligosacáridos, disacáridos y

monosacáridos. Al igual que las proteasas pueden hidrolizar las uniones glucosídicas internas de los polisacáridos (endo-amilasas) y las que se encuentran en las extremidades de la cadena (exo-amilasas), siendo más las terminales más fáciles de degradar para las amilasas que las interiores.

Podemos encontrar diferentes tipos de amilasas

- Las  $\alpha$ -amilasas
- Las  $\beta$ -amilasas
- Las glucoamilasas

La  **$\alpha$ -amilasa** actúan directamente sobre los enlaces  $\alpha$ -1, 4 de la molécula (Fennema, 2000) y de manera aleatoria, así que se producen cadenas largas de glucosa y trabajan más rápido que las  $\beta$ -amilasas (Kirti et al., 2015), necesita normalmente una temperatura de 30-39°C, una concentración de 0.5% peso/volumen y un pH neutro de 6.5 a 7.5, no obstante, encontramos diferencias dependiendo del origen de la enzima. (De Lera, 2011). Las  $\alpha$ -amilasa presentan una gran utilidad tanto para la industria textil como para la de alimentos pues rompen la molécula del almidón en fracciones más cortas (dextrinas).

Por otro lado, la  **$\beta$ -amilasa** es otra enzima que degrada el almidón, estas son importantes en la germinación de granos. Estas son exohidrolasas ya que actúan sobre el extremo no reductor del almidón, produciendo maltosa, un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, el cual es muy afín a las levaduras durante una fermentación alcohólica. Sin embargo, las  $\beta$ -amilasas son menos termoestables que la  $\alpha$ -amilasa con una temperatura máxima de 60 ° C (Cifuentes, 2020). El término beta se refiere a la configuración anomérica inicial del grupo de azúcar libre resultado de la hidrólisis del almidón y no a la configuración del enlace hidrolizado (Peter, 2013)

La  **$\gamma$ -amilasa** (glucoamilasa, amilogucosidasa o alfa -1-4-D-Glucan glucohidrolasa) es una exohidrolasa que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-4 y

$\alpha$  1-6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena de almidón (Mera & Cataño, 2005), está presente principalmente en el reino animal, aunque también presente en *Bacillus* y *Saccharomyces cerevisiae*; esta enzima actúa sobre el enlace  $\alpha$ -1-6 para producir  $\alpha$ -glucosas (Taninguchi & Honnda, 2009). Las glucoamilasas, excepto algunas de *Aspergillus awamori*, son inactivas en almidón crudo y por lo general presentan óptima actividad en el intervalo de pH de 3-5 y de temperatura de 50-60 °C (Kirti et al., 2015) (Rico, 2011).

La  $\alpha$ -amilasa desempeña, junto con las glucoamilasas y la isomerasa, un papel esencial en la producción de jarabes de maíz (Castro. et al., 2006) (Meléndez, 2004). También se utiliza en la elaboración de vinos y cervezas para la clarificación de los turbios de almidón. Además, se utilizan en la industria panadera. La fermentación por la levadura cesa cuando el azúcar de la misma se agota. La harina de trigo cultivado en América del Norte es pobre en  $\alpha$ -amilasa. Si se le agrega la enzima se produce una constante liberación de maltosa que permite que la fermentación prosiga. En cuanto a la industria de la masa y la tortilla, maneja un quinto del producto interno bruto, con ventas anuales de aproximadamente 4000 millones de dólares. El consumo per cápita es de 123 Kg de tortilla anuales; El uso de amilasas no ha llegado a consolidarse en el proceso de nixtamalización, pero representa una alternativa viable de conservación de sus propiedades, evitando el uso de aditivos relacionados con el proceso (Torres et al., 1996).

## **5.6. Microorganismos con capacidad amilolítica**

Las características enzimáticas de los microorganismos brindan una opción en la obtención de metabolitos que puedan ser usados a nivel industrial, aprovechando procesos de biodegradación de los polisacáridos como el almidón (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006), utilizando enzimas reductoras para producir azúcares simples. Dentro de estos se identifican bacterias como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas*

*sp.*, y *Streptomyces sp.* (Sánchez et al., 2005), muchos microorganismos presentes de forma natural en los alimentos o bien en las materias primas poseen las capacidades metabólicas para degradar los componentes que los alimentos poseen, para poder aprovechar su potencial es necesario realizar el aislamiento y la purificación de los mismos, así como su identificación microbiológica.

Los microorganismos amilolíticos utilizan enzimas reductoras para producir azúcares simples; dentro de estos se identifican bacterias como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Streptomyces sp.* Dentro de la diversidad de enzimas amilasas, hay microorganismos que pueden producir una o varias:

La producción de la  $\alpha$ -amilasa es de origen fúngico por la especie *Aspergillus oryzae* y bacteriano por las especies de *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* (Navarro, 2019). En cuanto a la  $\beta$ -amilasa en las referencias se citan a las especies *Bacillus polymyxa*, *B. Cereus*, etc (Melendez, 2004). Amiloglucosidasa o glucoamilasa (AMG), es una enzima extracelular producida principalmente por los hongos de los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus*, también se ha visto su producción por los géneros fúngicos *Mucor*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces* y de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter* (Sánchez et al., 2005).

## **5.7 Aislamiento y purificación**

El aislamiento de cepas es el método de desarrollar microorganismos en condiciones que favorezcan solo los requerimientos necesarios del microorganismo a estudiar; es decir si se requiere obtener un microorganismo aerobio, es necesario favorecer un crecimiento con presencia de oxígeno; si se requiere la inhibición de bacterias, es necesario incluir un antibiótico para impedir su desarrollo.

Por otra parte, la purificación es obtener una sola cepa que posea las mismas características morfológicas y fisiológicas. Para la identificación microbiológica de forma corriente se emplean las pruebas bioquímicas.

### **Tinción de Gram**

La fijación es el proceso por el cual se conservan y fijan en su posición las estructuras internas y externas de las células. Durante la fijación se mata al microorganismo y se fija al portaobjeto; los fijadores químicos penetran en las células y reaccionan con componentes celulares para inactivarlos. La tinción de Gram es el método más usado en bacteriología donde se caracteriza por diferenciar la pared celular donde una Gram positiva posee una sola capa homogénea de peptidoglicano y la negativa es más compleja poseyendo una capa de peptidoglicano, rodeada de una membrana externa. Por tanto, los colorantes no interaccionan de la misma manera. (Prescott et al.; 2002)

### **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas son usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de microorganismos (por la cual puede hacerse una identificación final de especie). (Bailón L; et al., 2003)

Algunos ejemplos son:

- Catalasa: La catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (aerotolerantes) que contienen citocromos las excepciones principales son las especies de *Streptococcus*, que carecen de catalasa. El  $H_2O_2$  es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares (MacFaddin, 2013).  
Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández et al.; 2010).
- Agar Hierro tres azúcares (TSI): El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir

sulfuro de hidrógeno. El medio contiene 0.1% de glucosa y 1% de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el de sulfato ferroso ponen en evidencia la formación de sulfato de hidrógeno. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el microorganismo fermenta lactosa y sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de SH<sub>2</sub> se manifiesta por un ennegrecimiento del medio (Caffer et al., 2008).

- Agar Lisina Hierro (LIA): Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad. La descarboxilación es el proceso mediante el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal (Bailon et al., 2003).
- Rojo de metilo-Voges Proskaguer: El test se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Los organismos que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4.4. Los organismos que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoina y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5.0 y amarillo a pH > 5.8. El test es útil para la diferenciación de *Escherichia coli* (rojo metilo positivo) de *Klebsiella* (rojo metilo negativo), la mayoría de las Enterobacteriaceae tienen uno u otro camino metabólico, pero raramente ambos.

Voges Proskauer: El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoina (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoina se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de  $\alpha$ -naftol antes del agregado de KOH (Bailon et al., 2003).

- Urea: Detecta la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa produciendo un cambio de color rojo en el medio. La hidrólisis de la urea es catalizada por la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos (Bailon et al., 2003).
- Citrato de Cimmons: La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico por la utilización del citrato como única fuente de carbono. En condiciones normales, el metabolismo del citrato involucra una condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para ingresar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido por la vía del ácido tricarbóxico o el camino metabólico de la fermentación del citrato. El medio para la fermentación del citrato también contiene sales inorgánicas de amonio. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como su única fuente de carbono (MacFaddin, 2003).
- Movilidad Indol Ornitina (MIO): determina la movilidad por flagelos presentes en bacterias, por medio de un medio semisólido. Indol; el principio se basa en determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir del triptófano. Ornitina; la ornitina del medio es el

sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa, la cual es una enzima inicial en la biosíntesis de poliaminas (MacFaddin, 2003).

## **5.8. Extracción de enzimas**

El aislamiento de microorganismos, como recursos renovables para su uso en la producción de enzimas es muy usual en la industria y la salud. La actividad biocatalítica de los microorganismos hace que éstos, como seres unicelulares, sean usados de forma eficaz, así como sus productos metabólicos como las enzimas extracelulares, las cuales facilitan su aislamiento y purificación, generan mayor volumen, son más puras y estables (Serna, 2013).

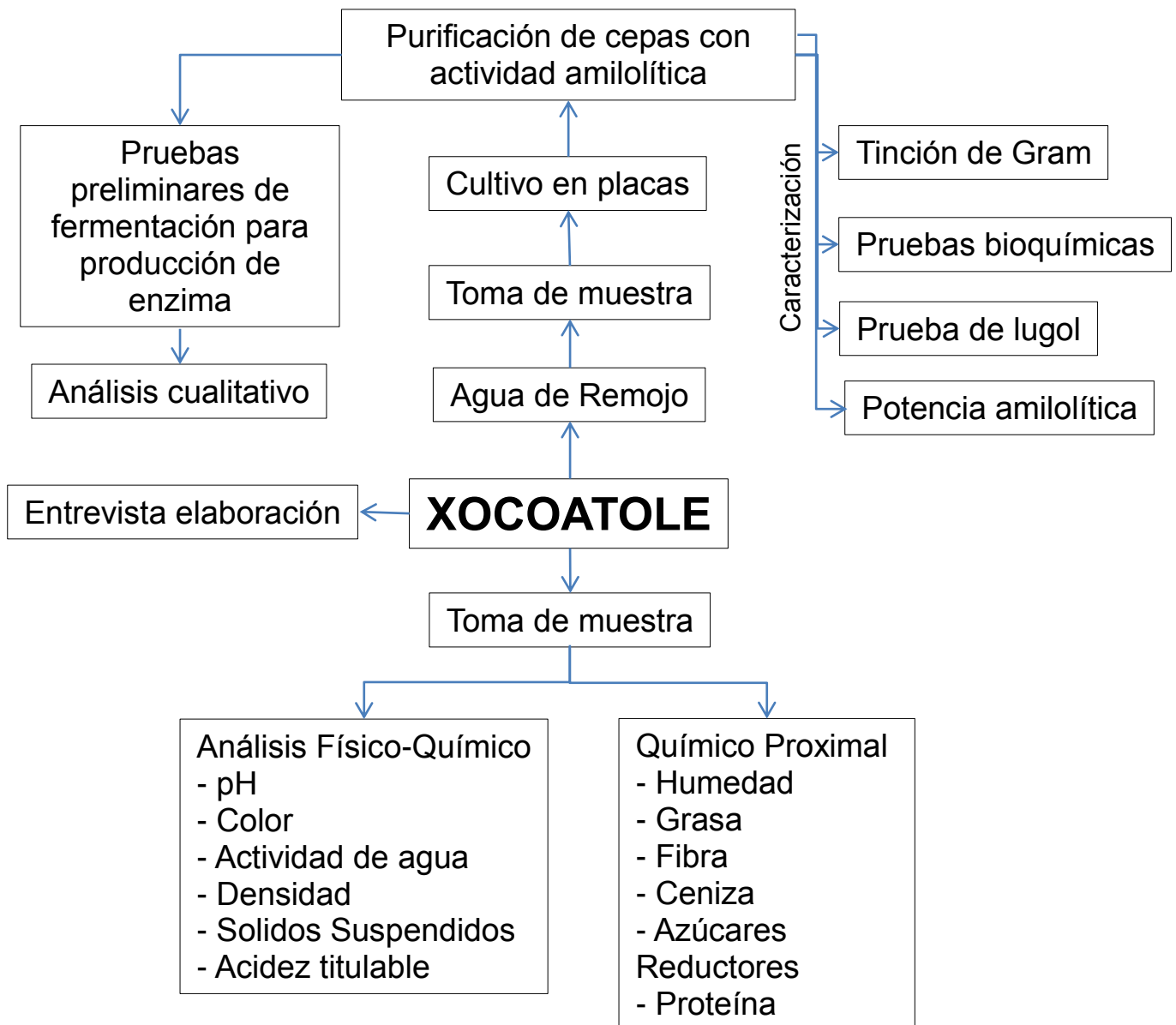
Las enzimas se obtienen de microorganismos (bacterias, hongos o levaduras) seleccionados por screening y, posteriormente, cultivados por fermentación (en matraz o reactor). A partir de los caldos de cultivo se procede a la purificación de la enzima que cataliza la reacción de interés. La purificación se lleva a cabo mediante técnicas de concentración y cromatográficas (Acebal, 2017).

Gran parte de los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas incluyen varias etapas de precipitación o centrifugación. Para mezclas con baja cantidad de contaminantes y alta concentración de la proteína de interés puede ser un método efectivo para concentrar y en algunos casos la precipitación, puede actuar como etapa única de purificación, dependiendo del grado de pureza final que se pretende obtener (Pesso & Vahan, 2005).

La precipitación es una operación muy utilizada, no sólo a escala de laboratorio sino también a escala industrial, para la purificación de proteínas de origen microbiano, animal o vegetal (Kim & col, 2000; Cooper & col, 2005; Boeris & col, 2008).

## CAPÍTULO VI METODOLOGÍA

### 6.1 Diagrama de trabajo



## **6.2 Toma de muestra**

a) Toma de muestra del Xocoatole. Se realizó la compra del xocoatole en tres ocasiones diferentes en la plaza de Molcaxac del Progreso, Puebla, México, el alimento se colocó en recipientes estériles y con tapa, se dejó enfriar y se transportó en cadena de frío hasta el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la BUAP, donde fue analizado lo antes posible como lo establece la NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

b) Se tomó una muestra representativa de agua de remojo de maíz, de igual manera en la localidad de Molcaxac del Progreso Puebla con las personas que expenden el Xocoatole, no menor a 150 ml de muestra; en un recipiente estéril y se mantuvo en refrigeración hasta su manejo microbiológico (NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico).

## **6.3 Realización de entrevista**

En simultaneo a la toma de muestra, se realizó una entrevista del tipo mixta o semiestructurada con la persona que lo elabora, acerca del proceso de preparación y algunos otros aspectos importantes sobre este alimento (Díaz et al., 2013). La guía de la entrevista se puede leer en ANEXO 1

## **6.4 Análisis fisicoquímico y Químico Proximal**

### **pH**

Se mezcló cuidadosamente la muestra hasta su homogeneización y se ajustó la temperatura a °C y pH. Se calibró el potenciómetro MS Tecnopon modelo mPA 210, con las soluciones reguladoras de pH 4 y pH 10. Se sumergió el electrodo en la muestra de manera que los cubrió perfectamente, se realizó la medición del pH.

Se sacó el electrodo y se lavó con agua (NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS).

### **Color**

Se calibró el equipo colorímetro ColorFlex Modelo Hunter Lab, con los discos en los parámetros A, B y L. se realizó la medición de las pruebas colocando unas gotas en la placa de vidrio previamente limpio. Se realizó la medición por triplicado (Goñi & Salvatori, 2015).

### **Actividad de agua**

Las mediciones se realizaron con el equipo aqualab bajo las instrucciones del equipo, la medición se realizó por triplicado

### **Determinación de densidad**

Se lavó el picnómetro, posteriormente se llevó a peso constante mediante calor en ECOSHEL modelo 9025H, se llenó el picnómetro con xocoatole y se llevó a cabo el pesado. Se realizaron los cálculos según la siguiente formula:

#### **Fórmula 1**

$$Densidad = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}$$

Dónde:

M1 (peso de Picnómetro vacío)

M2 (Peso de Picnómetro lleno de agua destilada)

M3 (Peso de picnómetro con líquido problema)

(NMX-F-075-1987. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA EN ACEITES Y GRASAS VEGETALES O ANIMALES. FOODS. VEGETABLES OR ANIMALS OILS AND FATS. SPECIFIC GRAVITY DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS)

### **Sólidos suspendidos**

Se calibró el refractómetro EASY OVER NBL 100 con agua destilada después se colocó la muestra en el refractómetro, con unas gotas, leer el resultado y se realizó por triplicado (NORMA MEXICANA NMX-F-436-SCFI-2011 INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHOLERA - DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX EN JUGOS DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE AZÚCAR Y MATERIALES AZUCARADOS - MÉTODO DEL REFRACTÓMETRO).

