

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA

0567
4
28

**EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA PRODUCCION
DE UN POLISACARIDO EXOCELULAR POR *Lactobacillus
delbrueckii ssp. bulgaricus*.**

T E S I S
Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(QUIMICA DE ALIMENTOS)
P R E S E N T A
I.A. MA. ANDREA TREJO MARQUEZ



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 está 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.

00567

Trejo Marquez, Ma. $\frac{4}{26}$
Andrea

Efecto de la fuente...

1995

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Eduardo Bárzana
VOCAL: Dr. Fermín Pérez
SECRETARIO: Dra. Amelia Farrés
SUPLENTE: Dr. Guillermo Aguilar
SUPLENTE: M. en C. Ana Ma. Obregón

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. Ma. del Carmen Wachter Rodarte

ASESORES TECNICOS:

M. en C. Mariano García Garibay
Dra. Amelia Farrés González Saravia

SUSTENTANTE:

I. A. Ma. Andrea Trejo Márquez

Esta tesis se la dedico a los hombres y mujeres sin rostro y sin historia, a los armados de verdad y fuego, a los olvidados, a los desposeídos, a esos que hoy han dicho ¡BASTA! A: Ramona, Moisés, Mario, Ana Ma., Tacho, Irma, Matilde, Benito, Javier, Issac, Felipe, David, Salvador, el Heriberto, la Eva , Marcos, a TODOS, por su gran EJEMPLO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la M. en C. Ma. del Carmen Wachter Rodarte por la acertada dirección de este trabajo de tesis, así como por su gran apoyo, confianza en mi trabajo y ayuda a lo largo del tiempo en el que fue desarrollado.

Asimismo, agradezco al M. en C. Mariano García Garibay y a la Dra. Amelia Farrés González Saravia por su asesoría, apoyo, tiempo y conocimientos que hicieron posible la realización de esta tesis.

Por otro lado, es necesario agradecer la valiosa ayuda de la I.A. Ma. Guillermina Peralta Romero por su cooperación en la ultrafiltración del suero lácteo, al igual que al Dr. Jaime Vernon por su apoyo para el secado del mismo. También agradezco a la técnico académico del laboratorio de Microbiología, Q.F.B. Rocio Santillana, por su valioso apoyo durante el desarrollo de la parte experimental. Agradezco de manera especial a la pas. Biol. Ma. Teresa Flores por su colaboración en el tedioso trabajo de Laboratorio.

Se agradece a la Q.F.B. Diana Labastida, a la Q.F.B. Martha Giles, al M. en C. Adelfo Escalante y a la pas. Q.F.B. Juana Pastrana por su ayuda y apoyo en los diferentes momentos de la realización de este trabajo.

Finalmente agradezco al Dr. Fermín Pérez, al Dr. Eduardo Bárzana, al Dr. Guillermo Aguilar y a la M. en C. Ana Ma. Obregón sus valiosas sugerencias en la revisión del presente trabajo.

LA TORMENTA...
...la que está

Nacerá de choques de estos dos vientos, llega ya su tiempo, se atiza ya el horno de la historia, reina ahora el viento de arriba, ya viene el viento de abajo, ya la tormenta viene...así será...

LA PROFECIA...
...la que está

Cuando amaine la tormenta, cuando la lluvia y fuego dejen en paz otra vez la tierra, el mundo ya no será mundo, sino algo mejor.

Subcomandante Marcos

CONTENIDO

	página
Lista de Figuras	iii
Lista de Tablas	iv
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	3
2.1 Morfología de las bacterias lácticas del yoghurt	3
2.2 Relación simbiótica de las bacterias del yoghurt	4
2.3 Metabolismo de las bacterias lácticas	4
2.3.1 Metabolismo de carbohidratos	5
2.3.2 El papel de los aminoácidos y los péptidos	9
2.3.3 Sistema proteolítico	12
2.3.3.1 Papel del calcio en la síntesis de enzimas proteolíticas	16
2.3.4 Transporte de aminoácidos	17
2.4 Bacterias lácticas filantes	18
2.4.1 Detección y cuantificación de polímeros producidos por bacterias lácticas	19
2.4.2 Biosíntesis de polisacáridos	20
2.4.3 Composición y estructura química de polisacáridos microbianos	20
2.4.4 Función de los polisacáridos microbianos	23
2.4.5 Factores genéticos asociados a la producción de polisacárido	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIALES Y METODOS	26
4.1 Microorganismos	26
4.2 Confirmación de la identidad de la cepa	26
4.3 Conservación de cepas	28
4.3.1 Conservación a largo plazo	28
4.3.2 Conservación a corto plazo	29
4.4 Preparación de inóculos	29
4.5 Análisis	29
4.5.1 Cuantificación del polímero	29
4.5.2 Determinación del crecimiento	30
4.5.3 Determinación de la actividad proteolítica	31
4.6 Diseño de experimentos	31

	página
4.6.1	Estabilidad en la producción del polímero 31
4.6.2	Efecto de medios con diferente relación carbohidrato/proteína en la producción de polímero 32
4.6.3	Efecto del uso de suero ultrafiltrado adicionado con casaminoácidos, triptona o caseína en la producción de polímero 33
4.6.4	Efecto de la concentración de casaminoácidos en la producción de polímero 35
4.6.5	Efecto de diferentes grupos de aminoácidos en el crecimiento y producción del polímero 36
4.6.6	Determinación de la actividad proteolítica de cepas filantes y una no filante de <i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> 37
5.	RESULTADOS Y DISCUSION 38
5.1	Verificación de la identidad de las cepas 38
5.2	Conservación de cultivos 38
5.3	Estabilidad en la producción del polímero 40
5.4	Efecto de medios con diferente relación carbohidrato/proteína en la producción del polímero 41
5.5	Efecto del uso de suero ultrafiltrado adicionado con casaminoácidos, triptona o caseína en la producción del polímero 48
5.6	Efecto de la concentración de casaminoácidos en la producción del polímero 53
5.7	Efecto de diferentes grupos de aminoácidos en el crecimiento y producción del polímero 59
5.8	Determinación de la actividad proteolítica de cepas filantes y no filantes de <i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> 62
6.	CONCLUSIONES 68
7.	RECOMENDACIONES 69
	BIBLIOGRAFIA 71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Vías para la utilización de lactosa y galactosa en bacterias ácido lácticas.	8
2.2 Rutas metabólicas homofermentativa y heterofermentativa propuesta para bacterias lácticas.	10
2.3 Localización y distribución de enzimas proteolíticas de bacterias lácticas.	13
4.1 Diagrama experimental.	27
5.1 Producción de polímero de cepas liofilizadas de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> , utilizando dos medios de suspensión.	39
5.2 Producción total de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en medios con diferente relación carbohidrato/proteína.	43
5.3 Cinética de crecimiento de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en medios con diferente relación carbohidrato/proteína.	45
5.4 Producción específica de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en medios con diferente relación carbohidrato/proteína.	47
5.5 Producción de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en diferentes fuentes de nitrógeno.	49
5.6 Cinética de crecimiento de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en diferentes fuentes de nitrógeno.	51
5.7 Producción específica de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en diferentes fuentes de nitrógeno.	52

página

5.8	Producción total de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a diferentes concentraciones de casaminoácidos.	54
5.9	Cinética de crecimiento de <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> a diferentes concentraciones de casaminoácidos.	56
5.10	Producción específica de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a diferentes concentraciones de casaminoácidos.	57
5.11	Crecimiento y producción de polímero por <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en un medio con diferentes grupos de aminoácidos.	60
5.12	Actividad proteolítica específica de tres cepas de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en leche descremada.	64
5.13	Cinética de crecimiento de tres cepas de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en leche descremada.	65
5.14	Producción total de polímero de dos cepas de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> en leche descremada.	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Concentraciones mínimas de aminoácidos requeridos por algunas bacterias lácticas para un máximo crecimiento	11
2.2	Enzimas proteolíticas purificadas de <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> .	16
4.1	Composición química de medios.	33
4.2	Composición química del suero ultrafiltrado.	34
4.3	Grupo de aminoácidos probados como fuente de nitrógeno.	36
5.1	Cambios en la producción del polímero por la cepa NCFB 2772 de <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> .	41

RESUMEN

Se realizó un estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de un polisacárido exocelular por una cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Se comparó el crecimiento y la producción de polisacárido en medios con diferente relación carbohidrato/proteína, encontrándose que en un concentrado proteico se obtuvo el mayor crecimiento, comparado con leche, suero lácteo y suero con casaminoácidos. La relación carbohidrato/proteína del medio no afectó la producción específica del polisacárido.

Se estudió el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y se obtuvo una mayor producción específica del polisacárido con la fuente más hidrolizada (casaminoácidos) que con triptona, caseína y leche. La concentración de casaminoácidos afectó la producción específica del polisacárido. A menor concentración de casaminoácidos mayor producción específica del polisacárido. Ningún aminoácido estimuló la producción del polisacárido. Sin embargo, la tirosina y la prolina mejoraron ligeramente el crecimiento.

La cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 1489 presentó una actividad proteolítica mayor ($13.1 \text{ mg tirosina/ufc} \times 10^{-7}$) que las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483, las cuales presentaron actividades de 6.36 y 8.61 mg tirosina/ufc $\times 10^{-7}$ respectivamente. Esto sugiere que la actividad proteolítica baja de las bacterias filantes provocan un menor crecimiento y tiene como consecuencia una mayor producción de polímero, comparado con las no filantes.

1. INTRODUCCION

El yoghurt es un producto fermentado, producido al inocular leche con *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* en una proporción de 1:1.

