

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS



Evaluación cinética de la producción de enzimas celulolíticas de microorganismos probióticos en cultivo líquido utilizando aguamiel como sustrato.

Por:

WENDY GARCÍA CALVO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
TÍTULO DE INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre 2021.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS
DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS EN CULTIVO LÍQUIDO UTILIZANDO
AGUAMIEL COMO SUSTRATO**

TESIS

Presentada por

WENDY GARCÍA CALVO

y que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Presidente



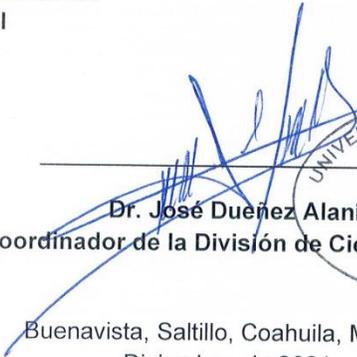
Dr. Ruth Elizabeth Baldemares Cerda
Vocal



M.C. Carolina Losoya Sifuentes
Vocal



Dra. María Elena Castelo Mejía
Vocal



Dr. José Duñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS
DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN CULTIVO LÍQUIDO UTILIZANDO
AGUAMIEL COMO SUSTRATO**

TESIS

Presentada por

WENDY GARCÍA CALVO

y que somete a consideración del H. Comité Asesor como requisito parcial para
obtener el título profesional de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Asesor principal



M.C. Carolina Losoya Sifuentes
Co-asesor



Dr. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Co-asesor



Dra. María Elena Castelo Mejía
Co-asesor

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2021

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a Dios porque siempre ilumino mi camino en cada momento de mi carrera y nunca dejarme sola.

A mis padres Domingo y Cristina por apoyarme en todo momento, por los valores que siempre me han inculcado, y por haberme dado la dicha de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mis hermanos Luis Miguel García Calvo, José Domingo García Calvo, Víctor Manuel García Calvo por ser parte importante de mi vida y representar la unidad de familia que somos y seremos siempre.

A mi padrino Alejandro Calvo Noriega porque también formo parte de esta trayectoria que siempre me dio su apoyo incondicional.

A mis tíos y primas porque también me aconsejaron para ser buena persona de bien.

A mis abuelos por confiar en mí y también por sus buenos consejos que ellos me daban.

AGRADECIMIENTO

Agradezco adiós por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias y sobre todo felicidad.

Gracias a mi hermosa Universidad autónoma agraria Antonio narro por brindarme sus puertas abiertas y por todo lo que ella me dio. Porque siempre fue mi segunda casa a la cual siempre estaré agradecida en ella.

Gracias al Dr. Mario Alberto Cruz por su paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado por compartirme sus experiencias y conocimientos, porque siempre me impulso a ser mejor persona como profesionalista. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan.

Gracias a la doctora Ruth Belmares por brindarnos el acceso al laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Gracias a la M.C. Carolina Losoya Sifuentes por brindarme sus conocimientos y aprendizajes.

Gracias a Karen Nataly Pinto Jiménez y Abril Oralía Vázquez Juárez por ser buenas amigas y ser muy importante en mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, por darme buenos consejos y motivarme a que todo es posible.

Gracias a mis compañeros de viaje, que hoy culminan esta maravillosa aventura y no puedo dejar de recordar cuantas tardes y horas de trabajo nos juntamos a lo largo de nuestra formación. Hoy nos toca cerrar un capítulo maravilloso en esta historia de vida y no puedo dejar de agradecerles por su apoyo y constancia, al estar en las horas más difíciles, por compartir horas de estudio. Gracias por estar siempre allí.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
ABSTRACT	vii
RESUMEN	viii
1.- INTRODUCCIÓN	9
2.- OBJETIVOS.....	11
2.1.- Objetivo general.....	11
2.2.- Objetivos específicos	11
3.- JUSTIFICACIÓN	12
4.- ANTECEDENTES.....	13
4.1.- Probióticos	13
4.2.- Microorganismos	14
4.2.1.- Microorganismos probióticos	15
4.2.2.- Lactobacillus.....	16
4.2.3.- Enterococcus.....	18
4.2.4.- Aguamiel.....	19
4.2.5.- Agave	20
4.2.6.- Importancia socioeconómica del agave y subproductos	22
4.3.- Enzimas	22
4.4.- Fermentación láctica.....	24
5.- METODOLOGIA	25
5.1.- Preparación del medio	25
5.2.- Preparación de M.O.....	25
5.3.- Identificación Microscópica (Arredondo Vazquez,2019).	25

5.4.- Conservación de los M.O.....	26
5.5.- Preparación del inóculo	26
5.6.- Fermentación en Medio Líquido	28
5.7.- Cinética de producción de enzimas celulolíticas.....	28
5.8.- Determinación de enzimas celulolíticas	28
5.9.- Determinación de proteínas, azúcares totales.....	29
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1.- Evaluación del microorganismo	30
6.2.- Identificación microscópica	31
6.3.- Preparación del inóculo	32
6.4.- Cinética de producción enzimática	33
6.5.- Determinación de la actividad amilasa.....	33
6.6.- Determinación de la actividad xilanasa.....	35
6.7.- Determinación de la actividad celulasa.....	36
6.8.- Determinación de proteínas.....	39
6.9.- Determinación de azúcares totales.....	40
7.- CONCLUSIÓN	42
8.- BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Tipos de morfología de las bacterias.</i>	14
Figura 2. a) Imagen microscópica del microorganismo <i>Lactobacillus</i> , b) Tipos de <i>Lactobacillus</i>	17
Figura 3. 1) imagen microbiológicamente, 2) imagen microscópica.....	19
<i>Figura 4. Planta del agave</i>	21
<i>Figura 5. a) Acción de las enzimas, b) formación de activar de las enzimas según de la ecuación de las enzimas.</i>	23
Figura 6. Conteo de células con la cámara de Neubauer.	27
Figura 7. <i>Aislamiento de bacterias en medio de cultivo M.R.S</i>	30
<i>Figura 8. Caracterización de bacterias A) bacilos b) cocos.</i>	31
Figura 9. Caracterización microscópica de la cámara Neubauer.	32
<i>Figura 10. Cinética de actividad amilasa utilizando microorganismos probióticos y como sustrato aguamiel en medio líquido.</i>	33
<i>Figura 11. Cinética de actividad amilasa utilizando microorganismos probióticos y como sustrato aguamiel en medio líquido.</i>	34
<i>Figura 12. Cinética de actividad xilanasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato.</i>	35
<i>Figura 13. Cinética de actividad xilanasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato.</i>	36
Figura 14. Cinética de actividad celulasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato	37
Figura 15. Cinética de actividad celulasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato	38
<i>Figura 16. Determinación de proteínas con microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido.</i>	39
<i>Figura 17. Determinación del consumo de sustrato por microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido.</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales microorganismos probióticos	16
Tabla 2. se muestran las principales aplicaciones y usos dados a esta planta.....	21

ABSTRACT

In summary, *aguamiel* is a drink with a sweet taste, as it is also acidic or subtly alkaline because it is rich in proteins and carbohydrates such as glucose and fructose. On the other hand, this drink is used primarily to create pulque or as an energy drink. Studies have reported that *aguamiel* belongs to products with characteristic functionalities since it has bio-active properties such as amino acids and sugars present in them. The objective of this project was to evaluate the production of cellulase, amylase enzymes and xylanases from 2 probiotic microorganisms, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus lactis* using *aguamiel* as liquid substrate through kinetic characterization. For this, a methodology was proposed such as medium preparation, microorganisms preparation, microscopic identification, conservation of microorganisms, preparation of the inoculum, fermentation in liquid medium, etc. Therefore, 10 strains were evaluated, which resulted in 3 microorganisms with macroscopic characteristics and were selected as probiotics, for which it was necessary to carry out a microscopic identification. According to the results obtained from the evaluation of the three enzymes evaluated, the highest production presence was of the cellulase enzyme of the microorganisms *Lactobacillus lactis* with a value of 1460 mg / mL and *Enterococcus faecium* with a value of 1198 mg / mL. This is due to the amount of glucose that cellulase contains and makes the substrate more adaptable.

Keywords: mead, enzymes, glucose, probiotics, microorganisms

RESUMEN

En resumen, el aguamiel es una bebida de un sabor dulce, como además es acida o sutilmente alcalino debido a que es rica en proteínas y carbohidratos como son la glucosa y fructosa. Por otra parte, esta bebida de aguamiel es usado primordialmente para crear pulque o como para una bebida energizante. Dichos estudios han informado que el aguamiel de agave pertenece a los productos con funcionalidades de características ya que cuenta con propiedades bio-activos como son los aminoácidos y azúcares presentes en ellos, El objetivo de este proyecto fue evaluar la producción de las enzimas celulasas, amilasas, y xilanasas de 2 microorganismos probióticos, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus lactis* utilizando aguamiel como sustrato líquido mediante la caracterización cinética. Para ello se planteó una metodología como la preparación del medio, preparación de M.O, identificación microscópica, conservación de los microorganismos, preparación del inóculo, fermentación en medio líquido, etc. Por ello 10 cepas fueron evaluadas lo cual se obtuvieron 3 microorganismos con características macroscópicas y fueron seleccionadas como las probióticas para lo cual fue necesario realizar una identificación microscópica. De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación de las tres enzimas evaluadas la mayor presencia de producción fue de la enzima celulasa de los microorganismos *Lactobacillus lactis* con un valor de 1460 mg/mL y *Enterococcus faecium* de un valor de 1198 mg/mL esto puede deberse a la cantidad de glucosa que contiene la celulasa y hace que el sustrato se adapte más.

Palabras claves: aguamiel, enzimas, glucosa, probióticos, microorganismos.

