

183  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estrategias Para la Obtención de una Cepa  
Hiperproductora de Exopolisacáridos en Bacterias  
Lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp.  
*thermophilus***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**JESUS VILLEGAS CRUZ**

MEXICO, D. F.

1995

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**

Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Villegas Cruz Jesús

con número de cuenta 8630092-6 con el Título:

" Estrategias Para la Obtención de una Cepa Hiperproductora de Exopolisacáridos en Bacterias Lácticas de Streptococcus galivarius subsp. thermophilus "

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dra. Director de Tesis	Amelia Farrés González-Saravia		<i>Amelia Farrés González-Saravia</i>
Dr.	René Cárdenas Vázquez		<i>René Cárdenas Vázquez</i>
Biól.	Carlos A. Castillo Pompeyo		<i>Carlos A. Castillo Pompeyo</i>
Biól.	José A. Escalante Lozada		<i>José A. Escalante Lozada</i>
Suplente M. en C. Suplente	Ma. del Carmen Wachter Rodarte		<i>Ma. del Carmen Wachter Rodarte</i>

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Amelia Farrés González-Saravia, en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

Los Sinodales designados para evaluar el presente trabajo fueron los siguientes:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
Dr. René Cárdenas Vázquez  
Biól. Carlos Alberto Castillo Pompeyo  
Biól. José Adelfo Escalante Lozada  
M. en C. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

Durante el desarrollo de este trabajo se tuvo el apoyo de media beca para Tesis de Licenciatura, de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (D.G.A.P.A.).

## *AGRADECIMIENTOS*

A Dios

A mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento, así como por la paciencia y confianza que han tenido para conmigo.

A mis hermanos Gloria, Mario, Martín, Paty, Víctor, Reyna, Marina, Estela.

A Tere, por estar conmigo apoyándome y alentándome, ¡gracias Tere!

A Amelia Farrés agradezco de manera muy especial, la oportunidad, confianza, y apoyo, así como su amistad y orientación en la culminación de esta importante etapa de mi vida.

A los Sinodales, por sus críticas e interesantes comentarios que le dieron la forma final a este trabajo.

A Adelfo y Carmen Wachter, por su ayuda y comentarios en la realización de este trabajo, gracias.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio: Alicia, Ma. Luisa, Laura, René, Rodolfo e Ismael.

A Lety García, por toda su ayuda.

A Samuel, por su gran trabajo fotográfico

A mi querida Facultad de Ciencias, por haberme brindado la formación, gracias.

	pág.
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCION</b>	
1.1 Generalidades	1
1.2 Clasificación de las Leches Fermentadas	4
1.3 Beneficios Nutricionales de las Leches Fermentadas	5
1.4 Yoghurt, Definición y Características Generales	5
1.5 Actividades Metabólicas de Importancia en la Elaboración del Yoghurt	6
1.6 Consistencia y Textura del Yoghurt	7
1.7 Taxonomía de <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	8
1.8 Polisacáridos Exocelulares en Bacterias Acido-Lácticas	9
1.9 Composición de los Exopolisacáridos	10
1.10 Funciones de los Exopolisacáridos Bacterianos	11
1.11 Efecto Estresante de los Agentes Antibióticos y Mutágenos en Bacterias	12
1.12 Utilización de Colorantes en la Identificación de Organismos Productores de Exopolisacáridos	14
<b>CAPITULO 2. JUSTIFICACION</b>	16
<b>CAPITULO 3. OBJETIVOS</b>	18
<b>CAPITULO 4 MATERIALES Y METODOS</b>	
1. Microorganismos Empleados	19
2. Medios y Condiciones de Cultivo	20
3. Determinación de Crecimiento	21
4. Extracción y Cuantificación del Exopolisacárido	21
5. Tratamiento de Bacterias con Agentes Químicos	22
6. Selección y Aislamiento de Colonias Bacterianas	22
7. Evaluación de la Producción de Exopolisacáridos en Cepas Aisladas	23
<b>CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
1. Inestabilidad del Fenotipo Filante	24
2. Relación Entre la Producción de Exopolisacáridos y el Tamaño de la Población	25
3. Producción Específica de Exopolisacáridos	27
4. Absorción del Colorante Rojo Neutro Como un Método Para la Selección de Cepas de Interés en la Producción de Exopolisacáridos	28
5. Efecto de los Agentes Antibióticos y Mutágenos en la Población Bacteriana	30
6. Efecto de los Agentes Antibióticos y Mutágenos en la Producción de Exopolisacáridos	31
7. Aislamiento de Cepas Hiperproductoras de Exopolisacáridos	34

*INDICE*

<b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>45</b>

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### 1.1. Generalidades.

Los alimentos producidos por acción de microorganismos han existido desde tiempos muy antiguos. Se piensa que éstos aparecieron al mismo tiempo que cuando el hombre se enfrentó por primera vez a los problemas de descomposición y transmisión de enfermedades por alimentos. Entre estos alimentos se pueden mencionar el pan, la cerveza, el vino y algunos alimentos lácteos fermentados, que tuvieron sus orígenes en la antigüedad, en diferentes lugares y que ahora se consumen prácticamente en todo el mundo (Wacher, 1990).

Las leches fermentadas son productos preparados a partir de leche entera, parcial o completamente descremada, leche concentrada o leche sustituida parcial o completamente, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos (Oberman, 1985).

La fermentación de la leche permite mantener este alimento en buen estado durante varios días sin que pierda su calidad nutritiva, e inclusive la mejora desarrollando nuevas características de sabor, aroma, apariencia o textura. En algunos países se prefieren las leches fermentadas con respecto a la leche fresca en vista de que se consideran más seguras desde el punto de vista microbiológico, ya que en ellas es difícil que se presente el crecimiento de microorganismos patógenos y, cuando ésto ocurre, es generalmente originado por problemas en el transporte, pasteurización y refrigeración de los alimentos (Kroger *et al.*, 1989).

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos seguramente se originó durante el almacenamiento del alimento líquido. Los métodos tradicionales aplicados en la producción de leches fermentadas dependen de las condiciones climáticas y de las circunstancias regionales. Existe una gran cantidad de leches fermentadas que varían de acuerdo a los microorganismos empleados, a los tipos de leches y al procedimiento de elaboración (Green, 1982). Los nombres populares de las leches fermentadas tradicionales originales se muestran en la tabla 1. En el proceso de fermentación de las leches intervienen un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que conservan la leche y que le imparten sus características sensoriales distintivas.

Actualmente existen nuevos tipos de leches fermentadas, preparadas con la adición de frutas o saborizantes, enriquecidas con vitaminas o conteniendo bacterias intestinales seleccionadas tales como *Lactobacillus acidophilus* y varias especies de *Bifidobacterium* (Kurmann, 1984; Puhan, 1988).



Tabla 1. Leches Fermentadas.

Nombre tradicional	País o región de origen	Tipo de leche, condiciones	Microbiota
Prokish	Asia, Africa, Europa	Fermentación en bolsas de tela	Mezcla de bacterias lácticas, desconocida
Prostokvasha	Medio Oriente, Balcanes	Fermentación en recipientes de arcilla	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , ocasionalmente con <i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Yoghurt (yaghurt)	Medio Oriente, Balcanes	Leche de vaca, oveja, cabra o mezcla de leches	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Micrococcus</i> y bacilos formadores de esporas
Leche búlgara	Bulgaria	Leche de vaca, oveja cabra o mezcla de leches	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Kefir	Cáucaso	Leche de vaca, oveja, cabra o mezcla de leche en bolsas de cuero o en barriles de madera	<i>Lactococcus lactis</i> y especies de <i>Leuconostoc</i> , <i>L. kefir</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Torula kefir</i> , <i>Micrococcus</i> y bacilos formadores de esporas
Koumiss	Estepas asiáticas	Leche de yegua, camella o burra en bolsas de cuero	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Torula koumiss</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Micrococcus</i> y bacilos formadores de esporas
Brano	Bulgaria	Leche de oveja, vaca	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , levaduras
Hooslanka	Este de los Cárpatos	Leche de oveja, vaca o mezcla de leches en recipientes de madera ("berbenitza")	<i>L. lactis</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , levaduras
Zhentitsa	Este de los Cárpatos	Leche de oveja fermentada con pasturas	Mezcla de bacterias lácticas y levaduras
Riazhenka	Ucrania, Rusia	Leche de vaca en cualquier tipo de recipiente	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> y algunas veces <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Varenets	Rusia	Leche de vaca en cualquier tipo de recipiente	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> y algunas veces <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Tabla 1. Leches Fermentadas (Continuación)

Nombre tradicional	País o región de origen	Tipo de leche, condiciones	Microbiota
Villia (Filia)	Finlandia	Leche de vaca	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Geotricum candidum</i>
Tact-mjök	Pen. Escandinava	Leche de vaca	Mezcla de microbiota láctica mesófila
Kjaddermilk	Pen. Escandinava	Leche de vaca	Mezcla de microbiota láctica mesófila
Skir	Islandia	Leche de vaca con la adición de renina, sin suero	<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>
Sos-tej	Hungría	Leche de oveja con la adición de renina con poco suero	Mezcla no definida de microbiota láctica
Syuzma	Azerbaijan	Leche de vaca	"Búlgaros"
Tan (than)	Armenia	Leche de oveja, cabra o mezcla de leches, fermentación en bolsas de tela	"Búlgaros"
Tulum, kurut	torba, Turquía y Asia	Leche de oveja, cabra o vaca, fermentación en bolsas de tela	Mezclas de microbiota similar a la del yoghurt, específica para cada región
Gruzovina	ex Yugoslavia	Leche de oveja, vaca o mezcla de leches, fermentación en bolsas de tela.	Mezcla de microbiota similar a la del yoghurt, específica para cada región
Airan	Cáucaso, Bulgaria	Leche de oveja, vaca o mezcla de leches	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> y algunas veces <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Matzun, matzoni	Cáucaso, Armenia	Leche de oveja, cabra, búfalo o mezclas de leches	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
Dahi (dadhi)	India, Irán	Leche de vaca, búfalo o mezcla de leches	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , levaduras
Gioduu	Italia, Córcega	Leche de oveja, vaca	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Tomado de Oberman, 1985 y modificada la nomenclatura microbiana de acuerdo a García-Garibay, 1993.

## INTRODUCCION

El yoghurt y otros alimentos lácteos fermentados han sido muy populares por mucho tiempo en países del Mediterráneo (los Balcanes, Norte de Africa), en el centro y suroeste de Asia (Mongolia, Turquía, Irak, Irán, Siria) y en Europa Central. En muchos de estos países, el yoghurt es elaborado usando procedimientos tradicionales.

Desde la última guerra mundial el consumo de yoghurt se ha incrementado no únicamente en países Europeos, sino también en Estados Unidos, donde resalta su producción a escala industrial (Zourari *et al.*, 1992).

En México se elaboran industrialmente el yoghurt que es con mucho la leche fermentada más importante, el yakult, el jocoque (equivalente al buttermilk elaborado en Estados Unidos), y en menor producción el labne o jocoque árabe. Existe también en muchos hogares la costumbre de elaborar leches fermentadas a nivel casero, principalmente yoghurt, labne y sobre todo un producto denominado "búlgaros", que en esencia equivale al kefir.

### 1.2. Clasificación de las Leches Fermentadas.

Resulta difícil elaborar una clasificación de los principales tipos de leches fermentadas debido a que sus características pueden variar de un fabricante a otro o bien debido al tipo de microorganismos iniciadores, de acuerdo a la región o del procedimiento de inoculación y aún de las condiciones climáticas. Sin embargo existe una clasificación propuesta por Marshall (1986), en la cual se toma como criterio el tipo de microbiota dominante en diversos productos como puede apreciarse en la tabla 2. Esta clasificación es referida en revisiones recientes (García-Garibay, 1993).

Tabla 2. Clasificación de las Leches Fermentadas.

Grupo	Microbiota	Características	Productos
I	<i>Lactococcus</i> y <i>Leuconostoc</i> (mesófilos)	Acidez baja o moderada	Jocoque, Buttermilk, Leches escandinavas
II	<i>Lactobacillus</i>	Acidez moderada o alta	Leche búlgara, Leche acidófila, Yakult
III	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> (termófilos)	Acidez moderada o alta	Yoghurt, Dahi, Labneh, Bioghurt, Prostokvasha, Brano, Gioddu
IV	Bacterias lácticas y levaduras	Acidez y alcohol	Kefir, Koumiss, "Búlgaros"

Tomado de Marshall, 1986 y García-Garibay, 1993.

### 1.3 Beneficios Nutricionales de las Leches Fermentadas.

Los efectos benéficos de las leches fermentadas en la nutrición humana se deben no solamente al alto valor nutricional asociado a la gran cantidad de compuestos propios de la leche, sino que también dependen del contenido de una gran cantidad de productos metabólicos. El ácido láctico, principal producto metabólico ha mostrado propiedades bacteriostáticas y en algunos casos efectos microbicidas contra microorganismos contaminantes, particularmente contra algunos bacilos formadores de esporas y coliformes. En general, los efectos antimicrobianos de las leches fermentadas pueden ser atribuidos a ácidos orgánicos, probióticos o bacteriocidas, compuestos volátiles, peróxido de hidrógeno y algunas otras sustancias aún no identificadas presentes en estos alimentos (Pereira Martins, 1988; Oberman, 1985; Garcia-Garibay, 1993).

Por otra parte se ha observado que el consumo de leches fermentadas favorece la secreción de jugos gástricos e intestinales. Existe también una muy buena aceptación de estos alimentos en personas lactasa-deficientes. De esta forma el yoghurt ha sido propuesto para el tratamiento de acidez subnormal, hiperacidez y enfermedades ulcéricas (Oberman, 1985).