Una alternativa interesante para la elaboración de yoghurt es la utilización de bacterias filantes, las cuales producen un polisacárido que mejora la textura y la apariencia del producto ya que, aumenta la viscosidad y disminuye considerablemente la sinéresis o separación de suero (21).

El uso de estas cepas filantes en la elaboración de alimentos como el yoghurt puede ser de gran utilidad, sobre todo en países como México, donde la legislación prohíbe la adición de estabilizantes a estos productos.

El estudio de la característica filante de estas bacterias lácticas se inició hace algunos años y ha incluido diferentes aspectos fisiológicos y genéticos. Diversos investigadores han reportado la composición del polisacárido (7,8,12,34). Otros estudios muestran cómo influye la fuente de carbono en su producción y composición (34). El efecto de diferentes factores en la producción de polisacárido por estas bacterias lácticas ha sido reportado. García-Garibay y Marshall (23) encuentran que la temperatura de incubación presenta un efecto en la producción de polisacárido por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Cowie (12) encuentra que la presencia de calcio estimula la producción de polímero en leche por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Otro aspecto interesante ha sido el estudio de la inestabilidad de la característica filante.

La pérdida espontánea de esta propiedad se ha relacionado con varios factores, aunque todavía no ha sido posible explicar claramente la causa. Se cree que la capacidad de producción de polímero está asociada con un plásmido, y varios autores reportan que para bacterias lácticas mesófilas el carácter filante está relacionado con un plásmido, pero en el caso de cepas de bacterias lácticas termófilas la característica filante no se encuentra codificada en plásmidos (41,45,58, 59, 62).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de un polisacárido exocelular por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Se busca ampliar el conocimiento actual del comportamiento de estas bacterias lácticas filantes, ya que la mayoría de las investigaciones se han enfocado a estudiar solamente el efecto de la fuente de carbono; sin embargo la fuente de nitrógeno es de suma importancia para el metabolismo de estas bacterias.

2. GENERALIDADES

2.1 MORFOLOGIA DE LAS BACTERIAS LACTICAS DEL YOGHURT

Las bacterias lácticas comprenden a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, y *Lactobacillus*. Estas bacterias son importantes componentes de la microbiota de una amplia variedad de productos fermentados, donde su principal función es la acidificación (31).

En la elaboración de yoghurt se emplean dos especies de bacterias lácticas, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Lactobacillus bulgaricus es un bacilo largo, no móvil, Gram positivo y produce D(-)-ácido láctico por homofermentación. Es termófilo por lo cual es capaz de crecer a temperaturas mayores de 45°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es 40-43°C, no crece a temperaturas menores de 15°C. Como fuente de carbono utiliza glucosa, lactosa, fructosa y galactosa. Puede crecer a pH menores de 5 (6).

Streptococcus thermophilus, presenta forma esférica u ovoide, se asocia en pares o cadenas largas de células. Es Gram positivo, no móvil, termófilo por lo que crece entre 40 y 45°C y no crece a temperaturas menores de 20°C. Produce L(+)-ácido láctico por homofermentación. Como fuente de carbono utiliza glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa (6).

2.2 RELACION SIMBIOTICA DE LAS BACTERIAS DEL YOGHURT

Se ha observado una relación simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, ya que presentan una producción mayor de ácido en cultivos mixtos que en cultivos de cepas puras. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* estimula a *S. thermophilus* en la primera etapa de la incubación porque libera de la caseína los aminoácidos necesarios para *S. thermophilus* (36). Diversos investigadores llegaron a la conclusión que *S. thermophilus* en condiciones anaerobias produce una sustancia estimuladora para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, que es igual o puede ser reemplazada por el ácido fórmico, y en la segunda etapa, cuando el crecimiento de *S. thermophilus* se detiene por el efecto adverso del ácido láctico, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* aumenta su crecimiento por la antes mencionada estimulación (20).

2.3 METABOLISMO DE BACTERIAS LACTICAS

Las bacterias ácido lácticas son nutricionalmente muy exigentes pero están bien equipadas para utilizar un amplio rango de nutrientes que se encuentren en su medio (31). Se caracterizan por requerimientos nutricionales complejos (proteínas, vitaminas y aminoácidos).

La característica más importante del metabolismo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* es la conversión de los carbohidratos a ácido láctico. Son homolácticas y convierten más del 90% de lactosa a ácido láctico aunque también producen acetaldehído y diacetilo en cantidades pequeñas. El diacetilo aparece como resultado de la actividad metabólica de *S. thermophilus* y su concentración es muy baja (0.5 ppm). El acetaldehído es el principal compuesto volátil que proporciona el típico sabor del yoghurt y *Streptococcus thermophilus*

puede formarlo a partir de la glucosa vía piruvato, pero sólo pequeñas cantidades son formadas en esta ruta por *Lactobacillus bulgaricus*, en el que la vía principal es a partir del aminoácido treonina. El acetaldehído no se metaboliza posteriormente a etanol porque las bacterias del yoghurt no presentan actividad de alcohol deshidrogenasa u oxidasa (37).

Aunque las bacterias lácticas son consideradas como débilmente proteolíticas, causan un grado significativo de proteólisis en muchos productos lácteos fermentados. Esto conduce a cambios en la estructura física del producto y contribuye a la producción de compuestos responsables del sabor.

A pesar de que el metabolismo de grasas es reducido en el yoghurt, se piensa que contribuye significativamente al sabor, aumentando el contenido de ácidos grasos libres, atribuido a la acción de enzimas lipolíticas de las bacterias iniciadoras (35)

2.3.1 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

La conversión de carbohidrato a lactato por bacterias ácido lácticas se considera como el proceso de fermentación más importante empleado en la tecnología de alimentos (28).

El único carbohidrato presente en la leche es la lactosa y tanto *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* como *S. thermophilus* lo metabolizan para producir ácido láctico. El ácido láctico ayuda a desestabilizar las micelas de caseína y conduce así a la coagulación de la proteína de la leche y a la formación del gel.

La lactosa se hidroliza a glucosa y galactosa y en ambas especies la glucosa se metaboliza a través de la vía de Embden Meyerhoff-Parnas con el paso final de conversión de piruvato a lactato (37).

Las bacterias ácido lácticas poseen dos sistemas de transporte de lactosa a la célula: el sistema fosfoenolpiruvato (PEP):lactosa fosfotransferasa y el sistema de permeasas (25,57).

En el caso del sistema de fosfoenolpiruvato:lactosa fosfotransferasa, el azúcar se fosforila mientras pasa a través de la membrana celular. Posteriormente es hidrolizado por la fosfo- β -D-galactosidasa para obtener glucosa y galactosa-6-fosfato. La glucosa se metaboliza por la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas mientras que la galactosa 6-fosfato se metaboliza por la ruta de la D-tagatosa-6-fosfato (31). Esto se observa en bacterias mesófilas como *S. cremoris* y *S. lactis*. La principal enzima de los estreptococos del grupo N es la fosfo- β -galactosidasa (36). En *S. cremoris* se encontró que el sistema predominante es fosfoenolpiruvato:lactosa fosfotransferasa (55).

Para el caso de los estreptococos del grupo N las enzimas de la ruta de Leloir están presentes pero posiblemente reprimidas cuando este organismo crece en lactosa (37).

La lactosa puede pasar al interior de la célula con la ayuda de permeasas específicas y una vez dentro se hidroliza por la enzima β -galactosidasa a glucosa y galactosa. La glucosa se metaboliza a través de la vía Embden Meyerhoff-Parnas (28). En *Lactobacillus* si la concentración de lactosa en el medio es baja, la D-galactosa se fosforila en una reacción catalizada por la galactocinasa y se convierte en glucosa 6-fosfato por la ruta de Leloir (36).

En la Figura 2.1 se representa esquemáticamente las vías para la utilización de lactosa y galactosa en bacterias ácido lácticas.

Algunas cepas de lactobacilos, incluyendo a *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* muestran actividad de las enzimas fosfo- β -galactosidasa y β -galactosidasa, aunque esta última es la predominante (36).

La mayoría de las cepas de *S. thermophilus* no pueden metabolizar la galactosa y esto se atribuye a un defecto en el mecanismo de inducción de la galactoquinasa. En este caso la galactosa se excreta de la célula y se acumula en el medio (42).

Streptococcus thermophilus no tiene fosfo- β -galactosidasa y por lo tanto se espera que no posea enzimas para la vía de la tagatosa. Se ha reportado que la β -galactosidasa se sintetiza constitutivamente, excepto en el caso de la cepa STA de *S. thermophilus*, donde es inducida. Esta no se reprime cuando el organismo crece en glucosa como única fuente de carbono y la galactosa se acumula en el medio cuando el crecimiento es en lactosa. El organismo sólo metaboliza galactosa por la vía de Leloir cuando la lactosa es limitante (36).

El metabolismo de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* es también homoláctico y la β -galactosidasa es la enzima predominante, con lactato como producto final. Muchos lactobacilos son capaces de producir acetaldehído y alcohol como metabolitos finales. *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* no poseen alcohol deshidrogenasas (36).