1.- INTRODUCCIÓN

El aguamiel es una bebida de un sabor dulce, como además ácida o sutilmente alcalina debido a que es rica en proteínas y carbohidratos como son la glucosa y fructosa, más adelante es una savia de color amarillento que también tiene un olor herbáceo que es obtenido al hacer una capación del maguey duro, ya que se raspa en el centro del maguey para conformar una cavidad de 20-30 centímetros de hondura lo que va a servir para hacer un almacenamiento de alrededor de 1500 litros de aguamiel a lo largo de 3 a 6 meses. (Muñiz Márquez et al., 2013). Diversos estudios han comunicado que el aguamiel de agave pertenece a los productos con funcionalidades de características ya que cuenta con propiedades bio-activos como son los aminoácidos y azúcares presentes en ellos. Esta bebida de aguamiel es usada primordialmente para crear pulque o como para una bebida energizante (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018). Por consiguiente, esta bebida es de forma natural que resultaría ser un óptimo elemento para ser empleado a la industria de la fermentación (Muñiz Márquez et al., 2013).

El término probiótico viene de “alimento funcional” ya que son microorganismos vivos (Cunningham et al., 2021). Los alimentos funcionales contienen minerales específicos como: vitaminas, ácidos grasos, fibra dietética y aditivos alimentarios o probiótico (Ciemar and Gibson, 1998; Salminen et al., 1998a). Microbiológicamente los microorganismos llamados *Enterococcus* son clasificados como cocos ya que son gram positivos ubicuos que se encuentran en aguas, suelos y alimentos. Por lo tanto, son microorganismos anaerobios facultativos, catalasa negativos puesto a que forman parte de la microbiota normal del hombre y otros animales donde habitualmente residen (Murray BE, 1990). Los *Lactobacillus* también son cepas que se han utilizado tradicionalmente para productos lácteos fermentados además es una bacteria ácido-láctica que se ha estudiado por presentar un antagonismo de bacterias de gram positivas-negativas cuya principal característica es tener una producción de nisina que permite reducir las poblaciones bacterianas patógenas presentes en alimentos.

Además esta bacteria es un miembro deseable de la micro-flora intestinal (Mohammad & Hashemi, 2016).

Estos microorganismos se les llama enzimas celulolíticas por lo que son sintetizadas por numerosos microorganismos. Por lo tanto, son un grupo importante de enzimas que pueden degradar celulosa. Las celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo enzimático celulítico que, como su nombre lo indica es capaz de hidrolizar la celulosa por lo que compone homopolimeros compuestos por unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico β -1,4. Así mismo estas enzimas celulolíticas tienen una clasificación de acuerdo al sitio de acción en el sustrato celulósico que divide en tres grandes grupos como es: Endoglucanasas que cortan uniones de composición y seleccionados por su capacidad de producción de enzimas celulolíticas en medio de cultivos líquidos (Arévalo, 2011; Bautista, 2011).

Debido a lo anterior en el presente proyecto se pretende producir enzimas celulolíticas con microorganismos probióticos usando como sustrato de aguamiel.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Evaluar la producción de las enzimas celulasas, amilasas, y xilanasas de 2 microorganismos probióticos, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus lactis* utilizando aguamiel como sustrato líquido mediante la caracterización cinética.

2.2.- Objetivos específicos

- Activar las cepas de *Lactobacillus lactis* y *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS para identificar las colonias.
- Identificar y caracterizar las cepas microscópica y macroscópicamente para evitar la contaminación.
- Producir el inóculo de cada una de las cepas en medio de cultivo selectivo.
- Evaluar cinéticamente la fermentación de los microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en cultivo líquido.
- Determinar la producción de las enzimas celulasa, amilasa y xilanasas, mediante ensayos enzimáticos en la cinética.

3.- JUSTIFICACIÓN

Lo que se pretende es el saber la importancia que tiene los dos microorganismos probiótico para producir enzimas utilizando aguamiel en medio líquido mediante una caracterización cinética. Puesto que una de las importancias que tienen los probióticos son aditivos que mejoran el proceso digestivo al mantener un ambiente intestinal sano, ya que hacen que modifiquen la composición o la actividad de la microflora intestinal, unas de las bacterias probióticas mencionada como el *Enterococcus faecium*, que puede ser utilizada para prevenir problemas diarreicos también se dice que las bacterias *Lactobacillus lactis* es una bacteria ácido láctico por lo cual presenta características como un probiótico ya que son bacterias de Gram positivas.

Las enzimas también tienen una gran importancia por lo que son proteínas que participan en los procesos biológicos en lo cual son proteínas complejas que producen un cambio químico específico en todas las partes. Por ejemplo, pueden ayudar a descomponer los alimentos que consumimos para que el cuerpo los pueda asimilar de una forma más sencilla.

El auge mundial en la alimentación es el uso de ingredientes bio-activos como alternativas para buscar una vida saludable. De aquí nace la importancia de la producción de aguamiel en las distintas aplicaciones industriales diferentes al uso tradicional de la elaboración de pulque tales como, la fabricación de jarabes fructosados, azúcares que sirvan como edulcorantes naturales para pacientes diabéticos, miel de maguey entre otros. Además, se ha reportado el empleo del pulque para elaborar el famoso y tradicional “pan de pulque” producido en el estado de Coahuila.

Por lo que el emplear este tipo de muestras como sustratos para la producción de probióticos y que además se evalué la producción de enzimas celulolíticas favorece el uso integral de los productos del maguey en el Estado.

4.- ANTECEDENTES

4.1.- Probióticos

En 1989, Fuller definió como "probiótico" "un microbio vivo complemento alimenticio que perjudica beneficiosamente al animal huésped. Lo que optimiza su equilibrio microbiano intestinal. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, una vez que se administran en porciones correctas, confieren un beneficio para la salud del huésped (humano) (FAO / Organización Mundial de la Salud, 2002). De acuerdo con la definición de la OMS (OMS), los probióticos son "microorganismos vivos que una vez que se administran en porciones correctas confieren un beneficio para la salud del huésped". En la actualidad, las cepas probióticas clásicas que se venden en el mercado integran bacterias del ácido láctico (LAB) como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que poseen un impacto benéfico en el procedimiento de ciertos trastornos gastrointestinales. No obstante, otras bacterias, o sea, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, varias especies de levadura *Bacillus* y *Saccharomyces* además se usan como cepas probióticas. En los últimos años, los probióticos se han estudiado extensamente por sus efectos útiles para la salud (Akimowicz et al., 2021).

Así mismo los Probióticos son un cultivo de puro o mezcla de microorganismos vivos, que aplicados al hombre o animales aportan efectos benéficos al huésped perfeccionando las características de la microflora nativa. Pues se utiliza en alimentos lácteos, alimentos para bebés, productos a base de jugos de frutas, productos a base de cereales, y farmacológicos (Guerrero, 2016). El creador Tannock et al. (2000), identificó que el consumo de probióticos a extenso plazo, no se asoció con cambios drásticos en la estructura de la microbiota intestinal, ya que se planteó una definición opción de células microbianas las cuales circulan el tracto digestivo y las cuales proporcionan beneficio a la salud del consumidor.

Gracias a la demanda de productos nutritivos y con costo añadido a la salud de parte del consumidor, el desarrollo de alimentos funcionales, que son esos que buscan

proporcionar efectos benéficos a la salud más allá de los que comúnmente tienen dentro sus nutrientes (Roy, 2005), con la adhesión de dichos microorganismos es más grande cada vez gracias a su potencial impacto terapéutico.

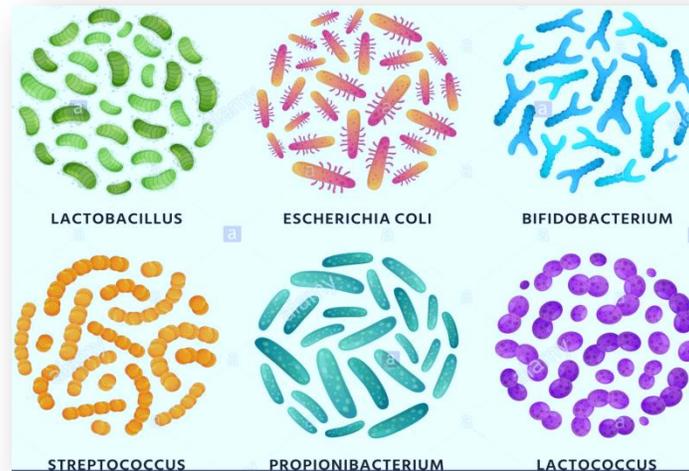


Figura 1. Tipos de morfología de las bacterias.

4.2.- Microorganismos

Los microorganismos son los que colonizan una gran parte de la superficie del cuerpo humano que se encuentra en contacto directo con el medio externo, pero también superficies internas. El ecosistema intestinal es un complejo ambiente en el que se producen interacciones dinámicas y recíprocas entre el epitelio, el sistema inmunitario y la microbiota local. Se estima que en el tracto gastrointestinal coexisten, en un delicado equilibrio, entre 500 y 1000 especies de microorganismos. Puesto que pueden conformar la microbiota local o ser microorganismos de tránsito, como aquellos que ingresan con los alimentos. El tubo digestivo es colonizado por bacterias a partir del nacimiento. El estómago y la primera porción del intestino no son sitios ideales para el establecimiento de bacterias comensales debido a los rangos de pH y la presencia de enzimas digestivas, por lo que el intestino grueso es el sitio más colonizado del tracto gastrointestinal. La composición de la microbiota intestinal varía a lo largo de la vida y

con las condiciones nutricionales y fisiológicas del hospedador. El sistema inmunitario intestinal madura a medida que se establecen los agentes que constituyen la microbiota. Los microorganismos de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Clostridium* son colonizadores tempranos; con posterioridad se instalan *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y distintos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, entre otros (Del Coco, 2015).

4.2.1.- Microorganismos probióticos

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de los Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen los probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped”. Esta definición refleja el hecho de que los probióticos pueden ser enfocados no solamente al intestino, sino también la cavidad bucal, la nasofaringe, el estómago, la vagina, la vejiga y la piel. No obstante no hay mucha aceptación de la comunidad científica médica (Guerrero, 2016).