Se han reportado también efectos benéficos contra niveles altos de colesterol, infecciones de la cavidad bucal, alteraciones en el aparato circulatorio, daños a la piel, y en favor de reacciones inmunológicas no específicas, entre otros (Marteau, 1993). Pero debido a que los agentes responsables de estos efectos no han podido ser determinados, en la mayoría de los casos se cuestiona sus beneficios desde el punto de vista médico.

### 1.4 Yoghurt, Definición y Características Generales.

En Francia, el término *yoghurt* puede ser usado legalmente para designar el producto resultante de la fermentación de la leche llevado a cabo exclusivamente con la participación de dos bacterias ácido lácticas, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, las cuales deben presentar una población viable en el producto final aproximado a 10 millones de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de yoghurt. Es notable que estas dos condiciones son rara vez especificadas por la legislación existente en muchos otros países productores de yoghurt (Zourari, 1992).

Se considera que la fermentación debe realizarse con estos microorganismos iniciadores empleando inóculos del 0.5 al 1.0%, con una proporción de 1 a 1 en el número de bacterias entre ambas especies (Kroger, 1989). De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico. Existen varios tipos de yoghurt, entre los que se encuentran el tipo firme, batido o agitado y líquido, algunos otros como el congelado, deshidratado, entre otros, cada uno de ellos en forma natural o adicionado con sabores o con fruta.

En México el consumo de yoghurt en 1980 fué de 15 mil toneladas, lo cual representó el 8% de los productos lácteos consumidos en nuestro país en ese año. En 1985 el consumo de este producto fué de 32 mil toneladas (más del doble en cinco años), representando el 13% de los lácteos producidos, alcanzando entre 1985 y 1990 una producción de 49 mil toneladas (García-Garibay, 1993; Wacher *et al.*, 1993).

### 1.5 Actividades Metabólicas de Importancia en la Elaboración del Yoghurt.

El papel de los streptococos y lactobacilos en la elaboración del yoghurt puede ser sintetizado como sigue: acidificación de la leche, síntesis de compuestos aromáticos, desarrollo de textura y viscosidad. Este último aspecto es requerido principalmente para yoghurts agitados y líquidos. De este modo, la elaboración industrial del yoghurt toma en consideración estas tres propiedades para la selección de las cepas iniciadoras (Zourari, 1992).

El principal papel de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* en la elaboración del yoghurt es la acidificación de la leche por la producción de una gran cantidad de ácido láctico a partir de lactosa. El ácido láctico reduce el pH de la leche y conduce a una solubilización progresiva del fosfato de calcio micelar. Esto causa la demineralización de las micelas de caseína y su desestabilización, lo cual genera la completa precipitación de la caseína en un rango de pH de 4.6-4.7 (Fox, 1989). Además, el ácido láctico provee al yoghurt con su característico sabor ácido (Zourari, 1992).

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* es una bacteria esférica que se observa en pares o cadenas y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* es un bacilo largo, ambas son bacterias gram positivas, termófilas que presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 45 y 55 °C (Buchanan, 1974; Sneath *et al.*, 1986).

Ambas bacterias son homofermentativas y transforman la lactosa de la leche a ácido láctico, responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característicos del yoghurt. La formación de ácido láctico en estas bacterias es por medio de la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas, con un paso terminal de piruvato a lactato debido a la acción de la lactato-deshidrogenasa aunque cada especie produce un enantiómero diferente (Zourari, 1992). *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* produce el ácido D-(-) láctico en tanto que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produce ácido L-(+) láctico. La proporción del isómero L en el yoghurt es de 55 a 60% del ácido láctico total, y solo este enantiómero es asimilable por los mamíferos, aunque no hay ninguna evidencia de que el enantiómero D resulte tóxico al hombre (García-Garibay, 1993).

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* hidroliza la lactosa por medio de la  $\beta$ -galactosidasa, metabolizando solamente el residuo de glucosa y excretando la galactosa al medio extracelular, mientras que la hidrólisis de lactosa por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* es por medio de la fosfo  $\beta$ -galactosidasa. El residuo de galactosa cuando puede ser utilizado, es fosforilado por medio de la galactoquinasa para ser metabolizado dentro de la vía de Leloir (Zourari, 1992).

El sabor típico del yoghurt es debido al ácido láctico y a varios compuestos carbonilo como son el acetaldehído, acetona y diacetilo, producidos por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Además de éstas, se han identificado muchos compuestos volátiles en el yoghurt, por ejemplo ácidos grasos volátiles (Turcic *et al.*, 1969; Dumont, 1973) y varios compuestos derivados de la degradación termal de lípidos, lactosa y proteínas durante el tratamiento caliente de la leche antes de la elaboración del yoghurt como son, aldehídos, cetonas, alcoholes, lactonas y compuestos azufrados (Tamime, 1980). El acetaldehído es considerado como el principal componente del sabor del yoghurt (Law, 1981) y se ha subrayado la importancia de éste en la proporción de acetona (Bottazi, 1969). Es producido como un subproducto de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (principal ruta de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*), o bien a partir de treonina (ruta empleada por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*). Ambas bacterias carecen de la enzima alcohol-deshidrogenasa, lo que las hace incapaces de transformar acetaldehído a etanol (Zourari, 1992). El diacetilo contribuye al sabor delicado total del yoghurt y parece ser importante cuando el contenido de acetaldehído es bajo (Groux, 1973). Por otra parte, es muy difícil evaluar la contribución de los varios compuestos volátiles porque su percepción sensorial varía considerablemente (Dumont, 1973).

Los requerimientos de aminoácidos son satisfechos por las propias bacterias hidrolizando las proteínas de la leche (caseína y proteínas del suero de la leche), principal fuente de nitrógeno para bacterias ácido lácticas, las cuales utilizan con la acción de proteasas exocelulares, aminopeptidasas unidas a membrana y exopeptidasas (Zourari, 1992). *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* posee un sistema de proteasas y peptidasas exocelulares, activas dentro de un amplio rango de temperatura y pH, mientras que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* posee una proteasa externa, probablemente unida a su pared celular (García-Garibay, 1993). La liberación de aminoácidos no sólo satisface los requerimientos de ambas bacterias, sino que el contenido de aminoácidos en el producto final es alto, encontrándose grandes cantidades de ácido glutámico y prolina (Oberman, 1985).

Al principio de la fermentación para la elaboración del yoghurt, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* crece rápidamente y es el principal responsable en la producción de ácido láctico. Al mismo tiempo, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* crece lentamente pero produce una gran cantidad de acetaldehído, acetoina y diacetilo (Salcedo, 1992). El crecimiento sinérgico de ambas bacterias parece relacionarse con una simbiosis, en donde *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* proporciona aminoácidos esenciales y péptidos a la otra bacteria al liberarlos al medio, mientras que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produce ácido fórmico junto con CO<sub>2</sub>, el cual estimula la producción de ácido en *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* (Rajagopal, 1990).

### 1.6 Consistencia y Textura del Yoghurt.

La leche empleada en la elaboración del yoghurt puede modificarse al inicio de la fermentación, por la adición de leche descremada en polvo u otros sólidos de leche como caseinatos, o por la concentración por evaporación, ósmosis inversa o ultrafiltración. La

finalidad de estas modificaciones es la de mejorar la firmeza del producto y darle al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado (sinéresis) durante el manejo del yoghurt.

En algunos países es muy común el uso de estabilizantes que también mejoran el cuerpo, la textura, la sensación táctil en la boca y la apariencia del yoghurt. Los estabilizantes deben ser cuidadosamente elegidos para obtener las propiedades deseadas, ya que estos pueden tener diferentes características. Una mezcla adecuada de estabilizantes puede dar mejores resultados que uno solo de ellos. Algunos comúnmente utilizados son: carragenina, gretina, almidón, goma guar, goma de algarrobo, alginatos, pectina, entre otros. El uso de estos aditivos en concentraciones superiores al 0.3% pueden tener efectos adversos en el sabor. El uso de estabilizantes no está permitido por la legislación en países como Francia, Holanda, y México (García-Garibay, 1993).

Alternativamente, si se desea un yoghurt con alta viscosidad, se tiene un efecto similar cuando se emplea leche con un alto contenido de sólidos, que cuando se emplean cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* capaces de producir polisacáridos exocelulares, los cuales se unen a la matriz de proteína del sistema y evitan la sinéresis o desuerado (Schellhass, 1985). Estudios de microscopía electrónica de barrido mostraron que una parte del polisacárido producido por una cepa filante de *Lactobacillus* cubre las células con una capa uniforme, y el resto del polímero se enlaza entre células adjuntas y a la caseína por vía de una densa red de filamentos visibles influenciando de esta manera la viscosidad del medio (Botazzi, 1986; Teggatz, 1990).

La utilización de cepas de bacterias productoras de exopolisacáridos, representa una gran ventaja económica ya que permite el ahorro de leche y estabilizantes, y una ventaja legal ya que se puede omitir el uso de estabilizantes en la elaboración del yoghurt.

### 1.7 Taxonomía de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* es el nuevo nombre propuesto para designar a *Streptococcus thermophilus*, el cual fué originalmente descrito por Orla-Jensen (1919), y lo ubica aparte de los otros streptococos y especialmente de los streptococos lácticos, siendo actualmente designados como lactococos. Es aislado exclusivamente de los medio ambientes lácteos, fermenta pocos carbohidratos como son lactosa, sacarosa, glucosa y algunas veces galactosa, y se caracteriza por su termorresistencia y crecimiento a altas temperaturas las cuales pueden alcanzar de 50 a 52 °C. Además no se ha encontrado algún antígeno grupo-específico (Hardie, 1986).

Estudios de homología DNA-DNA pueden suministrar más información en estas bacterias y puede cuestionar su clasificación. El contenido de citosina más guanosina (% mol G+C) del DNA alcanza de 37.2 a 40.3 de acuerdo a Farrow y Collins (1984). Estos autores obtuvieron 61-78% de homología entre DNA de varias cepas de *S. thermophilus* y una sonda de *S. salivarius* (la homología entre DNA de cepas de *S. salivarius* y una sonda de *S. thermophilus* alcanzó de 67-91%). De este modo confirmaron la alta homología de

DNA (70-100%) observada en un estudio previo por Kilpper-Bälz *et al* (1982), para dos cepas de cada especie. Con base en estos resultados, Farrow y Collins (1984), propusieron que *S. thermophilus* debería ser reclasificado como una subespecie de *S. salivarius* a pesar de las grandes diferencias fenotípicas entre estas dos bacterias. El hecho es, que la lactato-deshidrogenasa de las cepas-tipo de ambos streptococos tienen diferentes propiedades (Garvie, 1978). Además, la termorresistencia de sus fructosa-difosfato-aldolasas es diferente, como es su nivel de homología con la aldolasa de *Enterococcus faecalis* fijada por ensayos de inmunodifusión, a pesar de distancias de migración muy cercanas (London, 1973).

En suma, Garvie y Farrow (1981) ubicaron previamente estas cepas estreptococales en el mismo grupo, basados en la homología entre su DNA y RNA ribosomal de las cepas-tipo de *Streptococcus bovis* (esta cepa ahora pertenece a la especie *Streptococcus equinus*; Schleifer y Kilper-Bälz, 1987), pero en diferentes clusters. Además, hibridación molecular DNA-DNA entre varias cepas de *S. thermophilus* y *S. salivarius* han producido únicamente un 60% de homología en condiciones óptimas y 30% bajo condiciones estrictas de hibridación (Schleifer y Kilper-Bälz, 1987). Basados en recientes datos de hibridación, diferencias fenotípicas y acontecimientos en biotipos completamente diferentes (boca/leche), Schleifer y Kilper-Bälz (1987), sugirieron mantener a *S. thermophilus* y *S. salivarius* como dos especies separadas. Es obvio que la taxonomía de *S. thermophilus* requiere discusión adicional y que se requieren más datos antes de alcanzar una decisión definitiva.

Colmin *et al* (1991), desarrollaron una sonda de DNA la cual específicamente hibridizó a 25 cepas de subespecies de *thermophilus* a dos cepas de subespecies de *salivarius*. Esta hibridación cruzada sugiere ambas especies comparten secuencias de DNA común, pero son necesarios más datos para soportar una posible relación entre estos dos streptococos.

### 1.8 Polisacáridos Exocelulares en Baceterias Acido-Lácticas.

La superficie de las células microbianas es una fuente rica en moléculas que contienen carbohidratos. Algunas de éstas son únicas en su tipo, confinadas a un grupo limitado de microorganismos. Estas moléculas son los componentes de las paredes celulares microbianas tales como los mananos en levaduras, los ácidos teicurónico y teicoico de bacterias, lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Sin embargo, además de estos componentes de la pared, los polisacáridos pueden encontrarse asociados con otras macromoléculas de la superficie o totalmente disociados de la célula microbiana. Estos son los exopolisacáridos o polisacáridos exocelulares que muestran considerable diversidad en su composición y estructura. Algunos de estos polímeros pueden tener una fuerte similitud química con componentes de la pared celular, pero la mayoría poseen estructuras químicas no relacionadas con los constituyentes celulares.

Los exopolisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos, especialmente entre especies procariontes, entre los que se encuentran saprófitos de vida libre, patógenos al



hombre, de animales y plantas. La mayoría de las microalgas producen algún tipo de exopolisacáridos aunque es poco común su producción en levaduras y hongos (Sutherland, 1990).

La definición de *exopolisacáridos* (EPS) propuesta por Sutherland en 1972 provee un término general para describir todas las formas de polisacáridos ubicados en el exterior de la superficie de las células microbianas y puede ser aplicado a polímeros de muy diversa composición y de diferentes propiedades físicas. Esta definición contrasta con el término *glycocalyx*, que ha sido usado para representar un arreglo complejo de especies macromoleculares incluyendo componentes los cuales son verdaderamente extracelulares, junto con polisacáridos de la pared y muchas otras especies químicas que no son carbohidratos. Aunque este término describe estructuras vistas bajo el microscopio o microscopio electrónico es inadecuada en términos químicos. Los exopolisacáridos normalmente no contribuyen por sí mismos a la estructura microbiana; ya que los otros componentes de la superficie celular no son inalterados si los exopolisacáridos están ausentes. Sin embargo, forman estructuras que pueden ser reconocidas *per se* por microscopía de luz o electrónica (Cerning, 1990; Sutherland, 1990).