Por otro lado, *S. lactis ssp. diacetilactis* es incapaz de usar citrato como fuente de energía para el crecimiento, pero puede metabolizar éste y se observa un incremento del 35% en la

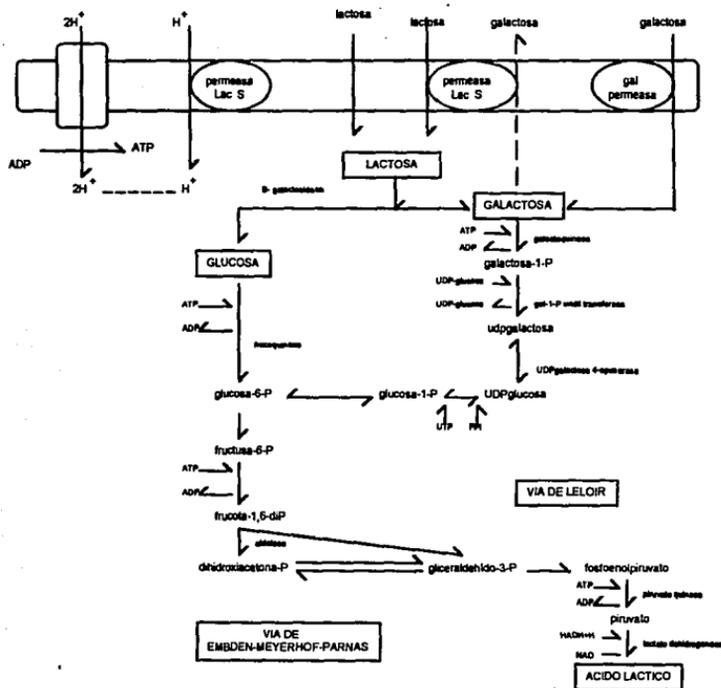


Figura 2.1 Metabolismo de lactosa y galactosa en *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. salivarius thermophilus*.

Fuente: Escalante (17).

velocidad específica de crecimiento. Una situación similar se presenta con *Leuc. lactis* el cual puede también utilizar citrato en presencia de otra fuente de carbono (36,26).

Streptococcus cremoris y *S. lactis* generalmente llevan a cabo el metabolismo de carbohidrato por la vía de la tagatosa además de la vía Embden-Meyerhof, pero algunas cepas de *S. lactis* pueden también usar la vía de Leloir si la galactosa está presente en el medio de crecimiento (56). *S. thermophilus* sólo usa la vía Embden Meyerhof, y en los lactobacilos se ha mostrado la presencia de β -D-fosfo-galactosidasa. Esta enzima produce intracelularmente galactosa-6-fosfato la cual luego puede metabolizarse por la vía de la tagatosa. *Leuconostoc* y *Lactobacillus* son también capaces de metabolizar glucosa vía hexosa monofosfato (36). En la Fig 2.2 se muestra las rutas metabólicas homofermentativas y heterofermentativas propuestas para bacterias lácticas.

2.3.2 EL PAPEL DE LOS AMINOACIDOS Y LOS PEPTIDOS

La caseína constituye cerca del 80% de todas las proteínas presentes en la leche bovina y sirve como la mayor fuente de nitrógeno para las bacterias lácticas que crecen en leche.

Los aminoácidos son un requerimiento o un estimulante para el crecimiento de las bacterias lácticas, y la mayoría de ellas son auxotróficas para muchos aminoácidos. En la leche, los aminoácidos libres presentes normalmente son insuficientes para permitir altas tasas de crecimiento, por lo que se requiere de un sistema proteolítico complejo compuesto por enzimas capaces de producir péptidos pequeños y aminoácidos libres provenientes de la caseína de la leche (30). Mills y Thomas (38) reportaron que para *S. cremoris* los aminoácidos libres presentes en la leche permiten solamente un crecimiento correspondiente a un 8-16% del que se

encontraría en la leche coagulada.

La prueba de la importancia del sistema proteolítico es el hecho de que la concentración de aminoácidos libres en leche es muy baja comparada con los requerimientos de aminoácidos para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (Tabla 2.1). Esto indica que las bacterias lácticas poseen enzimas proteolíticas que permiten obtener aminoácidos de la proteína de la leche para un máximo crecimiento.

Se han estudiado los requerimientos de aminoácidos para algunas bacterias lácticas; existe información detallada para los estreptococos del grupo N, pero poca para otros grupos (31). Se ha encontrado que los estreptococos termófilos no sólo tienen requerimientos de algunos aminoácidos, sino también se estimulan por aminoácidos no esenciales (valina, metionina, leucina, triptofano) para producir más ácido que el normal (36). Información cualitativa indica que *Lactobacillus* presenta requerimientos mayores que los estreptococos (40).

Tabla 2.1 Concentraciones mínimas de aminoácidos requeridos por algunas bacterias lácticas para un máximo crecimiento ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>S. lactis</i>	<i>S. lactis</i> ssp. <i>diacety-lactis</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. thermophilus</i>	aa libres en leche
Glu	77	87	70	150	35.9
Leu	41	37	32	n.e	1.2
Ile	33	30	32	n.e	0.8
Val	27	30	41	n.e	2.6
Arg	37	36	39	n.e	1.6
Cys	e	e	27	80	n.d
Pro	n.e	n.e	38	n.e	8.8
His	23	24	14	60	2.8
Phe	21	n.e	6	n.e	n.e
Met	22	21	11	n.e	n.d

e=estimulante; n.e=no estimado; n.d=no detectado.

Fuente: Law (31)

2.3.3 SISTEMA PROTEOLITICO

La capacidad proteolítica de las bacterias ácido lácticas es importante ya que vuelve útiles proteínas y péptidos para su crecimiento (31).

Las bacterias lácticas se consideran débilmente proteolíticas, comparadas con otros grupos o géneros de bacterias como Bacillus, Pseudomonas, coliformes, etc., pero aún así su sistema proteolítico es muy versátil tanto en número y tipo, como en la distribución celular de estas enzimas (31).

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas está constituido por proteinasas y peptidasas. El término de proteinasa se utiliza para las enzimas que solamente actúan sobre proteínas nativas y peptidasas para las enzimas que actúan en péptidos (36).

De acuerdo con su localización en la célula, existen proteinasas y peptidasas extracelulares e intracelulares, aunque no todas las especies de bacterias lácticas presentan todos los diferentes tipos de enzimas. En la Figura 2.3 se presenta la localización y la distribución de las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas.

Muchos géneros y especies de bacterias secretan proteinasas extracelulares. Estas enzimas son las primeras en entrar en contacto con las proteínas de la leche (36).

La síntesis de proteinasas está regulada por la concentración de aminoácidos y de péptidos en el medio. Si la concentración de aminoácidos es baja, la velocidad de síntesis de proteinasas es mayor y si existen altas concentraciones extracelulares de aminoácidos, la célula

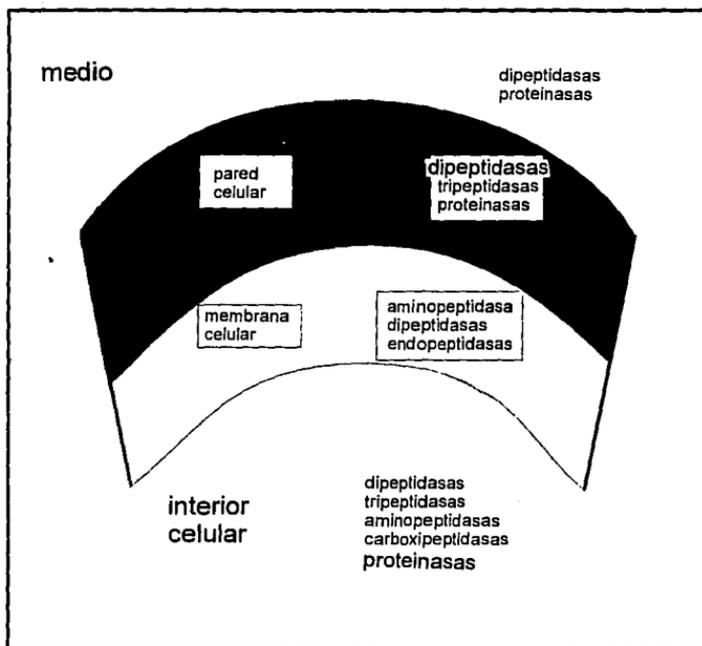


Figura 2.3 Localización y distribución de enzimas proteolíticas de bacterias lácticas.
Fuente: Law (31)

responde reduciendo la velocidad de síntesis de la enzima, hasta que el metabolismo celular haya usado esta fuente externa de nitrógeno (31).

Uno de los problemas que se han presentado en el estudio de estas enzimas esta definido por la manera como se establece su carácter extracelular, ya que muchos de los autores reportan la presencia de enzimas extracelulares cuando para su obtención han utilizado tratamientos con enzimas líticas o choque osmótico, no tomando en cuenta la posible liberación de enzimas intracelulares (36).

Las proteinasas de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* han sido clasificadas en dos tipos de acuerdo con su acción específica en la hidrólisis de caseína. Las del tipo PI o HP, hidrolizan la β -caseína pero tienen poca o ninguna acción sobre la α o κ caseína. Las proteinasas tipo PIII o AMI se encuentran solamente en pocas cepas e hidrolizan las caseínas α , β y κ (44).

En *Lactobacillus* se producen proteinasas activas en α , β y κ caseína pero su actividad es extremadamente variable dependiendo de la cepa. El Abboudi *et al.* (16) demostraron que *Lactobacillus* hidroliza preferentemente β -caseína pero también degrada proteínas del suero. La mayoría de las proteinasas de *Lactobacillus* y de estreptococos del grupo N no degradan α -caseína.

Las proteinasas extracelulares e intracelulares son una parte vital en el mecanismo por el cual las bacterias utilizan las proteínas para su crecimiento (31).

El segundo paso en la utilización de la caseína involucra la degradación de péptidos a productos más pequeños por la acción de las peptidasas.