Pues los microorganismos probióticos son de forma bacilar o cocobacilos gram positivos, no esporulados que tienen la propiedad de desdoblar algunos carbohidratos para producir compuestos de menor peso molecular, como los ácidos lácticos, propionico, fórmico, acético, CO₂, diacetilo, H₂O₂, entre otros. Debido a que estos productos contribuyen a mejorar procesos digestivos y a combatir la microbiota patógena intestinal, ya que mantiene el equilibrio inmunológico. Dado a que estos microorganismos ya se encuentran en el mercado en forma de tabletas, capsulas, en polvo y adicionados a alimentos. Sin embargo, se pueden aislar de alimentos de origen animal y vegetal fermentados en forma natural (Salazar, B., & Montoya C., O. ,2003).

En la tabla 1 Lista de los principales microorganismos probióticos utilizados hasta el momento.

Tabla 1. Principales microorganismos probióticos

Lactobacillus <i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. kefir</i> <i>L. lactis</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. sakei</i> <i>L. salivarius</i>	Bifidobacterium <i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>	Sacharomyces <i>S. boulardii</i> <i>S. cerevisiae</i>
	Enterococcus <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Otros Lactococcus <i>L. lactis</i> <i>L. cremoris</i> <i>L. diacetylactis</i> Bacillus <i>B. subtilis</i> <i>B. coagulans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Leuconostoc</i> spp. <i>Pediococcus acidilactici</i>
	Streptococcus <i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i>	

4.2.2.- Lactobacillus

Los *Lactobacillus* son bacterias gram positivas, inmóviles, no formadoras de esporas, tolerantes a los ácidos, en forma de varilla que no respiran (bacilo) o esféricas (cocos) que producen ácidos lácticos como el principal producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. En animales de granja confieren buena salud intestinal al estimular el crecimiento de una microbiota sana , previniendo la colonización intestinal de patógenos entéricos , reducen los efectos nocivos fecales emisión de gases (Hong et al., 2002),del mismo modo que la producción de sustancias antimicrobianas son patrones de resistencia a los antibióticos por lo que mejora de la capacidad digestiva y la respuesta inmune mediada por anticuerpos, y eficacia y seguridad demostrables(Dowarah et al., 2017).

Por otra parte, los lactobacilos requieren de medios complejos para su crecimiento con vías fermentativas y sacroclásticas y los subproductos que producen por fermentación incluyen lactato y rara vez acetato. Por un lado, desempeñan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio de la microbiana intestinal después de la ingesta de antibióticos. Además, los lactobacilos se utilizan en el tratamiento de la diarrea infecciosa, la intolerancia a la lactosa, las enfermedades alérgicas, la proliferación del cáncer y la mejora del sistema inmunológico del huésped. Por una parte el consumo de *Lactobacillus sp* y otras formulaciones probióticas puede reducir la diarrea asociada a antibióticos, *Clostridium* difícil diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad de Crohn en gran medida (Das et al., 2019).

De hecho hay diversos informes científicos que indicaron que EPS (Entidad Promotora de Salud) que las especies de *Lactobacillus* pueden contribuir a la salud humana por medios de numerosos efectos demostrados: papel prebiótico, modulación de la sistema inmunológico, antioxidante, antitumoral, antiulceroso o colesterol bajo actividades errantes, etc (Ale et al., 2020).

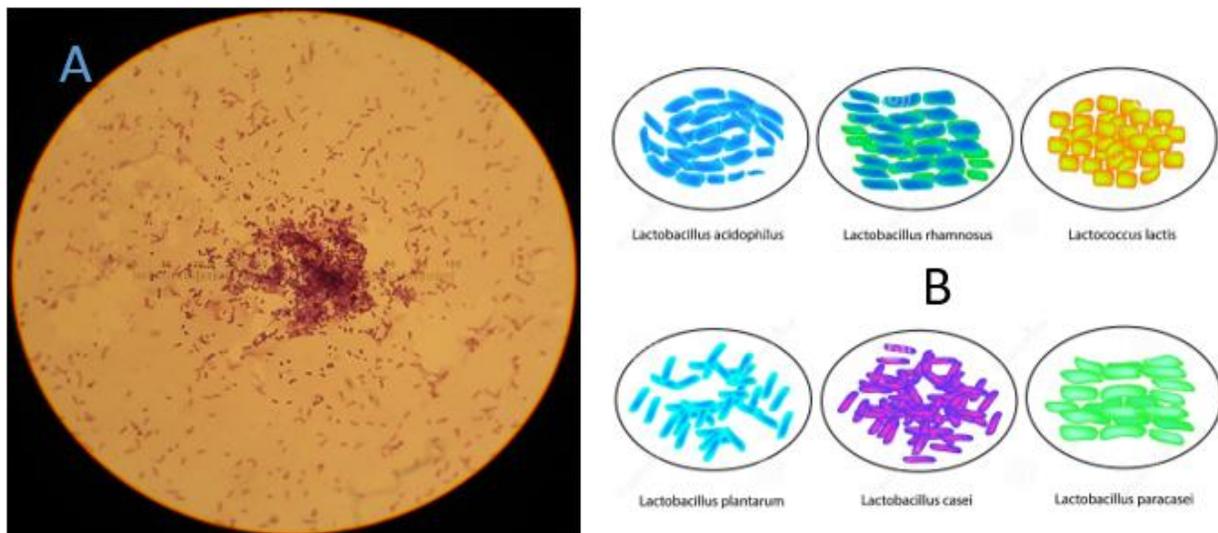


Figura 2. a) Imagen microscópica del microorganismo *Lactobacillus*, b) Tipos de *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales como carnes y pescados. Ya que forman parte de la flora normal de la boca, tracto- intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. Por lo que no son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervienen la caries dental). Este microorganismo tiene una gran importancia industrial, puesto que se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos...). por otra parte, Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales como (pepinillos, aceitunas...). De tal manera que son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme, son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos no son esporulados. Son sacarolíticos. y su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores. Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C (Axelsson ,2004).

4.2.3.- Enterococcus

El término de *Enterococcus* es oriundo del griego “enteron” que significa “intestine” y “kokkos” que significa “bava o grano” morfológicamente, los *Enterococcus* son difícilmente distinguibles de los *Streptococcus* por lo cual al inicio se clasificaron como microorganismos de este conjunto (*Streptococcus* conjunto D de la Lancefiel), (Sherman JM,1937).

Asimismo, son microorganismos cocos gram positivos que tienen la posibilidad de descubrir como células asiladas, conformando parejas o en cadenas cortas. Además, son miembros de este género son anaerobios facultativos y catalasa negativos. No obstante, varias cepas de *E. faecalis* generan una pseudo catalasa una vez que crecen en un medio de cultivo que contenga sangre por lo cual se puede observar una débil efervescencia (Facklam RR,1989).

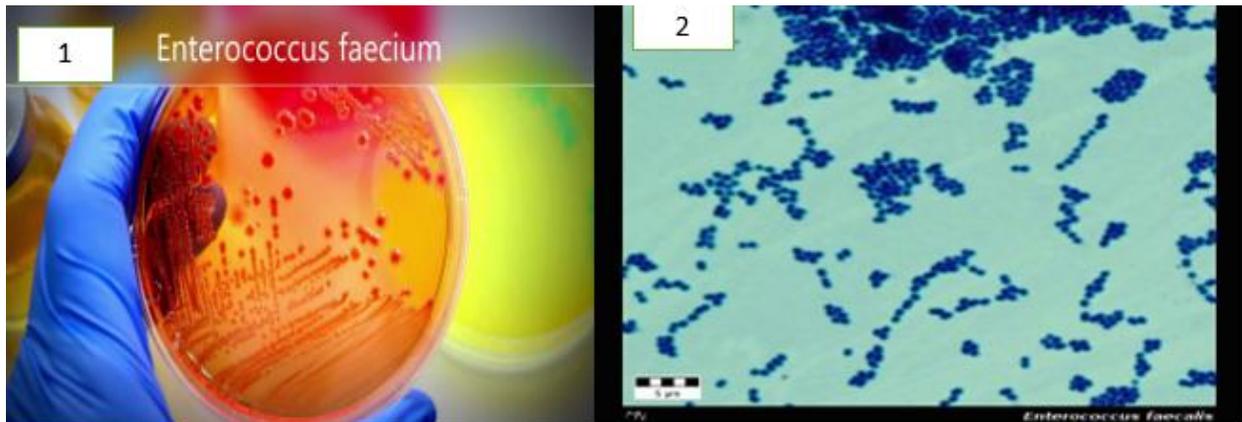


Figura 3. 1) imagen microbiológicamente, 2) imagen microscópica.

4.2.4.- Aguamiel

En la actualidad el aguamiel es comúnmente empleado para la manufactura del pulque que es una bebida alcohólica ancestral; no obstante, la producción de las dos bebidas no es rentable gracias a diferentes componentes entre los que se resaltan los próximos:

(a) A partir de la década de 1960 nació una disminución en la demanda de pulque gracias a un aumento del consumo de cerveza.

(b) Los bajos costos del pulque (0.26-0.43 dólar/L) no han creado una importante ganancia económica para los agricultores.

(c) Los cultivos de maguey fueron usados para los demás objetivos, entre los cuales está la preparación de platos clásicos, la averiguación de insectos víveres exóticos, la producción de tequila o mezcal y el aprovechamiento varias fibras (Muñiz Márquez et al., 2013).

4.2.5.- Agave

El agave habitualmente conocido como "maguey" es oriundo de México, que aloja el 75% del total de especies. en las Américas, de las cuales el 55% son endémicas. Varias especies de agave se conocen habitualmente como "maguey pulquero" (*Agave salmiana*, *A. Mapisaga*, *A. Atrovirens*, *A. Americana*, *A. Ferox*), debido a que tienen dentro una savia denominado "aguamiel" que se usa primordialmente para crear "pulque", una de las bebidas alcohólicas más viejas en las Américas. Diversos estudios han comunicado que el aguamiel de agave es un producto con funcionalidades características debidas a la existencia de elementos bio-activos como aminoácidos y sacarosa(Rasc et al., 1923). Aguamiel de *Agave salmiana* se usa primordialmente para crear pulque y como bebida energética en los pueblos donde esta crecido.