Los EPS bacterianos pueden ser divididos en dos formas básicas. Como una cápsula (polisacárido capsular, PSC), en donde el polisacárido está íntimamente asociado con la superficie celular y puede estar enlazado covalentemente. En contraste, los polisacáridos mucoides o filantes no están asociados con la superficie celular. La distinción entre PSC y polisacáridos filantes es a menudo definida operacionalmente por el grado de asociación con la célula después de la centrifugación. Sin embargo, la diferenciación de estas dos formas puede ser difícil, ya que células que producen grandes cantidades de PSC pueden "liberar" algo del material de la periferia, dando la apariencia de producción filante. La mayoría de las bacterias presentan una preferencia para la producción de una forma sobre la otra, aunque algunas cepas de *Klebsiella* sp. pueden producir simultáneamente las dos químicamente idénticas (Whitfield, 1988).

### 1.9 Composición de los Exopolisacáridos.

Los polisacáridos son polímeros de residuos monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos que se forman por la eliminación de una molécula de agua entre el hidroxilo del grupo hemiacetal de dos residuos adyacentes. Además de los varios azúcares pueden existir sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Los carbohidratos que se encuentran en microorganismos son extremadamente diversos. La mayoría de estos azúcares se encuentran en polisacáridos de animales y plantas. Los carbohidratos D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en las formas piranosas están presentes en muchos exopolisacáridos. Las 6-desoxihexosas, L-fucosa y L-ramnosa, frecuentemente están también presentes. Una distinción entre eucariontes y procariontes puede verse en la presencia de pentosas en eucariontes. Los polisacáridos eucarióticos pueden contener pentosas, tales como D-ribosa o D-xilosa, pero su presencia es menos común en polímeros de procariontes. Algunos polisacáridos pueden contener uno o más azúcares poco comunes, como las L-liexosas o formas furanosas de las hexosas, glucosa y galactosa.

Se pueden encontrar también formando parte de los exopolisacáridos amino azúcares, como son N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina entre los más comunes. El N-acetil-D-manosamina se encuentra ocasionalmente y existen también varios azúcares amino poco comunes, tales como fucosamina y talosamina.

Los EPS bacterianos pueden ser divididos en dos grupos basados en su composición química. Pueden estar formados por un solo tipo de monosacáridos denominándose homopolisacáridos, o bien pueden estar formados por varios tipos de residuos, denominándose heteropolisacáridos. Existen formas lineares y ramificadas. Los homopolisacáridos están constituidos por glucanos neutros, mientras que la mayoría de los heteropolisacáridos parecen ser de naturaleza polianiónica.

Muchos exopolisacáridos microbianos, incluyendo varios de potencial importancia industrial son homopolímeros. Estos incluyen un gran número de glucanos, cuyo principal componente es la D-glucosa, y poseen diversas estructuras con propiedades significativamente diferentes.

A excepción de las dextranas, los levanos y los mutanos la mayoría de los polisacáridos microbianos son probablemente heteropolisacáridos. Existen una serie de polímeros con dos componentes azucarados hasta otros con cuatro o cinco monosacáridos. La posible variedad de estructuras y diferencias resultan en propiedades muy amplias indicadas por el número de posibles configuraciones y enlaces. Cada hexosa puede tener enlaces  $\alpha$  o  $\beta$  en la forma piranosa o furanosa, enlazados en la posición 2, 3, 4 o 6. Sin embargo la mayoría de los polisacáridos que han sido descubiertos están formados de dos o tres azúcares y varios sustituyentes acilo. Es además probable que la mayoría de los polímeros con potencial industrial contengan más determinados tipos de enlaces, al menos en la cadena principal, tal que éstos puedan conferir las propiedades físicas deseadas (Sutherland, 1990).

### **1.10 Funciones de los Exopolisacáridos Bacterianos.**

Se han identificado bacterias que producen EPS en una variedad de nichos ecológicos y parece que el papel preciso que desempeñan depende del medio ambiente natural del microorganismo. Se ha sugerido que la capacidad de producir EPS resulta en una respuesta directa a las presiones selectivas en el medio ambiente (Dudman, 1977). Se ha sugerido que los EPS pueden desempeñar un papel importante en la protección de la célula contra la desecación, fagocitosis y ataque de fagos, proveyendo a la célula de una elevada tensión de oxígeno, participando en el intercambio de iones metálicos, funcionando como agentes adhesivos y en interacciones entre bacterias y plantas (Cerning, 1990).

Los EPS parecen no funcionar como fuentes de energía, ya que las bacterias formadoras de polímero usualmente no son capaces de catabolizar el polímero que sintetizan (Cerning, 1990).

En una variedad de medio ambientes la sobrevivencia depende de la capacidad de un microorganismo para adherirse a una superficie. La presencia de EPS en la adhesión por biocapas sobre superficies inertes y biológicas ha sido reconocida hace poco tiempo, aunque sus implicaciones resultan en problemas tanto microbiológicos como comerciales y son tan diversos como la limpieza de oleoductos hasta el ataque de caries dental (Costerton *et al*, 1987). Los beneficios de los EPS pueden manifestarse en eventos subsecuentes tales como la estabilización y persistencia de la colonia.

La producción de EPS, particularmente en la forma de cápsulas, está presente en algunas bacterias patógenas y se ha visto son importantes en la bacteria para sobrevivir en el hospedero por la evasión de la fagocitosis (Dudman, 1977). Esta evasión de la respuesta inmune puede ser debida a la estructura química del PSC la cual lo mimetiza ante los componentes de la célula del hospedero (Jann, 1983).

Se ha sugerido que las lectinas (proteínas enlazadas a polisacáridos) secretadas por plantas leguminosas pueden ser importantes en el establecimiento de la asociación simbiótica con *Rhizobium*. La especificidad de la lectina para un *Rhizobium* particular determina con cuales especies formar una asociación.

Se ha planteado que los fagos reconocen y se enlazan a los exopolisacáridos. La cola se mueve a lo largo de las cadenas de glucanos generando una abertura para la cabeza del fago por via de la actividad de endoglucosidasas las cuales están localizadas en la base de la cápside. La inyección del ácido nucleico ocurre con la ayuda de otro receptor de la pared de la célula hospedero (Lindberg, 1977).

La mayoría de las funciones adscritas a los EPS son de naturaleza protectora. La capacidad de un microorganismo para rodearse de una capa de EPS altamente hidratada puede proveerlo de protección contra la desecación y la depredación por protozoarios. Además, la presencia de polisacárido en gel alrededor de la célula puede tener efectos significativos en las propiedades de difusión en el interior y exterior de la célula (Dudman, 1977). Los EPS aniónicos pueden enlazar y afectar la penetración a la superficie celular de iones metálicos útiles y tóxicos (Dudman, 1977). Células inmersas dentro de una matriz de polímero pueden por momentos, ser inaccesibles a agentes antibacterianos tales como antibióticos (Costerton *et al*, 1987).

## **1.11 Efecto Estresante de Agentes Antibióticos y Mutágenos en Bacterias.**

### **1.11.1. Efecto Estresante de los Antibióticos en Bacterias.**

Los antibióticos y las bacteriocinas son compuestos químicos derivados del metabolismo secundario producidos por microorganismos que inhiben o matan un amplio espectro de microorganismos de especies estrechamente relacionadas o diferentes cepas de la misma especie (Jay, 1992). La mayoría de los antibióticos usados son producidos por hongos y bacterias del género *Streptomyces*. Algunas sustancias parecidas a antibióticos

son producidas por *Bacillus* sp. La nisina es producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis*, aunque no es considerada por muchos como un antibiótico sino como una bacteriocina.

El ataque a bacterias puede ocurrir en varias formas, tales como la disolución de la pared celular o bien por inhibición de la síntesis de proteínas. Existen diversos antibióticos entre los que destacan la ampicilina, tetraciclina, novobiocina, cloramfenicol, kanamicina y neomicina. Cada uno de estos antibióticos opera a través de un mecanismo diferente, por ejemplo, la tetraciclina se enlaza a una de las proteínas de la subunidad 30S del ribosoma e inhibe la translocación ribosomal al bloquear el centro A del ribosoma lo que impide la unión de nuevos aminoacil-tRNAs, el cloramfenicol enlaza a la subunidad ribosomal 50S de los ribosomas mitocondriales y en los ribosomas 70S de células procariontes inhibiendo la síntesis de proteínas, la ampicilina enlaza e inhibe varias enzimas en la membrana bacteriana que están involucradas en la síntesis de la pared celular (Sambrook, 1989; Lehninger, 1976). El efecto bactericida de la novobiocina perjudica la integridad de la membrana celular e inhibe la función de la subunidad B de la enzima DNA girasa, lo cual tiene como consecuencia la inhibición de la división celular por la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA) (Althaus, 1988; Smith, 1967). Algunas veces, por cambios otorgados en la codificación del genoma y particularmente en plásmidos, una bacteria puede adquirir una característica que le permita resistir la acción de uno o varios antibióticos (Begley, 1994).

Se pueden incluir sustancias que inhiben el crecimiento en un medio de cultivo para prevenir el crecimiento de determinados microorganismos. Las bacterias varían ampliamente en su sensibilidad a los antibióticos, los cuales consecuentemente pueden ser usados a bajas concentraciones para prevenir el desarrollo de las bacterias sensibles en una población inicial (Rehm, 1981).

A concentraciones mayores, un antibiótico es generalmente tóxico para organismos procariontes pero no para algunos eucariontes. La penicilina por ejemplo, es un agente muy usado para la purificación de eucariontes como protozoarios, hongos y algas que son contaminados por bacterias. Contrariamente, organismos procariontes son insensibles a polieno, o antibióticos como nistatina, los cuales son generalmente tóxicos para organismos eucarióticos. La incorporación de este tipo de antibióticos en medios de aislamiento algunas veces pueden ser aprovechados en la purificación de bacterias altamente contaminadas por hongos o amibas (Rehm, 1981).

### **1.11.2 Efecto de los Mutágenos en Bacterias.**

La mutagénesis es la fuente de toda variación genética la cual puede resultar en la producción de una proteína mutante o afectar el control de la síntesis de un producto genético (Smith, 1991).

El efecto mutagénico al que están expuestos los seres vivos, comúnmente no da todos los posibles tipos de mutación, por lo que en el laboratorio se pueden generar

organismos con una elevada tasa de mutación para diversos experimentos o para la explotación comercial después de una reducción de costos al incrementar la productividad, la capacidad de utilizar materiales renovables o sustratos baratos o bien, al generar nuevas propiedades físicas o químicas deseables en los productos. Estos cambios en la tasa de mutación pueden lograrse por el uso de agentes físicos y químicos los cuales incrementan la velocidad espontánea a la que ocurren normalmente (Rowlands, 1984; Smith, 1991).

Los mutágenos son clásicamente divididos en dos tipos: físicos, como la radiación ultravioleta, gamma y X; y químicos como etil metano sulfonato (EMS), metil nitroso guanidina (NTG) y bromuro de etidio. La mayoría de los mutágenos producen más de un tipo de daño en el DNA, pero el grado en el cual producen los diferentes tipos de daño varía con el mutágeno. Así por ejemplo, la radiación U.V. da una elevada proporción de dímeros de pirimidina, la radiación ionizante da un elevado grado de rompimientos en cromosoma, EMS y NTG son agentes alquilantes y el bromuro de etidio se enlaza al DNA por intercalación entre las bases, causando un desenrollamiento del DNA (Rowlands, 1984; Sambrook, 1989).

### **1.12 Utilización de Colorantes en la Identificación de Organismos Productores de Exopolisacáridos.**

El aislamiento de una cepa puede ser dividida en la selección a partir del medio ambiente natural, o dentro de una población obtenida por un tratamiento mutacional (Rehm, 1981).

Los métodos de detección/selección baratos, simples y muy rápidos son de gran valor para el aislamiento de cepas, por ejemplo los métodos de tinción selectiva para colonias en placas son usados en numerosas ocasiones. Un buen ejemplo es la identificación de colonias productoras de polisacáridos en placas visualmente, debido a su apariencia gelatinosa.

Lafferty en 1979 identificó colonias productoras de polihidroxibutirato (polímero del ácido butírico) por su coloración blanca lechosa, apariencia de forma de cúpula y por su reacción con Sudán Negro B. Otro ejemplo es el trabajo de Hacking en 1983, quien aisló variantes inestables en la síntesis de alginato de *Pseudomonas mendocina* en un medio con carbenicilina. La razón de esta propuesta fue que aunque las pseudomonas normalmente no producen polisacárido, se aíslan frecuentemente variantes mucoides de pacientes con fibrosis cística, cuando son tratados por largos periodos con carbenicilina (Rowlands, 1984).

La utilización de colorantes en la identificación de polisacáridos exocelulares y de polímeros de carbohidratos en general se ha usado, en la cuantificación de actividades xilanolíticas mediante el uso del Rojo Congo (Capalash *et al.*, 1990), para medir exopolisacáridos en floculos de lodos activados utilizando Rojo de Rutenio (Figueroa, 1989) y en la detección de *Salmonella* con la ayuda de Rojo Neutro (Pettiper, 1989).

## INTRODUCCION

Salcedo (1992) ha propuesto un método de selección por la absorción de los colorantes Rojo Neutro y Rojo de Rutenio en bacterias lácticas de las especies *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueki* subsp. *bulgaricus*, como un procedimiento que permite diferenciar macroscópicamente colonias filantes y no filantes. Estos colorantes pueden unirse a la fracción de polisacáridos de la pared celular en bacterias gram positivas (Figueroa, 1989; Pettiper, 1989). Las diferencias coloniales entre cepas filantes y no filantes de ambas especies bacterianas son un elemento importante en la identificación de colonias de bacterias productoras de polisacáridos exocelulares, lo cual es fundamental al tratar de manipular genéticamente las cepas, puesto que se ha reportado la incapacidad de continuar con los trabajos para determinar características genéticas específicas de las cepas productoras de polímeros debido a la falta de un método de selección de colonias filantes (Vescovo *et al.*, 1989).