El estudio de las peptidasas ha incluido el aislamiento y la caracterización bioquímica de las enzimas purificadas. Se incluyen: aminopeptidasas, dipeptidasas, tripeptidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas y peptidasas específicas para péptidos que contienen prolina. Todas han sido encontradas en diferentes especies de bacterias lácticas (29).

Los dipéptidos y oligopéptidos que contienen prolina no son hidrolizados por aminopeptidasas generales. Existen oligopéptidos ricos en prolina liberados de la caseína por la acción de proteinasas para los cuales las bacterias ácidos lácticas dependen de peptidasas específicas de prolina. La velocidad de hidrólisis de este tipo de péptidos depende del tipo de aminoácidos que se encuentren alrededor de la prolina (29,31).

Las peptidasas extracelulares son las enzimas que manifiestan actividad fuera de la membrana celular. Diversos autores han reportado peptidasas extracelulares: Sohaug *et al.* (49) purificaron una peptidasa de *S. lactis* que hidroliza dipéptidos pero no los que contienen glicina o prolina como aminoácido terminal. Shankar *et al.* (46) reportan peptidasas unidas a la superficie celular en *S. thermophilus* y Eggimann *et al.* (15) una aminopeptidasa de *L. lactis*.

Los estreptococos del grupo N contienen un gran número de peptidasas intracelulares que sirven para liberar todos los aminoácidos provenientes de péptidos derivados de la caseína. Se ha encontrado que *S. lactis ssp. diacetilactis* y *S. cremoris* contienen: di, tripeptidasas, aminopeptidasas-P, prolina iminopeptidasa y en general aminopeptidasas. Todas las peptidasas purificadas presentan un amplio grado de diversificación en pH, temperatura óptima y peso molecular, aunque la mayoría son sensibles al EDTA es decir, metalo enzimas (29).

Recientemente se han estudiado en detalle peptidasas de *Lactobacillus* que parecen tener

un mayor rango de actividad que las de los estreptococos del grupo N. En la Tabla 2.2 se muestran algunas características de enzimas proteolíticas purificadas de cepas de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Tabla 2.2 Enzimas proteolíticas purificadas de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

ENZIMA	pH	TEMP. OPTIMA (°C)	Tipo	PM* (kDa)	CEPA	REFERENCIA
Aminopeptidasa	7.0	50	Metalo	95	B14	(4)
Dipeptidasa	7.0	50	metalo	51	B14	(60)
X-Pro-DPAP ^b	6.5	45	serina	95	CNRZ 397	(3)
proteinasas	5.5	42	metalo	170	CNRZ 397	(30)
Aminopeptidasa	5.5	42	metalo	95	CNRZ 397	(2)

* PM: peso molecular.

^b X-Pro-DPAP: protil dipeptidil aminopeptidasa.

2.3.3.1 PAPEL DEL CALCIO EN LA SINTESIS DE ENZIMAS PROTEOLITICAS

El papel del calcio en la actividad proteolítica y en la síntesis de proteinasas en bacterias lácticas ha sido estudiado, sin que hasta la fecha se haya establecido un acuerdo al respecto.

Mills y Thomas (38) encontraron que la actividad proteolítica de *S. cremoris* y *S. lactis* era afectada por adición de iones de calcio. Exterkate (18) llegó a diferentes conclusiones acerca del papel del calcio, reportando que se liberan una cantidad constante de proteinasas al medio independientemente de la concentración de calcio existente. Terzaghi y Sandine (53) hicieron crecer *S. lactis* en un medio rico nutricionalmente (M17) pero con concentraciones bajas de

calcio y lo compararon con un crecimiento en leche. En ambos medios se produjeron células activas proteolíticamente pero en M17 no fueron sintetizadas dos proteínas. Esto sugiere una represión diferencial o desestabilización.

2.3.4 TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

Como otras bacterias, las lácticas pueden transportar activamente aminoácidos y péptidos a través de la membrana celular hacia dentro de la célula en contra del gradiente de concentración (31).

Las bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y los estreptococos del grupo N transportan los aminoácidos y péptidos mediante sistemas separados (31).

Existen fuertes evidencias de que *S. lactis* puede utilizar péptidos vía peptidasas unidas a la pared celular, o bien transportándolos intactos (36). Se han identificado 3 tipos de sistemas de transporte de aminoácidos en *Lactococcus* (14,42):

a) Transporte mediante la fuerza protón motriz. Se utiliza este sistema en la toma de L-metionina y de los aminoácidos ramificados L-leucina, L-isoleucina y L-valina; los aminoácidos neutros L-serina, L-treonina, L-alanina y glicina y los aminoácidos básicos L-lisina. La toma de L-histidina, L-cisteína, L-tirosina y L-fenilalanina pueden ser también por fuerza protón motriz. La L-prolina, sin embargo no es tomada en forma libre sino formando parte de péptidos.

b) Transporte unido a enlaces fostatos. Se lleva a cabo por la formación de enlaces de alta

energía mediante el uso de ATP o de metabolitos derivados de éste. Se han reportado para *Lactococcus* con este sistema la toma de glutamato, glutamina, asparagina y posiblemente aspartato.

c) Transporte por intercambio, el cual se ejemplifica por el sistema antiporte de arginina/ornitina presente en *L. lactis ssp. lactis*. La toma de la arginina y la excreción de la ornitina es ayudada por el gradiente de concentración de los dos aminoácidos.

2.4 BACTERIAS LACTICAS FILANTES

Las bacterias lácticas filantes son aquéllas que pueden sintetizar polímeros, los cuales suelen ser caracterizados por su localización relativa en la célula.

Algunas bacterias acumulan el polisacárido intracelularmente y otras afuera de la pared celular. El término polisacárido exocelular (EPS) fue propuesto por Sutherland (52) y se define, en términos generales, como todas aquéllas formas de polisacárido bacteriano que se excretan de la pared celular. Los polímeros extracelulares pueden formar parte de una cápsula firmemente unida a la superficie de la célula bacterial o puede ser observado como material viscoso desprendido o secretado por el microorganismo pero no unido a la célula (52).

Algunos microorganismos productores de polímero pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Este último es considerado como uno de los organismos lácticos más eficientes en la producción de polímeros. La dextrana fue el primer polisacárido microbiano producido industrialmente. En el caso de otras bacterias ácido lácticas el

problema más común en la producción de polisacárido es la pérdida gradual de la característica filante. Diversos autores han reportado que esta pérdida espontánea ha sido relacionada con la presencia de plásmidos inestables en bacterias lácticas mesófilas (41,58,59).

2.4.1 DETECCION Y CUANTIFICACION DE POLIMEROS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LACTICAS

La producción de polisacáridos por bacterias filantes se ha determinado por diversos métodos. La viscosidad y la consistencia se han utilizado como criterios para detectar su presencia. Otra metodología cualitativa ampliamente usada ha sido a partir de la formación de hebras al tocar el medio con la punta de una pipeta. Sólo recientemente, se ha intentado hacer más precisa la medición de polímero y no sólo a través de pruebas visuales (8, 12.). Manca de Nadra *et al.* (34) reporta un método basado en la absorción de yodo por el polisacárido producido. García-Garibay y Marshall (23) reportan el método denominado "Haze assay" basado en la medición espectrofotométrica de la turbidez producida por el polisacárido.

La medición de la viscosidad ha sido difícil de interpretar, particularmente para soluciones no-Newtonianas. La viscosidad en un medio líquido puede ser afectada no sólo por la cantidad de polímero presente, sino también por la presencia de otros productos metabólicos excretados en el medio. Por lo tanto un organismo puede producir la misma cantidad de polímero y el medio presentar diferentes características reológicas. Además se ha observado que la viscosidad medida disminuye cuando se prolonga el tiempo de incubación. Macura y Townsley (33) encontraron que la viscosidad decrece después de 24 horas de crecimiento celular, dependiendo del tipo de cepa. Se sugiere que una glucohidrolasa destruye el polisacárido y la viscosidad disminuye progresivamente en el caso de *S. thermophilus*.

2.4.2 BIOSÍNTESIS DE POLISACARIDOS

La biosíntesis de heteropolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas mesófilas y termófilas no se ha estudiado ampliamente. Sin embargo se puede asumir que la síntesis ocurre en la membrana citoplasmática y utiliza nucleótidos como precursores. Sutherland (52) propone un modelo para explicar la síntesis de exopolisacáridos en bacterias Gram-negativas. La producción de EPS involucra un número relativamente grande de enzimas, que incluyen UPD glucosa deshidrogenasa, glucosatransferasa, galactotransferasa I y II, ac. glucorónico transferasa y polimerasa.

2.4.3 COMPOSICION Y ESTRUCTURA QUIMICA DE POLISACARIDOS MICROBIANOS

Los exopolisacáridos no contribuyen por sí mismos a la estructura microbiana, ya que se ha observado que no se alteran otros componentes de la célula en su ausencia (52).

Las condiciones de crecimiento pueden afectar drásticamente la composición, propiedades físicas y organización del EPS en la superficie bacteriana.

Los EPS están compuestos principalmente por carbohidratos que pueden estar modificados con sustituyentes orgánicos e inorgánicos. De acuerdo con su composición básica existen los homopolisacáridos, formados por unidades repetidas de un mismo carbohidrato, y los heteropolisacáridos, formados por unidades de distintos monómeros de carbohidrato.

La mayoría de los polisacáridos microbianos son heteropolisacáridos. La cantidad de

estructuras es muy grande, por el número de posibles enlaces y configuraciones. Cada hexosa puede ser enlazada en forma α o β , los azúcares pueden estar en forma de piranosas o furanosas, y además pueden estar unidos en posición 2,3,4, o 6 (52).