La planta de agave es popular en América Latina, primordialmente en México como "maguey". Esta planta podría ser hallada a lo largo del territorio mexicano, en donde se aloja más del 75% de las especies de este género, sin embargo, esta planta se distribuye extensamente a lo largo del conjunto de naciones americano (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018).

El agave por su categorización taxonómica, se separa en 2 géneros *Littaea* y *Agave* que cuentan con 54 y 82 especies respectivamente. Al subgénero *Agave* lo incorporan 12 secciones, 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades, dando un total de 197 taxones, no obstante, las especies donde se puede sustraer el aguamiel para su aprovechamiento son contadas (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018).

El agave está clasificado como una planta monocárpica, ya que florece sólo una vez en su historia. Pasado este proceso de floración la planta fallece. Las hojas, llamadas regionalmente como "pencas" permanecen distribuidas de forma circular en torno al tronco o piña dando una forma tipo roseta. Las pencas son de color verde o amarillo; de cuerpo humano grueso y carnosos y terminan con una punta afilada o espina apical.

Gracias a su composición e relación con el medio, esta planta puede ajustarse de forma fácil a las condiciones del medio ambiente con suelos pobres en nutrientes como zonas montañosas o rocosas (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018). El tipo de clima donde esta planta se realiza de forma conveniente es en regiones donde escasea el agua, primordialmente en regiones áridas o semiáridas.



Figura 4. Planta del agave

Tabla 2. se muestran las principales aplicaciones y usos dados a esta planta.

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentación	Azúcar, Pan de pulque	Piña
	Guisos, Dulces	Flores
	Mixiote, Gusanos blancos y rojos	Hojas
Bebidas	Aguamiel, Atole, Pulque	Piña
	Mezcal, Tequila	
	Vinagre	
	Jarabe	
Agrícola	Cerca delimitante, Inhibidor de la erosión	Planta entera Hojas
	Composta o Fertilizante	
Otros	Celulosa para papel, Producción de etanol, Glucósidos	Hojas y fibra
	Producción de saponinas	Piña

Fuente: Centro de Propagación de Agave del Estado de Guanajuato.

Históricamente, la aplicación primordial del agave es la preparación de bebidas alcohólicas, precedidas por una fermentación tanto controlada como espontánea. Bebidas como el tequila o el mezcal, son conseguidas tras la fermentación controlada de los azúcares conseguidos tras la cocción y estrujado de la piña o tallo del agave. Otra bebida alcohólica con menor nivel de consumo es el pulque.

4.2.6.- Importancia socioeconómica del agave y subproductos

El valor del uso de plantas de *Agave* se remonta en la era prehispánica una vez que los pueblos nativos de las zonas centrales y norteñas del territorio vieron a estas plantas como una fuente de materia prima para la preparación de una enorme proporción de productos alimentarios entre los que se hallan el mezcal, tequila, sotol, gusanos blancos y rojos, recientemente el pulque obtenido sirve para la preparación de pan de pulque en zonas norteñas del territorio, además poseen aplicaciones agrícolas y de forraje empleándose como abono orgánico (Rasc et al., 1923).

4.3.- Enzimas

Durante la historia se vinieron utilizando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas usualmente usadas es la celulasas logradas por medio de fermentación de diferentes microorganismos puede sintetizarse a lo extenso de parte de su periodo de incremento (Medina, 2010).

Las enzimas son los catalizadores biológicos causantes de hacer cada una de las actitudes metabólicas en el organismo, su funcionalidad es minimizar la energía de activación para la transformación y síntesis de metabolitos. El acoplamiento de las actitudes enzimáticas relacionadas en labores usuales origina rutas metabólicas que se interconectan entre sí para armonizar los mecanismos biológicos y asegurar la estabilidad del organismo. Las enzimas catalizan centenares de actitudes paso a paso para degradar nutrimentos, mantener y cambiar energía, y sintetizar macromoléculas biológicas desde precursores primordiales. Las enzimas son primordiales para todo proceso bioquímica (Medina, 2010).

El análisis de las enzimas tiene gran trascendencia en el campo de la medicina, debido a que, varias patologías, en especial trastornos de los genes hereditarios, tienen la posibilidad de crear deficiencia o inclusive una ausencia total de una o más enzimas, en lo que otras patologías tienen la posibilidad de ser causadas por la actividad desmesurada de una enzima (Antonio & López, 2019). Las enzimas poseen más grande selectividad, especificidad y eficiencia que catalizadores químicos. Por sus características y su química verde, los biocatalizadores se aplican extensamente en la industria alimentaria, textil y farmacéutica (Valeria et al., 2019). Un biocatalizador de alta eficiencia para aplicaciones industriales. En la naturaleza existe un enorme conjunto de enzimas, que, al ser macromoléculas de procedencia biológico estuvieron sujetas a procesos evolutivos, y como consecuencia en la actualidad hay una extensa variedad que cataliza eficientemente diversas actitudes con elevado nivel de selectividad por los reactantes o sustratos (Antonio & López, 2019). La alta especificidad de una enzima por sus sustratos involucra que, la falta o deficiencia de alguna compromete severamente la homeostasis del organismo. Por consiguiente, los errores en el desempeño de las enzimas tienen la posibilidad de ocasionar patologías graves.

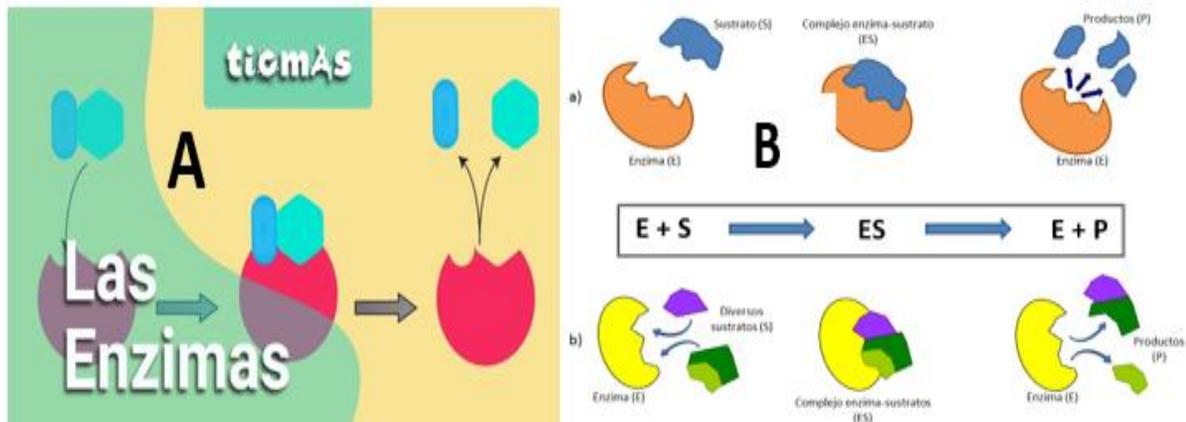


Figura 5. a) Acción de las enzimas, b) formación de activar de las enzimas según de la ecuación de las enzimas.

4.4.- Fermentación láctica

La fermentación láctica pertenece a los procesos más empleados para la conservación de alimentos. Su efectividad se relaciona con la formación de metabolitos, ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono y bacteriocinas, en mezcla con un bajón en la actividad de agua. El impacto de dichos metabolitos se refuerza con la interferencia microbiana, debido a que inhiben el aumento de ciertos microorganismos contaminantes, a medida que otros proliferan en el mismo sustrato. No obstante, con la intención de que esta interferencia sea positiva, la flora a inhibir debería ser superada por la flora adicionada (Caplice, 1999; Paul Ross et al., 2002; Devlieghere et al., 2004; Bourdichon et al., 2012).

Además de mejorar la conservación de los alimentos, la fermentación láctica da otros beneficios como la transformación de las propiedades sensoriales (aroma, sabor y textura), el aumento de la calidad nutricional (ya que se beneficia la digestibilidad de ciertos nutrientes) y efectos específicos en la salud (como es la situación de los microorganismos probióticos, vitaminas y minerales). Por lo anterior, tanto el mejoramiento de la calidad organoléptica como del costo nutricional del alimento se piensan fines en ciertos procesos fermentativos. Adicionalmente, puede considerarse la fermentación como un proceso clásico, enmarcado en la sostenibilidad, naturalidad y de conservación no térmica, que beneficia el crecimiento de la actividad antioxidante gracias al rompimiento de paredes celulares, debido a que se crean metabolitos secundarios y se liberan otros compuestos almacenados en las construcciones internas (Caplice, 1999; Bourdichon et al., 2012; Hugenholtz, 2013).

5.- METODOLOGIA

Los experimentos que se presentan a continuación se realizaron en el Departamento de Ciencia Y Tecnología de Alimentos en el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la UAAAN en colaboración con el laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutrición de la Facultad de Ciencias Químicas de la UA de C.

5.1.- Preparación del medio

Para la preparación del medio de cultivo se pesaron 14 gr de MRS, se mezclaron con 200 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, posteriormente se calentó en una parrilla de calentamiento hasta ebullición para que se disolviera el medio de cultivo. Se esterilizó en autoclave a 121 °C a 1atm por 15 min, transcurrido el tiempo se vaciaron en cajas Petri estériles de plástico, en la campana de flujo, después de que se solidificaron se dejaron en refrigeración hasta su uso (Arredondo Vázquez,2019).

5.2.- Preparación de M.O

Se utilizaron 2 microorganismos pertenecientes a la colección UAAAN-DCTA reconocidos como probióticos. Uno de los microorganismos fue el *Lactobacillus lactis* y el otro un *Enterococcus faecium*. Los cuales estaban conservados en congelación por lo que una vez que se descongelaron de los viales, posteriormente se sembraron 200 µL de cada vial en las cajas petri de Agar MRS y se esparcieron con una "L" de vidrio que se esterilizaba con alcohol cada que se utilizaba. Las cajas se incubaron a 37 °C por 48 h (Arredondo Vázquez,2019).

5.3.- Identificación Microscópica (Arredondo Vazquez,2019).