## CAPITULO 2

### JUSTIFICACION

Las bacterias que producen exopolisacáridos han sido identificadas en una variedad de nichos ecológicos y parece que el papel preciso que desempeñan depende del medio ambiente natural del microorganismo. Las células inmersas dentro de una matriz de polímero, pueden por momentos, ser inaccesibles a agentes antibacterianos tales como antibióticos al ser considerados principalmente como mecanismos de defensa (Costerton *et al*, 1987).

Algunas bacterias ácido-lácticas termófilas, como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, son capaces de producir exopolisacáridos (EPS) que en leches fermentadas como el yoghurt originan un producto con mayor viscosidad y mejor textura, incrementando la resistencia a la manipulación mecánica y disminuyendo notablemente el fenómeno de sinéresis (Wacher, 1993). Además, el uso de estas bacterias permite que la elaboración de yoghurt sea utilizando leche a su concentración normal como materia prima. Esto representa una ventaja económica, ya que permite el ahorro de sólidos de leche y de estabilizantes (García-Garibay, 1993).

Debido a que estos polímeros desempeñan un papel fundamental en la operación reológica y la textura de las leches fermentadas son de suma importancia desde el punto de vista industrial. Sin embargo, un problema que impide la utilización de estas cepas a gran escala es la inestabilidad en la producción de estos polímeros (Cerning *et al*, 1988; Cerning, 1990).

Son pocos los estudios disponibles en la caracterización y producción de estos polímeros, por lo que existen diversos grupos de trabajo en el mundo que han tratado de encontrar los aspectos genéticos y fisiológicos con los que se relaciona la producción de EPS en estas bacterias lácticas termófilas (García-Garibay, 1985; Cerning, 1986, 1988, 1990; Somkuti, 1986; Petit, 1991; Zourari, 1992; Salcedo, 1992).

A la fecha sólo se han determinado algunas de las características estructurales de los polímeros producidos por bacterias ácido lácticas termofilicas. Se desconocen los detalles de las rutas biosintéticas y se han propuesto algunas explicaciones en torno al fenómeno de inestabilidad para la producción de EPS relacionadas con la presencia de plásmidos. Hasta el momento no existen evidencias de una posible pérdida de plásmidos que codifiquen esta característica (Vedamuthu, 1986; Vescovo *et al*, 1989). El hecho es que existen cepas filantes de bacterias del yoghurt estudiadas que están libres de plásmidos (Cerning, 1986, 1988, 1990; Salcedo, 1992; Zourari, 1991).

Una hipótesis propone que la inestabilidad puede ser parcialmente debida a la presencia de enzimas glicohidrolíticas capaces de degradar el polisacárido (Cerning, 1988,

1990). Otra idea sugiere que la inestabilidad puede ser explicada por la eliminación de una fracción de la población capaz de producir el polímero (Salcedo, 1992).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para mejorar cepas ya existentes o para desarrollar nuevas cepas de bacterias ácido lácticas involucradas en la producción de alimentos fermentados con el propósito de mejorar la calidad de los productos. A menudo se seleccionan cepas con características que producen cambios eficientes en los productos deseados (McKay, 1990).

Se han realizado algunos trabajos de aislamiento y selección de cepas, resultado del tratamiento mutagénico de bacterias lácticas con propósitos particulares. Ejemplos de esto son el mejor aprovechamiento de la fuente de carbono como sustrato (Benateya, 1990; Sinha, 1990), mejorar la actividad proteolítica en la aceleración de la maduración de quesos (Gasson, 1984; Feirtag, 1987), en la utilización del citrato que permite la formación de cantidades excesivas de piruvato, el cual es usado para incrementar la producción de diacetilo modificando el sabor de leches fermentadas (Chuang, 1970), entre otros.

En nuestro grupo de trabajo la novobiocina y el bromuro de etidio fueron utilizados por Salcedo (1992) como agentes curantes de plásmidos en las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. El análisis de las colonias tratadas con estos agentes mostraron en algunas de ellas un posible incremento en la producción de exopolisacáridos. De esta manera, en la figura 1 se muestran las estrategias propuestas para la obtención de una cepa mejorada en la producción de exopolisacárido consistentes en el tratamiento de los microorganismos con dos grupos de agentes químicos: antibióticos como ampicilina y agentes que interfieren en replicación de DNA como novobiocina y bromuro de etidio.

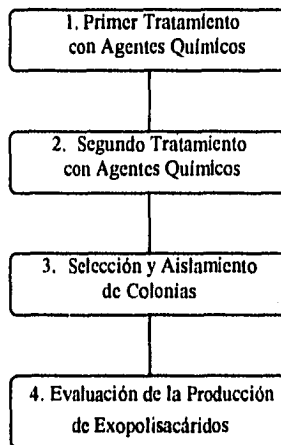


Fig. 1 Estrategias propuestas para la obtención de cepas hiperproductoras de EPS.



### CAPITULO 3

### OBJETIVOS

#### 1. OBJETIVO GENERAL.

Mejorar la producción de exopolisacáridos en *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

#### 2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Establecer los niveles basales de producción de exopolisacáridos en las cepas filante y no filante en función del número de resiembras y tamaño de la población.
- b) Validar la absorción del colorante rojo neutro en medio sólido como un método para la selección de cepas de interés en la producción de exopolisacáridos.
- c) Probar sustancias químicas antibióticas y que interfieren en replicación de DNA, que incidan en la producción de exopolisacáridos.
- d) Evaluar la cantidad de exopolisacárido producido y el tamaño de la población en cepas de interés resultantes de los tratamientos químicos, después de un determinado número de resiembras.

## CAPITULO 4

## MATERIALES Y METODOS

## 1. Microorganismos Empleados.

Se utilizaron las siguientes cepas de bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*:

a) Cepa NCFB 859 obtenida de la colección NCFB (National Collection of Food Bacteria, Schinfield, Reading, Inglaterra), con fenotipo filante o mucoide y gal<sup>-</sup>. Este microorganismo se observa como cocos en cadenas largas y algunas cortas.

b) Cepa ST233 obtenida de la colección INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia), con fenotipo no filante o no mucoide y gal<sup>-</sup>. Este microorganismo se observa como cocos en cadenas cortas o pares.

Las cepas fueron mantenidas por el método de liofilización usando como soporte leche descremada y por el método de congelación en chaquiras de vidrio con glicerol (Technical Service Consultants, LTD) a -20 °C como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Mantenimiento y conservación de cepas.

Liofilización		Congelación en perlas de vidrio (-20°C)	
Cultivo en medio sintético	50 ml	Cultivo en medio sintético	10 ml
Centrifugación	6 000 rpm/15 min/ 4 °C	Centrifugación	5 000 rpm/15 min
Decantar sobrenadante		Decantar sobrenadante	
Lavar con solución salina 0.9% estéril	10 ml	Lavar con solución salina 0.9% estéril	10 ml
Centrifugación	6 000 rpm/15 min/ 4 °C	Centrifugación	5 000 rpm/15 min
Decantar sobrenadante		Decantar sobrenadante	
Resuspender paquete celular en viales con leche estéril	2 ml	Lavar con solución salina 0.9% estéril	10 ml
Liofilizar		Centrifugación	5 000 rpm/15 min
		Decantar sobrenadante	
		Resuspender paquete celular en solución salina y pasar en viales con perlas de vidrio	
		Agitar y retirar el glicerol	
		Congelación	-20°C

La identificación y certificación de pureza de los microorganismos se determinó empleando el sistema API 50 CH de BioMérieux, que consiste en la fermentación realizada

por una suspensión bacteriana agregada a un total de 49 pozos con un carbohidrato diferente en cada uno. La capacidad de fermentar un determinado azúcar se determina por el cambio de color del indicador púrpura de bromocresol como resultado de la formación de ácido láctico. Se empleó una modificación a las especificaciones del proveedor sustituyendo la obtención de microorganismos que se realiza a partir de cajas, por microorganismos obtenidos a partir de una fermentación en lote sin agitación con la finalidad de garantizar una cantidad suficiente de microorganismos para la fermentación de los azúcares, como puede observarse en la tabla 4.

**Tabla 4. Identificación de los microorganismos por el sistema API 50 CH.**

Cultivo en medio sintético	
Centrifugación	5 000 rpm/15 min/4°C
Decantar sobrenadante	
Resuspender paquete celular	2ml de agua destilada estéril
Transferencia en gotas (n) en un vial con agua destilada estéril, hasta igualar el estándar de Mc Farland	vial con 5 ml de agua destilada estéril n= número de gotas empleadas para igualar la turbidez del estándar
Tomar 2n y resuspender en medio 50 CHL	
Tomar de esta solución hasta llenar cada pozo	100 µl
Cubrir con aceite mineral, colocar agua en la base del contenedor e incubar	37 °C/24 h

## 2. Medios y Condiciones de Cultivo.

Para la realización de este trabajo se utilizó el medio sintético MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) de Difco, adicionado con lactosa como fuente de carbono (Salcedo, 1992). La composición de este medio se ilustra en la tabla 5.

**Tabla 5. Composición del medio sintético.**

Medio sintético MRS-Lac	
Ingredientes	Proporción (g/l)
Proteosa peptona #3	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Lactosa	20
Dextrosa	20
Tween 80	1
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato de potasio dibásico	2

Al realizar cultivos en medio sólido se agregó al medio sintético agar bacteriológico (Difco) en una proporción de 15 g/l. Para preparar el medio MRS-Lac/Agar/Rojo Neutro se adicionó además de los componentes antes citados, rojo neutro en una proporción de 24 mg/l (Salcedo, 1992).

La recuperación de las cepas a partir de liofilizados y de interés durante el trabajo se realizó en de leche descremada bacteriológica al 11% (Skim Milk, Difco).

Todos los medios se esterilizaron a 121 °C o 15 lbs de presión por pulgada cuadrada durante 15 minutos.

Se realizaron precultivos antes de cada experimento inoculando éstos con 1% (v/v) del tubo con leche de las cepas recuperadas a partir del liofilizado. Se realizaron cultivos en lote sin agitación en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio sintético, inoculando cada matraz con 1% (v/v) del precultivo. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 24 h.

### 3. Determinación de Crecimiento.

La determinación de crecimiento fué realizada por el método de cuenta en placa por vaciado en medio MRS-Lac/Agar, utilizando solución salina isotónica como diluyente de las muestras de cultivo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

### 4. Extracción y Cuantificación del Exopolisacárido.

Se ha propuesto que la producción del polisacárido en este microorganismo se encuentra asociado a la célula de tal manera que el polímero sedimenta con el paquete celular durante una centrifugación. Se empleó la metodología propuesta por Cerning (1986), que se basa en el tratamiento del paquete celular con la enzima pronasa, la diálisis contra agua destilada y su posterior cuantificación por azúcares totales. La estrategia de extracción que presenta las modificaciones realizadas por Escalante (1994) se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Extracción del exopolisacárido.

Procedimiento	Proporción	Condiciones
Cultivo en medio sintético		37°C
Centrifugación		6 000 rpm/15 min/4 °C
Decantar sobrenadante		
Lavar con solución salina 0.9%	10 ml	
Centrifugación		5 000 rpm/5 min
Decantar sobrenadante		
Romper células con TCA 5%	5 ml	
Centrifugar, decantar y transferir a tubo Eppendorf		
Lavar con buffer de reacción	1 ml	
Resuspender en buffer de reacción	1 ml	EDTA 0.1 M, TRIS 0.1 M, SDS 0.5%
Agregar pronasa 20 mg/ml	125 µl	
Incubar en baño seco (Dri-Bath)		40 °C/20 h
Llevar a 5ml con agua destilada y dializar contra agua destilada		Bolsa de diálisis con poro de 12 000 a 14 000 Da, 4 °C/24 h
Cuantificar azúcares totales		Método de Fenol-Sulfúrico

La determinación del polímero se efectuó mediante el método de cuantificación de azúcares totales por fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956). Este procedimiento se basa en la oxidación de los azúcares en presencia de sustancias ácidas como la mezcla de ácido sulfúrico-fenol, formando anillos furánicos coloridos cuantificables en el espectrofotómetro. Para este método se preparó una curva estándar de glucosa en un rango de 10 a 100 µg/ml. La cantidad de azúcares totales se expresó como µg equivalentes de glucosa/ml a una determinada dilución. La técnica se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Cuantificación del exopolisacárido.**

Tratamiento	Observaciones
Muestra	1 ml
Fenol 5%	1 ml y mezclar
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	5 ml
Agitar en vórtex	*
Incubar	25 °C/ 25 min
Leer absorbancia	490 nm

\*Precaución, reacción exotérmica.

### 5. Tratamiento de Bacterias con Agentes Químicos.

El tratamiento químico se realizó al colocar en tubos de prueba con 10 ml de medio MRS-Lac líquido distintas concentraciones de un agente químico determinado. Se inoculó con 1% de un precultivo cada uno de estos tubos y se incubaron a 37 °C durante 20 horas. Al transcurrir este tiempo, se tomó una alícuota de 1% y se inoculó una segunda serie de tubos bajo las mismas condiciones. Es necesario señalar que para cada tubo de prueba correspondió una sola concentración de agente químico y que ésta fué la misma concentración que se utilizó para el segundo tratamiento. Se emplearon como agentes químicos ampicilina a concentraciones de 1 a 5 µg/ml, novobiocina de 20 a 80 µg/ml y bromuro de etidio de 1 a 4 µg/ml. Las concentraciones probadas fueron las empleadas por Salcedo (1992) en la curación de plásmidos de estos microorganismos. Para cada etapa del tratamiento se realizó un blanco que consistió en el crecimiento de los microorganismos sin ningún tratamiento químico bajo las mismas condiciones de incubación.