### **Acidez titulable**

El producto se homogenizó perfectamente y posteriormente se filtró mediante papel filtro, se pesó 10 ml de muestra y se transfirió a un vaso de precipitado de 400 ml y se diluyó en 50 ml de agua. Se preparó una muestra de NaOH al 0.1 N, se colocó una gota de fenolftaleína a la muestra y se tituló a goteo con el NaOH sobre la muestra. Se detuvo cuando viró de color y se realizó el cálculo según el ácido predominante de la muestra (NMX-F-102-S-1978. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE EN PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DE FRUTAS Y HORTALIZAS. NORMA MEXICANA. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS).

### **Humedad**

Se preparó dos cápsulas de vidrio, con gasa en el fondo y se secaron en la estufa TERLAB BTC-9100 para ponerlas a peso constante, se homogenizó bien la muestra y se pesó 10 gramos de ésta en las cápsulas, posteriormente se introdujeron las cápsulas en la estufa por mínimo 4 horas, al término se sacaron de la estufa, y se llevaron al desecador para llevar a temperatura ambiente, se pesó hasta que se obtuvo peso constante y se calculó humedad mediante la siguiente fórmula

#### Fórmula 2

$$\text{Humedad en \%} = \frac{(M2 - M3)}{(M2 - M1)} * 100$$

Dónde:

M1 = Peso de la cápsula con arena o gasa (g)

M2 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra húmeda (g)

M3 = Peso de la cápsula con arena o gasa más muestra seca (g)

(NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-116-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN ALIMENTOS POR TRATAMIENTO TÉRMICO. MÉTODO POR ARENA O GASA)

#### Cenizas

Se colocó en un crisol a peso constante de 3 a 5 g de muestra base seca. Se quemó en parrilla esta muestra hasta que dejó de desprender humo, se llevó el crisol a una mufla y se efectuó la calcinación por completo, se enfrió y transfirió a desecador y se determinó la masa mediante la siguiente fórmula:

#### Fórmula 3

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P - p) * 100}{M}$$

En donde:

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos

(NMX-F-066-S-1978. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS.  
FOODSTUFF DETERMINATION OF ASHES. NORMAS MEXICANAS.  
DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS)

### **Extracto etéreo**

Se transfirió 2.0 g de muestra seca finamente dividida en el cartucho; se cubrió con una porción de algodón. Se colocó el cartucho dentro del extractor Soxhlet Graham Deschem modelo 2L HT. En la parte inferior se ajustó un matraz con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C). Se colocó el refrigerante.

Se añadió éter por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor (alrededor de 80 ml). Se puso a circular el agua por el refrigerante y se calentó hasta que se obtuviera una frecuencia de unas 2 gotas por segundo. Se efectuó la extracción durante 4 horas. Se suspendió el calentamiento, se quitó el extractor del matraz y se dejó caer una gota de éter del extractor a un papel para decidir el término de la extracción.

Se evaporó suavemente el éter del matraz y se secó a 100°C hasta peso constante. Y se calculó porcentaje de extracto etéreo mediante la siguiente fórmula:

#### **Fórmula 4**

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{P - p}{M} * 100$$

Donde

P = Masa en gramos del matraz con grasa

p= Masa en gramos del matraz sin grasa

M= Masa en gramos de la muestra

(NMX-F-089-S-1978. DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO SOXHLET) EN ALIMENTOS. FOODSTUFF-DETERMINATION OF ETHER EXTRACT (SOXHLET). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS)

### **Determinación de fibra**

A 2.0 g de muestra se le extrajo la grasa. Se transfirió a un vaso de 600 ml, evitando la contaminación con la fibra de papel. Se agregó 1 g de asbesto preparado y 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25% hirviendo. Se colocó el vaso en el aparato sobre la placa caliente preajustada para que hirviera exactamente 30 minutos. Se giró el vaso periódicamente para evitar que los sólidos se adhirieran a las paredes. Se quitó el vaso y se filtró a través de papel o tela de lino. Se enjuagó el vaso con 50-70 ml de agua hirviendo y verterla sobre el papel satinado o el lino. Se lavó el residuo tantas veces como fue necesario, hasta que las aguas de lavado tuvieron un pH igual al del agua destilada. Se transfirió el residuo al vaso con ayuda de 200 ml de NaOH al 1.25% hirviendo y se calentó a ebullición exactamente 30 minutos. Se quitó el vaso y se filtró en buckner con papel filtro de masa conocida y cenizas conocidas.

Se lavó con agua hasta que las aguas de lavado tuvieran un pH igual al del agua destilada. Se transfirió el residuo a un crisol a masa constante y se secó a 130°C durante 2 horas.

Se enfrió y determinó su masa. Se calcinó a 600°C durante 30 minutos. Se enfrió y determinó su masa, según la fórmula:

**Fórmula 5**

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(Ps - Pp) - (Pc - Pcp)}{M} * 100$$

Donde

Ps = masa en gramos del residuo seco a 130°C.

Pp = masa en gramos de papel filtro.

Pcp = masa en gramos de las cenizas del papel.

M = masa de la muestra en gramos.

Pc = masa en gramos de las cenizas

(NMX-F-090-S-1978. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA EN ALIMENTOS. FOODSTUFF DETERMINATION OF CRUDE FIBER. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS)

**Azúcares reductores**

Se pesó una cantidad de muestra apropiada (de 5 a 10 g) y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se añadió 100 ml de agua y se agitó. Se añadió de 2 a 10 ml de disolución saturada de acetato neutro de plomo, se agitó y dejó sedimentar. Se añadió poco a poco oxalato de sodio o de potasio hasta la total precipitación del acetato de plomo. Se filtró recibiendo el filtrado en un matraz

volumétrico de 250 ml. Se lavó tres veces el matraz Erlenmeyer y el filtro con 20 ml de agua, se recibió el agua de lavado en un matraz volumétrico.

Se pasó el filtrado a bureta y se tituló (en muestra de reactivo Felingh A y B, 5 ml de cada uno, y 50 ml de agua). Se realizó el cálculo según la fórmula:

#### Fórmula 6

$$\% \text{ de Azúcares reductores directos} = \frac{25000 * T}{V * P}$$

Donde

T= Titulo de la disolución A+B en gramos de azúcar invertido

V= Volumen de la disolución problema, empleado en la titulación de 10 ml de la disolución A+B en mililitros

P= Peso de la muestra, en gramos

(NMX-F-312-1978. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR TOTAL AND DIRECT REDUCING SUBSTANCES IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS)

## Proteínas

### Etapa 1. Digestión

Se pesó de 20 a 40 mg de muestra haciendo bolitas con papel film, se pesó 2.5 g de mezcla catalizadora 2g de sulfato de potasio perfectamente molidos y mezclados. Se colocó en cada tubo digestor la mezcla catalizadora y muestra más 3.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (en ese orden). Se cuidó que el ácido no tocara las paredes del tubo. Se insertó los tubos correspondientes a las unidades destinadas en el equipo de digestión LABCONCO Rapidstill. Se ajustó el cuello de los tubos

con el sistema de salida de gases, que estuvieron conectados a una solución de 1.25 N de NaOH; se incrementó la temperatura del equipo en intervalos de 100°C hasta llegar a los 350°C.

Se esperó el tiempo necesario hasta que en el tubo no se observó formación de gases y la coloración fue verde esmeralda. Se bajó la temperatura del equipo en intervalos de 100°C, se apagó el equipo cuando la temperatura fue igual o menor a 100°C.

Una vez tibios los tubos se añadieron 40 ml de agua destilada más 10 ml de NaOH al 40%. Se tapó los tubos con papel film y se guardaron para su uso posterior.

## Etapa 2. Destilación

Se colocó agua desionizada en el recipiente contenedor del equipo hasta donde indica la marca. Se colocó el mecanismo de refrigeración y se mantuvo siempre frío. Se transfirió el contenido de los tubos de digestión a los tubos aptos para el destilador equipo LABCONCO Rapidstill. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 ml de ácido bórico al 4% más 2 gotas de Weslow. Una vez frío el destilador se colocó y aseguró el tubo en su lugar, se cerraron las llaves de vapor. Se colocó el matraz Erlenmeyer en su lugar para recuperar el producto. Se encendió el equipo y se mantuvo entre máximo y mínimo y se esperó a que ebulliciera el agua. Se detuvo el proceso de recuperación hasta que se alcanzó un volumen de 50 ml aproximadamente.

Se retiró el matraz Erlenmeyer se apagó el equipo, se abrieron las llaves de paso de vapor y aire y se retiró el tubo con mucho cuidado.

## Etapa 3 Titulación

Se tituló inmediatamente la muestra recuperada con 0.2 N de HCl y se registraron los mililitros gastados. Se realizaron los cálculos según la siguiente fórmula:

#### Fórmula 7

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{V * N * 0.014 * 100}{m}$$
$$\% \text{ de Proteína} = \frac{V * N * 0.014 * 100}{m} * \text{Factor}$$

Para el caso de maíz es de 6.25

(NMX-F-068-S-1980. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. FOODS. DETERMINATION OF PROTEINS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS).

### **6.5 Purificación de las cepas con capacidad amilolítica a partir del agua de remojo**

#### **Aislamiento de cepas**

Del proceso de remojo del maíz para la elaboración de xocoatole se tomó una muestra de agua, en un recipiente estéril y se inoculó por extensión en placas, colocando 100 µl en placa de cuenta estándar, Agar Papa Dextrosa y Agar Mc Conkey y se incubó a 37°C para Cuenta estándar (CE) y Mc Conkey y 28°C para PDA. Se revisaron las placas pasadas 24 horas para CE y Mc Conkey y 72 horas para PDA.

Para los microorganismos que crecieron en CE y agar Mc Conkey con diferencias notables en morfología; esto es tamaño (diámetro de la colonia), color, forma, textura, elevación, etc., se pasaron a placas de CE para aislamiento y purificación de cepas.

#### **Formulación de agar almidón y resiembra de cepas aisladas**

Se investigaron formulaciones de agar almidón, con base en ellas se modifica para obtener la formulación adecuada a las necesitadas.

#### Referencias:

1. Montor J., Olvera C., Reyes D., Sachman B., Ramírez L., Del Moral S., (2014) Caracterización bioquímica de Amijj33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan. Nova scientia vol. 6 no. 12, México.
2. Pérez Y., Díaz M., Rondón A., Fuentes L., González L., Guzmán A., (2020) Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. A partir del bioproducto IHPLUS con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial., Pastos y forrajes, vol. 42 no 1 Cuba.
3. Rodríguez Z., Boucourt R., Rodríguez J., Albelo N., Núñez O., Herrera, F (2006) Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 40, núm. 3, pp. 349-354 Instituto de Ciencia Animal La Habana, Cuba.
4. Sarabjeet K., Narender K., Ishwinder K., Girish S., (2018) Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic  $\alpha$ -amylase from hot springs, India., International journal of biological macromolecules., India.

De éstas se sacó una formulación, la cual se muestra en la Tabla 1:

**Tabla 1 Formulación de agar almidón**

Ingrediente	Cantidad
Agar bacteriológico	2%
Almidón	0.5%
Peptona de caseína	0.05%
Carboximetilcelulosa	0.05%

Las resiembras se realizaron por estría cruzada en dilución a partir de las colonias que una vez con características coloniales homogéneas se cultivaron en el agar almidón. Las colonias que presentaron halo de degradación siguieron en proceso de purificación. Se dió seguimiento a la purificación mediante tinción de Gram, pues poseyeron morfología al microscopio idéntica entre las células. La tinción se realizó de la siguiente manera (Aquiahuatl & Perez, 2004).

1. Se colocó en un portaobjeto una gota de agua, se tomó un poco de colonia con el asa estéril y se hizo un frotis
2. Después de que se secó, se tiñó con cristal violeta 1 minuto y se enjuagó, se colocó lugol sobre el frote durante 1 minuto
3. Se decoloró con alcohol cetona y posteriormente se tiñó con safranina durante 15 segundos y se enjuagó con agua.

Se registró morfología macroscópica y microscópica

### **Temperatura óptima de crecimiento**

Se sembraron las cepas puras mediante estría cruzada en placas de almidón y se incubaron a diferentes temperaturas (28°C, 37°C y 45°C) durante 24 horas. Se registró si existió crecimiento y actividad enzimática.

### **Pruebas bioquímicas**

Se realizaron los medios de cultivo según las indicaciones del proveedor y se sembraron de la siguiente manera (MacFaddin, 2004):

- Catalasa: Método del portaobjeto
  1. Con un asa se recogió el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas de sembrada y se colocó sobre un portaobjeto
  2. Se agregó una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% sobre el organismo del portaobjeto. Se usó una pipeta Pasteur
  3. No se invirtió el orden del método porque se pudo producir resultados falsos positivos
  4. No fué necesario la mezcla del cultivo y del peróxido de hidrógeno
  5. Se observó la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y se registraron los resultados
  6. Se desechó el portaobjeto poniéndolo en un desinfectante

- Citrato de Simmons: Se sembró por estría sobre la superficie del medio y se incubó de 35-37°C por 24-72 horas
- MIO: A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se sembró por punción profunda utilizando aguja de inoculación. Se sembró a 35-37°C durante 18-24 horas.  
Se revisó movilidad y color y luego se realizó prueba de indol.
- LIA: A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio y mediante el uso de aguja de inoculación, se inoculó el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo.
- RM VP: Se inoculó directamente a partir del cultivo en estudio. Esto a 35-37°C durante 48-72 horas.  
Rojo de metilo: Se añadió unas gotas de una solución de rojo de metilo al 0.04%, se observó el color del medio.  
Voges Proskauer: Se añadió 0.6 ml de alfa naftol al 5% en alcohol etílico absoluto y 0.2 ml de hidróxido de potasio al 40% a 2.5 ml de cultivo. Se agitó vigorosamente el tubo y se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Se observó el color de la superficie del medio.
- Urea: A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se estrió la superficie del medio en el pico de flauta. A 35-37°C durante 18-24 horas.

Para realizar la identificación de géneros se revisó una página especializada de Identificación Bacterial en línea ([www.microrao.com](http://www.microrao.com)).

### **Determinación cualitativa y cuantitativa de actividad amilolítica**

Para conocer las cepas productoras de almidón, se verificó las placas de cepas puras inoculadas en almidón, estas debieron formar un halo de degradación alrededor de la colonia; se tomó una regla vernier y se midió la colonia, así como el halo, en ambos casos el diámetro, se sacó el cociente de diámetro de halo entre diámetro de la colonia para conocer la potencia amilolítica (Rodríguez et al., 2006).

La potencia amilolítica es la capacidad de un microorganismo a producir amilasas, visualizado mediante la presencia de un halo de degradación alrededor de una colonia sobre medio de cultivo sólido. Esta se determina como el cociente de la medida del halo de degradación y la medida de la colonia (Pérez, 2020).

#### Fórmula 8

$$\text{Potencia amilolítica} = \frac{\text{diámetro de gradación}}{\text{diámetro de la colonia}}$$

Al mismo tiempo se colocó lugol a las placas de 24 horas de sembradas para asegurar la producción de amilasas de las cepas puras, mediante la visualización con lugol del almidón no hidrolizado e hidrolizado.

Al término de este análisis, se escogió la cepa más óptima (mayor halo de degradación y en menor tiempo) (Rubell et al., 2015).

## 6.6 Evaluación de la actividad enzimática

### Prueba de fermentación líquida

Se preparó la cepa con mayor potencia amilolítica, esto es del paso anterior; resembrándola en medio almidón.

Se incubó esta cepa ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) en matraces con caldo LB (2% de concentración de almidón), caldo almidón o caldo LB con glucosa (2% de concentración de almidón); en incubadora con agitación AYSPEL modelo INO 4-50 a 150 rpm a 36°C, pasadas 24 horas se detuvo la fermentación y se centrifugó para separar los microorganismos del sobrenadante, a 3500 rpm, esto fue en dos ciclos de 30 minutos cada uno.