Para la identificación microscópica de las cepas se llevó acabo la tinción de Gram; durante la tinción las bacterias Gram positivas se tiñen de morado, mientras que las bacterias Gram negativas toman una coloración rosa o roja. Esto es debido principalmente a las diferencias estructurales que presentan en su pared. Las bacterias

Gram negativas pierden el colorante cristal violeta con mayor facilidad que las Gram positivas.

De una placa se tomó una colonia y se extendió en un porta objetos, se secó a temperatura ambiente y flameo para su fijación; para la tinción se adiciono: cristal violeta(1min), lugol (1 min), alcohol (20 seg), y finalmente se empleó la safranina durante 30 segundos. En cada tinción se utilizó agua destilada para enjuagar.

La primera etapa es la preparación de un frotis bacteriano. Un frotis es la extensión de una muestra o cultivo sobre un portaobjetos para separar lo más posible los microorganismos.

5.4.- Conservación de los M.O

Se preparó el caldo de cultivo M.R.S, formulando acetato de sodio 1%, sulfato de magnesio 0.04%. extracto de carne 2% dextrosa 4%, citrato de amonio 0.4%, peptonada de caseína 2%, extracto de levadura 1%, fosfato dipostasico 0.4%, sulfato de manganeso 0.01% y tween 80 0.1 ml, en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se esterilizo a 121°C 1 atm por 15 min. Posteriormente se inculo con cada microorganismo en el medio de cultivo y se incubó a 37°C con cada microorganismo para conservar. Pasadas de 48 a 72 h en incubación se prepararon (1:1 v/v) con una solución de leche descremada al 10 % con glicerol al 10% esterilizada, viales estériles de 1.5 ml y se congelaron hasta su uso.

5.5.- Preparación del inculo

Para la preparación del inculo se utilizaron reactores de 20 mL a los cuales se les agregaron 10 mL de caldo MRS, se esterilizaron y posteriormente se le agrego el microorganismo correspondiente, se incubaron a 37°C por 48 h. después de este tiempo de incubación se realizó un conteo de células de los microorganismos. Se realizó utilizando una cámara de Neubauer, para lo cual se preparó una muestra 10 mL de agua y 500 microlitros de la muestra (microorganismo) y una gota de cristal violeta, para determinar el número de células viables (UFC/mL). Se hizo el conteo de esporas

como se puede observar en la figura 8, para inocular en la fermentación líquida contando los cuadros en la cámara:

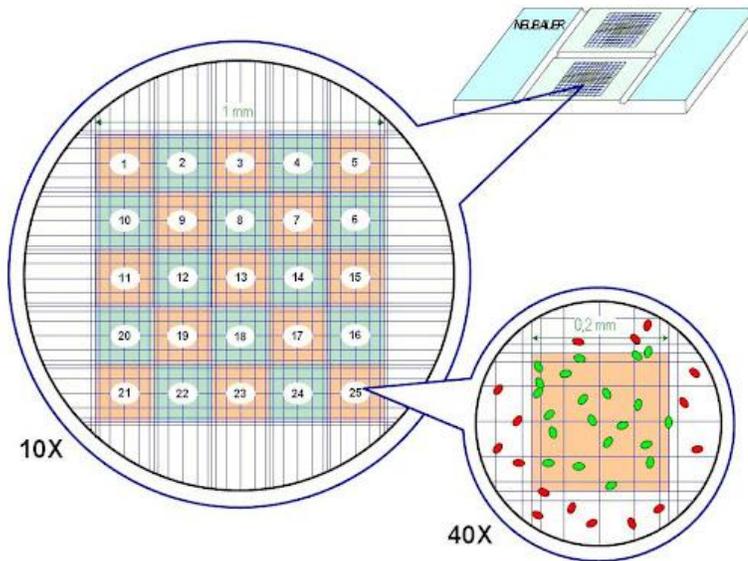


Figura 6. Conteo de células con la cámara de Neubauer.

Para obtener el número de células por ml se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Cel/mL} = (\text{prom}) (1 \times 10^4) (20) (25)$$

Donde:

Prom es el promedio del conteo en la cámara neubauer

(1×10^4) es el volumen de la cámara neubauer

20 es la dilución y

25 es el total de cuadros en la cámara neubauer

5.6.- Fermentación en Medio Líquido

Se realizó una fermentación utilizando reactores de 50 mL a los cuales se les agregó 20 mL de aguamiel, para la fermentación se utilizaron 7 frascos a los cuales una vez que se agregó el aguamiel se esterilizaron en una autoclave en 121°C 1 atm por 15 min. Esto se realizó para cada uno de los microorganismos a los cuales se les agregaron las células correspondientes utilizando la ecuación y se incubaron a una temperatura de 37°C.

5.7.- Cinética de producción de enzimas celulolíticas.

Para la cinética de producción los 7 frascos pequeños se inocularon y se metieron en la incubadora con agitación (150 RPM) a 37°C tomando una muestra por cada 24 h para posteriormente meterlos a congelación hasta el tiempo necesario para medir la actividad enzimática.

5.8.- Determinación de enzimas celulolíticas

Las actividades enzimáticas se representan como sustrato U/L. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford con estándar de albúmina. Todos los ensayos se realizaron en microtubo polipropileno de 1.5 ml de manera triplicada que para cada medio de extracción. La actividad de la enzima amilasa se midió utilizando el método del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller. Se agregaron diez microlitros de extracto del extracto enzimático crudo a 90 µL de almidón al 1% en agua destilada y se incubaron a 50 °C durante 60 min. posteriormente se adicionaron 100 µL de DNS para detener la reacción. La solución se hirvió durante 10 min y luego se colocó en hielo durante 5 min. La cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS con maltosa como estándar, midiendo la absorbancia a 546 nm en un espectrofotómetro (BIOBASE EL-10A); 1 U de amilasa se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 µmol de azúcar reductor en equivalentes de maltosa por minuto. La celulasa se midió utilizando

carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Se agregaron diez microlitros de solución del extracto enzimático crudo en 90 μL de solución de CMC al 0.25 % y se hicieron reaccionar a 50°C durante 60 min, y luego se midieron usando el ensayo de DNS a 546 nm con glucosa como estándar; 1U de CMC así se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 μmol de azúcar reductor en equivalentes de glucosa por minuto en las condiciones de ensayo descritas anteriormente. La actividad de la xilanasa se estimó utilizando una suspensión del 1% (p/v) de Xilano de madera de haya como sustrato. Una mezcla compuesta de 90 μL de xilano al 1%. Y 10 μL de extracto enzimático crudo se hizo reaccionar a 40°C durante 30 min y la cantidad de azúcar reductor se determinó utilizando el método DNS a 546 nm con D-xilosa como estándar. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades, donde 1 U se define como la cantidad de enzima requerida para la producción de 1 μmol de producto/min, y la productividad se presenta como U/L del Extracto enzimático crudo.

5.9.- Determinación de proteínas, azúcares totales.

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford lo cual se preparó 10 ml de azul de coomassie en 90 ml de H₂O destilada para el método de Bradford se tomaron 100 μL del extracto enzimático esto fue por triplicado en una placa, se le agregó 100 μL de azul de coomassie diluido y se dejó 5 min a temperatura ambiente, y se observó a 546 nm en un espectrofotómetro.

Para la preparación de azúcares totales se preparó 50 ml de fenol al 5%, por lo tanto, a los tubos se le añadieron 250 μL de muestra más 250 μL de fenol al 5% de manera triplicada y se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico. Luego ponerlo a baño maría a temperatura ambiente por 5 min. se dejaron enfriar en 5 min a temperatura ambiente estos se le agregó 250 μL en una placa para medir la absorbancia a 470 nm en el espectrofotómetro.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Evaluación del microorganismo

Se evaluaron diferentes cepas de la colección de la UAAAN-DCTA marcadas como microorganismos probióticos, de las muestras que se tomaron se obtuvieron 10 que presentaron crecimiento en medio de cultivo M.R.S. De las cepas cultivadas 3 (figura 9) presentaron las características buscadas. A estas cepas se les realizó una tinción de Gram y estas fueron las que resultaron ser Gram positivas al momento de observarlas al microscopio. Posteriormente se hizo una siembra por medio de la técnica de expansión con una varilla de vidrio, y extenderla a partir del punto céntrico.



Figura 7. Aislamiento de bacterias en medio de cultivo M.R.S

De las 10 cepas evaluadas se obtuvieron 3 microorganismos con estas características macroscópicas y fueron seleccionadas como las probióticas para lo cual fue necesario realizar una identificación microscópica.

6.2.- Identificación microscópica

La identificación microscópica se realizó en muestras con tinción de gram y como se puede observar en la figura 10, la muestra que se puede ver en el inciso a) presentan cadenas largas y sus esporas son de manera elipsoidal y son claramente con forma de bacilos. En el inciso b) los microorganismos que se observan se caracterizan por presentar una forma esférica, ovaladas claramente con forma como cocos estas cepas resultaron ser positivas por la coloración azul que tomaron en la tinción de Gram.

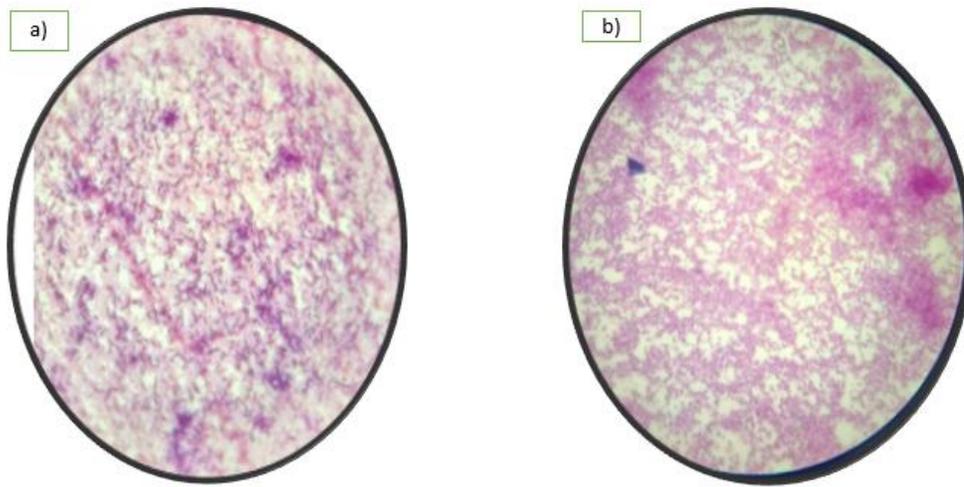


Figura 8. Caracterización de bacterias A) bacilos b) cocos

Tomando como referencia las laminillas observadas al microscopio podemos identificar 2 microorganismos uno con las características de *Enterococcus faecium* y otro presentando la forma como *Lactobacillus lactis*

6.3.- Preparación del inóculo

Para la realización de la fermentación una de las partes importantes es el tener un microorganismo puro para poder evitar la contaminación en la cinética. Además de la importancia de iniciar con la misma cantidad de inóculo para no dar ventaja al hacer la comparación de microorganismos.