### 6. Selección y Aislamiento de Colonias Bacterianas.

Para efectuar la selección y aislamiento de colonias se plaquearon 100 µl de una suspensión de células a partir de una serie de diluciones de las muestras originales en placas con medio MRS-Lac/ Agar/ Rojo Neutro, las cuales fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Al transcurrir este tiempo se recuperaron sólo dos colonias con mayor tamaño dentro de un total aproximado de 50 colonias muestradas por cada placa con palillos estériles, una con mayor absorción del colorante rojo neutro (característica que se denominó *rojo*) y otra con menor absorción (característica denominada *blanco*). Ambas colonias fueron transferidas a tubos con 10 ml de medio MRS-Lac incubándose 48 h a 37 °C.

**7. Evaluación de la Producción de Exopolisacáridos en Cepas Aisladas.**

Para evaluar la producción de exopolisacáridos en las cepas de interés se ajustaron por turbidez los inóculos de las cepas recuperadas al 1% y se inocularon matraces con 50 ml del medio de cultivo MRS-Lac líquido. Después de una fermentación en lote sin agitación por 20 h a 37 °C se cuantificó la producción de exopolisacáridos en cada una de las cepas de interés y tras varias resiembras.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION.

1. Inestabilidad del Fenotipo Filante.

En la figura 2 se muestra la cuantificación del exopolisacárido realizada por el método de Escalante y col. (1993) en el medio de cultivo sintético MRS-Lac líquido. Con esta metodología, se valoró la inestabilidad en la producción de estos polímeros en la cepa filante después de transcurridas cinco resiembras. Este fenómeno de inestabilidad se ha descrito ya en algunos trabajos para diferentes cepas de bacterias lácticas y se ha propuesto que puede ser parcialmente debido a la presencia de glicohidrolasas capaces de degradar el polisacárido (Cerning, 1986; 1988; 1990; Salcedo, 1992). Anteriormente la producción de exopolisacáridos en cultivos en leche se ha observado subjetivamente por la capacidad de bacterias filantes de formar filamentos al momento de tocar el medio de cultivo con algún objeto, lo cual representa desventajas metodológicas en la evaluación de la producción de estos polímeros (Salcedo, 1992; Cerning, 1990). Las mediciones de viscosidad, las cuales son usadas como una indicación de la producción de exopolisacáridos son difíciles de interpretar en alimentos como el yoghurt, particularmente por ser soluciones no Newtonianas dada la de interferencia de la matriz proteica del gel y la estrecha relación entre microorganismos, proteína y EPS (Cerning, 1990; Teggatz, 1990).

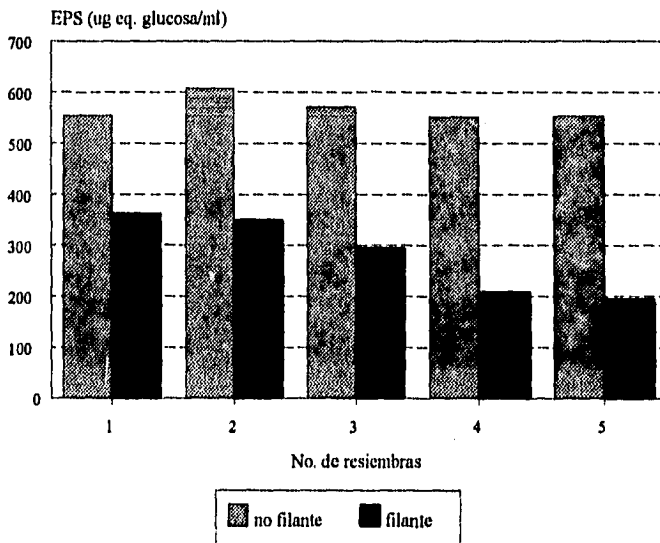


Fig. 2 Producción de EPS (ug eq. glucosa/ml) en las Cepas no Filante y Filante en Función del Número de Resiembras.

Se observa que la producción de polímero en la cepa filante inicialmente es de 362.34  $\mu\text{g}$  EPS/ml, la cual disminuye hasta la resiembra 5 a un valor de 195.39  $\mu\text{g}$  EPS/ml, lo que representa una disminución en la producción de casi la mitad respecto a la producción de la primera resiembra. Estos valores contrastan con una mayor producción de EPS registrada por Escalante (1993) en la misma cepa filante, empleando el medio Bellinker modificado.

Se observa además que la cepa que no responde al fenotipo filante también produce un polímero cuantificable por esta metodología y con un nivel de producción mayor al determinado en la cepa filante. Esta cepa no filante presenta una producción de exopolisacárido con muy poca variación a lo largo de las cinco resiembras sucesivas empleadas con valores aproximados a los 550  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## 2. Relación Entre la Producción de Exopolisacáridos y el Tamaño de la Población.

Al evaluar el crecimiento poblacional en estas bacterias a lo largo de cinco resiembras, se encontró que la población de la cepa filante disminuye de un valor de  $9.8 \times 10^7$  UFC/ml hasta un valor de  $5.7 \times 10^7$  en la segunda resiembra, para incrementarse nuevamente hasta alcanzar un valor de  $1.1 \times 10^8$  en la quinta resiembra como puede apreciarse en la figura 3.

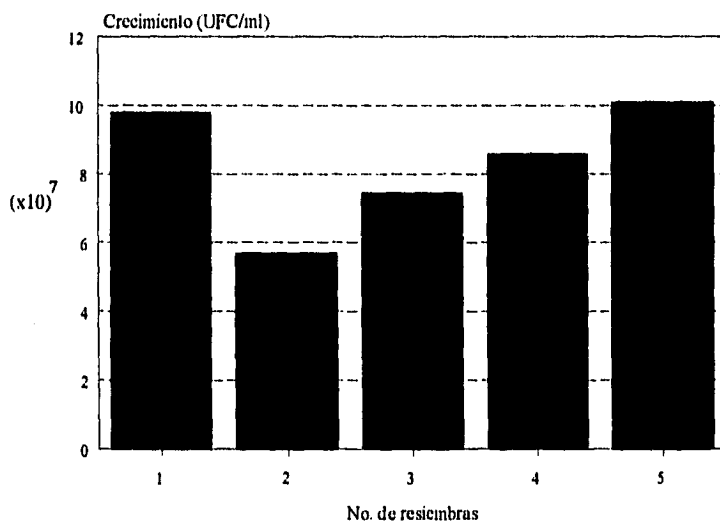


Fig. 3 Cuantificación Poblacional (UFC/ml) de la Cepa Filante en Función del Número de Resiembras.



## RESULTADOS Y DISCUSION

Anteriormente se planteó la posibilidad de que la inestabilidad en la producción de EPS en estas cepas pueda ser explicada por la eliminación de una fracción de la población bacteriana capaz de producir estos polímeros (Salcedo, 1992). El hecho es que aunque se ha sabido del fenómeno de inestabilidad presente en estas bacterias, éste no se había relacionado con el tamaño de la población.

Los resultados muestran que la inestabilidad en la producción de polímero en la cepa filante no está asociada a una disminución en la población, dado que mientras la concentración del polímero disminuye como se observa en la figura 2, la población se recupera en función del mismo tiempo empleado (ver figura 3). Indican también que probablemente el resultado del consumo del sustrato que se destina a la producción de polímero es canalizado a la producción de biomasa, en las resiembras en las cuales disminuye la producción de polímero (ver figuras 2 y 3).

En la cepa no filante como se muestra en la figura 4, la población en la primera resiembra tiene un valor de  $2.3 \times 10^{10}$  UFC/ml que se incrementa hasta alcanzar un pico en la resiembra cuatro de  $4.1 \times 10^{10}$  UFC/ml para disminuir hasta un valor de  $3.0 \times 10^{10}$  UFC/ml en la quinta resiembra. Estos resultados muestran un incremento notable en la biomasa favorecido en este medio de cultivo comparada con la cepa filante. Sin embargo aún con las variaciones en el crecimiento no se altera la producción de EPS en esta cepa (ver figuras 2 y 4).

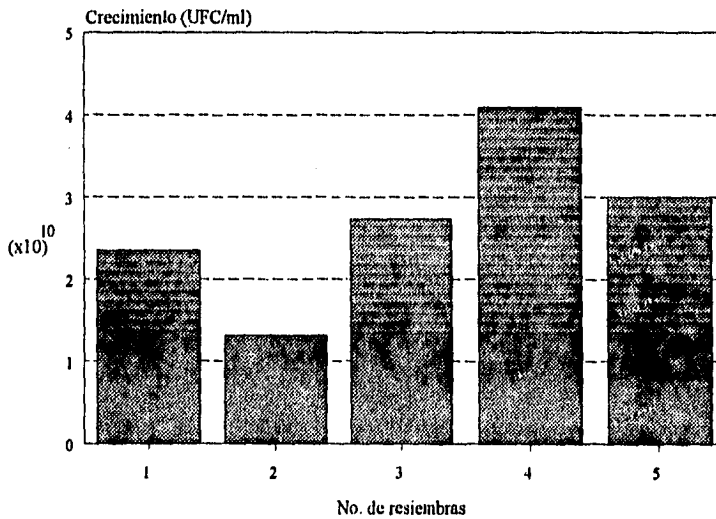


Fig. 4 Cuantificación Poblacional (UFC/ml) de la Cepa no Filante en Función del Número de Resiembras.

### 3. Producción Específica de Exopolisacáridos.

Con la idea de confirmar si la cepa no filante es una mayor productora de EPS, se evaluó la producción específica dada por la relación entre la cantidad de exopolisacárido que se tiene por unidad formadora de colonia. En las figuras 5 y 6 se observa que la cepa filante produce una mayor cantidad de polímero con respecto a la cepa no filante con una producción de  $3.7 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}$  eq. EPS/UFC en la primera resiembra y alcanzando un pico en la segunda de  $6.2 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}$  eq. EPS/UFC para disminuir hasta un valor de  $1.8 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}$  eq. EPS/UFC en la resiembra cinco.

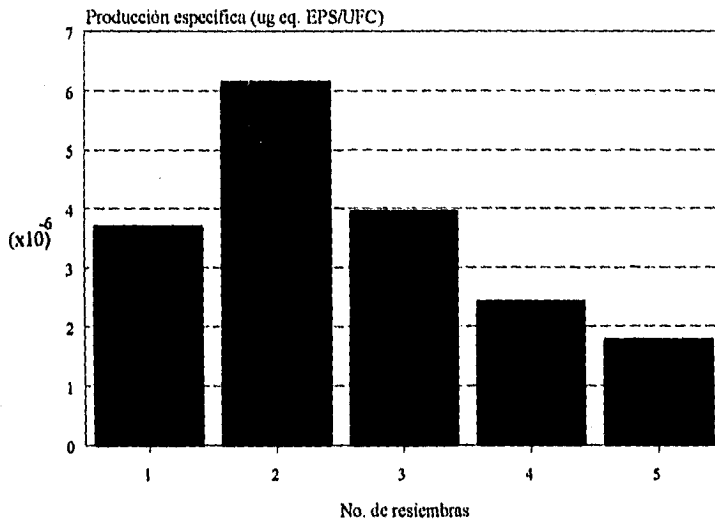


Fig. 5 Producción Específica de EPS ( $\mu\text{g}$  eq. glucosa/UFC) en la Cepa Filante en Función del Número de Resiembras.

Para la cepa no filante el nivel de producción específico máximo se obtiene en la segunda resiembra con  $4.6 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  EPS/UFC y disminuye hasta un valor de  $1.8 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g}$  EPS/UFC en la última resiembra. De esta forma la producción específica indica que la cepa con fenotipo no filante produce un polímero detectable por esta metodología, aunque en menor cantidad por UFC que la cepa filante.

Las diferencias fenotípicas entre ambas cepas se observan por la capacidad de la cepa filante de formar filamentos al momento de tocar el medio de cultivo con algún objeto, lo cual sugiere una distinta estructura en los polímeros producidos. Se ha reportado que un organismo que puede producir aún la misma cantidad de polímero que otro pero con una estructura ligeramente diferente en su composición, puede resultar en diferentes características reológicas generadas en el medio (Cerning, 1990).

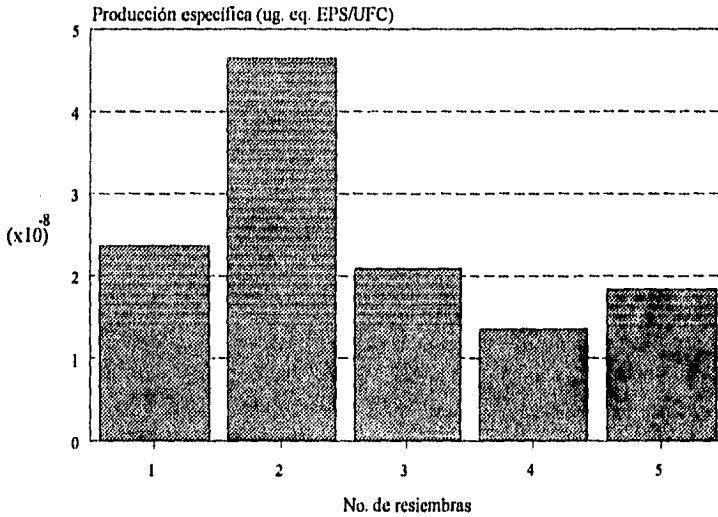


Fig. 6 Producción Específica de EPS (ug eq. glucosa/UFC) en la Cepa no Filante en Función del Número de Resiembras.