El caldo LB sin cultivar fue empleado como control negativo

Se obtuvo el sobrenadante después de la centrifugación y se esterilizó el sobrenadante mediante filtración con filtro estéril de 0.22  $\mu\text{m}$  (Pascon et al., 2011).

### **Evaluación cualitativa de la presencia de amilasas en los sobrenadantes**

Para determinar cualitativamente la actividad de enzimas amilasas producidas por el microorganismo de manera extracelular, se realizó la siguiente metodología.

Para determinar la existencia de la enzima amilasa (prueba cualitativa) se tomó cinco mililitros de cada sobrenadante; control negativo, almidón, caldo LB y caldo con glucosa, y se le añadió 40  $\mu\text{l}$  de lugol, esto para determinar que hubiera presencia de dicha enzima. Posteriormente se realizó una metodología diferente para ver el comportamiento de la enzima a temperatura controlada.

Se realizaron cuatro tubos con las siguientes soluciones:

1. Tubos con 18 ml de solución almidón 1% + 2 mL de sobrenadante de cultivo en caldo LB
2. Tubos con 18 ml de solución almidón 1% + 2 mL de sobrenadante de cultivo en caldo LB con glucosa
3. Tubos con 18 ml de solución almidón 1% + 2 mL de sobrenadante de cultivo en caldo almidón
4. Tubos con 18 ml de solución almidón 1% + 2 mL de caldo LB sin cultivo (control negativo)

Se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se fue midiendo grados Brix (sólidos solubles) a los tiempos de 0 minutos (inicial), 15 minutos, 30 y 60 minutos y se añadió gotas de lugol para observar la coloración debida a la actividad amilolítica (Montor et al., 2014).

Con la ayuda del trabajo de Bello et al., 2006 se calculó la cantidad de azúcares reductores totales iniciales, finales y se sacó la diferencia para cada sobrenadante.

$$Az.reductores_{Iniciales} - Az.reductores_{Finales} = Az.reductores_{Generados}$$

## **CAPÍTULO VII RESULTADOS**

### **7.1 Entrevista sobre el proceso de elaboración del Xocoatole**

Se entrevistó a la Sra. Hortencia González Falcón de 81 años de edad, quien elabora el xocoatole de forma artesanal desde aproximadamente 40 años, sin embargo; la elaboración del mismo es generacional, su mamá lo preparaba y vendía y le enseñó a hacerlo, es habitante del municipio de Molcaxac y al menos 3 generaciones atrás ha sido consumido en este lugar.

El xocoatole se expende generalmente los días de plaza (jueves) y a veces en día domingo, se sirve con frijoles negros.

Ella ha consumido el xocoatole desde su infancia de manera cotidiana, lo guarda en refrigeración durante la semana para consumirlo; no padece ninguna enfermedad degenerativa y se considera una persona muy sana. A sus 81 años de edad se encuentra con sus capacidades físicas y mentales normales.

La elaboración del xocoatole de forma artesanal la lleva a cabo de la siguiente manera:

Se emplea maíz azul, el grano se remoja en agua fría por dos días (adicionar un volumen de agua un poco mayor al del maíz) después del tiempo de remojo, se muele el grano remojado y la masa derivada se bate con agua tibia (suficiente cantidad de agua para alcanzar la consistencia de atole) y se deja por 3 días en tiempo de frío y por 1 día en tiempo de calor, la fermentación se lleva a cabo en bote plástico, se tapa de forma normal, si no cambia de color (de azul o morado a rosa) se saca de la misma agua de fermentación, se calienta y se vuelve a regresar al recipiente. Al finalizar el proceso de fermentación, se hierve el agua fermentada y se le va poniendo la masa hasta que se espese a consistencia de

atole (esta información se redacta de acuerdo a los datos obtenidos de la entrevista, dicha entrevista se encuentra en el apartado de Anexos).

## 7.2 Análisis fisicoquímico y Químico Proximal

La tabla 2 muestra los resultados de los análisis físico-químicos realizados, cada resultado se presentará por separado.

**Tabla 2 Resultados del análisis físico-químico de tres muestras de Xocoatole, en donde se muestra promedio y desviación estándar de dichos resultados**

<u>Análisis Físico-Químico</u>		Promedio	Desviación estándar
pH		3.74	0.0513
Color	L	52.88	2.39
	A	5.11	2.319
	B	0.245	0.0494
Actividad de agua		0.9696	0.0124
Densidad g/mL		1.1828	0.1521
Sólidos suspendidos		2.075	0.1767
Acidez titulable	<b>Tartárico</b>	0.1687	0.0265
	<b>Málico</b>	0.1507	0.0236
	Acético	0.135	0.0212
	Láctico	0.2025	0.0318
	Cítrico	0.144	0.0226

### pH

Al comparar estos resultados contra otras bebidas fermentadas como por ejemplo; el pulque que posee un pH que oscila entre 4.5 y 3.5 (Tapia, 2016) las mediciones entran dentro de estos parámetros pareciéndose bastante al pulque en cuanto a pH.

Por otro lado el tepache posee mediciones de pH que varían entre 6 y 4 (Barrer & Martínez, 2015), esto es menos ácido que el xocoatole y el pulque, puede ser debido a sus tiempos de fermentación, flora nativa, materia prima, etc.

Así bien, si se compara el Xocoatole con bebidas fermentadas a base de maíz se encuentra que el Axocot, bebida muy parecida al Xocoatole, con la diferencia de que el Axocot es una bebida nixtamalizada y adicionada con una hierba y mayor tiempo de fermentación, su pH es de 4 (Sánchez et al., 2010), muy cercana a la medición del Xocoatole de 3.74.

Las mediciones de pH de este tipo de bebidas pueden variar debido a que los procesos son artesanales, no existe una estandarización para ellos, además de que las condiciones de clima, humedad, materia prima, etc., van cambiando dependiendo del lugar en donde se elabore la bebida.

La medición de pH baja del Xocoatole es debido al proceso de fermentación, en donde derivado de dicho proceso se obtienen metabolitos como son muchos ácidos orgánicos (Rojas et al., 2011).

## **Color**

El color es una propiedad física de la materia, relacionada con el espectro de la luz absorbida. (Rettig, 2014). El espacio CIELAB es caracterizado por su no-linealidad y desde su creación ha sido el más empleado hasta el momento. Dentro del dicho espacio, tres de las coordenadas registradas son: L, a y b. La coordenada L representa la luminosidad, tomando valores desde 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que las coordenadas a y b expresan la rueda del color, tomando colores de +a (rojo) hasta -a (verde) y de +b (amarillo) hasta -b (azul) (Piñeiro et al., 2014).

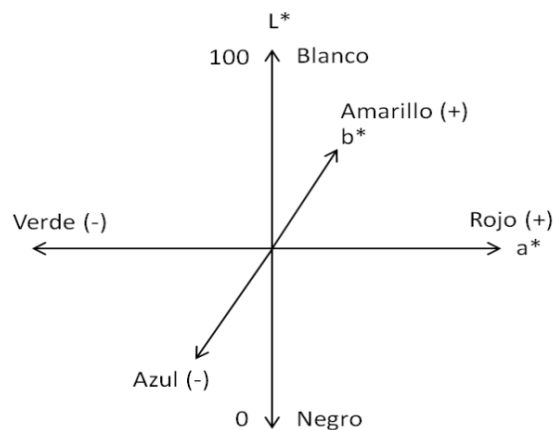
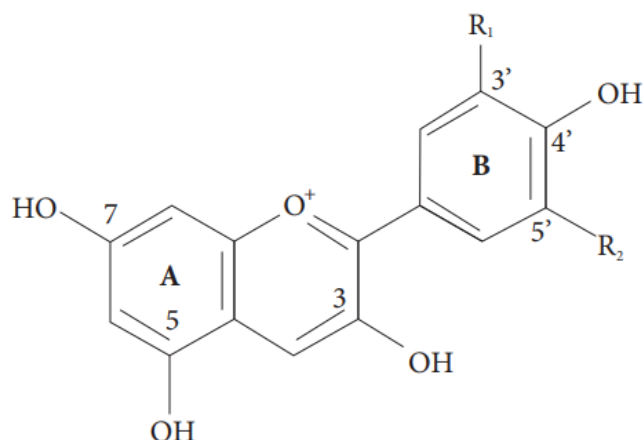


Figura 3. Grafica de representación tridimensional de espacio CIELAB. Tomada de Piñeiro-Di Blasi et al., DYNA 81 (184) pp 49-54, 2014

Por tanto, se determina que el color de esta bebida tiende más a los colores rojos, pues los valores obtenidos de las mediciones nos dan para L 52.88 esto es a la mitad de la escala de blanco al negro, para “a” +5.11 esto esta como notamos en la Figura 3 en el lado de los rojos y para “b” +0.24, prácticamente cero con un valor muy bajo; esto claramente debido al maíz con el que se elabora.

Al inicio del proceso, el maíz posee color azul, esto a que posee un pigmento muy característico de este maíz, las antocianinas. Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Su fórmula básica está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos. En su forma natural esta estructura se encuentra esterificada a uno o varios azúcares, en cuyo caso se denominan antocianinas simples. Si además del azúcar en la molécula existe un radical acilo, entonces son antocianinas aciladas (Salinas et al., 2003).



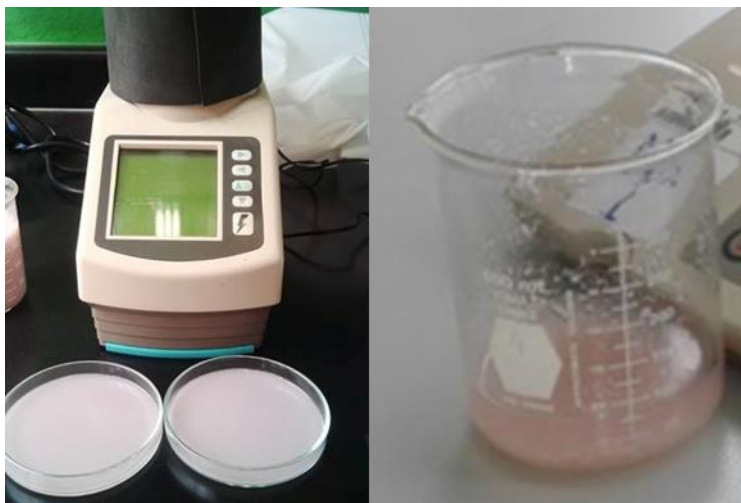
$R_1$	$R_2$	Antocianidina	Color
H	H	Pelargonidina	Naranja
OH	H	Cianidina	Naranja-Rojo
OH	OH	Delfinidina	Azul-Rojo
OCH3	H	Peonidina	Naranja-Rojo
OCH3	OH	Petunidina	Azul-Rojo
OCH3	OCH3	Malvidina	Azul-Rojo

Figura 4 Estructura química de las antocianinas más comunes en el grano de maíz. Obtenido y modificado de Salinas et al., (2013), Durst & Wrolstad, 2001

Los sustituyentes de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B de la estructura determinan el tipo de antocianidina o aglicona. Las antocianidinas reportadas en el grano de maíz son cianidina y pelargonidina, aunque también se han detectado la presencia de peonidina y malvidina (Salinas et al., 2013)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Así como también existen factores que determinan la alteración de este color como lo son la temperatura, presencia de oxígeno y **pH**. Este último factor relaciona la configuración de la estructura química con el cambio de color (Astrid, 2008). Por tanto, el color del Xocoatole está determinado por el cambio de pH que se da durante la fermentación y su

influencia en las antocianinas del maíz morado adquiriendo un color rosa por el pH bajo que lo caracteriza (Leal et al., 2014).



**Figura 5. Colorímetro y muestras de Xocoatole**

El Xocoatole es una bebida que dentro de su proceso de elaboración está relacionado el color, ya que la persona que lo elabora detiene el proceso de fermentación en cuanto la bebida cambia de color azul a rosa. De igual manera que con el valor pH, los valores pueden variar, debido a la concentración de la bebida, a mayor maíz será más opaca y oscura y al tiempo de fermentación durante el proceso artesanal. En comparación a otras bebidas fermentadas de maíz, se reportan datos de la Chicha de Jora, (bebida de Maíz fermentada adicionada con frutas) datos de L 27.41, a 5.03 y b 1.157, el parámetro más cercano es “a” el cual indica ser de igual manera cercanos a los rojos, pero en valor menor en L, el cual indica que es más oscura la bebida (Romero, 2017).

## **Aw**

Los resultados muestran una actividad de agua de 0.969, que sugiere una alta susceptibilidad al deterioro microbiológico, y por lo tanto se puede dar la oportunidad del desarrollo de microorganismos fermentadores, sin embargo, una

vez realizada la fermentación, el desarrollo de otros microorganismos incluyendo patógenos podría verse disminuido debido a su composición principalmente de almidón y al contenido de ácidos orgánicos y su pH (Arévalo, 2017).

No existen estudios de actividad de agua en bebidas fermentadas a base de maíz, únicamente datos sobre humedad.

## **Densidad**

La densidad es el cociente entre la masa del producto y el volumen que ocupa el objeto incluyendo el aire ocluido en su interior, esta estima la porosidad del alimento, dado que los alimentos líquidos generalmente carecen de porosidad, el valor de la densidad es la densidad aparente (Talens, 2020).

La densidad observada en el Xocoatole es aproximada a la del agua (VaxaSoftware, 2020) a 20°C (donde las mediciones de densidad para Xocoatole igualmente fueron a 20°C) fueron de 1.1828 g/ml, esto es el reflejo de la cantidad de agua contenida en esta bebida. Ya que lo que incrementa la densidad, es el maíz que se encuentra como ingrediente, en consecuencia, del almidón del maíz. En ocasiones se confunde con el valor de viscosidad el cual refleja la resistencia al movimiento del fluido (Martin, 2011), pero para la caracterización del xocoatole no es necesario este dato.

En cuanto a otras bebidas de maíz fermentadas se tiene el dato de una bebida fermentada a partir de jora de maíz negro del país de Ecuador (Chicha de jora), donde reportan 1.04 g/ml dato más bajo al resultado de Xocoatole de 1.182 g/ml, muy probablemente debido a la menor cantidad de almidón de maíz presente en la bebida (Romero, 2017).

## **Sólidos solubles**

Los sólidos solubles cuando son medidos mediante un refractómetro, miden los grados Brix, esta medición puede utilizarse como un estimador del porcentaje del contenido de azúcares en la muestra (Villalobos, 2009)

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo, así también la degradación del almidón ocurre de una manera normal pues esto permite proveer de carbono y mantener diferentes procesos celulares. Actualmente se sabe que múltiples isoformas de las enzimas que degradan el almidón, como son  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzimas desproporcionadora están presentes en la mayoría de las semillas (Bernal & Martínez., 2006), así se puede asegurar que existen carbohidratos derivados de la degradación del almidón contenido en el maíz utilizado como materia prima para la elaboración del Xocoatole, además de la posible degradación microbiana.

El resultado promedio de 2.075, muestra que no es elevado el valor de carbohidratos simples contenidos en la muestra (grados Brix), debido a que en el proceso de la fermentación, los microorganismos toman como principal alimento, los azúcares simples, que posee el maíz de manera natural así como aquellos derivados de la hidrólisis del almidón por la activación enzimática. Dejando muy poca cantidad de ellos después de la fermentación. Además de que a la bebida no se le añade azúcares extras en el proceso de elaboración (Buintrago & Tenjo, 2007).

Para poder tener un punto de referencia, sabemos mediante la bibliografía que el mango fresco posee un valor de 15 grados Brix en promedio (Valera et al., 2005), así como la manzana un promedio de 12.7, fresa 9.3, melocotón 14.6 y sandía 9.2 (Geraldo & Germán., 2006) y el atole elaborado de maíz y azucarado, con una medición de 19.6 grados Brix (Puga & Macancela, 2017).

## Acidez titulable

Para la determinación de acidez, no existen registros previos de ácido predominante en esta bebida, dado que para esta cuantificación se debe conocer este dato, así se procede a realizar un cálculo predictivo con dos ácidos muy comunes después de una fermentación, que son el ácido láctico y el ácido acético. Así como los ácidos predominantes del maíz; tartárico y málico (NMX-F-288-1977). Los resultados se observan más elevados cuando se supone el ácido láctico, dando un 0.2025%, comparado con la bebida fermentada Chicha de Jora que es a base de maíz y fruta, posee un porcentaje de acidez muy similar de 0.21% (Romero, 2017).