Se han encontrado tres tipos de estructuras de homopolisacáridos; algunos son moléculas lineales neutras compuestos por el mismo tipo de enlace y también hay ramificados con el mismo o con diferentes tipos de enlaces (9).

Los heteropolisacáridos varían dependiendo del tamaño y del tipo de monosacáridos que los forman, se ha encontrado que pueden estar unidos a un ácido úronico, el cual es usualmente ácido D-glucurónico, y rara vez son ramificados.

Los homopolisacáridos más comunes son la celulosa microbiana producida por *Acetobacter xylinum*, el curdlan producido por *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* y especies de *Agrobacterium* y de *Rhizobium*, las dextranas sintetizadas por *L. mesenteroides* y *L. dextranicum* y las mutanas producidas por *S. mutans* y *S. sobrinus* (9).

En el caso de los PE producidos por las cepas de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* existe controversia sobre los azúcares que los componen. Para *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, Manca de Nadra *et al.* (34) reportaron que el polímero producido en medio sintético estaba compuesto por glucosa y fructosa en relación 1:1. Cerning *et al.* (7) reportaron que el heteropolisacárido estaba compuesto por galactosa, glucosa y ramnosa en una relación molar de 4:1:1 y su peso molecular fue de aproximadamente de 500 000 Da. Marshall (36) recupera un polímero formado por galactosa, glucosa, xilosa y residuos de ácidos úronico.

Se ha encontrado que *S. thermophilus* también produce un polisacárido exocelular.

Cerning *et al.* (8) reportaron que el polisacárido esencialmente estaba compuesto por galactosa, glucosa y pequeñas cantidades de xilosa, arabinosa, ramnosa y manosa. Doco *et al.* (13) determinaron la estructura del exopolisacárido producido en leche y encontraron que estaba compuesto por galactosa, glucosa y N-acetilgalactosamina en relación 2:1:1 con un peso molecular de 1×10^6 Da.

A pesar de no existir un acuerdo acerca de los azúcares que componen los polisacáridos producidos por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en la mayoría de los trabajos se ha reportado que esencialmente están compuestos por galactosa y glucosa. Se ha encontrado que en el polímero producido por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* la galactosa representa el 66.5% del total y el 52% en el producido por *S. thermophilus* (8).

Cerning *et al.* (8) reportaron que las cantidades de polisacárido producidas por *S. thermophilus* varían entre 50 y 340 mg/l con viscosidades de 40 a 240 mpa.s según el medio utilizado. Para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* las cantidades varían entre 60 y 425 mg/l con viscosidades que van de 3 a 220 mpa.s. Cuando las dos especies se asocian la concentración de polisacárido fue de 800 mg/l.

Otros estudios demuestran cómo influye la fuente de carbono en la producción de polisacárido por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Cuando está es glucosa o fructosa, el polisacárido se produce después de 3 horas de incubación. Si la fuente de carbono es lactosa o sacarosa, la síntesis de polisacárido ocurre después de 5 horas de incubación (34).

2.4.4 FUNCION DE LOS POLISACARIDOS MICROBIANOS

Existen diferentes teorías sobre el papel biológico del polímero producido por las bacterias. Algunos autores sugieren que su función es la de proteger a la célula contra la desecación y el ataque de fagos o como agente adhesivo (9,52).

No parece que los polímeros exocelulares funcionen como fuente de energía, dado que las bacterias filantes usualmente no son capaces de catabolizar el polímero que sintetizaron. La teoría de que el polímero funciona para proteger a la célula de condiciones adversas se ha intentado demostrar. Algunos autores reportan que la presencia del polímero disminuye el daño celular en *Streptococcus* durante su mantenimiento por congelación a -17°C (24).

Otros trabajos han demostrado que el polímero no es necesario para mantener la viabilidad de las células, ya que éste puede ser removido física o enzimáticamente sin un efecto adverso sobre el crecimiento bacteriano (8).

2.4.5 FACTORES GENETICOS ASOCIADOS A LA PRODUCCION DE POLISACARIDOS

La inestabilidad de la característica filante en bacterias ácido lácticas ha sido estudiada por diversos autores. En bacterias mesófilas esta pérdida espontánea de la capacidad de producción de polímero se ha relacionado con la presencia de plásmidos. Se ha reportado que en una cepa suiza de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* el fenotipo filante está ligado a un plásmido de 17 MDa (41). Otros trabajos han demostrado que en *Lactococcus lactis ssp. cremoris* la

presencia de un plásmido de 18.5 MDa está asociado con la expresión del fenotipo mucoso; el plásmido fue transferido a otro *Lactococcus* no mucoso para demostrar su función (58). Estudios recientes parecen indicar que la capacidad de producción de polímero está ligada a la presencia de plásmidos de varios tamaños en las bacterias ácido lácticas mesófilas (59).

En el caso de bacterias termófilas la característica filante no se encuentra ligada a plásmidos como en el caso de las bacterias mesófilas (45).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de un polisacárido exocelular por una cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de medios con diferente relación carbohidrato-proteína en la producción de polisacárido.

2. Determinar el efecto del uso de suero lácteo ultrafiltrado adicionado con triptona, caseína o casaminoácidos en la producción del polisacárido.

3. Estudiar el efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno en la producción del polisacárido.

4. Determinar el efecto de diferentes grupos de aminoácidos utilizados como fuente de nitrógeno en la producción del polisacárido.

5. Evaluar la actividad proteolítica de cepas filantes y no filantes de esta especie bacteriana para establecer su relación con la capacidad para producir polisacárido.

4. MATERIALES Y METODOS

La metodología experimental se resume en la Figura 4.1.

4.1 MICROORGANISMOS

Para la realización de esta investigación se utilizaron las cepas filantes NCFB 2772, NCFB 2483 y la cepa no filante NCFB 1489 de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* de la National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra.

4.2 CONFIRMACION DE LA IDENTIDAD DE LA CEPA

Para la identificación de la cepa en estudio se realizó una tinción de Gram, la prueba de la catalasa y la de fermentación de carbohidratos usando el sistema API 50 CHL (Bio-mérieux). Este sistema consta de cada uno de los 50 carbohidratos que se van a probar y contiene también púrpura de bromocresol, el cual en solución presenta un color púrpura a un pH neutro, cambiando a un color amarillo a pH menor de 5.8.

Se preparó el inóculo de la bacteria láctica para llevar a cabo la prueba con el sistema API 50 CHL. Previamente se le hizo crecer en agar MRS a 37°C durante 24 horas. Se tomaron las colonias de la bacteria con ayuda de un hisopo de algodón estéril y se sumergió en agua destilada estéril hasta formar una suspensión. Se agitó en un Vortex y se tomaron 1 ó 2 ml de esta suspensión y se adicionaron a 10 ml del medio API CHL. Se inoculó con una pipeta Pasteur en cada una de los tubos y cúpulas de los 50 carbohidratos. Se incubó a 37°C durante 7 días y fue examinada diariamente para observar cualquier cambio de color en el medio. Se detecta la fermentación por el cambio de color de púrpura a amarillo.

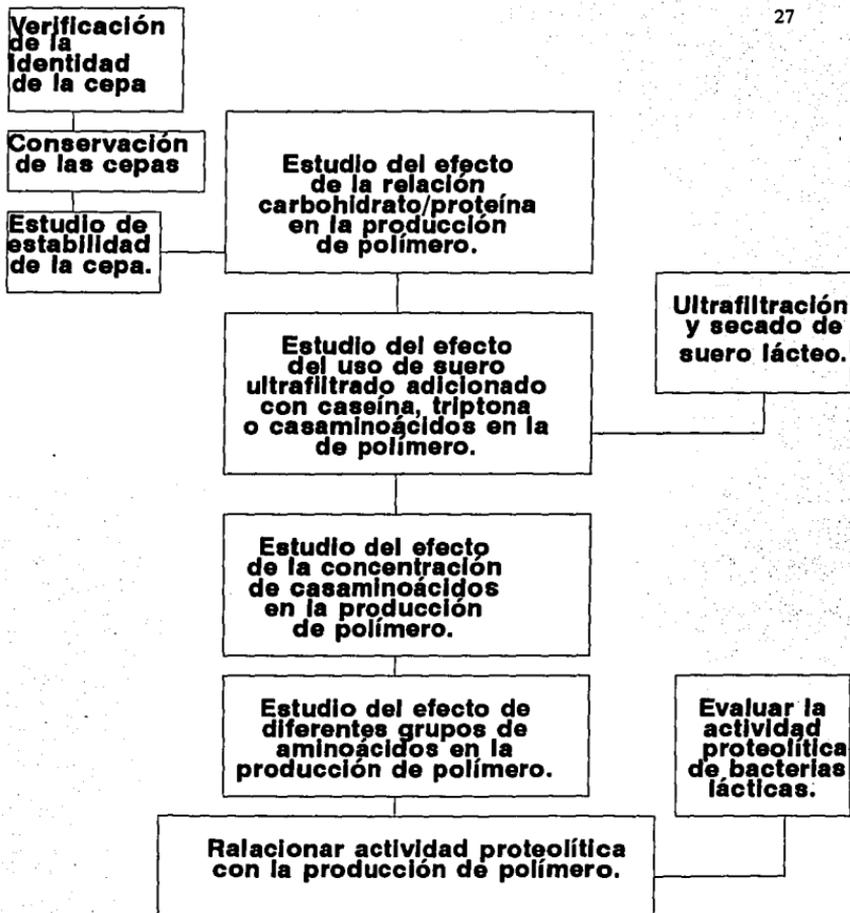


Figura 4.1 Diagrama Experimental.