Al observar en la cámara de Neubauer (figura 11) se distinguió unos puntos de color azul en lo cual se hizo un conteo de células que se obtuvieron 76 células.

$$\text{Cel} = (54.3) (1 \times 10^4) (20) (25) = 270 \times 10^6$$

$$270 \times 10^6 \text{-----} 1 \text{ MI}$$

$$270 \times 10^6 \text{-----} X = 7 \text{ MI}$$

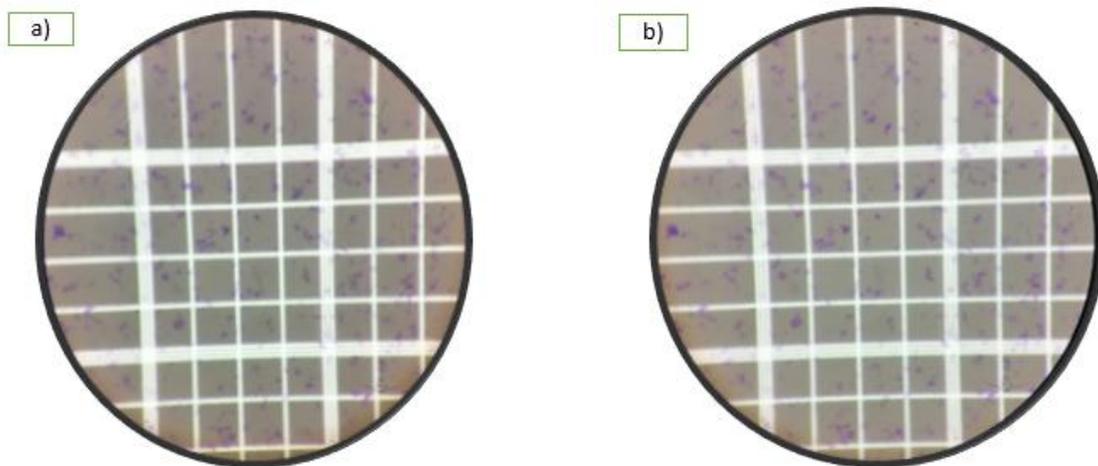


Figura 9. Caracterización microscópica de la cámara Neubauer.

a) Conteo de células de bacilos b) conteo de células de coccos.

En la figura 9 se puede ver las características de los microorganismos y al utilizar el colorante se pueden identificar los con las formas de los bacilos y coccos de una forma viable.

6.4.- Cinética de producción enzimática

Se seleccionaron dos microorganismos probióticos para iniciar la evaluación cinética utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido. En este estudio se evaluó la producción enzimática durante 144 h y 192 h de fermentación para determinar actividad enzimática de Xilanasas, Celulasa y Amilasa con la finalidad de ver el comportamiento de actividad enzimática de los dos microorganismos probióticos en cuál de ellos crece más rápido en el medio líquido. Esto ayuda en la determinación del comportamiento de los microorganismos durante este tiempo y se puedan plantear investigaciones posteriores en tiempos indicados.

6.5.- Determinación de la actividad amilasa

En la figura 10 se presentan los resultados utilizando el microorganismo probiótico *Enterococcus faecium* para la producción enzimática de amilasa utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido en diferentes horas. Se observa que la actividad comienza a partir de las 24 horas con (425 U/L) lo cual se mantiene constante a las 144 horas con (302 U/L) que el pico más alto es de (768 U/L) que fue alcanzada a las 168 horas.

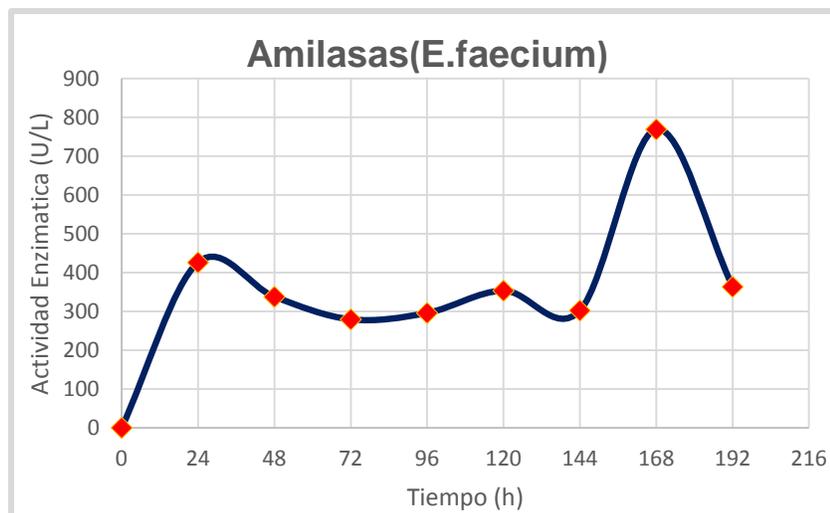


Figura 10. Cinética de actividad amilasa utilizando microorganismos probióticos y como sustrato aguamiel en medio líquido.

Se observa que en la figura 11 de la actividad enzimática inicia a las 24 horas con una actividad de (586 U/L). Posteriormente se mantuvo a las 48 horas con (642 U/L). Por lo tanto, que conforme pasan las horas se ve que el comportamiento disminuye, después aumenta su comportamiento a las 144 horas con una actividad de (679 U/L).

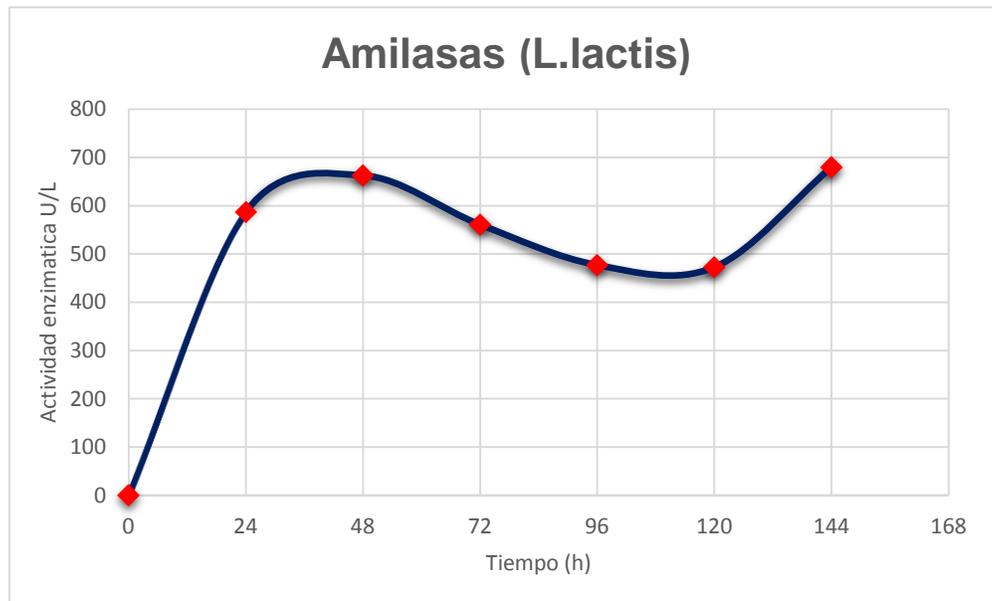


Figura 11. Cinética de actividad amilasa utilizando microorganismos probióticos y como sustrato aguamiel en medio líquido.

El comportamiento de la producción enzimática utilizando el microorganismo probiótico *Enterococcus faecium* es muy diferente al que presenta el microorganismo probiótico *Lactobacillus lactis*. Como se puede ver la diferencia entre la enzima amilasa con el microorganismo *Enterococcus* parte de las 24 horas con un valor de (425 U/L), pero se mantiene constante hasta las 144 horas de tal manera que la mayor producción de actividad fue de (768 U/L) alcanzada a las 168 horas mientras que en el microorganismo probiótico *E. faecium* inicia igual a las 24 horas con un valor de (586 U/L) y teniendo un valor máximo de (679 U/L). Esto puede deberse a que el microorganismo *E. faecium* se adapta más como sustrato para que produzca mayor actividad enzimática.

6.6.- Determinación de la actividad xilanasa

De la figura 12 se presentan los resultados utilizando el microorganismo probiótico *Enterococcus* para la producción enzimática de xilanasa utilizando aguamiel como sustrato. Se observa claramente que la actividad xilanasa con el microorganismo *L. lactis* se inicia a partir de las 24 horas con una actividad de (3925 U/L) por lo que a las 72 horas hay menor producción de actividad. Por lo tanto, la mayor actividad fue de las 48 horas con una mayor actividad de (4408 U/L).