## Análisis Químico Proximal

A continuación, en la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis químico proximal de tres muestras de Xocoatole, promedio, así como la desviación estándar de las mediciones.

**Tabla 3 Resultados del análisis químico proximal, de tres muestras de Xocoatole, en donde de muestra el promedio y desviación estándar de dichas mediciones**

Análisis Químico Proximal	Humedad %	Extracto etéreo %	Fibra %	Cenizas %	Azúcares directos %	Proteína %
Promedio	96.18	0.41	0.9170	0.1183	1.4744	0.8018
Desviación estándar	0.1039	0.0565	0.0604	0.0082	0.0446	0.0016

## Determinación de humedad

La humedad en el Xocoatole determinada en 96.18% es posible comparar con otras bebidas fermentadas elaboradas a base de maíz, puesto que el maíz empleado en ellas incrementa la cantidad de sólidos; el Axocot posee una humedad de 94.68% (Sánchez et al., 2010), la diferencia radica en casi 2% menos y a comparación del pozol también bebida fermentada de maíz, que es una masa fermentada la cual posee un menor contenido de humedad de 78.17% (Márquez, 2015)

Los resultados de humedad muestran una humedad elevada, al tener alta cantidad agua es más fácil que exista un deterioro microbiológico y por tanto también beneficia el proceso de fermentación.

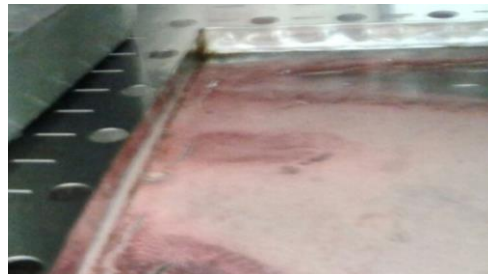


Figura 6. Muestra de Xocoatole en estufa para determinación de humedad

### **Extracto etéreo**

El extracto etéreo cuantifica las sustancias de naturaleza hidrofóbica. El maíz posee aproximadamente 8% de grasas (Fuentes, 2012), entre ellas existen ácidos grasos y algunas vitaminas de naturaleza hidrofóbica como A y E (Sebastián, 2015).

Comparando los resultados con el pozol de 1.13% (Márquez, 2015) y del Axocot del 0.26% (Sánchez et al., 2010) está última más parecida a los resultados obtenidos, pero en mayor proporción, los valores obtenidos para el Xocoatole estarían en un rango intermedio entre ambos, puesto que los análisis muestran un resultado de 0.41%.

## **Fibra**

La fibra cuantificada es obtenida del pericarpio del maíz, el maíz posee un 1.2% (Fuentes, 2012), el Axocot posee 0.13% (Sánchez et al., 2010) y el pozol 0.34% (Márquez, 2015) esto debido posiblemente a que se elaboran con maíz nixtamalizado el cual es un proceso térmico que requiere de una combinación de temperatura y tiempo (Méndez et al., 2008) y en el que se lleva a cabo el desprendimiento del pericarpio con los dedos (Cornejo et al., 2008), el Xocoatole presentó un porcentaje de 0.9170% por lo que contiene mayor cantidad de fibra que los anteriores, acercándose incluso a los valores del maíz., lo que es posiblemente debido a que en el proceso de elaboración, el maíz no es nixtamalizado y se elabora con el grano entero, por tanto al poseer gran parte de su fibra en el pericarpio y al no desprenderlo en el proceso de elaboración del Xocoatole conserva la mayor cantidad de fibra (Roque et al., 2016).

## **Cenizas**

Los porcentajes de cenizas en maíz son de 1.94% (Miranda., 2015) este es un porcentaje elevado, si lo comparamos contra los obtenidos, nos damos cuenta que la relación es de 1 a 18, esto es debido a la dilución del maíz en el agua.

Si se compara el xocoatole con otras bebidas fermentadas, como por ejemplo el pulque, que posee aproximadamente 3.1% de cenizas (Romero & Osorio, 2015) el porcentaje obtenido en el xocoatole de 0.1183% es muy bajo y a comparación con bebidas fermentadas de maíz, tenemos que el Axocot posee 0.15% (Sánchez et al., 2010), muy parecido al porcentaje del Xocoatole con la diferencia menos a 0.04% y el pozol siendo del 0.28% (Márquez, 2015) siendo de más del doble del Xocoatole.



Figura 7. Muestras precalcinadas de Xocoatole, para determinar de cenizas

### **Azúcares reductores**

El maíz como grano maduro contiene pequeñas cantidades de otros carbohidratos además del almidón, el total de azúcar del grano varía de un 1 a 3% entre ellos monosacáridos, disacáridos y trisacáridos (FAO, 1993). A la bebida Xocoatole no se le añaden azúcares, por tanto, los carbohidratos presentes corresponden únicamente al maíz, el resultado de 1.47% de azúcares reductores directos para el Xocoatole, se encuentra en el rango reportado para el maíz en grano, tomando en cuenta que es un alimento diluido de maíz en agua el porcentaje podría ser mayor, lo que sugiere una degradación del almidón a oligosacáridos durante el proceso de fermentación. Como anteriormente se trató en resultados de sólidos solubles, en el maíz encontramos enzimas,  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzimas desproporcionadora (Bernal & Martínez, 2006), que por ser parte del metabolismo del grano degradan almidón para los requerimientos del mismo grano, estos estarían generando un aumento en el porcentaje de azúcares reductores; pero al tener microorganismos que ocupan dentro de sus requerimientos azúcares simples podrían estar ocupando dichos azúcares y por ende la disminución de tal porcentaje (Buintrago & Tenjo, 2007).

Por otro lado, en comparación a otras bebidas fermentadas el Axocot posee 3.8% (Sánchez et al., 2010) esta bebida es fermentada más días además de adicionada con agua de una hierba, por otro lado, el pozol es una bebida que uno de sus ingredientes es el azúcar, el porcentaje es del 17.11% (Márquez, 2015).

El Xocoatole presenta una mayor cantidad de azúcares directos en comparación al grano de maíz, lo que implica la actividad enzimática (enzimas del grano o microbianas) sobre el almidón, pero también un contenido menor a otras bebidas fermentadas puesto que han sido empleados para la actividad metabólica del microorganismo para la fermentación.

### **Proteínas**

Dentro de la literatura encontramos que el porcentaje de proteína en el maíz oscila generalmente entre el 6 y 12% en peso seco, se distribuye principalmente en el germen y el endospermo en donde en esta parte del grano se encuentra el 80% de las proteínas totales (Sebastián, 2018), dentro del proceso de elaboración se puede llegar a perder proteína del germen y pericarpio. En comparación con los resultados obtenidos de 0.8018% es muy cercano al valor del Axocot de 0.96% (Sánchez M., et al, 2010) e inferior al valor del pozol con 2.74% (Márquez, 2015). El valor elevado del pozol podría deberse a que es adicionado con cacao el cual contiene un porcentaje de proteína que oscila del 11 al 12% (Verdesoto, 2009), el cual enriquece en porcentaje en la bebida. Además, durante el remojo las proteasas del grano se activan y quizá también los microorganismos consumen los aminoácidos derivados, lo cual estaría disminuyendo el porcentaje de proteína en el Xocoatole.

Tradicionalmente en la comunidad de Molcaxac del Progreso Puebla, México el Xocoatole es consumido adicionando frijoles, dicha leguminosa aportaría

contenido proteico, según estudios de Miranda et al., 2015, un 23.87%, porcentaje que incrementa grandemente su valor nutritivo.



Figura 8 Muestras en fase de digestión para la determinación de proteínas por método de Kjeldahl



Figura 9 Muestras en proceso de destilación de muestras de Xocoatole para determinación de proteínas

En la Tabla 4 se enlistan datos de cuatro bebidas fermentadas de maíz, en donde se pueden comparar los datos y notar que la bebida fermentada más similar al Xocoatole es el Axocot bebida que asemeja al proceso y materia prima del Xocoatole, además de ser del mismo estado, Puebla, México.

Tabla 4 Datos físico-químicos de cuatro bebidas fermentadas a base de maíz

Bebida		Xocoatole	Pozol (Márquez, 2015)	Axocot (Sánchez M., et al, 2010)	Chicha de jora (Romero, 2017)
Análisis					
	pH	3.74	NR	4	4.1
Color	L	52.88	NR	NR	27.41
	A	5.11			5.03
	B	0.245			1.157
	Actividad de agua	0.9696	NR	NR	NR
	Densidad g/ml	1.1828	NR	NR	1.04
	Sólidos solubles (°Brix)	2.075	NR	NR	11.5
	Acidez titulable %	Suponiendo ac. Láctico	NR	NR	0.21

	como ácido predominante 0.2025			
Humedad %	96.18	78.17	94.68	NR
Extracto etéreo %	0.41	1.13	0.26	NR
Fibra %	0.917	0.34	0.13	NR
Cenizas %	0.1183	0.28	0.15	NR
Azúcares directos %	1.4744	17.11	3.8	NR
Proteína %	0.1283	2.74	0.96	0.07

NR (No reportado)

### 7.3 Purificación de las cepas con capacidad amilolítica a partir de agua de remojo

#### Preparación de un medio de cultivo adecuado para el aislamiento de microorganismos amilolíticos

##### Aislamiento de cepas y Purificación

El aislamiento se llevó a cabo en medio cuenta estándar, para posteriormente diseñar un medio de cultivo adecuado a nuestras necesidades.

Para realizar la selección y la purificación de cepas amilolíticas se realizó un medio de cultivo sólido con la siguiente composición, basado en las siguientes referencias: Montor et al., 2014, Pérez et al., 2020, Rodríguez et al., 2009 y Sarabjet et al., 2018.

Tabla 5 Formulación de agar almidón modificado de acuerdo a las referencias de la literatura (Modificado de Montor et al., 2014, Pérez et al., 2020, Rodríguez et al., 2009 y Sarabjet et al., 2018)

Ingrediente	Cantidad
Agar bacteriológico	2%
Almidón	0.5%
Peptona de caseína	0.05%
Carboximetilcelulosa	0.05%

El agar bacteriológico da una fuente de carbono y da firmeza al medio, ya que esta purificación se hizo en un medio de cultivo sólido, lo que nos facilita la visualización de la degradación del almidón mediante un halo de degradación.

El almidón es esencial debido a que eso es lo que se busca, que se tome como principal fuente de carbono al almidón.

La peptona de caseína es la fuente de nitrógeno que tienen los microorganismos para su desarrollo. Y por último la carboximetilcelulosa, que es un carbohidrato, pero nos sirve para visualizar un halo de degradación del almidón sobre la placa Petri, así podemos ver dónde están las colonias de interés.

El pH de este medio de cultivo no se midió directamente, pero al ser su principal componente el agua y en segundo lugar el agar bacteriológico, se toma una medida de este medio de  $6 \pm 1$

Previo al aislamiento y purificación de las cepas con capacidad amilolítica, en la inoculación de agua de remojo en placas de agar Cuenta estándar y en placas de almidón, se obtiene los siguientes resultados:

Tres hongos filamentosos (mohos) dos de ellos verdes y uno rojo, en donde dos de ellos poseen halo de degradación, pero muy pequeño en comparación al diámetro de tamaño. Por otra parte, también se cuantifican 39 bacterias, de las cuales 18 de ellas presentan halo de degradación, aunque por el tamaño de dicho halo no se purifican para continuar con los experimentos.

### **Caracterización macroscópica y microscópica**

En la siguiente tabla (Tabla 6) se muestra la morfología colonial de las ocho cepas purificadas con actividad amilolítica.

**Tabla 6 Datos de morfología colonial de las ocho cepas puras**

Cepa	Forma	Elevación	Margen	Apariencia	Color
------	-------	-----------	--------	------------	-------

1AP	Puntiforme	Convexa	Entera	Brillante y traslucida	Color crema ámbar
2AP	Puntiforme	Plana	Entera	Traslucida y brillante	Traslucida amarillo claro
3AP	Circular	Plana	Entera	Brillante y traslucida	Crema brillante
4AP	Puntiforme	Plana	Entera	Opaca	Crema opaca
5AP	Puntiforme	Plana	Entera	Traslucida	crema traslucida ligeramente amarilla
6AP	Puntiforme	Elevada	Entera	Traslucida y brillante	No posee color
7AP	Puntiforme	Plana	Entera	Transparente y brillante	Entre amarillo claro crema y color amabar
8AP	Circular	Plana	Ondulada	Brillante	Crema ligeramente amarilla

En los cuadros de arriba se describen las características morfológicas en placa de las 8 cepas puras obtenidas. En ellas se encuentra la forma, elevación, margen, apariencia, consistencia, el seguimiento de la morfología colonial, junto con la observación microscópica permitió la purificación de cepas.

Referente a Sánchez et al., 2005, nos mencionan una bacteria similar a la colonia 3AP, reportada en este trabajo pues nos reportan un bacilo Gram (-) donde forman colonias regulares brillantes y cremosas.

El análisis microscópico de las cepas puras con tinción de Gram se realizó con el lente 100X a inmersión. A continuación, en la Tabla 7 se enlista la descripción para las cepas puras.

**Tabla 7 Descripción de cepas amilolíticas al microscopio**

Nombre de cepa	Gram Positivo o negativo	Descripción
1AP	Negativo	Bacilos ensanchados del centro, cortos y terminan en punta
2AP	Negativo	Bacilos agrupados en líneas ensanchados del centro terminan en punta.
3AP	Negativo	Bacilos cortos, ensanchados del centro, muy parecidos a 2AP.
4AP	Negativo	Bacilos delgados, largos, parecidos a actinomicetos
5AP	Negativo	Bacilos cortos y delgados pequeños
6AP	Negativo	Bacilos cortos y delgados levemente más grandes que 5AP
7AP	Negativo	Cocobacilos, crecimiento en rosario
8AP	Negativo	Bacilos medianos y delgados

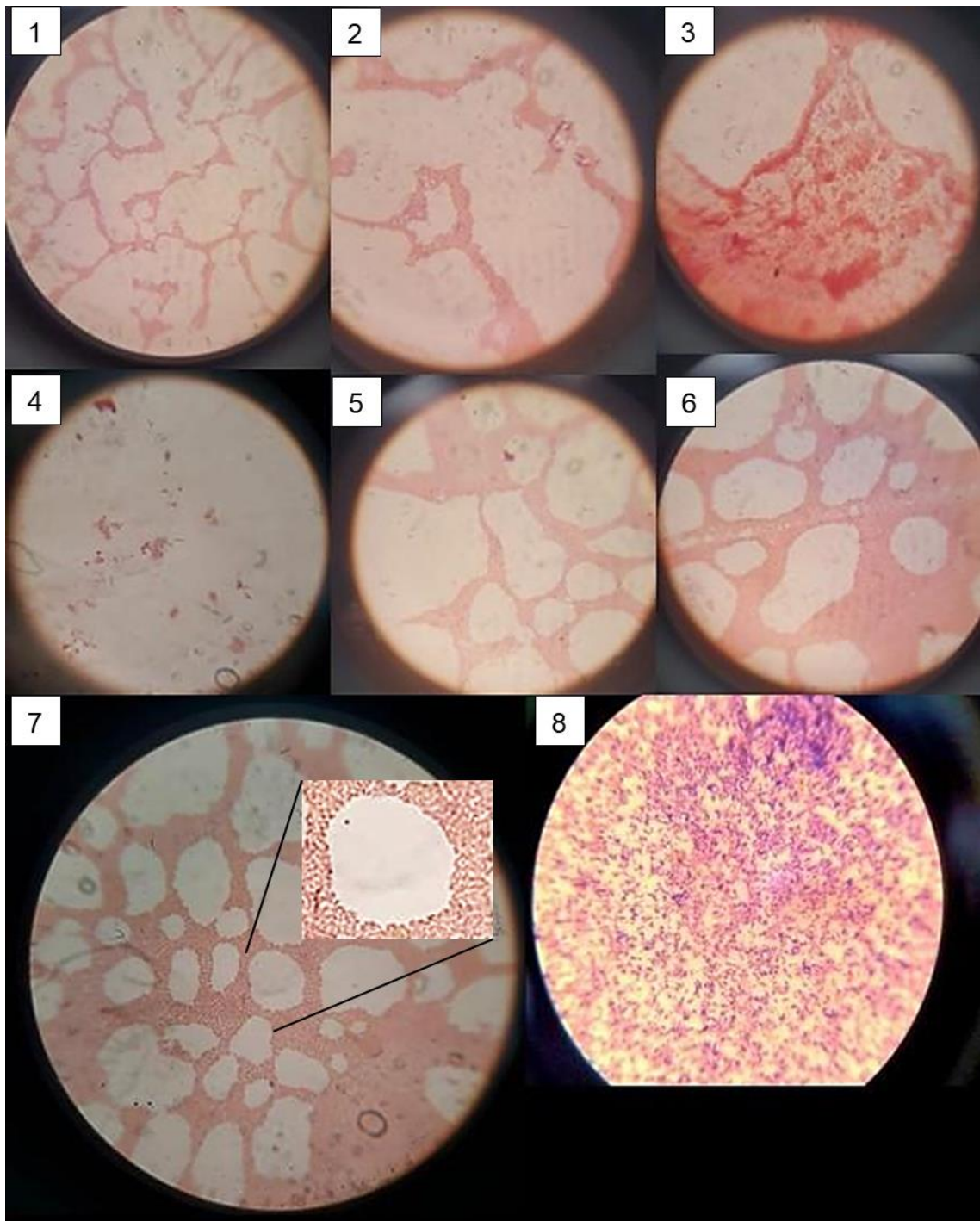


Figura 10 Fotografía de cepas puras visualizadas mediante microscopio a 100X, las cepas de izquierda a derecha tenemos a 1AP, 2AP, 3AP, 4AP, 5AP, 6AP, 7AP Y 8AP. La imagen mas grande es de la cepa con mayor potencia amilolítica