4.3 CONSERVACION DE CEPAS

4.3.1 CONSERVACION A LARGO PLAZO

Para mantener los cultivos viables y libres de contaminación se utilizó el método de liofilización.

Para preparar los cultivos para la liofilización, las bacterias se inocularon en tubos de tapón de rosca con caldo MRS (Oxoid) más 2% de lactosa y se incubaron a 37°C durante 12-16 horas. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos; se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado de las células bacterianas con agua destilada estéril reemplazando el mismo volumen de medio, agitando y centrifugando de nuevo tres veces. Las bacterias ya lavadas se colocaron en ampollitas previamente esterilizadas y utilizando como medio de suspensión leche descremada bacteriológica (Oxoid) al 10% (p/v) esterilizada a 121°C durante 12 minutos y/o suero bovino (esterilizado por filtración al vacío a través de una membrana de 0.45 µm). Las muestras fueron congeladas rápidamente y se colocaron en una liofilizadora (marca RP-2V) de 2 a 3 días. Las ampollitas se sellaron a la flama y se mantuvieron en refrigeración (5°C). Para reconstituir los cultivos se abrieron las ampollitas asépticamente y se agregó leche descremada estéril al 10% (p/v).

Para determinar el efecto del método de conservación sobre la producción de polisacárido se diseñó un experimento factorial. Este diseño se aplica cuando se desea estudiar el efecto de 2 o más variables simultáneamente. Las dos variables fueron: el medio de suspensión para la liofilización (leche y suero bovino) y el tiempo de conservación de la cepa. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa de estadística para Ciencias Sociales (SPSS, Chicago IL 60611, USA).

4.3.2 CONSERVACION A CORTO PLAZO

Los cultivos se conservaron por medio de resiembras mensuales en leche descremada bacteriológica (Oxoid) al 10% (p/v), esterilizada a 121°C por 12 minutos. Se inocularon al 1% (v/v) con el cultivo anterior, se incubaron a 37°C durante 12-16 horas y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 5°C.

4.4 PREPARACION DE INOCULOS

Para la preparación de los inóculos se utilizó leche descremada (Sveltes) al 10% (p/v), esterilizada a 121°C durante 12 minutos. Se inoculó al 1% (v/v), se incubaron durante 12-16 horas a 37°C. Como la característica filante en estas cepas es muy inestable se verificó antes de cada experimento que la producción del polímero del cultivo utilizado fuera de 0.10 a 0.12 mg eq dex/ml con un crecimiento de 1 a 3×10^4 ufc/ml.

Todos los inóculos se prepararon un día antes de llevar a cabo la fermentación, con el fin de contar con cultivos frescos.

4.5 ANALISIS

4.5.1 CUANTIFICACION DEL POLIMERO

La técnica empleada para la determinación del polímero fue la descrita por García Garibay (22). Se tomaron 6 ml de muestra y se agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 80%, se

agitó en un vortex y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. Se mezclaron 2 ml de sobrenadante con un volumen igual de etanol absoluto y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agitó y se leyó la turbiedad producida en el medio en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 720 nm. La concentración de polímero se reportó como miligramos equivalentes de dextrana (mg eq dex). Un miligramo equivalente de dextrana se define como la cantidad de polímero que produce la misma turbidez a 720 nm que 1 mg de dextrana (peso molecular de 2×10^6 Da) bajo las mismas condiciones.

4.5.2 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO

La población bacteriana en leche y otros medios derivados de ésta, se determinó por el método descrito por Kanasaki *et al.* (27). Este método permite estimar la población bacteriana en un cultivo lácteo a partir de turbidimetría después de la solubilización de las micelas de caseína a temperaturas bajas con hidróxido de sodio y EDTA.

Se tomaron 5 ml de muestra, se agregaron 0.1 ml de NaOH (10 M) y 10 ml de EDTA (0.2%) a 0-5°C. Se agitó en un vortex y se mezcló 1 ml de esta muestra con 2 ml de EDTA (0.2%). Ésta solución se agitó nuevamente. Se leyó la turbiedad producida en el medio en espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm, usando EDTA al 0.2% en la celda de referencia. Para determinar el crecimiento celular se utilizó una curva patrón entre las unidades formadoras de colonia (ufc) y la absorbancia producida por la muestra a 480nm.

La curva patrón fue construída de la siguiente manera: Se utilizó leche descremada (Sveltes) esterilizada a 121°C durante 12 minutos, se inoculó al 10% (v/v) y se incubó a 37°C durante seis horas. Se tomaron dos muestras de cultivo cada hora, con una se realizó una cuenta

en placa en agar MRS a 37°C durante 48 horas y con la otra se siguió el tratamiento de la muestra descrita por la técnica.

4.5.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Para la determinación de la actividad proteolítica se empleó la técnica de Fukumoto *et al.* (19). Se mezclaron 1 ml de muestra y 2 ml de caseína al 2% en amortiguador de fosfatos a pH 7. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 4 ml de ácido tricloroacético al 5% y se centrifugaron las muestras a 8000 rpm durante 10 minutos. Con el sobrenadante, se siguió el tratamiento de la muestra por la técnica de Lowry (32) utilizando una curva patrón de tirosina. La actividad proteolítica se reportó en microgramos de tirosina liberados por mililitro.

4.6 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

4.6.1 ESTABILIDAD EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

El mayor problema que se presenta cuando se trabaja con bacterias lácticas mucoides es la naturaleza transitoria de la característica filante, la cual ha sido reportada por diversos autores (22,45). Debido a esta inestabilidad en la producción del polímero fue necesario determinar cómo variaba ésta con el número de resiembras para establecer las condiciones de preparación del inóculo, ya que el objetivo de este trabajo fue comparar la producción del polisacárido en diferentes medios de crecimiento.

Se reconstituyó la cepa liofilizada 2772 NCFB de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en leche descremada (Sveltes) al 10% (p/v) esterilizada a 121°C durante 12 minutos. Se incubó a 37°C durante 12-16 horas y se determinó la producción de polímero por la técnica descrita anteriormente. Se realizaron 8 resiembras bisemanales bajo las mismas condiciones.

Se realizó un análisis simple de varianza para determinar el efecto del número de resiembras en la producción de polímero.

4.6.2 EFECTO DE MEDIOS CON DIFERENTE RELACION CARBOHIDRATO/PROTEINA EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

Se estudió el efecto de medios con diferente relación carbohidrato/proteína (C/P) en la producción de polímero, para lo cual se utilizaron como medios: leche descremada Sveltes al 10%, un concentrado proteico (importado por Arancia S.A., New Zeland Dairy Poart) rehidratado al 10% (p/v), suero lácteo al 7% (p/v) obtenido de la elaboración de queso tipo Chihuahua (Kem Fuds S.A., México), y suero al 7% (p/v) adicionado con 3% de casaminoácidos con una relación C/P de 2. La composición química de los materiales utilizados como medios se reportan en la Tabla 4.1.

La leche descremada, el concentrado proteico y el suero lácteo fueron esterilizados a 121°C durante 12 minutos. Los casaminoácidos fueron disueltos en agua destilada y esterilizados por filtración al vacío a través de membrana de 0.45 µm. Se realizaron fermentaciones por triplicado en matraces Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de medio y con tapones de algodón. Se inoculó cada medio con 10% (v/v) de cultivo de la cepa filante NCFB 2772 de *L. delbrueckii ssp.*

bulgaricus y se incubaron a 40°C, sin agitación por 6 horas. Cada hora se determinó la producción de polímero y el crecimiento bacteriano por las técnicas descritas anteriormente.

Tabla 4.1 Composición química de los medios (%)^a

COMPONENTE	SUERO LACTEO	CONCENTRADO PROTEICO	LECHE
Humedad	3.0	2.7	3.0
Sólidos totales	97.0	97.3	97.0
proteína	3.7 ^b		
	12.0 ^c	62.7 ^c	32.0 ^c
Carbohidratos ^d	74.3	31.0	60.8
Relación C/P ^e	6.2	0.5	2.0

^a Datos proporcionados por la QFB Diana Labastida P. (comunicación personal)

^b Proteína soluble determinada por método de Lowry.

^c Proteína determinada por método de Kjeldahl. Proteína= N₂ x Factor(6.38)

^d Azúcares totales por método de Fenol sulfúrico.

^e Relación carbohidratos/proteínas.

Para determinar el efecto de medios con diferente relación carbohidrato/proteína en la producción de polímero se realizó un diseño estadístico "Split plot". Este diseño es similar al factorial pero, es utilizado cuando una de las variables se desea evaluar con mucha precisión. Las dos variables en estudio fueron: relación C/P y el tiempo. Las variables de respuesta fueron: producción de polímero y crecimiento.

4.6.3 EFECTO DEL USO DE SUERO LACTEO ULTRAFILTRADO ADICIONADO CON AMINOACIDOS, TRIPTONA O CASEINA EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

Para el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de polímero fue necesario contar con un medio con todos los componentes de la leche pero libre de la fuente de nitrógeno, para lo cual se utilizó un suero de quesería que provenía de la elaboración de queso panela. Se pasteurizó 20 minutos a 80°C y se sometió a un proceso de ultrafiltración para

eliminar la mayor parte de las proteínas, trabajando así con el permeado. Se utilizó un ultrafiltro Romincon HF-LAB-5 con una membrana de fibra hueca de polisulfona, con un límite de exclusión molecular de 10000 Dalton, a temperatura ambiente y una presión de entrada y salida de 25 y 10 libras por pulgada cuadrada, respectivamente. Se sometió a un proceso de secado en un secador de espreas (Atomizador Niro) para tener un lote de este suero para todos los experimentos programados.