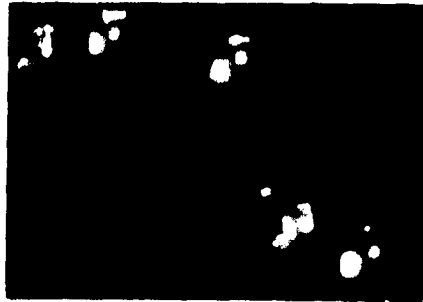
#### 4. Absorción del Colorante Rojo Neutro Como un Método Para la Selección de Cepas de Interés en la Producción de Exopolisacaridos.

Salcedo (1992) reportó diferencias morfológicas debidas en principio al grado de absorción del colorante Rojo Neutro entre colonias de la cepa filante y no filante en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* como puede apreciarse en las figuras 7A y 7B. Las colonias de la cepa filante se observan circulares, lisas, con absorción intensa del colorante en la parte central, mientras que en la cepa no filante se observan colonias lisas un poco más grandes, sin absorber el colorante en forma tan intensa. Estos datos resultan importantes, puesto que diferentes autores han reportado la incapacidad de continuar con los trabajos para determinar características genéticas específicas de las cepas productoras de polímeros, debido a la falta de un método de selección de colonias filantes (Vescovo *et al*, 1989).

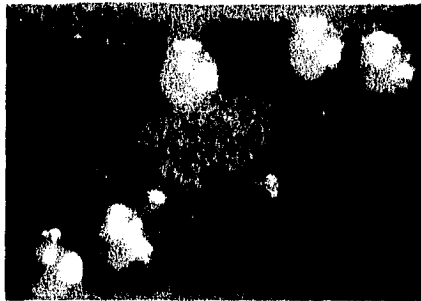
RESULTADOS Y DISCUSION

Se efectuó también el crecimiento de ambas cepas en una misma placa con medio MRS-Lac/Agar/Rojo Neutro y se observaron diferentes grados de absorción del colorante Rojo Neutro entre las cepas filante y no filante en las colonias plaqueadas como puede apreciarse en la figura 7C.

A



B



C

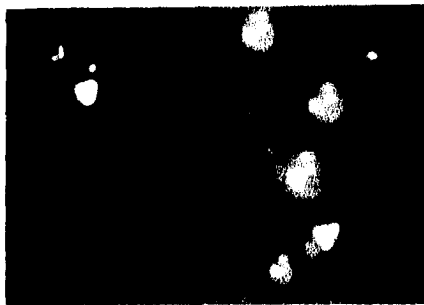


Fig. 7 Morfología colonial de las cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en MRS-Lac/Agar/Rojo Neutro. A) Cepa NCFB 859, filante, B) Cepa ST233, no filante, y C) filante+nofilante.

Con base en lo anterior, se utilizó la absorción diferencial del colorante Rojo Neutro como un método de selección de colonias hiperproductoras de exopolisacárido después de un tratamiento con agentes químicos antibióticos y mutagénicos de las cepas filante y no filante y el resultado de esta selección se evaluó al cuantificar la producción de exopolisacárido después de una fermentación en lote sin agitación.

### 5. Efecto de los Agentes Antibióticos y Mutágenos en la Población Bacteriana.

El efecto de los agentes químicos en las poblaciones bacterianas de las cepas filante y no filante fué evaluado al registrar el número de unidades formadoras de colonias obtenidas después del tratamiento con cada uno de los agentes químicos, en las poblaciones inicial y final. En la tabla 9 se muestra que ambas sustancias antibióticas tuvieron efecto disminuyendo el tamaño de la población, muy probablemente debido al daño que estas sustancias pueden ocasionar en la biosíntesis de la pared bacteriana (Althaus, 1988; Sambrook, 1989). El antibiótico que mayor daño ocasionó a la población de ambas cepas fué la novobiocina, dado que este antibiótico puede tener efecto tanto en la integridad de la membrana celular como en la replicación de los ácidos nucleicos por inhibición de la enzima DNA girasa resultando como consecuencia una inhibición de la división celular (Althaus, 1988; Smith, 1967).

**Tabla 9. Efecto de los Agentes Antibióticos en la Población.**

Condiciones	Concentración (µg/ml)	Cepa Filante (UFC/ml)	Cepa no Filante (UFC/ml)
Controles	0	$9.8 \times 10^7$	$2.4 \times 10^{10}$
Ampicilina	1	$6.8 \times 10^5$	$2.8 \times 10^6$
	5	$3.5 \times 10^3$	$2.0 \times 10^4$
Novobiocina	20	$1.3 \times 10^4$	$4.3 \times 10^4$
	80	$5.3 \times 10^1$	$7.0 \times 10^2$

El efecto del bromuro de etidio (ver tabla 10), muestra también un daño a la población de ambas cepas que puede deberse a la intercalación que puede tener esta sustancia entre las bases del DNA, llegando a causar la pérdida de pequeños fragmentos de DNA (Sambrook, 1989) y trastornos en la replicación de DNA.

**Tabla 10. Efecto del Bromuro de Etidio en la Población.**

Condiciones	Concentración (µg/ml)	Cepa Filante (UFC/ml)	Cepa no Filante (UFC/ml)
Controles	0	$9.8 \times 10^7$	$2.4 \times 10^{10}$
Bromuro de Etidio	1	$8.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^7$
	4	$1.7 \times 10^2$	$2.6 \times 10^4$

La población bacteriana en ambas cepas disminuye por efecto de los agentes probados lo que nos permite seleccionar únicamente las colonias que pueden resistir el tratamiento estresante con la idea de que los cambios generados en el ambiente permiten la selección de nuevas características en las bacterias y propician el aislamiento de variantes genéticas, dado que se puede encontrar una amplia diversidad en la composición genómica de las poblaciones de microorganismos (Arber, 1990).

**6. Efecto de los Agentes Antibióticos y Mutágenos en la Producción de Exopolisacáridos.**

Aunque la función de los polisacáridos bacterianos parece depender del hábitat donde se encuentran, al ser considerados principalmente como mecanismos de defensa contra condiciones adversas consideradas como presiones de selección (Withfield, 1988), los resultados encontrados indican que no es posible determinar un patrón de inducción en la producción de exopolisacáridos de las colonias aisladas por el efecto de los agentes químicos empleados. En la tabla 11 se muestra el efecto de la ampicilina, que parece favorecer ligeramente la producción del polímero en la cepa filante cuando son utilizadas concentraciones intermedias, en tanto que con concentraciones mayores la producción disminuye considerablemente comparado con la producción de la cepa filante original.

**Tabla 11. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa Filante Después de un Tratamiento con Ampicilina.**

Efecto de la Ampicilina en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg eq. glucosa/ml)	Colonias Rojas EPS (µg eq. glucosa/ml)
1	335.75	357.78
2	272.34	404.95
3	377.36	410.29
4	198.31	207.46
5	203.62	221.19
Control Cepa Filante		350.37 µg eq. glucosa/ml

En la tabla 12 se muestra el efecto de la novobiocina sobre la producción de EPS. Se presenta una disminución de la producción de polímero conforme se incrementa la concentración de antibiótico empleado aunque se tiene un repunte cuando se emplea una concentración de 80 µg/ml. Esta disminución en la producción es aún mayor que la registrada con ampicilina lo cual bien puede deberse al doble efecto que la novobiocina tiene a nivel de la membrana celular como en la replicación de los ácidos nucleicos (Althaus, 1988; Smith, 1967).

**Tabla 12. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa Filante Después de un Tratamiento con Novobiocina.**

Efecto de la Novobiocina en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg eq. glucosa/ml)	Colonias Rojas EPS (µg eq. glucosa/ml)
20	286.07	353.88
40	239.21	393.96
60	149.82	155.36
80	260.17	310.73
Control Cepa Filante		350.37 µg eq. glucosa/ml

El bromuro de etidio como se muestra en la tabla 13, parece actuar como una sustancia efectora negativa de la producción conforme aumenta la concentración aplicada y llega a favorecer la producción en la cepa filante cuando se utiliza en bajas concentraciones. A una concentración de 1 µg/ml se vió favorecida la producción de polímero en un nivel de producción máximo obtenido a partir de la cepa filante.

**Tabla 13. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa Filante Después de un Tratamiento con Bromuro de Etidio.**

Efecto del Bromuro de Etidio en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg eq. glucosa/ml)	Colonias Rojas EPS (µg eq. glucosa/ml)
1	272.34	464.58
2	237.64	409.40
3	250.27	284.30
4	247.53	201.98
Control Cepa Filante		350.37 µg eq. glucosa/ml

En las tablas 14 y 15 se muestran el efecto de la ampicilina y novobiocina respectivamente sobre la producción de EPS, en colonias obtenidas a partir de la cepa no filante. En las colonias aisladas, las sustancias antibióticas inciden de manera poco favorable en el incremento de la producción de polisacárido y en algunos casos llegan a disminuir la producción de polímero hasta muy por debajo del nivel de producción obtenido en la cepa original.

**Tabla 14. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa No Filante Después de un Tratamiento con Ampicilina.**

Efecto de la Ampicilina en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg eq. glucosa/ml)	Colonias Rojas EPS (µg eq. glucosa/ml)
1	382.00	370.47
2	255.21	318.88
3	352.47	436.88
4	447.31	275.52
5	382.34	168.50
Control Cepa no Filante		554.34 µg eq. glucosa/ml

Cabe destacar que la producción de EPS en la cepa no filante se vió favorecida cuando se trató con 60 y 80 µg/ml de novobiocina lo cual representa los niveles de producción máximos obtenidos a partir de esta cepa como puede observarse en la tabla 15.

Tabla 15. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa no Filante Después de un Tratamiento con Novobiocina.

Efecto de la Novobiocina en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg/ml)	Colonias Rojas EPS (µg/ml)
20	399.51	193.59
40	397.04	405.67
60	618.99	707.77
80	659.68	847.10
Control Cepa no Filante		554.34 µg eq. glucosa/ml

La selección de colonias de la cepa no filante obtenidas por el tratamiento con bromuro de etidio, muestra en la tabla 16 una disminución en el nivel de producción de polisacárido comparado con la cepa original y al igual que en la cepa filante, ocurre un efecto negativo en la producción conforme se incrementa la concentración del bromuro de etidio.

Tabla 16. Colonias Aisladas a Partir de la Cepa no Filante Después de un Tratamiento con Bromuro de Etidio

Efecto del Bromuro de Etidio en la Producción de Exopolisacáridos		
Dosis (µg/ml)	Colonias Blancas EPS (µg/ml)	Colonias Rojas EPS (µg/ml)
1	512.08	500.55
2	520.86	424.81
3	374.86	305.16
4	351.81	366.08
Control Cepa no Filante		554.34 µg eq. glucosa/ml

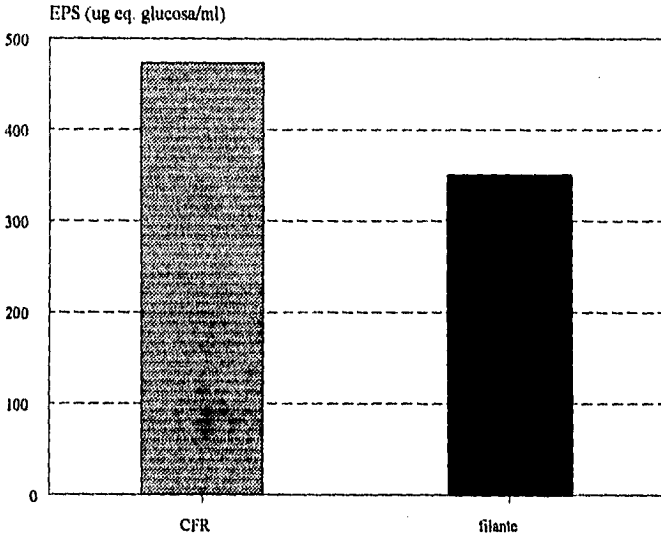
A partir de la selección de colonias de la cepa filante después del tratamiento con los diferentes agentes químicos, se observa que hay un patrón distintivo entre colonias *rojas* (que absorben más el colorante) y *blancas* (que absorben menos que las *rojas*) dentro del contexto de todas las colonias muestreadas de la caja, este patrón coincide con una mayor producción de polímero por parte de las colonias *rojas* con respecto a las *blancas* cuando son llevadas a una fermentación en lote. Esto refleja la utilidad práctica del método como una herramienta valiosa para la preselección de colonias de interés en la producción exopolisacáridos a partir de la cepa filante.

La selección de colonias de la cepa no filante por la absorción de colorante después de los tratamientos químicos, no responde al patrón distintivo entre *rojas* y *blancas* cuando se evalúa la producción de polímero. Se puede observar que la absorción de colorante no se correlaciona con la producción de polímero como se presenta en la cepa filante. Esto puede ser debido a un arreglo estructural diferente del polímero sintetizado, el cual no permite la absorción intensa del colorante, imposibilitando un fácil reconocimiento de variantes en la producción de exopolisacárido.



**7. Aislamiento de Cepas Hiperproductoras de Exopolisacáridos.**

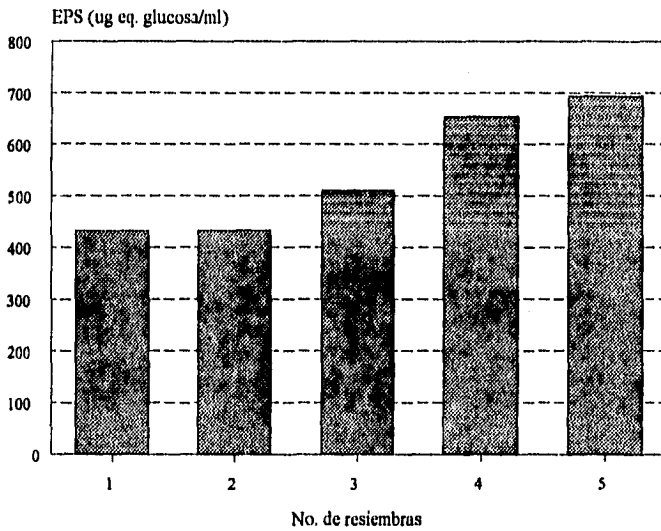
Después de los tratamientos químicos empleados, se aislaron tres cepas de interés en la producción de exopolisacáridos bajo el criterio de mayor absorción del colorante Rojo Neutro y mayor producción en medio líquido después de una fermentación en lote sin agitación. La primera de ellas, denominada como CFR, se aisló a partir de la cepa filante después del tratamiento con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml y representa un incremento en la producción total de polímero cercano al 30% con respecto a la cepa original y con un fenotipo filante como se muestra en la fig. 8.