En el agua de remojo se pudieron aislar bacterias las cuales poseen mayores ventajas al desarrollarse con respecto a los mohos que son los más reportados en la bibliografía como se mencionó anteriormente o bien son los más empleados como fuente de amilasas como lo son, menos tiempo de incubación y mayor potencia amilolítica, por tanto, poseen buen potencial biotecnológico, si comparamos esta caracterización con otras referencias, Buitrago et al., 2014 reporta 16 bacterias Gram (+) y solo 2 Gram (-), esto es el 11% de bacterias Gram (-), , por otra parte Rodriguez et al., 2006 reporta un 90% de bacterias Gram (+) y 10% de bacterias Gram (-) entre ella bacilos y cocos, en el presente trabajo se reportan únicamente bacterias Gram (-) lo que sugiere que se trata de cepas posiblemente no reportadas.

#### **Aislamiento y purificación de cepas con mayor actividad amilolítica**

Se obtuvieron ocho cepas puras con potencial amilolítico, se muestran a continuación las fotos de las placas en las cuales se muestran el halo de degradación caracterizado por hacer más transparente el medio de cultivo. A dichas cepas se les denominó de 1AP a 8AP.

En la Figura 11 se puede observar cada colonia y el halo de degradación generado alrededor

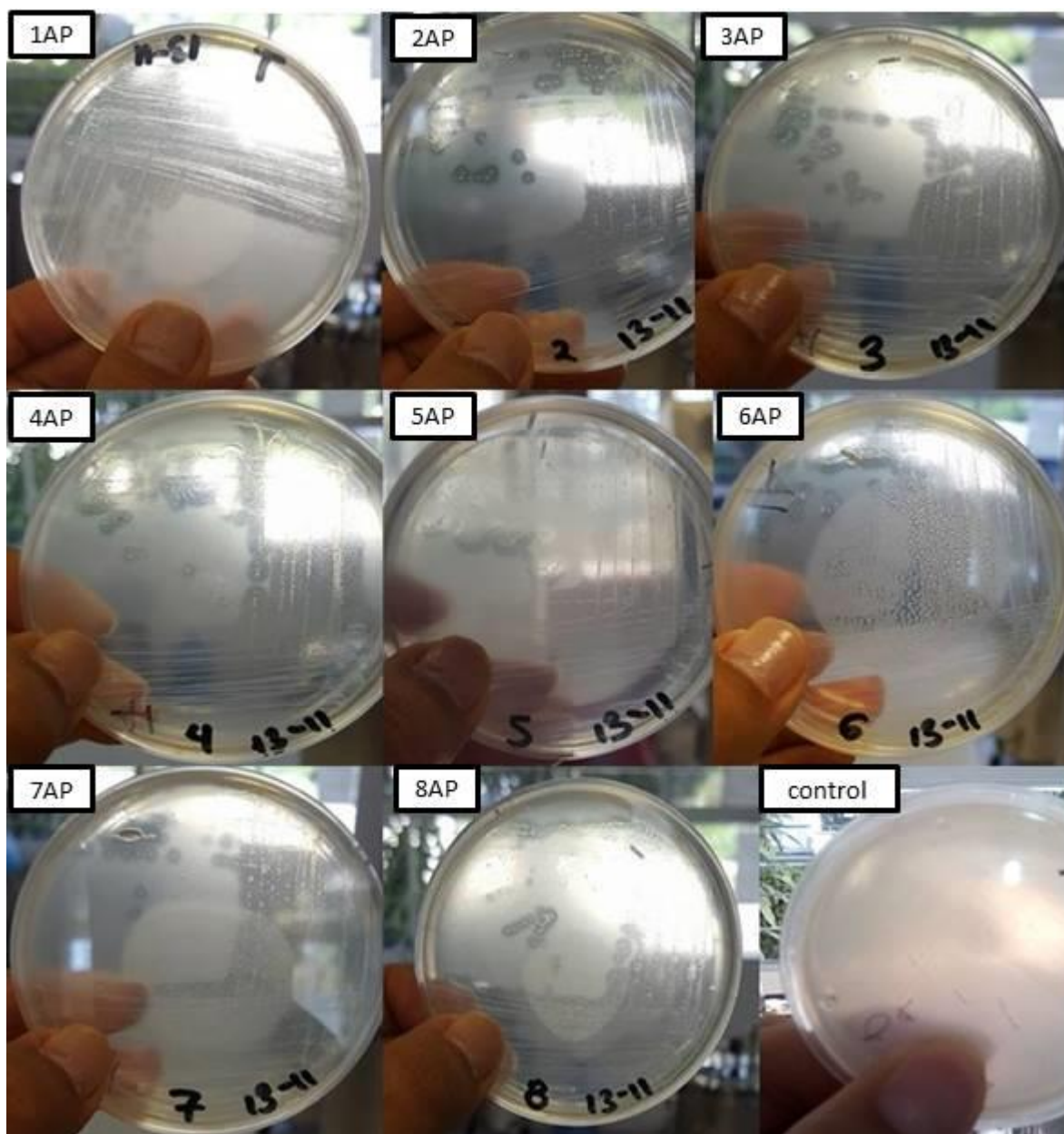


Figura 11 Cepas puras en placas de agar almidón con cultivos de 24 horas comparadas con una placa control que es un medio de cultivo sin inocular, se pueden observar las colonias con el halo de degradación del almidón alrededor.

Con las cepas puras se determinó la temperatura óptima de crecimiento, ya que estos microorganismos podrían tener un mejor crecimiento a diferentes temperaturas. En la Tabla 8 se enumeran las cepas puras y su desarrollo a tres diferentes temperaturas, en cultivos de 24 horas. Como puede observarse, la

temperatura óptima de crecimiento sería de 37 °C en el que se observa bien tanto la colonia como el halo de degradación para todas las cepas aisladas en este rango de tiempo.

**Tabla 8 Resultados de desarrollo de las ocho cepas puras a diferentes temperaturas durante 24 horas**

<b>Colonia</b>	<b>Temperatura de 28°C</b>	<b>Temperatura de 37°C</b>	<b>Temperatura de 45°C</b>
1AP	Buen crecimiento, halo de degradación, crecimiento extendido	Buen crecimiento, halo de degradación, colonias aisladas, halo de degradación. Esta temperatura se eligió para la determinación de la potencia amilolítica	Sin crecimiento
2AP	Buen crecimiento, halo de degradación, crecimiento extendido		Sin crecimiento
3AP	Bajo crecimiento, halo de degradación, colonias aisladas		Sin crecimiento
4AP	Sin crecimiento		Poco crecimiento, halo de degradación
5AP	Bajo crecimiento, halo de degradación tenue		Sin crecimiento
6AP	Buen crecimiento, poco halo de degradación, crecimiento extendido		Sin crecimiento
7AP	Buen crecimiento, halo de degradación, crecimiento extendido		Sin crecimiento
8AP	Poco crecimiento, sin halo de degradación observable,		Sin halo de degradación observable

	crecimiento extendido		
--	-----------------------	--	--

A la temperatura de 28°C la cepa 4AP no tuvo crecimiento, las cepas 3AP, 5AP y 8 AP tuvieron escaso crecimiento, y las cepas 1AP, 2AP, 6AP y 7 AP presentaron muy buen crecimiento, pero debido a que el crecimiento era muy abundante no se consideró adecuado pues no permitía realizar la purificación y la medición para determinar la potencia amilolítica en dichas cepas.

Para la temperatura de 45°C no hubo crecimiento para la mayoría de las cepas con excepción de las cepas 4AP y 8 AP, en donde la 4AP presenta halo de degradación y la 8AP no.

La temperatura de 37°C es favorable para todas las cepas puesto que en todas se observa un buen crecimiento con colonias aisladas, lo que favorece la medición de halos de degradación, purificación y experimentos posteriores.

Esto lo podemos comparar con lo reportado por Rodríguez et al., 2006, en donde su aislamiento fue realizado a 30°C durante 72 horas; Castro et al., 2018, con condiciones de desarrollo de 28°C durante 7 días o con Buitrago et al., 2014 en donde utilizaron 5 días a 30°C, el estudio más cercano a las cepas halladas es el reportado por Pascon et al., 2011 en donde indican 39°C por 26 horas. Se destaca que los microorganismos aislados en el presente trabajo tienen menor tiempo de desarrollo comparados con los reportados en la bibliografía.

Una vez determinada la temperatura adecuada de crecimiento se puede continuar con los experimentos para determinar la capacidad de dichos microorganismos para producir amilasa, se emplearon unas pruebas sencillas (cualitativa y cuantitativa).

### **Pruebas bioquímicas**

Para caracterizar microbiológicamente las cepas, se realizaron pruebas bioquímicas a las cepas puras, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Resultados de pruebas bioquímicas, catalasa, citrato, TSI, MIO, LIA, RM-VP y Urea para las ocho cepas puras

Cepa		1AP	2AP	3AP	4AP	5AP	6AP	7AP	8AP
Prueba bioquímica									
Catalasa		+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato		+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	Superficie / Profundidad	SC	K/K	K/SC	K/K	A/SC	K/K	K/K	K/K
	Producción de Gas	-	-	-	-	-	-	-	-
	Producción de $H_2S$	-	-	-	-	-	-	-	-
MIO	Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+
	Indol	-	-	-	-	-	-	-	+
	Ornitina	-	-	-	-	-	-	+	-
LIA	Producción de $H_2S$	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lisina descarboxilisa	-	-	-	+	-	-	+	+
	Lisina Desaminasa	+	+	+	-	+	+	-	-
RM-VP	Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vogues Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea		-	-	-	-	-	-	-	-

K (Alcalino), A (Ácido), - (Negativo), + (Positivo), SC (Sin Cambio)

La Tabla 9 refleja que las cepas comparten metabolismos similares, ya que, en las pruebas de catalasa, citrato, RM-VP y urea los resultados son los mismos para las 8 cepas estudiadas.

Para la determinación de posibles géneros bacterianos se utilizó el programa en línea **Online Bacterial Identification**, en la página [www.microrao.com](http://www.microrao.com).

Tabla 10 Géneros bacterianos para las cepas puras, determinados mediante la página [www.microrao.com](http://www.microrao.com)

Cepa	Identificación de miembros de <i>Enterobacteriaceae</i> (Versión básica)	Identificación de <i>Pseudomonas</i> y miembros relacionados
1AP	<i>Providencia rettgeri</i> 53.3%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 18.81%
2AP	<i>Providencia rettgeri</i> 53.3%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 18.81%
3AP	<i>Providencia rettgeri</i> 53.3%	<i>Pseudomonas cepacia</i> 47.98%
4AP	<i>Enterobacter aerogenes</i> 72.3%	<i>Pseudomonas cepacia</i> 47.98%
5AP	<i>Providencia rettgeri</i> 53.3%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 18.81%
6AP	<i>Providencia rettgeri</i> 39.04%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> 18.81%
7AP	<i>Enterobacter aerogenes</i> 56.78%	<i>Pseudomonas cepacia</i> 97.99%
8AP	<i>E. coli</i> 79.19%	<i>Pseudomonas cepacia</i> 52.91%

De acuerdo con el programa de identificación bacterial en línea, las cepas con mayor porcentaje de coincidencia son la 4AP coincidiendo con *Enterobacter aerogenes* en un 72.3% y 7AP concuerda con *Pseudomonas cepacia* en un 97.99%

Las bacterias del género *Pseudomonas* se identifican como bacilos gram negativo, móviles, aerobios, pues poseen un metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno y en algunos casos acepta el nitrógeno como aceptor de electrones, lo que permite que puedan desarrollarse de forma anaerobia., la reacción oxidasa es positiva y la catalasa siempre es positiva (Pintado, 2019). De acuerdo a Araque

2008 las cepas identificadas como *P. cepacia* mostraron en estudios microscópicos bacilos gram negativos pequeños y macroscópicamente como colonias traslucidas, brillantes, con bordes definidos y con pigmento amarillo. Por estas descripciones podemos suponer que algunas cepas se tratan de *Pseudomonas*, resaltando la cepa 7AP que la identificación en línea determina un 97.99% de probabilidad a ser una bacteria de este género.

En la Figura 12 podemos notar la colonia del género *Pseudomonas* encontrada por Pintado 2019 en microscopia a 100X y del lado derecho la cepa 7AP, reportada en este trabajo. Notamos la similitud en morfología, así como en que ambas son Gram negativas.

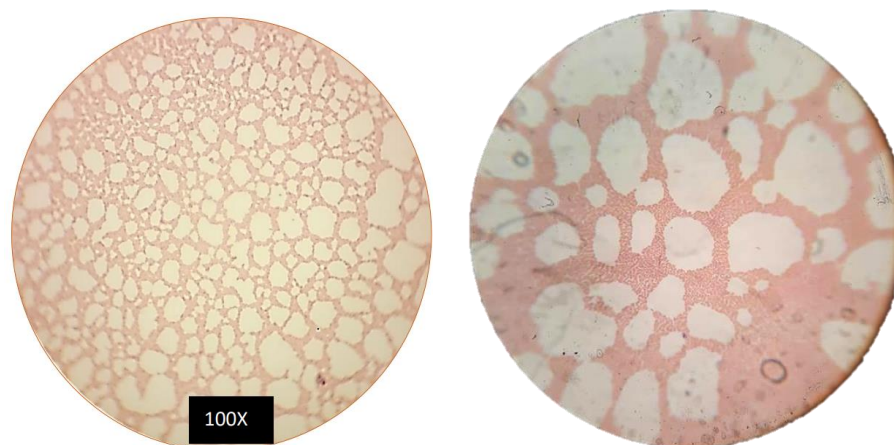


Figura 12 Cepa reportada como del género *Pseudomonas* por Pintado 2019 y del lado derecho cepa 7AP, ambas vistas a 100X al microscopio

Y en la Figura 13 se muestran imágenes de morfología colonial de *Burkholderia cepacia* y la colonia 7AP, la primera en agar soya tripticaseína y la segunda en agar almidón. Se muestran ambas colonias de color blanco, aunque el crecimiento es más abundante, podría deberse a un mayor tiempo de desarrollo.