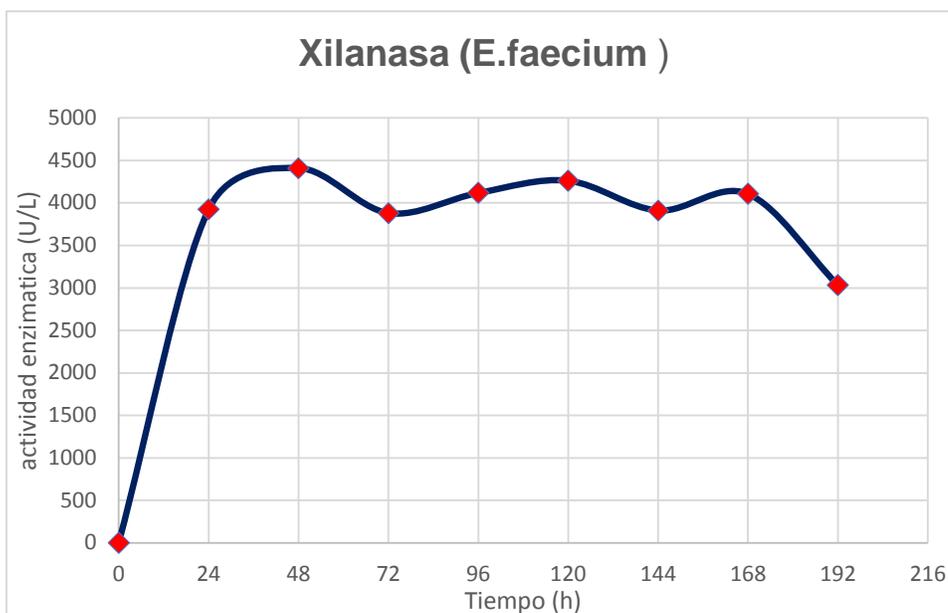


Figura 12. Cinética de actividad xilanasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato.

Del mismo modo en la figura 13 se presenta los resultados utilizando el microorganismo *Lactobacillus lactis* como se puede observar que su actividad xilanasa comienza a las 24 horas con una alta actividad de 4286 U/L de tal manera que a las 72 horas con (4054 U/L) obtuvo una disminución constante hasta las 144 horas con (4601) que la mayor actividad enzimática fue a las 48 horas con una actividad de (4728 U/L).

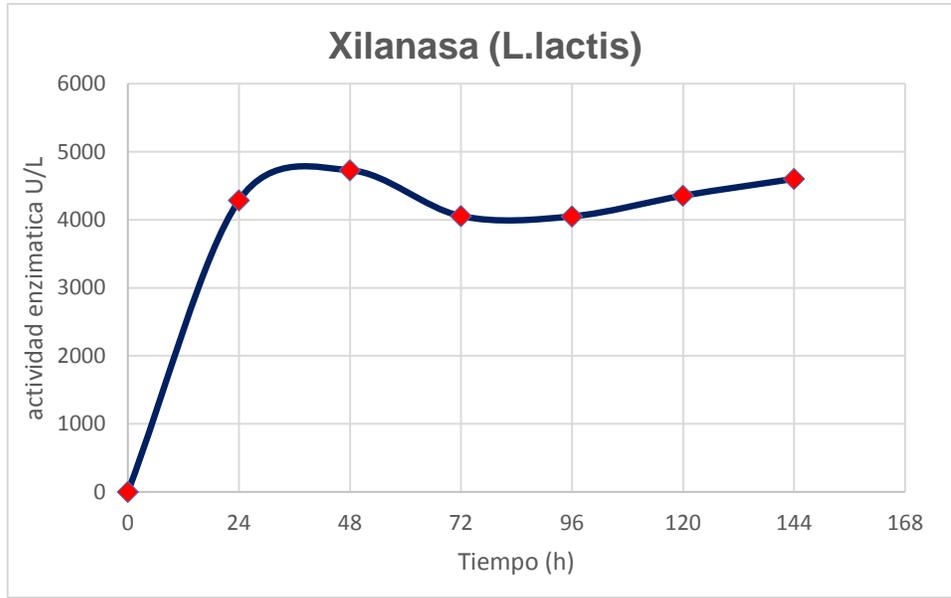


Figura 13. Cinética de actividad xilanasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato.

El comportamiento de la actividad xilanasa entre el microorganismo probiótico *E. faecium* es diferente que el microorganismo *L. lactis*, aunque los dos microorganismos se producen a las 24 horas, pero existe una diferencia entre el microorganismo *E. faecium* que tiene un valor mayor de (4408 U/L) que el microorganismo *L. lactis* tiene un alto valor de actividad fue de (4728 U/L) a las 48 horas de microorganismo *L. lactis* esto se debe que el microorganismo se adaptó más en el sustrato.

6.7.- Determinación de la actividad celulasa

En la figura 14 se presenta los resultados utilizando el microorganismo *Enterococcus faecium*. Se puede observar el comportamiento de la celulasa que a las 24 horas tuvo una mayor actividad de 1318 U/L puesto que a las 48 horas con (1113 U/L) hubo una baja actividad constante hasta las 192 horas con una menor actividad de (1198 U/L).

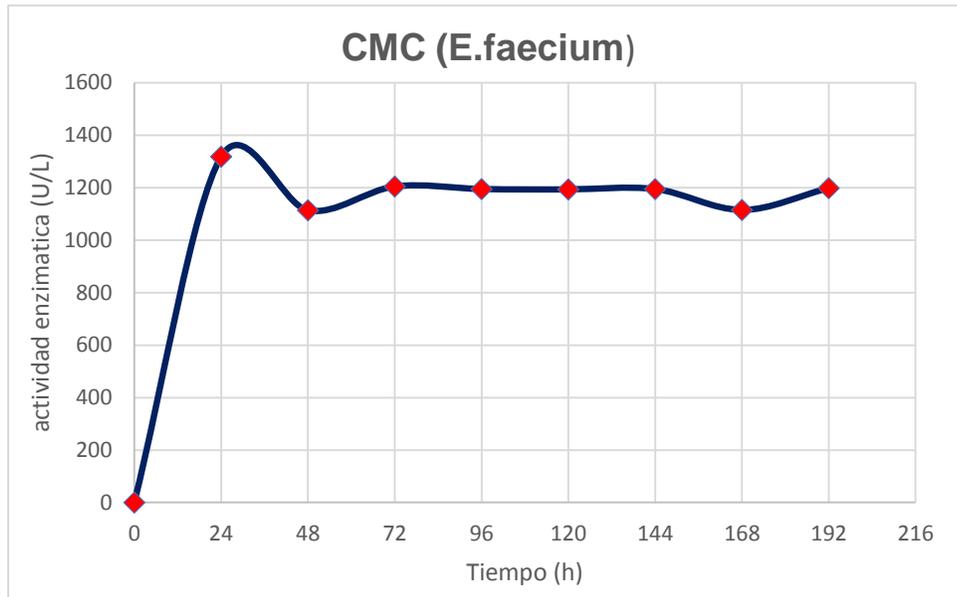


Figura 14. Cinética de actividad celulasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato

En la figura 15 se presenta los resultados utilizando el microorganismo *Lactobacillus lactis*. Se observa a las 24 horas con una actividad de 1077 U/L en el cual tuvo una disminución a las 48 horas y se puede ver como a las 72 horas hubo una constante de actividad hasta llegar a las 144 horas con una mayor actividad de 1460 U/L.

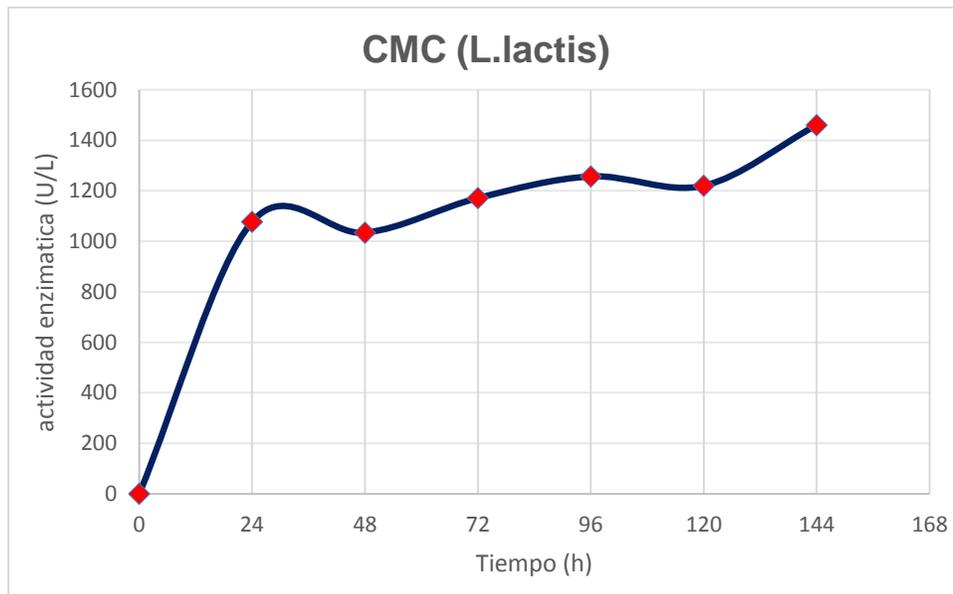


Figura 15. *Cinética de actividad celulasa utilizando microorganismos probióticos y aguamiel como sustrato*

Haciendo una comparación de la producción de enzima celulasa de los dos microorganismos probióticos se puede deducir que ambos microorganismos tienden a producir a las 24 horas, pero a diferencia de actividad enzimática de cada microorganismo probiótico. Otra diferencia que presenta el microorganismo *E. faecium* es que a las 144 horas tiene un valor mayor de 1194 U/L, aunque el aumento en las horas de fermentación es lento en su producción.

De las tres enzimas evaluadas la mayor presencia de producción fue de la enzima celulasa de los microorganismos *Lactobacillus lactis* con un valor de 1460 mg/mL y *Enterococcus faecium* de un valor de 1198 mg/mL esto puede deberse a la cantidad de glucosa que contiene la celulasa y hace que el sustrato se adapte más.

6.8.- Determinación de proteínas

En la figura 16 se presenta el microorganismo probiótico *Lactobacillus lactis* se observa a partir de las 24 horas con un valor de 9.5 mg/mL pero se identifica como a las 168 horas con un valor mayor de producción de 11 mg/mL de este mismo comportamiento se observa también del microorganismo *Enterococcus faecium* que igual se da una producción a las 24 horas con un valor de 6 mg/mL y se puede ver como este microorganismo que a las 96 horas tiende un valor mayor de 9 mg/mL mientras a las 168 horas tiene una menor producción de 6 mg/mL.