**Fig. 8 Producción de EPS (ug eq. glucosa/ml) por las Cepas CFR y Filante en MRS-Lac Después de 24 h de Fermentación.**

*RESULTADOS Y DISCUSION*

Se evaluó el nivel de producción total de exopolisacárido en la cepa CFR como se aprecia en la figura 9, a lo largo de cinco resiembras. Se observa un incremento en la producción de polímero con el número de resiembras, contrario a lo que ocurre en la cepa filante donde la producción disminuye (ver figura 2). El nivel de producción en la cepa CFR de polímero va de los 464.58  $\mu\text{g}$  EPS/ml en la primera resiembra a los 694.25  $\mu\text{g}$  EPS/ml en la quinta en una perspectiva de recuperación en la producción de exopolisacárido.



**Fig. 9** Producción de EPS ( $\mu\text{g}$  eq. glucosa/ml) en la Cepa CFR en Función del Número de Resiembras.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 10 se observa que la población bacteriana de la cepa CFR se incrementa de un valor de  $2.4 \times 10^6$  UFC/ml en la primera resiembra hasta un pico en la tercera de  $3.28 \times 10^6$  UFC/ml para disminuir finalmente en la quinta resiembra hasta un valor de  $7.3 \times 10^5$  UFC/ml, aunque estos niveles son menores que los obtenidos en la cepa filante original (ver figura 3). Este comportamiento en el crecimiento muestra que la cepa CFR, fuera de la resiembra 3 tiene una tendencia a disminuir en vez de aumentar como ocurre en la cepa filante original (ver figura 3) a lo largo de las resiembras empleadas.

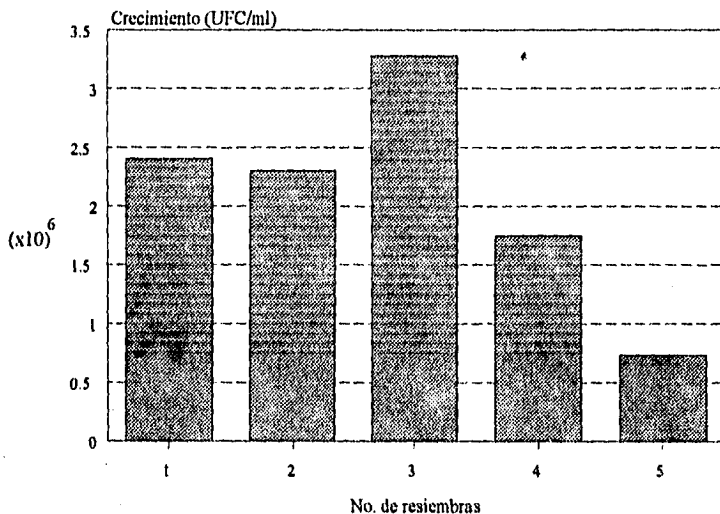


Fig. 10 Cuantificación Poblacional (UFC/ml) de la Cepa CFR en Función del Número de Resiembras.

Como se muestra en las figuras 9 y 10, puede existir una relación inversa entre el nivel de producción de polímero con respecto a la cantidad de biomasa generada a lo largo de las resiembras empleadas, de manera que cuando se incrementa el nivel de producción del polímero la biomasa disminuye o viceversa.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 11 se muestra la producción específica de la cepa CFR. Se observa que la cantidad de polímero formado aumenta como en la producción total. En la cepa CFR la producción específica se incrementa de un valor inicial de  $1.8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  EPS/UFC en la primera resiembra hasta un valor de  $9.5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  EPS/UFC en la última, el cual representa un incremento del 81% en la producción específica del polímero. La producción específica en esta cepa para la primera resiembra, representa un 98% más en la producción que el registrado para la cepa filante original.

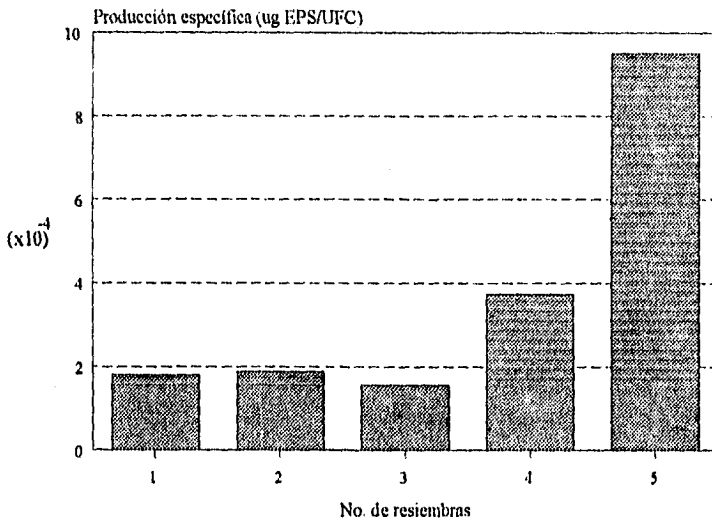


Fig. 11 Producción Específica de EPS ( $\mu\text{g}$  eq. glucosa/UFC) en la Cepa CFR en Función del Número de Resiembras.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron también otras dos cepas de interés en la producción de exopolisacáridos a partir de la cepa no filante original después del tratamiento con novobiocina, bajo el criterio de mayor absorción del colorante Rojo Neutro y mayor producción en medio líquido después de una fermentación en lote sin agitación. Estas dos cepas, que no responden al fenotipo filante *rojo* fueron denominadas como 5R obtenida después del tratamiento con 60  $\mu\text{g/ml}$  y 6R obtenida después del tratamiento con 80  $\mu\text{g/ml}$ .

La cepa 5R presentó una producción total de exopolisacárido de 707.77  $\mu\text{g EPS/ml}$  en tanto que en la cepa 6R fué de 847.10  $\mu\text{g EPS/ml}$ . Estos valores representan, como se observa en la figura 12, un incremento del 27.68% y 52.81% respectivamente comparados con la cepa original.

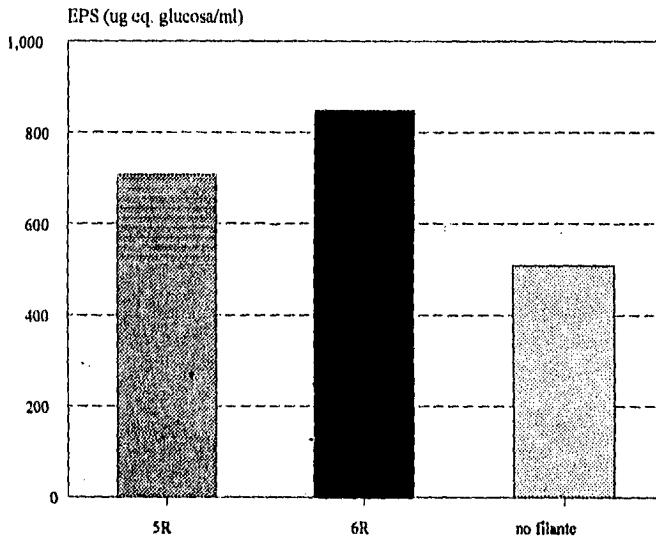


Fig. 12 Producción de EPS ( $\mu\text{g eq. glucosa/ml}$ ) por las Cepas 5R, 6R y no Filante en MRS-Lac Después de 24 h de Fermentación.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se evaluó la producción total de polímero de ambas cepas tras varias resiembras y se observó una disminución paulatina de la producción como puede apreciarse en la figura 13. Esto difiere de lo observado en la cepa no filante original. La producción de la cepa 5R disminuyó de 707.77 a 556.86  $\mu\text{g}$  EPS/ml después de un repunte en la quinta resiembra, en tanto que la cepa 6R muestra una producción de 847.10  $\mu\text{g}$  EPS/ml en la primera resiembra y disminuye hasta una producción de 498.02  $\mu\text{g}$  EPS/ml en la última. Todos estos valores en producción, excepto los de la primera resiembra, se encuentran muy aproximados al nivel de producción de la cepa no filante original (ver figura 2).

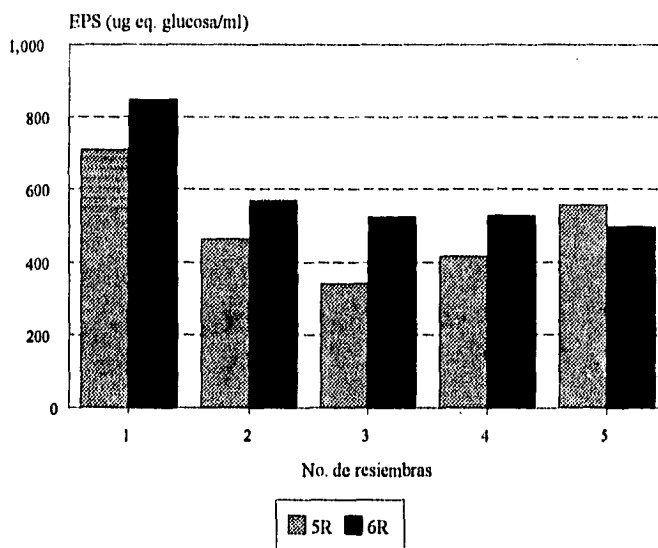


Fig. 13 Producción de EPS (ug eq. glucosa/ml) en las Cepas 5R y 6R en Función del Número de Resiembras.

RESULTADOS Y DISCUSION

La población de ambas cepas, como se muestra en la figura 14, se incrementa en la cuarta resiembra hasta  $1.7 \times 10^8$  UFC/ml en la cepa 5R y  $3.3 \times 10^8$  UFC/ml en la cepa 6R y disminuye en la última resiembra hasta valores de  $8.3 \times 10^7$  UFC/ml y  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente. Con estos datos se observa un menor crecimiento poblacional de esta cepa comparado con la cepa no filante original (ver figura 4).

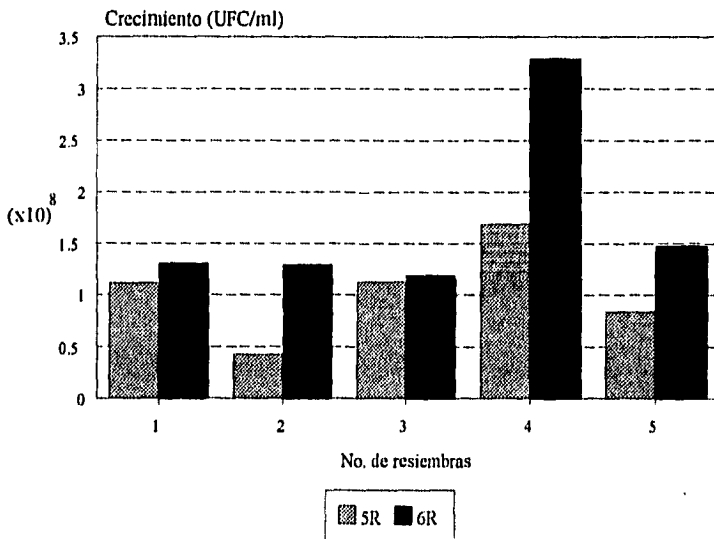


Fig. 14 Cuantificación Poblacional (UFC/ml) de las Cepas 5R y 6R en Función del Número de Resiembras.

RESULTADOS Y DISCUSION

La producción específica en estas cepas muestra el grado de inestabilidad en la producción de polímero como puede observarse en la figura 15, que confirma el comportamiento obtenido inicialmente, aunque solo la cepa 5R muestra un incremento en la segunda y en la quinta resiembra. La producción específica obtenida en estas cepas sin embargo, es mejor que el nivel de producción que se obtiene en la cepa no filante, que es del orden de  $10^{-8}$   $\mu\text{g EPS/UFC}$  (ver figura 6).

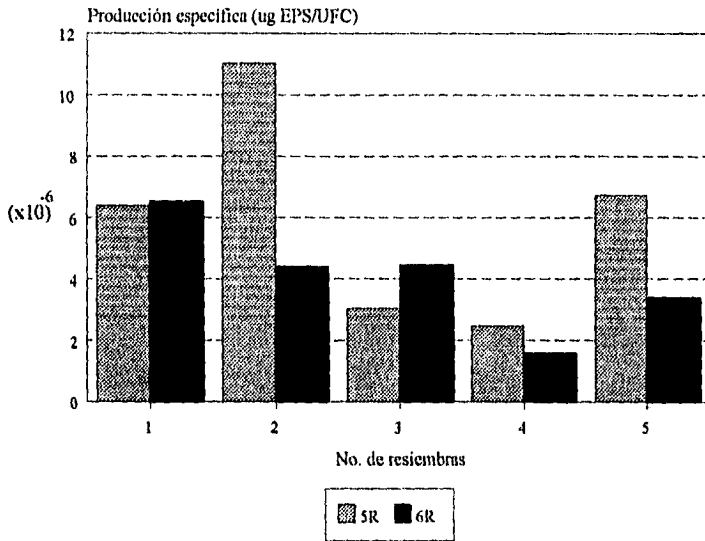


Fig. 15 Producción Específica de EPS (ug eq. glucosa/UFC) en las Cepas 5R y 6R en Función del Número de Resiembra.



## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

Después del desarrollo de este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

Se evaluó la producción de exopolisacáridos en las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en el medio sintético MRS-Lac. Con este medio fué posible determinar en la cepa filante el problema de inestabilidad en la producción de exopolisacáridos que se ha reportado en diferentes cepas de bacterias lácticas (Cerning *et al.*, 1988; Cerning, 1990).