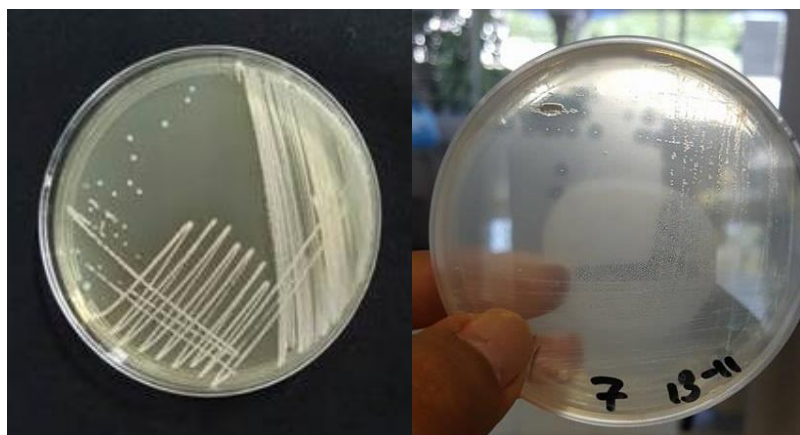


Figura 13 Cepa de *Burkholderia cepacia* en agar soya tripticaseina por Espinoza et al, 2020 y del lado derecho la cepa 7AP en agar almidón

Este género es meramente ambiental por existir en suelo, agua y plantas, posee cualidades benéficas como la biorremediación y contribución del crecimiento vegetal (Rojas et al., 2019). Por lo cual este género posee cualidades biotecnológicas como lo reporta Padilha et al, 2012, trabajo donde reportan a *Burkholderia cepacia* para la extracción de lipasa con condiciones óptimas de 37°C y un pH de 8. En la bibliografía Rojas et al, 2019, nos reporta a *Burkholderia cepacia* como agente patógeno en personas inmunocomprometidas. Carson et al 1973 nos reporta esta cepa con la cualidad de degradar almidón. Aunque en Siervas et al 2021 no demuestra esta cualidad.

En referencia a otros trabajos con cepas amilolíticas, Sánchez et al., 2005, nos muestra ocho cepas catalasa positiva además de citrato positivo como en las cepas 1AP, 2 AP, 3 AP, 4AP, 5AP, 6 AP Y 7AP, estas cepas correspondieron a géneros de *Bacillus sp* y *Clostridium sp.*, Montor., et al, 2014, reportan a *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, como una bacteria productora de amilasa, la que en ese estudio presentó mayor potencia amilolítica de entre las aisladas, sin embargo no reportan el valor.

En la Figura 14 se observan las pruebas bioquímicas de citrato, TSI, LIA y Urea

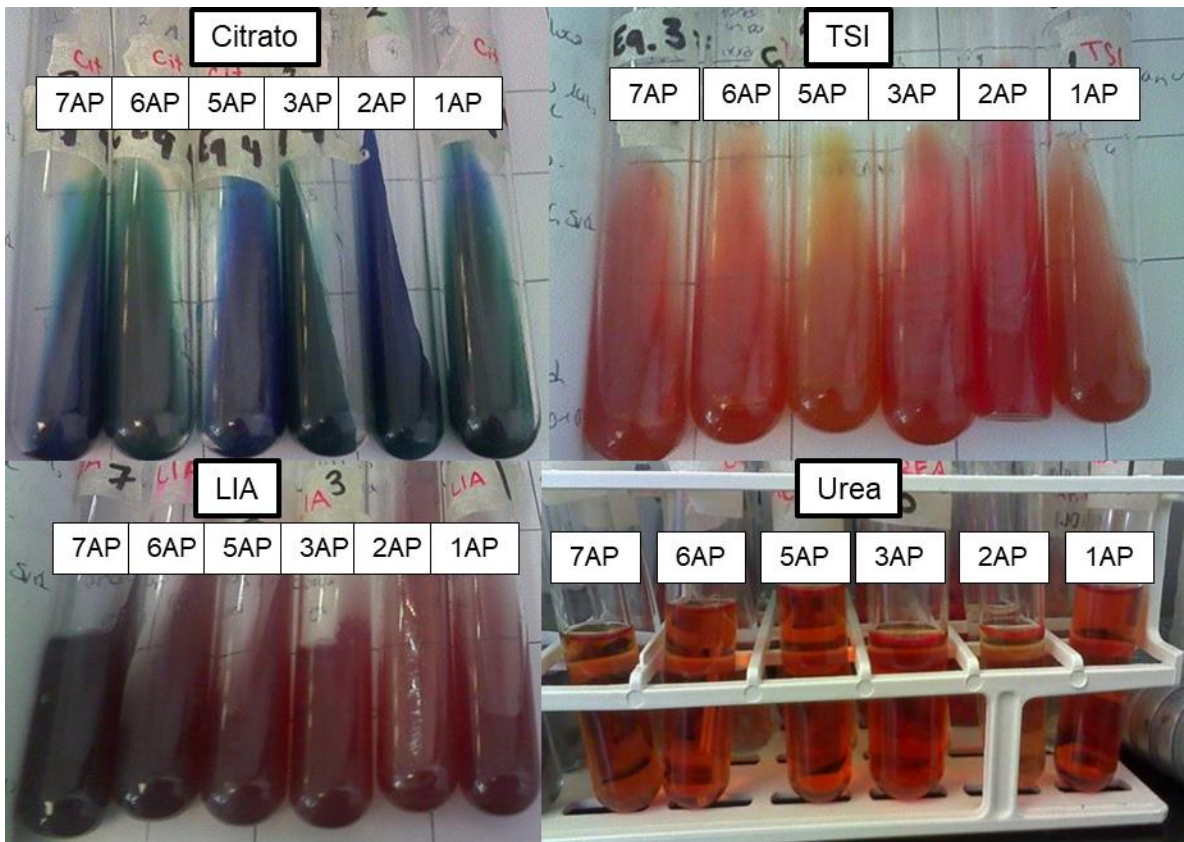


Figura 14 Pruebas bioquímicas Citrato, TSI, LIA y Urea

Las pruebas bioquímicas son parecidas entre sí, lo que nos podría llevar a pensar que se trata de especies iguales y géneros diferentes o simplemente con metabolismos muy parecidos.

### Prueba de lugol

Para corroborar el efecto de la enzima secretada por las colonias en el medio con almidón, se empleó la prueba de lugol, el cual muestra con color de azul-morado-negro en las zonas de la placa donde el almidón no ha sido hidrolizado por la enzima, mientras que las zonas en donde la amilasa liberada ya actuó no se tiñen de este color, de acuerdo al fundamento de la prueba de lugol, en las Figura 15 se observan los resultados en placa de esta prueba.

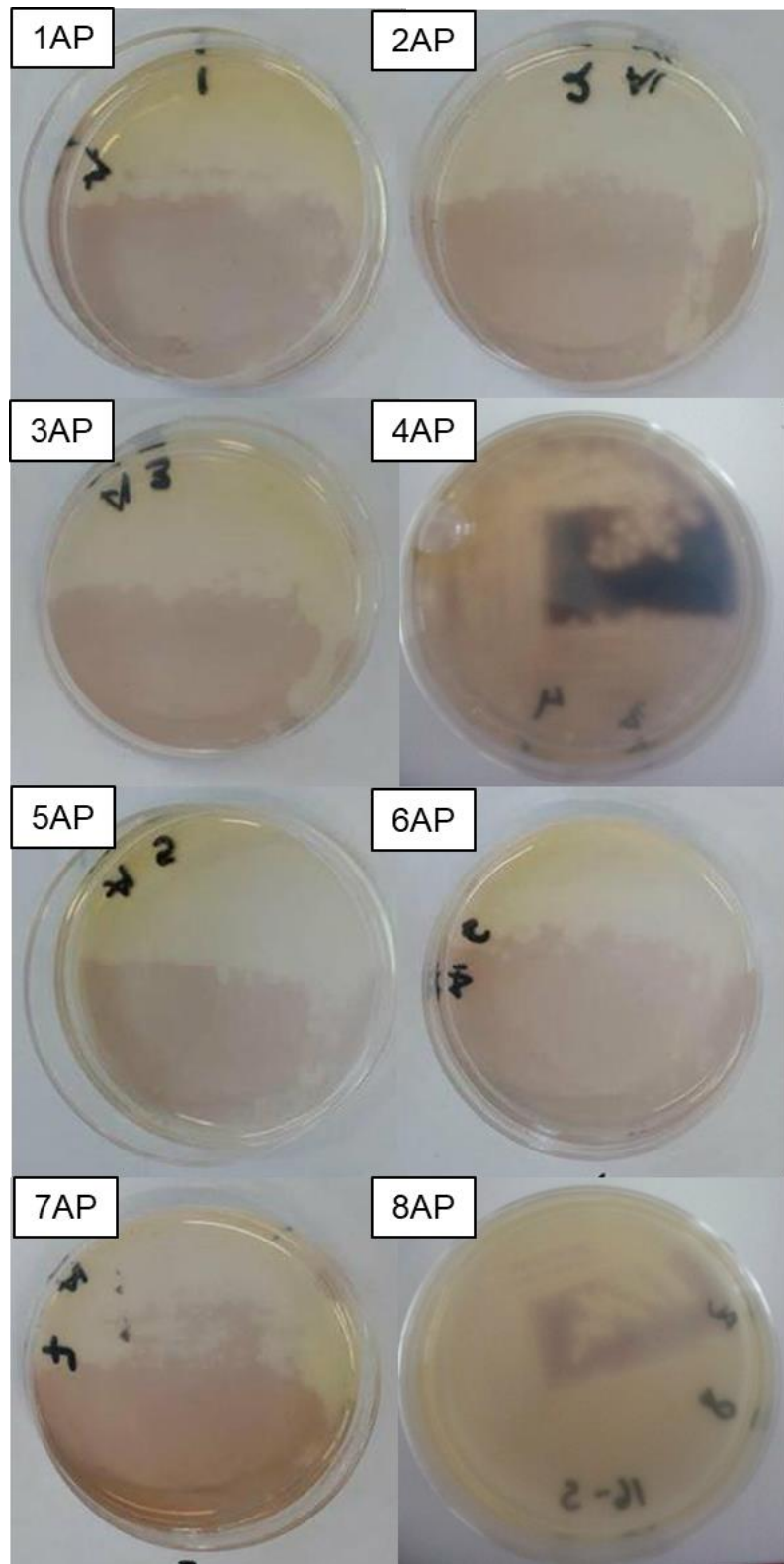


Figura 15 Pruebas de lugol en placa para las cepas puras 1AP a 8AP

Observando el color amarillo a lo largo del crecimiento colonial y los márgenes circundantes se puede deducir donde hubo degradación del almidón, por tanto, lo que permite aseverar que existe una producción de amilasas por parte de estos microorganismos. En el caso de las 4AP y 8AP se puede observar una zona francamente oscura que nos daría una idea de que el almidón está intacto, mientras que en las otras cepas es menos intenso.

### **Potencia amilolítica**

Una vez con las cepas puras se midió la potencia amilolítica para cada cepa; esta es la relación que existe entre el tamaño de la colonia contra el tamaño del halo de degradación, por tanto, se tienen los siguientes resultados (Tabla 11):

**Tabla 11 Resultados de potencia amilolítica para las ocho cepas puras**

Cepa	1AP	2AP	3AP	4AP	5AP	6AP	7AP	8AP
Halo de degradación	3	3	3	3.5	2.5	2.5	3	7
<i>Diametro de colonia (mm)</i>	0.5	0.5	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	1
Potencia Amilolítica	6	6	7.5	15	12.5	25	30	7

Al revisar la bibliografía se puede encontrar cepas con potencias más bajas, por ejemplo, Rodríguez et al., 2006 reporta un moho con 3.57 de potencia amilolítica, Sánchez et al., 2020 señala una cepa con 7 a condiciones de 48 horas de desarrollo, 60°C, Buitrago et al., 2014 que nos reportan un halo de degradación con su mayor valor de 28 mm, aunque no nos reportan potencia amilolítica, así mismo como Vieira et al., 2018 que describe dos cepas con halo de 4 y 5 mm de potencia En este trabajo se reporta una cepa con gran potencial amilolítico por poseer una potencia de 30 y que en este caso se seleccionó para los experimentos posteriores, esta cepa es la 7AP.

### **7.4 Evaluación de la actividad enzimática**

### Pruebas colorimétricas para detectar presencia de amilasa

Para corroborar la presencia de enzima en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa 7AP, se realizaron las pruebas de fermentación líquida esto también puede servir para la extracción y purificación de la enzima del sobrenadante y la determinación de la actividad enzimática en pruebas posteriores. Para determinar esta actividad en los sobrenadantes se realizó una prueba cualitativa de lugol.

Una vez obtenidos los sobrenadantes de los diferentes cultivos (en medio almidón, Caldo LB, Caldo LB-Glucosa) y esterilizados, se incubaron a una temperatura de 37°C que fue la temperatura óptima de crecimiento de esta cepa a diferentes tiempos de incubación (0 minutos, 15 minutos, 45 minutos y 60 minutos) y comparándolos con un control negativo (Figuras 16).

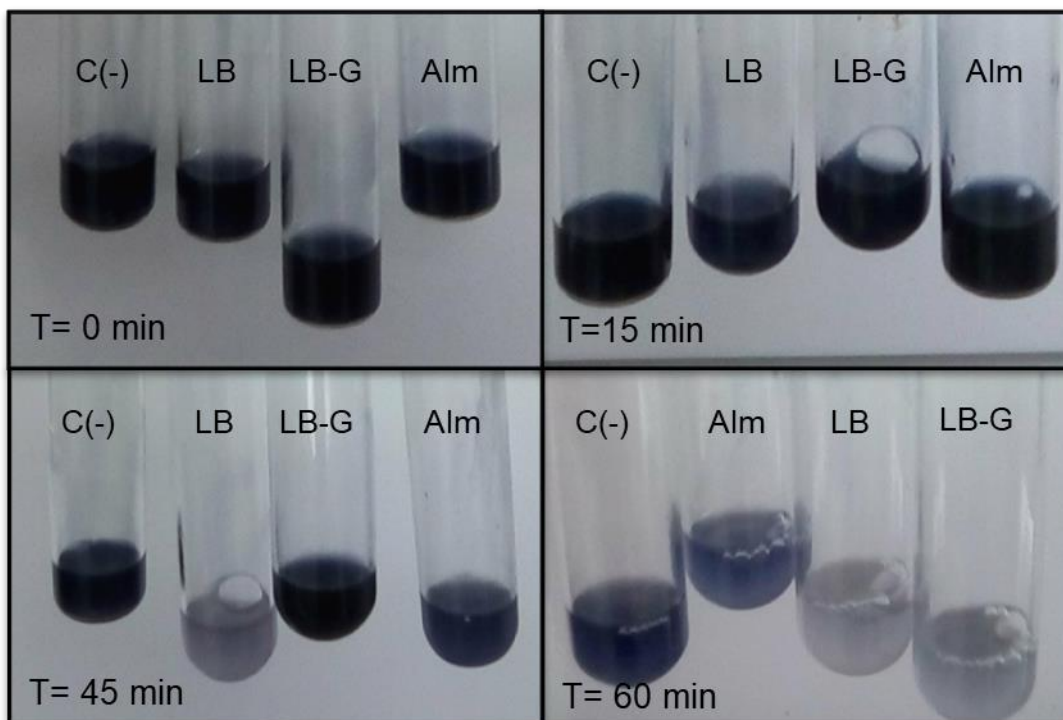


Figura 16 Decoloración de soluciones de almidón (1%) por efecto de los sobrenadantes de los cultivos de 7 AP a diferentes tiempos y 37°C. Donde C(-) = Control, LB = Caldo LB, LB-G = Caldo LB adicionado con glucosa y Alm= Caldo almidón