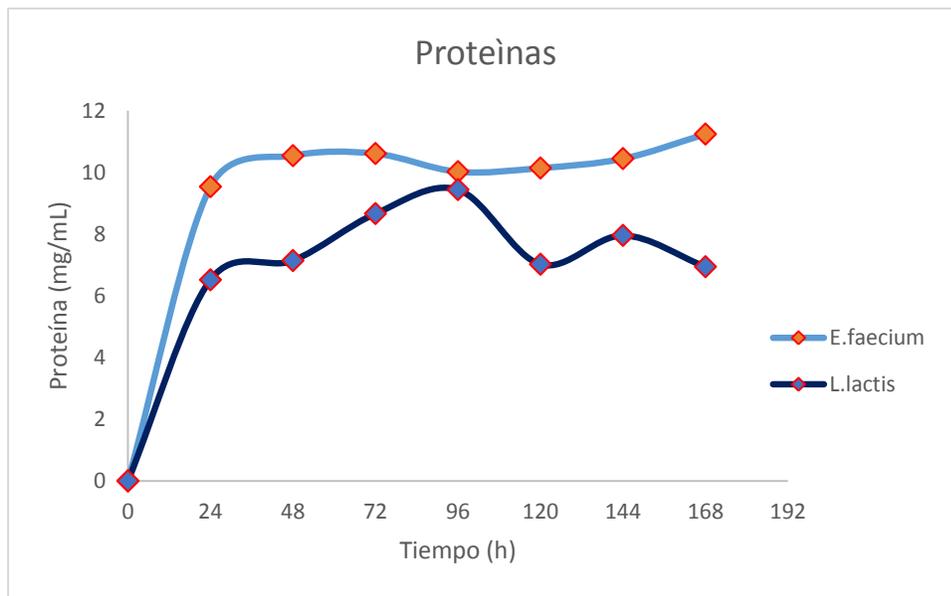


Figura 16. Determinación de proteínas con microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido.

Haciendo comparación de los dos microorganismos de como el microorganismo probiótico *Enterococcus faecium* produjo más proteína que la de *Lactobacillus lactis* en el cual las dos bacterias inician a las 24 horas, pero en el caso de *Lactobacillus lactis* presenta un valor 6.5 mg/mL de proteína y *E. faecium* con un valor de 9.5 mg/mL con

una elevación de proteínas a las 168 horas con una actividad de 11 mg/mL que en el microorganismo *E. faecium* tiene una baja actividad de 6 mg/mL.

6.9.- Determinación de azúcares totales

En la figura 17 se presenta el consumo de azúcares totales por las bacterias. Se puede observar que las tendencias de consumo se aprecian de una manera a las 24 horas en los microorganismos probiótico *Lactobacillus lactis* tanto como en el microorganismo probiótico *Enterococcus faecium*. El mayor consumo de azúcares totales corresponde a la bacteria *Lactobacillus lactis* con un consumo de 4.6584 g/L de azúcares totales a las 24 horas. Seguido por la bacteria *E. faecium* que muestra una degradación de 4.25g/L de azúcares totales de tal hora que la bacteria anterior. También el consumo de sustrato por las bacterias se puede observar que la más alta degradación de azúcares se presenta hasta las 168 horas mostrando un valor de azúcares totales de 3.5 g/L para el microorganismo probiótico *Enterococcus faecium* y para la muestra de *Lactobacillus lactis* se encuentra un menor consumo a las 168 horas con un valor de 3.6 g/L teniendo una diferencia de 0.1g/L.

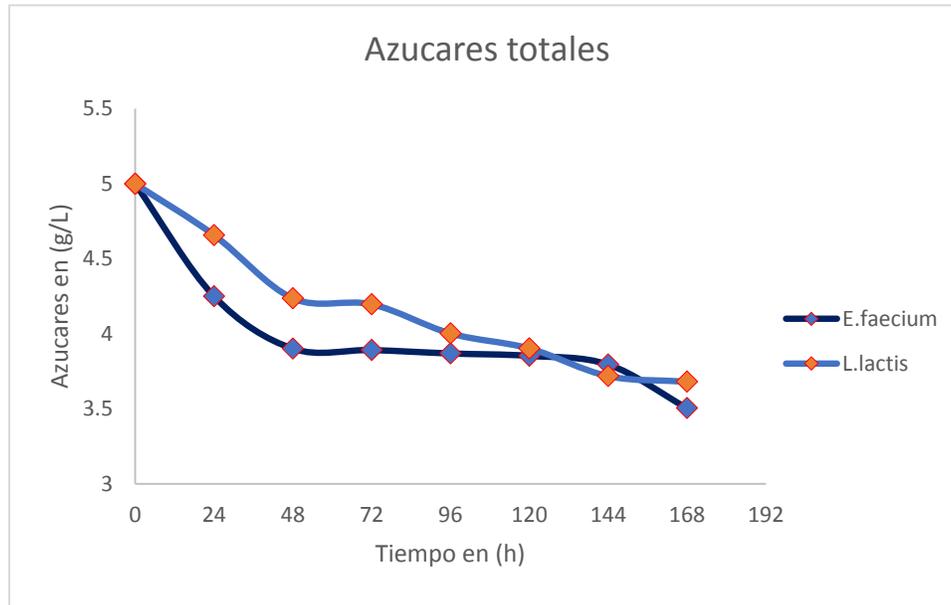


Figura 17. Determinación del consumo de sustrato por microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en medio líquido.

Haciendo una comparación de las dos bacterias, podemos deducir que donde se presenta un consumo de azúcares totales en la bacteria *Lactobacillus lactis* con un valor de 4.6 g/L a las 24 horas, disminuyendo hasta obtener un valor mínimo de 3.5 g/L a las 168 horas.

Haciendo una comparación de las dos bacterias, podemos decir que donde se presenta un consumo de azúcares totales es en la bacteria *Enterococcus faecium* con un valor de 4.25 g/L a las 24 horas, disminuyendo hasta obtener un valor mínimo de consumo de 3.6 g/L a las 168 horas.

7.- CONCLUSIÓN

Las cepas de *Lactobacillus lactis* y *Enterococcus faecium* se activaron en medio MRS se identificaron las colonias con características de color blanco y con un crecimiento abundante.

Se identificaron y se caracterizaron las cepas microscópica y macroscópicamente sin ninguna contaminación.

Se produjo el inóculo de cada cepa en un medio de cultivo selectivo.

Se evaluó cinéticamente la fermentación de los microorganismos probióticos utilizando aguamiel como sustrato en cultivo líquido.

Se obtuvieron los resultados para la determinación de la producción de las enzimas celulasa, amilasa y xilanasas, mediante ensayos enzimáticos en la cinética.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Akimowicz, M., Srednicka, P., Juszcuk-kubiak, E., Micha, W., & Roszko, M. Ł. (2021). *Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review*. 153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112306>
- Arévalo Rodríguez A.L., 2011. Evaluación de la actividad celulolítica de microorganismos aislados a partir de fuentes de biomasa lignocelulósica. Tesis Ingeniería Biotecnológica. Cúcuta, Colombia: Universidad Francisco de Paula Santander; Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente.
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A., & Binetti, A. G. (2020). *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties? *Journal Of Food Microbiology*, 90(February), 103465. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103465>
- Antonio, P., & López, G. (2019). *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada , Baja California Maestría en Ciencias en Nanociencias Nanobiorreactores con actividad enzimática como terapia para.*
- Antonio, P., & López, G. (2019). *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada , Baja California Maestría en Ciencias en Nanociencias Nanobiorreactores con actividad enzimática como terapia para.*
- Caplice, E. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131–149.
- Cunningham, M., Vinderola, G., Charalampopoulos, D., Lebeer, S., Ellen, M., & Grimaldi, R. (2021). Trends in Food Science & Technology Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats – is the clinical evidence transferable? *Trends in Food Science & Technology*, 112, 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.009>
- Das, D. J., Sc, M., Sc, A. S. M., Ph, D., Sc, J. B. J. M., Ph, D., Sc, S. T. M., & Ph, D. (2019). Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition*, 69, 110567. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110567>

- Del Coco, V. F. (2015). Microorganisms conferring beneficial health effects. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.001>
- Dowarah, R., Verma, A. K., & Agarwal, N. (2017). The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs : A review. *Animal Nutrition*, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.002>
- Espinel, E., & López, E. (2009). Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium commune* produced by solid state fermentation. (*Prueba*) *Revista Colombiana de Química (Prueba)*, 38(2), 191–208.
- Guerrero, P. (2016). *Evaluación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán , Jalisco ”* (Issue February 2013). https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/13462/TD_pedrojavierguerrero.pdf?sequence=2
- Guzmán-pedraza, R., & Contreras-esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1–22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Medina, D. P. (2010). *Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano*. 23, 81–88.
- Mohammad, S., & Hashemi, B. (2016). Probiotic Lactobacillus Strains from Traditional Iranian Cheeses. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00014-9>
- Muñiz Márquez, D. B., Rodríguez Jasso, R. M., Rodríguez Herrera, R., Contreras Esquivel, J. C., & Aguilar González, C. N. (2013). Artisanal Production of Aguamiel: A Traditional Mexican Beverage Artisanal Production of Aguamiel: A Traditional Mexican Beverage. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*

Producción, 5(10), 12–19. [http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.10/5 produccion.pdf](http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.10/5%20produccion.pdf)

Rasc, L., Cruz, M., Rodr, R. M., Neira-vielma, A. A., Ram, S. N., & Belmares, R. (1923). *foods Agave salmiana*. 1–12.

Valeria, M., Bonavia, G., Matteis, L. De, Ivanchenko, P., Martra, G., Gornati, R., De, J. M., & Bernardini, G. (2019). Journal of Colloid and Interface Science Enzyme activation by alternating magnetic field: Importance of the bioconjugation methodology. *Journal of Colloid And Interface Science*, 537, 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.058>