Se realizó un análisis químico proximal del suero lácteo ultrafiltrado (SUF) y su composición química se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Composición química del suero ultrafiltrado.

COMPONENTE	(%)	TECNICA
Humedad	3.0	Diferencia de sólidos totales
Sólidos totales	97.0	Estufa al vacío (1)
Proteína	2.9	Método de Lowry (32)
Carbohidratos	87.4	Por Diferencia
Grasa	1.7	Método de Goldfish (1)
Cenizas	5.0	Método general de incineración (1)

Para determinar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de polímero y el crecimiento de la bacteria, se realizaron fermentaciones por triplicado utilizando como medio base un suero lácteo ultrafiltrado al 6.5% (p/v) y se agregaron al 3.5% (p/v): casaminoácidos (Difco), triptona que es una peptona de caseína (Oxoid) y caseína (Difco). También se utilizó leche descremada Svelts al 10% para comparar el comportamiento de la bacteria. La caseína y los casaminoácidos fueron esterilizados por filtración al vacío a través de una membrana de 0.45 μm . La leche, la triptona y el suero lácteo fueron esterilizados a 121°C durante 12 minutos para evitar la caramelización de los azúcares presentes. Se realizaron

fermentaciones por triplicado en matraces Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de medio y con tapones de algodón. Se inocularon con 10% de cultivo de la cepa NCFB 2772 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, se incubaron a 40°C, sin agitación y por 6 horas. Se determinó la producción del polímero y el crecimiento cada hora.

Para evaluar el efecto de los casaminoácidos, la triptona y la caseína utilizados como fuente de nitrógeno para la producción del polímero y el crecimiento de la bacteria se realizó un diseño estadístico "Split plot".

4.6.4 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CASAMINOACIDOS EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

Para el estudio del efecto de la concentración de casaminoácidos en la producción del polímero. Se utilizó como medio base el suero ultrafiltrado al 6.5% (p/v), se esterilizó a 121°C durante 12 minutos y se adicionaron diferentes concentraciones de casaminoácidos (Difco): 0.10%, 0.25%, 0.50%, 1.50%, 2.50% y 3.50%. Los casaminoácidos se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración al vacío a través de una membrana de 0.45 µm. Se realizaron fermentaciones por triplicado en matraces Erlenmeyer (250 ml) con 100 ml de medio y con tapones de algodón. Se inocularon al 10% y se incubaron a 40°C, sin agitación durante 6 horas. Cada hora se determinó el crecimiento bacteriano y la producción de polímero.

4.6.5 EFECTO DE DIFERENTES GRUPOS DE AMINOACIDOS EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE POLIMERO

Para el estudio del efecto de diferentes grupos de aminoácidos en el crecimiento y producción de polímero, se llevó a cabo el diseño utilizado para estudios de auxotrofia en bacterias que han sufrido alguna mutación, descrito por Sherman *et al.* (47). Se probaron 20 aminoácidos y se determinó qué grupo o aminoácido es utilizado por este microorganismo. Las combinaciones de aminoácidos usadas se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Grupos de aminoácidos probados como fuente de nitrógeno.

I	II	III	IV	V	
Gly	Asn	Cys	Met	Gln	VI
His	Leu	Ile	Val	Lys	VII
Phe	Tyr	Trp	Thr	Pro	VIII
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg	IX

Fuente: Sherman *et al.*(47)

Este experimento permite conocer si alguno de estos grupos de aminoácidos (I,II,III...IX) son requeridos por la bacteria, y si existen dos grupos útiles, entonces la intersección de ambos nos dice el aminoácido necesario para que la bacteria pueda crecer y producir polímero.

Se utilizó como medio base el suero lácteo ultrafiltrado al 6.5% (p/v), se esterilizó a 121°C durante 12 minutos y se mezcló con 0.1% de casaminoácidos, y con cada uno de los nueve grupos de aminoácidos (Merck) mostrados en la tabla 4.3, a una concentración final de 0.1 mg/ml. También se estudió la condición X, la cual contenía el suero con 0.1% de casaminoácidos y la condición XI en la que solamente se colocó el suero lácteo ultrafiltrado. Los casaminoácidos y cada uno de los diferentes grupos de aminoácidos se disolvieron previamente en agua destilada y se esterizaron por filtración al vacío a través de una membrana de 0.45 μm . Se ajustó el pH a

6.5 con hidróxido de sodio al 10 M o con ácido clorhídrico 1 N.

Se realizaron fermentaciones por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio. Se inocularon al 10% (v/v) y se incubaron a 40°C sin agitación durante 6 horas. Se determinaron el crecimiento y la producción de polímero.

4.6.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CEPAS FILANTES Y NO FILANTES DE *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*

Para establecer si existía relación entre la actividad proteolítica y la capacidad de producción del polímero en *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, se determinaron las actividades proteolíticas de las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483 y la no filante NCFB 1489, así como la producción del polímero y su crecimiento.

Se realizaron fermentaciones utilizando como medio leche descremada Sveltes al 10%, esterilizada a 121°C durante 12 minutos y se inoculó con 10% de precultivo. Se incubó a 40°C sin agitación durante 6 horas y cada dos horas se determinaron el crecimiento bacteriano, la producción del polímero y la actividad proteolítica de cada una de las cepas.

Para establecer el efecto de la actividad proteolítica de la bacteria láctica en la producción del polímero y en el crecimiento se realizó un análisis estadístico "Split Plot". Las variables en estudio fueron el tipo de cepa (filante y no filante) y el tiempo. Las variables de respuesta fueron: la producción del polímero, el crecimiento y la actividad proteolítica.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 VERIFICACION DE LA IDENTIDAD DE LAS CEPAS

Se trabajó con las cepas NCFB 2772, NCFB 2483 y NCFB 1489 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* las cuales son bacterias Gram positivas y catalasa negativas.

Se determinó el patrón de fermentación de las cepas utilizadas con el sistema API CHL, encontrándose que las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483 fermentaron la D-glucosa, D-fructosa, D-manosa y lactosa, mientras que la cepa no filante NCFB 1489 solamente fermentó D-glucosa, D-fructosa y lactosa. Estas características corresponden con las señaladas por la National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra.

5.2 CONSERVACION DE LOS CULTIVOS

Para este estudio se requería un lote de cultivos viables que permitiera abastecernos de la bacteria filante sin las variaciones que podrían inducirse por las constantes resiembras realizadas en el laboratorio, por lo que se utilizó el método de liofilización para su conservación. Se probaron dos diferentes medios soporte: leche y suero bovino. En la Figura 5.1 se muestra la producción del polímero de cada mes, durante un año de la cepa liofilizada, utilizando ambos medios de suspensión. No se encontraron diferencias significativas en la producción del polímero ($p > 0.05$) entre los dos medios de suspensión ni entre las muestras analizadas en ese período de tiempo. Después del primer mes de conservación de la cepa se encontró una producción del polímero de 0.15 mg eq dex/ml para los dos medios soportes utilizados. A partir del segundo mes la producción del polímero varió en el rango de 0.12 a 0.15 mg eq dex/ml. Por lo que se considera que la liofilización como método de conservación fue adecuado ya que no afectó la

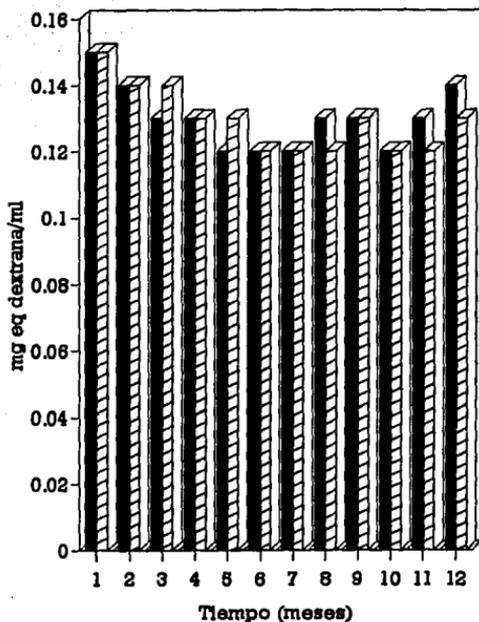


Figura 5.1 Producción total de polímero por cepas hioflizadas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, utilizando dos medios de suspensión: suero bovino (▨) y leche (■); reconstituídas en leche descremada e incubadas durante 12 horas a 40 °C. Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de ± 0.01 a ± 0.018 .

capacidad de producción del polímero de la bacteria, durante este período de tiempo.

5.3 ESTABILIDAD EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

El mayor problema que se presenta cuando se trabaja con bacterias lácticas mucoides es la naturaleza transitoria de la característica filante, que ha sido reportada por diversos autores (22,45). Debido a esta inestabilidad en la producción del polímero fue necesario determinar cómo variaba ésta con el número de resiembras para establecer las condiciones de preparación del inóculo, ya que el objetivo de este trabajo era comparar la producción de polisacárido en diferentes medios de crecimiento.

Se partió de un cultivo liofilizado de la cepa NCFB 2772 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y se encontró que la producción del polímero se incrementó durante las primeras resiembras, hasta que alcanzó su máximo en la cuarta transferencia, después de la cual la producción disminuyó. Al realizar un análisis de varianza, se encontró que el número de resiembras tiene un efecto significativo ($p < 0.01$) en la producción del polímero. Después de la primera resiembra se obtuvo una producción de 0.02 mg eq dex/ml y no se observó la formación de filamentos al tocar el medio de cultivo con una asa (método visual utilizado para determinar la presencia del polímero). La concentración se incrementa hasta llegar a la cuarta resiembra, cuando se obtuvo el valor máximo de 0.12 mg eq dex/ml, para posteriormente descender hasta 0.015 mg eq dex/ml en la octava (Tabla 5.1).