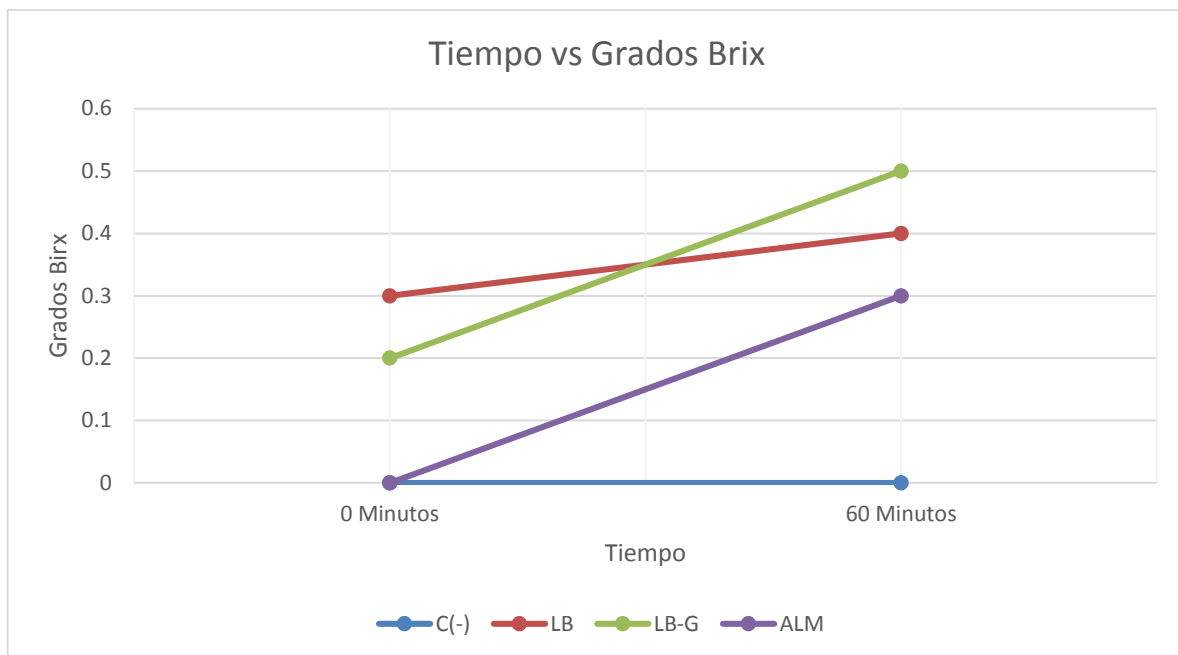
En la Figura 16 se observa que en el tiempo 0 el color del lugol en interacción con el almidón, característico color azul intenso, posteriormente al tiempo 15 minutos los tubos sin cambio con excepción del tubo LB el cual se nota un ligero aclaramiento. En el tiempo 45 minutos el tubo de control negativo y LB-G, conservan el color azul mientras que el Almidón empieza a presentar cambio y el LB sigue con la reducción de color azul. Finalmente, al tiempo de 60 minutos los sistemas enzimáticos de Alm, LB y LB-G presentan cambio de color y visualizando que aparentemente el tubo de LB posee más presencia enzimática seguida del LB-G. Dentro de la biotecnología y la tecnología del DNA se ha desarrollado sistemas para la sobreexpresión de enzimas y con modificaciones en su actividad, como la capacidad de utilizar sustratos no convencionales etc. (Oliart et al, 2016) en este experimento no se utiliza esta tecnología, por tanto, El-Fallal et al, 2012 hace referencia a que existen factores que alteran la producción de las amilasas varias de ellas son condiciones de producción como periodo de incubación, sistema enzimático, la variación del pH. Los sobrenadantes varían en composición, lo que afecta el sistema enzimático y por tanto su pH, esto podría ser un indicativo del funcionamiento de las enzimas y por tanto en el cambio de coloración en los tubos con el complejo enzima-sustrato. Por otro lado, se mencionó que existen diferentes tipos de amilasa, estas funcionan de manera distinta, la  $\alpha$ -amilasa actúa en zonas aleatorias por tanto produce cadenas largas de glucosa (Kirti et al., 2015), la  $\beta$ -amilasa actúa en los enlaces  $\alpha$  1-4 glucosídicos, por tanto, generando maltosas (Cifuentes, 2020) y la glucoamilasa actúa en el extremo no reductor de amilosa y amilopectina, generando moléculas de glucosa (Mera & Cataño, 2005), si entendemos que la reacción lugol-almidón está dada por la inclusión del yodo en la hélice de la amilosa cada 7 u 8 unidades de glucosa (Badui, 2006) se puede suponer que se están generando diferentes tipos de amilasas en los destinos sobrenadantes puesto que el color solo nos indica que existe esta inclusión, por tanto está más referida a la  $\alpha$ -amilasa, pues al generar cadenas largas de glucosas interrumpen mayormente este complejo que en las otras amilasas que generan monosacáridos o disacáridos. La disminución de color

en los sobrenadantes indica que existe algún tipo de enzima amilasa y es funcional en las condiciones de temperatura de 37°C y tiempo máximo de 60 minutos, en comparación con estudios de Yañiquez et al, 2019 que reporta una  $\alpha$ -amilasa con funcionamiento de 50°C y pH 5 y Navarro 2019 con requerimientos de 55°C y pH de 7.

Además de observar visualmente el color generado en las muestras que depende del contenido de almidón y estructura (Badui, 2006), se midieron grados brix que es un reflejo de los sólidos solubles en las muestras, esto con fundamento de que las amilasas pueden hidrolizar el almidón formando moléculas más pequeñas o bien monosacáridos, por acción de las  $\beta$ -amilasa y glucoamilasas (Cifuentes, 2020) (Mera & Cataño, 2005) y por tanto aumentan los sólidos solubles en las muestras. Los datos obtenidos del aumento en grados Brix de las muestras se destacan a continuación en la Tabla 12

**Tabla 12 Datos obtenidos de grados Brix de Soluciones de almidón con sobrenadante a diferentes tiempos e incubados a 35°C**

GRADOS BRIX	Muestra	PROMEDIO $\pm$ DESVIACIÓN ESTANDAR
0 MINUTOS	C(-)	0 $\pm$ 0
	LB	0.3 $\pm$ 0
	LB-G	0.2 $\pm$ 0
	ALM	0 $\pm$ 0
60 MINUTOS	LB	0.4 $\pm$ 0
	LB-G	0.5 $\pm$ 0
	ALM	0.3 $\pm$ 0



**Gráfica 1 Datos de tiempo contra grados Brix de soluciones de almidón y sobrenadantes incubados a 35°C a tiempo inicial y 60 minutos**

En la Gráfica 1 se observa que todos los sobrenadantes presentaron un incremento de grados Brix con respecto al tiempo de incubación. El experimento que resultó con mayor aumento es el correspondiente a los sobrenadantes LB-G y Alm a los 60 minutos de incubación. En lo que respecta al sobrenadante de LB podemos ver como su incremento es también considerable, aunque menor que en los otros dos. Esto demuestra, actividad de las enzimas que producen aumento de sólidos solubles en el medio como monosacáridos y disacáridos por lo que se podría tener la presencia de las enzimas  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa (Kirti et al., 2015).

Por otra parte, Bello et al, 2006 muestra un análisis de la relación de grados brix con respecto a la concentración de azúcares reductores totales en agua, en la Figura 17 se muestra la gráfica referente a esta relación, así como la ecuación que la describe.

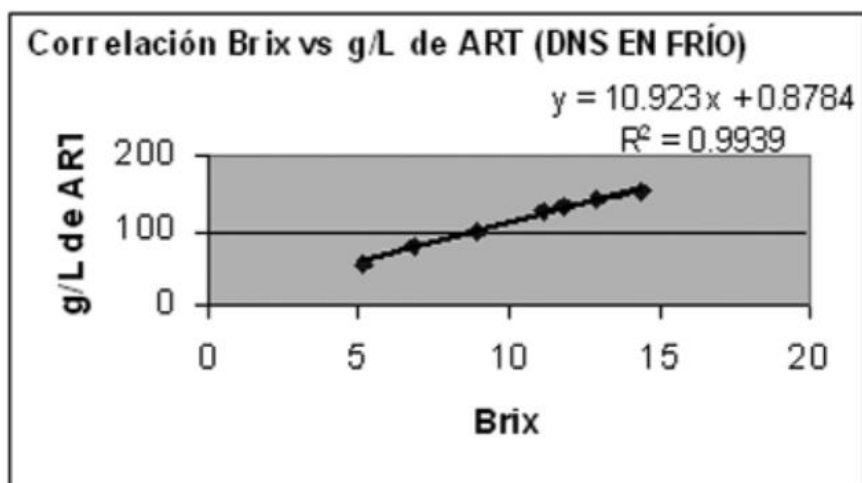


Figura 17 Correlación Brix vs g/l de azúcares reductores totales para el método de DNS en frío. Tomado de Bello et al., (2006) Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico

Basándonos en la ecuación reportada por estos autores se tomó como base para realizar una predicción de la cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras de actividad con los sobrenadantes (enzima) para tiempos inicial y final (0 y 60 minutos)

Tabla 13 Predicción de Cantidad de azúcares reductores libres en muestras de sobrenadantes con base en correlación Brix vs g/l de Bello et al, 2006

$y = 10.923 X + 0.8784$					
Muestra	0 minutos		60 minutos		Diferencia
	Brix	Azúcares reductores g/L	Brix	Azúcares reductores g/L	Azúcares reductores generados
LB	0.3	4.1553	0.4	5.2476	1.0923
LB - Glucosa	0.2	3.063	0.5	6.3399	3.2769
Almidón	0	0.8784	0.3	4.1553	3.2769

Los resultados sugieren que las muestras con mayor funcionalidad en la enzima son las de Almidón y LB-G si se requiere determinar la existencia de  $\beta$ -amilasa o

glucoamilasa en los sistemas enzimáticos, pues son las enzimas que se podrían estar reflejando en los sólidos solubles por la generación de glucosas libres o maltosas.

Aparentemente el sustrato LB permite la expresión de amilasas puesto que tanto en las pruebas de lugol como en las de °Brix presenta resultados más claros en la disminución de color desde los 15 min de incubación, de la misma manera se puede observar un incremento de los grados Brix de 0.1 (1.0923g/L), tomando en cuenta estos resultados sería la enzima  $\alpha$ -amilasa la preferentemente hidrolizaría las cadenas de amilasa, en el caso del sustrato LB-G, la actividad degradante de  $\alpha$ -amilasa se ve retrasada con respecto a LB, observándose la decoloración por hidrólisis de amilasa hasta los 60 min sin embargo, el incremento en grados Brix se observa desde los 20 min lo que podría indicar que la enzimas que se indujeron en este cultivo fue mayormente de los tipos  $\beta$ -amilasa y/o  $\gamma$ -amilasa que producen glucosas libres o unidades de maltosa e incrementarían los valores de grados Brix en 0.3 grados Brix (3.2769 g/L) a los 60 min. En el caso del cultivo con Alm, los sobrenadantes mostraron decoloración por actividad amilolítica desde los 45 min en la prueba de lugol acompañada de un incremento de 0.3 grados Brix a los 60 min (3.2769 g/L), lo que al igual que en el caso del sobrenadante LB-G indicaría la presencia de las enzimas  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa. Para dar una idea de qué tanto se puede incrementar la presencia de azúcares reductores con estas enzimas ( $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa) se comparan los resultados con (García & Valderrama, 2016) que en un sistema de hidrólisis de almidón con la enzima comercial glucoamilasa Naturalzyme GA 300 L generaron 100 g/L de azúcares reductores en 30 min a las condiciones óptimas recomendadas por el fabricante con una concentración de enzima de 0.005% (alrededor de 5 g/L de enzima respecto al peso de la harina); tomando en cuenta esto, se considera que las enzimas presentes en los sobrenadantes pueden ser de considerable utilidad industrial, necesitando continuar evaluándose más pruebas, así como su purificación y caracterización.

## CAPITULO VIII CONCLUSIONES

- El proceso de elaboración del Xocoatole expendido en Molcaxac del Progreso Puebla México, es un proceso que requiere de mínimo tres días de proceso, en éste, un paso fundamental es la fermentación del mismo y que requiere cambios físicos (cambio de color); desencadenados por cambios químicos como pH y acidez, detectados por el productor para decidir el término del proceso de elaboración. El proceso y la materia prima son muy importantes, puesto que esto determina la diversidad de microorganismos encontrados en este y por tanto las funcionalidades derivadas de ellos.
- El análisis químico proximal del Xocoatole se realizó de manera general, ya que esta bebida es muy variada en cuanto a su composición y por tanto los componentes primordiales se enumeraron en este trabajo, siendo el agua su mayor componente seguido de carbohidratos, fibra, lípidos, proteínas y finalmente cenizas. Las características de pH, humedad y cenizas fueron similares a otras bebidas tradicionales como a el Axocot bebida fermentada igualmente elaborada de maíz. Lo que también nos llevaría a suponer que posee un valor nutricional elevado.
- Al ser una bebida fermentada, se sabe que cuenta con una flora nativa que realiza la fermentación como parte del metabolismo de estos microorganismos, lo que conlleva a su uso biotecnológico.
- Los microorganismos aislados del agua de remojo, en su mayoría son bacterias, de las cuales solo algunas presentaron actividad amilolítica, todas ellas se describen como bacterias Gram (-) de morfología similar (bacilos), la cepa con mayor potencia (7AP) amilolítica presentó morfología cocobacilar.
- Tomando como criterio decisivo la potencia amilolítica, los resultados presentan valores mayores a otros trabajos de la bibliografía. La cepa 7AP

elegida presentó la potencia más elevada, siendo esta 30, esta cepa presenta ventajas de rápido desarrollo (24 horas) y bajos requerimientos nutricionales.

- Se comprueba que la enzima producida por 7AP es extracelular y posee funcionalidad de acuerdo a lo observado en las pruebas de color con lugol de los cultivos LB, LB-G, Alm
- De acuerdo a los resultados en los experimentos de actividad enzimática, los sobrenadantes LB-G presentaría actividad amilolítica para las tres enzimas ( $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa), el sobrenadante LB presentaría actividad principalmente para  $\alpha$ -amilasa sin descartar la actividad de las otras, y para el sobrenadante Alm tendría más actividad para las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ , sin descartar la actividad de  $\alpha$ -amilasa
- La obtención de esta enzima podría mejorar procesos, así como hacerlos más eficientes.
- Este proyecto es el primero en el campo de la investigación sobre el Xooatole ya que no existe ningún reporte previo.
- La realización de esta investigación contribuye a la riqueza cultural gastronómica del Estado de Puebla, debido a que aporta información acerca de una bebida tradicional Mexicana.

## **ANEXOS**

### **Entrevista**

Preguntas realizadas a la persona que elabora el Xocoatole de la región de Molcaxac del Progreso, Puebla, México.

Señora Hortencia González Falcón

1. ¿Cuál es un nombre?
2. ¿Qué edad tiene?
3. ¿Quién le enseñó a preparar el Xocoatole?
4. ¿Sabe desde cuando se consume el Xocoatole en su región, Molcaxac del Progreso Puebla, México?
5. ¿Dónde expande el Xocoatole?
6. ¿Cómo se consume el Xocoatole?
7. ¿Desde cuándo consume esta bebida fermentada Xocoatole?
8. ¿Padece alguna enfermedad crónica o degenerativa?
9. ¿Podría describir el proceso de elaboración del Xocoatole, que se elabora en su región, Molcaxac del Progreso Puebla, México?

## FUENTES DE CONSULTA

[1] Acebal C., (2017) Biotecnología enzimática y biotransformaciones de interés industrial, Universidad Complutense de Madrid, España.

[2] Agama E., Juárez E., Evangelista E., Rosales O., Bello L., (2012) Características del almidón y relación con las enzimas de su biosíntesis, Agrociencia, México.

[3] Agama E., Ottenhof M., Farhat I., Paredes O., Ortiz J., Bello L., (2005) Aislamiento y caracterización del almidón de Maíces pigmentados., Agrociencia vol. 39 no. 4, México.

[4] Alaya Dawn Johnson (2019) Xocoatolli y Xocotamalli, preparación, historia y semiótica del maíz en estado laminar, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

[5] AQUALAB, Fichas técnicas: Actividad de agua., (2008), extraído de <https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/09/actividad-del-agua.pdf>

[6] Aquiahuatl R. M., & Pérez C. M., (2004) Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología General., Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa México. México.

[7] Arevalo S., (2017) Agua en los alimentos., Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Perú.

[8] Araque Y., (2008) Estudio fenotípico y molecular del complejo *Burkholderia cepacia* y géneros relacionados, Tesis de doctorado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

[9] Astrid G.G., (2008) Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión., Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia., Colombia.

- [10] Badui D. S. (2006). Química de los alimentos, PEARSON EDUCACIÓN, México.
- [11] Bailón L., González R., & Cervantes A. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. México, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [12] Bello D., Carrera E., Diaz Y., (2006) Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico., Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Ciudad de la Habana, Cuba.
- [13] Beltrán A., Herreño L., (2010) Aplicación de la enzima  $\alpha$ -amilasa comercial BAN 480L a la harina de arroz de la variedad Fedearroz 50 para la colaboración de una bebida vegetal., Universidad de La Salle, Ciencia Unisalle, Colombia.
- [14] Bernal L., Martínez E., (2006) Una nueva visión de la degradación del almidón., Revista del centro de investigación. Universidad La Salle, vol. 7 no. 25, México.
- [15] Bertran V. M., (2010). Acercamiento antropológico de la alimentación y salud en México., PHYSIS Revista de Saúde Colectiva, Rio de Janeiro, 20, pp 387-411, Brasil.
- [16] Britania. (2015). MIO Medio., de Laboratorios BRITANIA S.A, Argentina, extraído de [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2832fb81126.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2832fb81126.pdf)
- [17] Buitrago S., Sánchez E., Guerrero H., (2014) Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá., Servicio Nacional de Aprendizaje., Colombia.