Se observó que existe una relación inversa entre el nivel de producción de exopolisacárido y el tamaño de la población en las cepas filante y CFR. Cuando disminuye el nivel de producción del polímero en la cepa filante la biomasa se incrementa y cuando aumenta la producción de polímero en la cepa CFR la población disminuye.

El medio sintético MRS-Lac favorece mucho más el crecimiento de la cepa no filante que el de la filante. Debido a ésto, la cepa no filante se muestra al evaluar la producción total, como una mayor productora de polímero por su alto crecimiento poblacional.

La producción específica del polímero indica que la cepa filante produce una mayor cantidad de exopolisacárido por unidad formadora de colonia comparado con la producción de la cepa no filante. Apreciamos que ambas cepas producen polímero y que las diferencias encontradas en el fenotipo filante pueden ser debidas a un diferente arreglo estructural.

Se validó el método de selección por la absorción del colorante rojo neutro entre las cepas filante y no filante, como un criterio confiable para la detección de cepas de interés en la producción de exopolisacáridos. Únicamente en la cepa filante se puede establecer una relación entre mayor color y producción.

El uso de sustancias estresantes disminuyó el nivel de población de ambas cepas. Únicamente el bromuro de etidio a bajas concentraciones y la novobiocina a elevadas, incidieron favorablemente la producción de exopolisacáridos. El uso de ampicilina no favoreció el incremento de la producción del polímero y en algunos casos la disminuyó.

Se aislaron tres cepas de interés en la producción de exopolisacárido. La cepa denominada CFR obtenida a partir del tratamiento con bromuro de etidio, presenta un incremento en la producción cercano al 30% determinado a partir de la producción total y un 80% en la producción específica. Esta cepa mostró incrementos en la producción tras varias resiembras, fenómeno contrario al que se presenta en la cepa silvestre. El crecimiento poblacional en esta cepa tras las mismas resiembras empleadas, tiende a disminuir cuando el polímero se incrementa.

## *CONCLUSIONES*

Las cepas denominadas como 5R y 6R, aisladas después del tratamiento con novobiocina, presentan un incremento en la producción total de polímero cercano al 30 y 50% respectivamente, comparados con la cepa no filante original. La producción de polímero disminuye después de varias resiembras, pero aún con esta disminución la producción específica se mantiene por encima de la cepa original. Se observa también un menor crecimiento poblacional de esta cepa comparado con la cepa no filante.

## PERSPECTIVAS

Con base en los resultados que se obtuvieron en este trabajo se sugieren realizar las siguientes recomendaciones:

- 1) Determinar la estructura y tipos de enlace de los exopolisacáridos producidos por las cepas filante y no filante para tratar de explicar las diferencias en absorción de colorante.
- 2) Evaluar el papel del tipo y concentración de azúcar con respecto al nivel de producción, la estructura y la composición del exopolisacárido.
- 3) Identificar las enzimas clave involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos en las cepas filante y no filante para conocer la canalización de los metabolitos que expliquen los cambios en producción, relación EPS/biomasa y cambios en el comportamiento de inestabilidad.
- 4) Caracterizar las cepas mutantes en términos de:
  - a) Estructura y composición de exopolisacáridos.
  - b) Asimilación de sustrato y diferencias en patrón de crecimiento.
  - c) Actividades enzimáticas involucradas.
  - d) Cambio en comportamiento a través de resiembras, lo cual podría sugerir la presencia o ausencia de actividad glicohidrolítica.

## BIBLIOGRAFIA

- Althaus, I. W., Dolak, L. and F. Reusser. (1988). Coumarins as inhibitors of bacterial DNA gyrase. *J. Antibiotics* 41: 373-376.
- Arber, W. (1990). Limits to genetic stability: Relevance for microbial evolution. Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Strasbourg, France. Vol. 1.
- Begley, S. (1994). The end of antibiotics. *Newsweek*. March 28: 35-39.
- Benateya, A., Bracquart, P. and G. Linden. (1990). Galactose-fermenting mutants of *Streptococcus thermophilus*. *Can. J. Microbiol.* 37: 136-140.
- BioMerieux, S.A. API 50 CH in vitro diagnostic (#5 030 0). API 50 CHL Medium (#5 041 0). Marcy l'Etoile-France.
- Bottazi, V. and M. Vescovo. (1969). Carbonyl compounds produced by yoghurt bacteria. *Neth Milk Dairy J.* 23: 71-78.
- Botazzi, V. and F. Bianchi. (1986). Types of microcolonies of lactic acid bacteria, formation of void spaces and polysaccharides in yoghurt. *Sci. Tecn. Latt-Casearia.* 37: 297-315.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8a. Ed. Williams and Wilkins Co. USA. pp. 490-576.
- Capalash, N., Sharma, P. and K. G. Gupta. (1990). Use of a modified cupric acetate method for the detection and quantitation of xylanolytic activities: A comparative study with the congo red method. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 151-154.
- Cerning, J., Bouilliane, C. and M. J. Desmazeaud. (1986). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides production from *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.* 8: 625-628.
- Cerning, J., Bouilliane, C., Landon, M. and M. J. Desmazeaud. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 10: 255-260.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 113-130.
- Cheetham, P. S. J. (1987). Screening for novel biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 194-211.

## BIBLIOGRAFIA

- Chuang, L. F. and E. B. Collins. (1970). Isolation of nitrosoguanidina-induced mutants of *Streptococcus diacetylactis* with enhanced ability to produce acetoin and diacetyl. *J. Dairy Sci.* 54: 282-283.
- Colmin, C., Pébay, M. Simonet, J. M. and B. Decaris (1991). A species-specific DNA probe of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol. Lett.* 81: 123-128.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and T. J. Marrie. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- de Man, J. C., Rogosa, M. and M. E. Sharpe. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- Difco. (1985). Difco Manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 th Ed. Difco Laboratories. USA. pp. 1155.
- Dubois, M., Gilles K., Hamilton, J. and P. Rebers. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Dudman, W. F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. In: Surface carbohydrates of the procariotic cell. (Sutherland, I. W., Ed.). Academic Press, New York. 357-415.
- Dumont, J. P., J. Adda. (1973) Méthode rapide [d'étude] des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. Application au yoghourt. *Le Lait.* 53: 12-22.
- Escalante, A., Villegas, J., Wachter, C., García-Garibay, M. y Farrés, A. (1993). Metabolismo de Carbohidratos en Bacterias Lácticas Productoras de Exopolisacáridos del Género *Streptococcus thermophilus*. V Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jal. México. Vol. 3. No. 1, 2. FB34-FB36.
- Escalante, A. (1994). Metabolismo de carbohidratos en *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* productora de exopolisacáridos. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH. Facultad de Química. UNAM.
- Farrow, J. A. E. and M. D. Collins. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *S. salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 357-362.
- Feirtag, J. M. and L. L. McKay. (1987). Thermoducible lysis of temperature sensitive *Streptococcus cremoris* strains. *J. Dairy Sci.* 70: 1779-1784.

BIBLIOGRAFIA

- Figueroa, L. A. and J. A. Silverstein. (1989). Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnol. Bioengineering*, 33: 941-947.
- Fox, P. F. (1989). The milk protein system. In: *Developments in dairy chemistry-4. Functional Milk Proteins* (Fox, P. F. ed.). Elsevier Appl. Sci. London. 1-53.
- García-Garibay, M., Revah, S. y L. Gómez. (1993). Productos lácteos. En: *García-Garibay, M., Ramírez, Q. y A. López-Munguía (Coordinadores). Biotecnología Alimentaria*. LIMUSA. México. 153-179.
- García-Garibay, M. (1985). Studies on growth, slime production and slime composition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*. Tesis de Maestría. Food Research Institute. Reading, Inglaterra.
- Garvie, E. I. (1978). Lactate dehydrogenases of *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Res.* 45: 515-518.
- Garvie, E. I. and J. A. E. Farrow. (1981). Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. C* 2: 299-310.
- Gasson, M. J. and F. L. Davies. (1984). The genetics of lactic acid bacteria. In: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* (Davies, F. L. and B. A. Law., Eds.). Elsevier. New York. 99-126.
- Green, M. L. and D. J. Manning. (1982). Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.* 49: 737-748.
- Groux, M. (1973). Étude des composants de la saveur du yoghourt. *Lait*, 53: 146-153.
- Hardie, J. M. (1986). Genus *Streptococcus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and J. G. Holt, eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. 1043-1070.
- Jann, K. and B. Jann. (1983). The K antigens of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 9: 5517-5526.
- Jay, J. M. (1992). *Modern Food Microbiology*. 4th Ed. Van Nostrand Reinhold. New York, USA. 701 pp.
- Kilpper-Bälz, R., Fischer, G. and K. H. Schleifer. (1982). Nucleic acid hybridization of Group N and Group D streptococci. *Curr. Microbiol.* 7: 245-250.

BIBLIOGRAFIA

- Kroger, M., Kurmann, J. A. and J. L. Rasic. (1989). Fermented milks: Past, present and future. *Food Technol.* 43: 92-95.
- Kurmann, J. A. (1984). Aspects of the production of fermented milks. *Bull. Fed. Int. Lait.* 179: 16-28.
- Law, B. A. (1981). The formation of aroma and flavour compounds in fermented dairy products. *Dairy Sci. Abstr.* 43: 143-154.
- Lehninger, A. (1976). *Biochemistry*. 2nd. Ed. Worth Publishers, Inc. USA. 1104 pp.
- Lindberg, A. A. (1977). Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. In: *Surface Carbohydrates of the Procariotic Cell*. (Sutherland, I. W., ed.). Academic Press, New York. 290-356.
- London, J. and K. Kline. (1973). Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. *Bacteriol. Rev.* 37: 453-478.
- Mc Kay, L. L. and K. A. Balwin. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 3-14.
- Marshall, V. M. E. (1986). The microflora and production of fermented milks. In: Adams, M. R. (comp.). *Progress in Industrial Microbiology*. Amsterdam, Elsevier. 23: 1-44.
- Marteau, P. and J. C. Ramabud. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 207-220.
- McKay, L. L. and Baldwin, K. A. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 3-14.
- Oberman, H. (1985). Fermented milks. In: B. J. B. Wood (Ed.). *Microbiology of fermented foods*. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publisher. London. 167-195.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*. AF Host and Son, eds. Copenhagen.
- Pereira Martins, J. F. and R. H. Luchese. (1988). The assessment of growth compatibility between strains of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Rev. Inst. Latic Cândido Tostes (Brasil)* 43: 11-13.
- Petit, C., Grill, J. P., Maazouzi, N. and R. Marczak. (1991). Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 216-221.
- Pettipher, G. L. and Y. B. Watts. (1989). Evaluation of lysine-iron-cystine neutral red for the detection of *Salmonella* in the Bacterimeter. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 243-244.

BIBLIOGRAFIA

- Puhan, Z. (1988). Results of the questionnaire 1785B "Fermented milks". Bull. Fed. Int. Lait. 227: 138-164.
- Rajagopal, S. N. and W. E. Sandine. (1990). Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. J. Dairy Sci. 73: 894-899.
- Rehm, H. J. and G. Reed. (1981). Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 Volumes. Microbial fundamental. Vol 1. Weinheim. Federal Republic of Germany. 519 pp.
- Rowlands, R. T. (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. Review. Enzyme Microb. Technol. 6: 3-10.
- Salcedo, L. A. (1992). Factores genéticos relacionados con la expresión del fenotipo mucoso en bacterias lácticas utilizadas en la elaboración del yoghurt. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and T. Maniatis. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Schleifer, K. H. and R. Kilpper-Bälz. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. Syst. Appl. Microbiol. 10: 1-19.
- Schellhass, S. M. and H. A. Morris. (1985). Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. Food Microstructure. 4: 279-287.
- Sinha, R. P. (1991). Genetic characterization of partial lactose-fermenting revertants from lactose-negative mutants of lactococci. Can. J. Microbiol. 37: 281-286.
- Smith, C. A. and E. J. Wood. (1991). Molecular biology and biotechnology. Chapman & Hall Limited. New York. cap. 8.
- Smith, D. H. and B. D. Davis. (1967). Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 93: 71-79.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and J. G. Holt. (1986). Bergy's manual of systematic bacteriology. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. 999-1103.
- Somkuti, G. A. and D. H. Steinberg. (1986). Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. J. Ind. Microbiol. 1: 157-163.



## BIBLIOGRAFIA

Sutherland, I. W. (1990). Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press. United Kingdom. 163 pp.

Tamime, A. Y. and H. C. Deeth. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. J. Food Prot. 43: 939-977.

Technical Service Consultants Ltd. Proect bacterial preservers. Basingstoke. England.

Teggatz, J. A. and H. A. Morris. (1990). Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. Food. Struct. 9: 133-138.

Turcic, M., Rasic, J. and Canic, V. (1969). Influence of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* culture on volatile acids content in the flavour components of yogurt. Milchwissenschaft. 24: 277-281.

Vedamuthu, E. R. and D. H. Neville. (1986). Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. Appl. Environ. Microbiol. 51: 677-682.

Vescovo, M., Scolari, G. L. and Bottazzi, V. (1989). Plasmid encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Biotechnol. Lett. 11: 709-712.

Wacher, C., Galván, M. V., Farrés, A., Gallardo, F., Marschall, V. M. E. and M. García-Garibay. (1993). Yogurt production from reconstituted milk powders using differen polymer and non-polymer forming starter cultures. J. Dairy Res. 60: 247-254.

Wacher, C. y R. Santillana. (1990). La fermentación del pozol. En: Durán, C. (Ed.). Alimentos y Biotecnología. Fac. Química. UNAM. México. 101-110.

Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. Can. J. Microbiol. 34: 415-420.

Zourari, A., Accolas, J. P. and M. J. Desmazeaud. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. Lait. 72: 1-34