- [18] Buitrago J., Tenjo D., (2007) Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *saccharomyces cerevisiae*, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- [19] Bustos A. Yauhtli Q., (2017) Sendejo, bebida fermentada de San Isidro Labrador, municipio de Villa Victoria del Estado de México. Un estudio antropológico sobre la tradición alimentaria en las familias González-Sánchez y Rubio-López, Tesis de Grado, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca México.
- [20] Caffer M., Terragno R. & Binsztein N. (2008). Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp.. America del Sur: WHO Global Salm Surv
- [21] Canales S. Liliana. (2018). Evaluación del efecto de extractos de Asteraceas sobre la actividad de amilasa pancreática y glucosidasa, Tesis de Maestria, Instituto Politecnico Nacional. Tlaxcala, México.
- [22] Castro C., Navas C., Caro O., & Piñeros Y. (2006) Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus* sp. Aislado de semillas de lentejas. Colombia Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- [23] Carson L., Favero M., Bond W., Petersen N., (1972) Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water, American Society for Microbiology, vol. 25 no. 3, United States of America.
- [24] Catrin E., (2017) pH and Titratable acidity. Food and analysis. University of Georgia, pp. 389-406.
- [25] Cervantes C. Mario, Pedroza R. Aura M., (2007) El Pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman., NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas., Vol. 5 no. 8, 101-212., Colombia.

- [26] Cruz U. S., & Ulloa M., (1989) Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, Alimentos fermentados de Maíz consumidos en México y otros países Latinoamericanos. (Serie de Investigaciones Sociales, 6), México, 77 pp.
- [27] De Lera S. A., (2011) Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa., Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, País Vasco.
- [28] Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial (2016) Panorama Agroalimentario, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, México.
- [29] El-Fallal A., Abou M., El-Sayed A., Omar N., (2012) Starch and microbial  $\alpha$ -Amylases: from concepts to biotechnological applications - Carbohydrates Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology, INTECH chapter 21, Egypt.
- [30] Entrevista a Hortencia González Falcón, Molcaxac Puebla, México, 2019
- [31] Espinosa D., Lopez L., Carcaño M., & Serret M., (2020) El género Burkholderia: Entre en mutualismo y la patogenicidad. Revista mexicana de fitopatología 28 (3). México.
- [32] Fernández A., García C., Saez J., & Valdezate S. (2010) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, EIMC, España, pp 6
- [33] FAO, (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, no. 25, extraído de <http://www.fao.org/3/t0395s/T0395S00.htm>
- [34] Fuentes L. Luz., (2012) Comparación de cualidades nutricionales de once variedades de maíz., Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro División de Ciencia Animal., México.
- [35] Gallegos G. Miriam J., (2003) Pozol Bebida Tradicional. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México

- [36] García D., Valderrama J., (2016) Evaluación de la licuefacción e hidrólisis enzimática como tratamientos para incrementar el rendimiento alcohólico en la fermentación de chontaduro (*Bactris gasipaes*)., Universidad de La Salle, Colombia.
- [37] Garcia J., (2015), Toponimia y Antroponimia de la región de Calpixcayotl de Tlatlauquitepec, Puebla, extraído de <http://laregiondetlatlauqui.blogspot.mx/2015/04/una-bebida-de-samana-santa-el-xocoatole.html>
- [38] Giraldo G., Germán A., (2006) El efecto del tratamiento de impregnación a vacío en la respiración de frutas (manzana, fresa, melocotón y sandía) mínimamente procesadas., *Vitae* vol. 3 no. 2 pp 21-25, Colombia.
- [39] Glen P., Loraine W., (2020) Barley: Current understanding of omics data on quality, *Comprehensive Foodomics*, pages 513-527, United States of America.
- [40] Goñi S., & Salvadori V., (2015) Medición de color de alimentos en el espacio CIELAB a partir de imágenes. UNLP, Argentina.
- [41] Greenfield H., Southgate D.A.T., (2003) Datos de composición de alimentos obtención, gestión y utilización, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación., Roma
- [42] Gutiérrez A. Arellano B., Gutiérrez C., Escalera E., Romero G., Romero G., Saucedo J., & Gonzales O., (2017) Medios de cultivo en Microbiología Manual de laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- [43] Hausen C., (1946) Notas etnográficas sobre los mazatecos de Oaxaca, México. *Am. Indig.*, pp. 33-34, México.
- [44] Hernández F., (1942) Historia de las plantas de la Nueva España., Publicado en el Instituto de Biología UNAM. I (XLIV), 288-292. México.

- [45] Herrera T., (2007) Los hongos en la cultura Mexicana: Bebidas y alimentos tradicionales fermentados, hongos alucinógenos., Universidad Nacional Autónoma de México., Etnobiología 5: 108-116. México.
- [46] Jean F. & Mac Faddin. (2000). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Uruguay Editorial Panamericana
- [47] Jiménez A. Sandra A., (2017), Identificación de la capacidad biotransformadora, de bacterias ácido lácticas nativas de tres productos artesanales (Queso adobera, Tejuino y Pulque) para convertir ácido linoleico en ácido linoleico conjugado., Tesis de maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C, Jalisco, México.
- [48] J. J. Montor Antonio, C. Olvera-Carranza, D. Reyes-Duarte, B.Sachman-Ruiz, L. Ramírez-Coutiño & S. Del Moral. (2014) Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan. Nova Scientia Vol. 6 no. 12
- [49] Kirti R., Rachita R., Sanchi D. (2015) Review on characteristics and application of amylase., International Journal of Microbiology and Bioinformatics vol. 5 pp. 1-5., India
- [50] Laboratorio de mecánica y fluidos, Densidad, (2010), extraído de <http://www.fisica.uson.mx/manuales/mecyfluidos/mecyflu-lab10.pdf>
- [51] Lansing M. Prescott, John P. Harley & Donald A. Klein. (2002), Microbiología. McGraw Hill España
- [52] Leal I., Tarantino G., Hernandez R., Moran H., (2014) Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de agave cocui., Multiciencias, vol. 14, no. 4, Universidad del Zulia, Venezuela.
- [53] Lehninger Albert L. (2009). Principios de Bioquímica. Barcelona Editorial Omega

- [54] Leyva T. Doris A., Perez V. Arturo (2015) Pérdida de las raíces culinarias por la transformación en la cultura alimentaria. Veracruz, México. Extraído de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342015000400016](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000400016)
- [55] Maryen M., (2013) Obtención y purificación de preparados enzimáticos enriquecidos en Pepsina a partir de desechos de matadero y su empleo en estudios de Digestibilidad in Vitro, Universidad de la Habana, Cuba
- [56] Mathias-Rettig, (2014) Ka Ah-Hen, Kb\*.a. el color de los alimentos un criterio de calidad medible. Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia., Chile, extraído de <http://www.agrarias.uach.cl/wp-content/uploads/2016/04/art07-Mathias.pdf>
- [57] Melendez E. Martha (2004) Producción, Extracción, Purificación, Usos y aplicaciones de la enzima amilasa en la industria de los alimentos. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” México.
- [58] Mera I., Carrera J., (2005) Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, vol. 3 no. 1, Universidad de Cauca, Colombia.
- [59] Navarro G., (2019) Determinación de la cinética enzimática de la obtención de jarabe de glucosa a partir de papa, Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Centro de Perú- Unidad de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, Perú.
- [60] Nieblas C., Gallardo I., Rodriguez L., Sarría F., Batista J., Perez M., (2017) Obtención de jarabes glucosados por hidrólisis enzimática empleando almidón de sorgo CIAPR-132, Facultad de Química y Farmacia Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Cuba.
- [61] Nielsen S., (2010) Food Analysis, Food Science Text Series, Springer science, USA.

[62] Normas Mexicanas, NMX-F-527-1992. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS DISUELTOS Y SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN EN AGUA. FOODS. DETERMINATION OF TOTAL RESIDUE, FILTRABLE RESIDUES AND SUSPENDED MATTER IN WATER. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS

[63] Norma Oficial Mexicana, NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-116-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN ALIMENTOS POR TRATAMIENTO TÉRMICO. MÉTODO POR ARENA O GASA, 1994,

[64] Normas Mexicanas, NMX-F-089-S-1978. DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (MÉTODO SOXHLET) EN ALIMENTOS. FOODSTUFF-DETERMINATION OF ETHER EXTRACT (SOXHLET). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS, 1978.

[65] Normas Mexicanas, NMX-F-090-S-1978. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA EN ALIMENTOS. FOODSTUFF DETERMINATION OF CRUDE FIBER. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS

[66] Normas Mexicanas, NMX-F-312-1978. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR TOTAL AND DIRECT REDUCING SUBSTANCES IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS

[67] Norma Mexicana, NMX-F-068-S-1980. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. FOODS. DETERMINATION OF PROTEINS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS, 1980.

[68] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

- [69] Oliart R., Manresa A., Sánchez M., (2016) Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico., CienciaUAT 11(1), 79-90, México.
- [70] Padilha G., Cuervelo J., Monte R., Basile E., (2012) Extracción de lipasa de Burkholderia cepacia mediante PEG/ fosfato ATPS y su caracterización bioquímica, Braz. Arco. Biol. Technol. Vol. 55, Brasil
- [71] Pascon R., Faria R., Spinelli R., Dutra E., Assis D., Juliano L., Vallim M., (2011) Amilolytic microorganism from Sao Paulo zoo composting: Isolation, identification and amylase production., Sage hindawi, volumen 2011, article ID 679624, 8 pages, Brazil.
- [72] Pérez H., Díaz M., Rondón A., Fuentes L., Gonzalez L., & Guzmán A., (2020), Aislamiento de cepas de Basillus spp. A partir del bioproducto IHUPLUS con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial, Cuba.
- [73] Peter E., (2013) Recombinant DNA technologies, Biochemistry of foods, pages 503-556, Canadá.
- [74] Pintado R., (2019) Especies de Pseudomonas en el aire de la ciudad de Pirua, Perú, entre marzo y septiembre del 2017., Tesis de grado, Universidad Nacional de Pirua, Perú
- [75] Piñeiro J., Martínez J., Pozos J., Iglesias C., Cuesta L., Taboada J., Gajino P., Tresaco E., (2014) Desarrollo de una aplicación para la comparación rápida de pigmentos a partir de sus coordenadas colorimétricas. DYNA, vol. 81 no. 184, Colombia.
- [76] Puga G., Macancela K., (2017) Diseño de un proceso relacionando materias primas y equipos para la obtención de ATOLE (bebida de maíz)., Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.

[77] Rico Y., (2011) Producción, purificación y caracterización parcial de una Glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

[78] Rodríguez Z., Boucourt R., Rodríguez J., Albelo N., Núñez O., & Herrera F. R. (2006), Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 40, núm. 3, pp. 349-354 Instituto de Ciencia Animal La Habana, Cuba.

[79] Rojas F., Lopez D., Meza G., Méndez A., Ibarra J., Estrada P., (2018) El controvertido complejo Burkholderia cepacia, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos, Revista Argentina de Microbiología pp 84-92, Instituto Politécnico Nacional, México.

[80] Rojas L., Lorenzo Y., Domenech F., (2011) Estudio del consumo de ácidos en el ajuste de pH en diferentes medios de fermentación alcohólica ICIDICA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, vol. 45 no. 2, Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar., Cuba.

[81] Rojo R., Mendoza G., Crosby M., (2001) Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz., Colegio de posgraduados., México.

[82] Romero R., (2017) Elaboración de una bebida fermentada a partir de Jora de Maíz negro, Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.

[83] Roque L., Arámbula G., López M., Ortiz H., Carballo A., Herrera J., (2016) Nixtamalización de cinco variedades de maíz con diferente dureza de grano: Impacto en consumo de combustible y cambios fisicoquímicos., Agrociencia vol. 50, no. 6., México.

[84] Saab G., Del Rio G., Santamaría R., Díaz M., López M., (2006) La enzima alfa amilasa en la industria nuevas aplicaciones basadas en la relación estructura-función., Universidad Nacional Autónoma de México., México.

[85] Salinas Y., Martínez F., Soto M., Ortega R., Arellano J., (2003) Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* vol. 37 no. 6, México.

[86] Salinas Y., Garcia C., Coutiño B., Vidal V., (2013) Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz., *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 Supl 3-A. México.

[87] Sánchez D. María G., López F. Clementina E., Flores V. Martha., & Jofre G. Ana L., (2005), Estudio preliminar del Axokot, bebida tradicional fermentada, bajo una perspectiva transdisciplinaria. Universidad Simón Bolívar., Instituto Politécnico Nacional., Instituto de Química UNAM., México.

[88] Sánchez E., Heredia J., Buitrago S., Medina J., (2020) Isolation and identification of potencial amylolytic and cellulolytic microorganisms from soil of Bogota wetlands., *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol 22 no. 1, Colombia.

[89] Sánchez H. Claudia., Mejía G. Carlos., Figueroa M. Carlos, Esquivia M. Mabel., Zapata G. Norela. (2005) Estudio de cepas nativas amilolíticas. Universidad de Antioquia, Medellin. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* Vol. 12 no. 2., Colombia.

[90] Sarabjeet K., Narender K., Ishwinder K., Girish S., (2018) Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic  $\alpha$ -amylase from hot springs, India., *International journal of biological macromolecules.*, India

- [91] Sebastián M. Pablo., (2018) Evaluación del valor nutricional de maíces especiales: Selección para calidad agroalimentaria., Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba., Colombia.
- [92] Sepúlveda M. L., (2015), Laboratorio: PH, escuela normal Juan P. Pringles, extraído de [http://server-enjpp.unsl.edu.ar/escuela/images/laboratorio\\_de\\_ph.pdf](http://server-enjpp.unsl.edu.ar/escuela/images/laboratorio_de_ph.pdf)
- [93] Sirvas S., Buleje V., Salvatierra L., Jaramillo L., (2021) Isolation and identification of proteolytic, amyolytic, lipolytic and chitinolytic bacteria from shrimp waste, Revista Peruana de Biología 28 (1), Perú.
- [94] Talens P., (2020) Determinación experimental de densidad y porosidad en alimentos sólidos y líquidos., Universidad Politécnica de Valencia, España.
- [95] Valera A., Zambrano J., Materano W., Quintero I., (2005) efectos de la concentración de solud y la relación fruta/jarabe sobre la deshidratación osmótica de mango en cilindros. Vol. 55 no. 1 pp 117-132. Venezuela.
- [96] Vanegas Zamora R. V., Méndez Arteaga J. J., Walter Murillo-Arango. (2015) Potencial amilolítico de microorganismos asociados al arroz cultivados a partir de almidón extraído de subproductos del grano. Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, ISSN 0370-3908, Vol. 39, Nº. 153, 2015, págs. 514-519., Colombia.
- [97] Vieira T., Werneck C., Peres C., Machado D., (2018) Isolation and identification of a potential amyolytic probiotic bacterium from the Gut of Jundiá Catfish, *Rhamdia quelen*, Brazilian archives biology and technology, vol. 61, Brazilian.
- [98] Villalobos L., (2009) Metodologías de análisis de factores de calidad en frutas tropicales
- [99] Taninguchi H., Honnda Y., (2009) Amylases, Encyclopedia of Microbiology, Third edition, pages 159-173., Japan.

[100] Torres F., Moreno E., Chong I., Quintanilla J., (1996), La industria de la masa y la Tortilla: Desarrollo y Tecnología, Instituto Nacional de Bellas Artes, México.

[101] Wade I. G., (2004) Química Orgánica, Editorial Pearson Educación S. A., España.

[102] Yañiquez J., Huanca S., Tejeda L., Aliaga E., Peñarrieta J., Mollinero P., (2019) Determination of the temperature, pH and concentration parameters for  $\alpha$ -Amilasa Mg a new enzyme, Rev. Bol. Quim. Vol 36 no.1, Bolivia.

[103] Zumbado F. H., (2004) Análisis Químico de los Alimentos. Métodos Clásicos., Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana., Cuba.