Algunos autores han reportando un comportamiento similar para esta misma cepa bacteriana (22,45).

Tabla 5.1 Cambios en la producción del polímero en la cepa NCFB 2772 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

NUMERO DE RESIEMBRAS	PRODUCCION DE POLIMERO (mg eq dex/ml)	PORCENTAJE DE PRODUCCION(a)
1	0.022	+18
2	0.045	+38
3	0.085	+71
4	0.120	100
5	0.100	-17
6	0.065	-46
7	0.055	-54
8	0.015	-87

(a) Porcentaje de aumento (+) o de reducción (-) en la producción de polímero con respecto a la cuarta resiembra donde se obtuvo el valor máximo.

5.4 EFECTO DE LA RELACION CARBOHIDRATO/PROTEINA EN LA PRODUCCION DEL POLIMERO

La mayoría de los estudios realizados acerca de microorganismos productores de exopolisacáridos se refieren al efecto de la fuente de carbono sobre la composición y tiempo de producción de polímero (9,34,52). Sin embargo, el efecto de la fuente de nitrógeno ha sido muy poco estudiada.

Se estudió el efecto de medios de cultivo con diferente relación carbohidrato/proteína en la capacidad de producción del polímero en la cepa NCFB 2772 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, ya que diversos autores reportan (52) que el balance entre el substrato utilizable y el nutriente limitante es importante para la producción del polímero. Se menciona que usualmente los carbohidratos deben estar presentes en cantidades adecuadas o en exceso y que la limitación

de nitrógeno puede estimular la producción de polímero.

Se trabajó con cuatro medios con diferente relación carbohidrato/proteína: leche ($C/P=2$), un concentrado proteico ($C/P=0.5$), suero lácteo ($C/P=6$) y suero con casaminoácidos ($C/P=2$).

En la Figura 5.2 se observa que durante las primeras 3 horas de la fermentación la producción total de polímero fue mayor en el suero con casaminoácidos comparado con los otros medios utilizados; sin embargo, a partir de la tercera hora la producción de polímero se mantuvo constante en este medio y se incrementó en los medios sin casaminoácidos. De esta manera, en el suero con casaminoácidos el 91% de la producción de polímero se llevó a cabo durante las primeras 3 horas, mientras que en el concentrado, la leche y el suero la mayor producción de EPS fue durante las últimas tres horas (81%, 52% y 62% respectivamente).

Cowie (12) reportó que la producción de polímero por la cepa Lb335 de *L. bulgaricus* se estimuló por la presencia del calcio. Esto ayuda a entender lo observado en este trabajo, ya que el comportamiento registrado en los diferentes medios puede estar relacionado con la presencia de este ion, ya que el concentrado y la leche lo contienen, y esto permite que la producción total de polímero al final de la fermentación sea mayor que en los otros medios (suero y suero con casaminoácidos), los cuales lo contienen en una concentración mínima.

A las 6 horas de la fermentación, la producción total del polímero fue mayor en el concentrado proteico ($C/P=0.5$) 0.077 mg eq dex/ml, seguido de la leche ($C/P=2$) con 0.057 mg eq dex/ml, el suero con casaminoácidos ($C/P=2$) con 0.045 mg eq dex/ml y el suero solo ($C/P=6$) con 0.026 mg eq dex/ml.

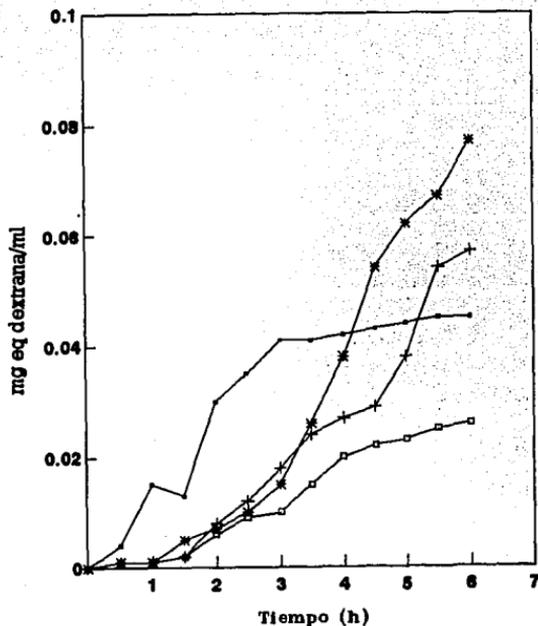


Figura 5.2 Producción total de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en medios con diferente relación carbohidrato/proteína: suero con casaminoácidos C/P=2 (*), leche C/P=2 (+), concentrado proteico C/P= 0.5 (*), suero C/P= 6 (□). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 5 \times 10^{-3}$ a $\pm 3 \times 10^{-3}$.

Cerning *et al.* (8) observaron la misma producción de polímero (60mg/l) de la cepa CNRZ 416 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en leche ultrafiltrada adicionada con 1% de casaminoácidos y en leche descremada. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, ya que en el concentrado se registró una mayor producción de polímero comparando con leche. Es posible que lo observado por Cerning *et al.* (8) sea debido a que en el caso de la leche ultrafiltrada la temperatura de incubación fue de 32°C y en el de la leche descremada de 42°C, que es la temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria.

Por otro lado, también se observó un efecto significativo ($p < 0.01$) de la relación C/P en el crecimiento de la bacteria. En la Figura 5.3 se puede observar que en la primera hora de la fermentación no existió diferencia significativa en el crecimiento de la bacteria en los diferentes medios, pero a partir de la segunda hora y hasta el final de la fermentación el crecimiento en el concentrado proteico fue mayor comparado con los otros medios utilizados. De esta manera, al finalizar la fermentación (sexta hora), en el concentrado proteico el crecimiento llegó hasta 1×10^9 ufc/ml y la población bacteriana registrada en suero (7.4×10^7 ufc/ml), leche (1.1×10^8 ufc/ml), y suero con casaminoácidos (7.9×10^7 ufc/ml) no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$).

Diversos autores (11,39,50) han reportado un efecto buffer del concentrado proteico, debido a que no sólo se incrementa la concentración de las proteínas sino también de calcio, fosfatos, potasio, sodio y magnesio. Estudiando el crecimiento de bacterias lácticas en leche ultrafiltrada, reportan que cuando crecen en el concentrado se requiere de un tiempo mayor que en la leche para reducir el pH, debido al mencionado efecto buffer. Por otro lado, encuentran que la población final de bacterias es mayor en el concentrado (10^{11} ufc/ml) que en una leche control (10^9 ufc/ml), debido a que en el concentrado el pH se mantiene cercano a 6 durante un mayor lapso de tiempo. Es posible entonces que este efecto haya influido en las mayores poblaciones

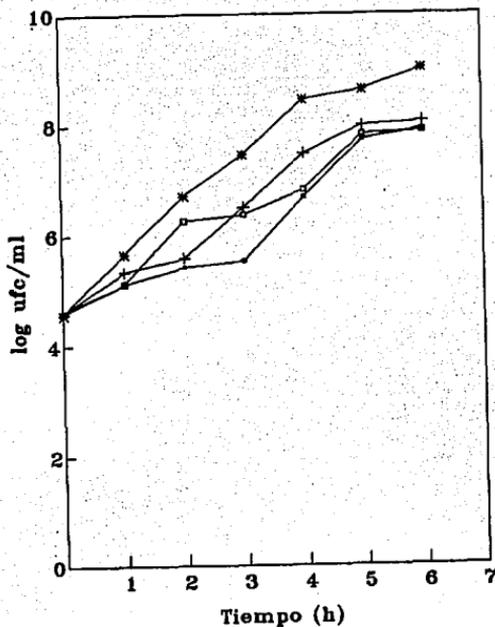


Figura 5.3 Cinética de crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en medios con diferente relación carbohidrato/proteína: suero con casaminoácidos C/P=2 (°), leche C/P=2 (+), concentrado proteico C/P= 0.5 (*), suero C/P= 6 (II). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de ± 0.01 a ± 0.12 .

registradas en el concentrado comparadas con los otros medios, incluyendo a la leche.

El uso de los medios con las diferentes relaciones carbohidrato/proteína presentó un efecto significativo ($p < 0.01$) en la producción específica del polímero, la cual indica la cantidad del polímero producida por unidades formadoras de colonias (ufc). En la Figura 5.4 podemos observar que durante las tres primeras horas de la fermentación la producción específica del polímero en el suero con casaminoácidos fue la mayor (1.2×10^{-7} mg eq dex/ufc), seguida de la leche (0.51×10^{-8} mg eq dex/ufc), el suero (0.43×10^{-8} mg eq dex/ufc) y por último el concentrado proteico (0.05×10^{-8} mg eq dex/ufc). Sin embargo, a partir de la cuarta hora no existió diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los diferentes medios.

De los resultados anteriores se desprende que la relación carbohidrato/proteína de los diferentes medios utilizados no fue importante en la producción del polímero, ya que la mayor producción total observada en el concentrado proteico ($C/P=0.5$) se debió al mayor crecimiento de la bacteria, mientras que en el caso del suero con casaminoácidos, la mayor producción total y específica del polímero registrada durante las primeras horas de la fermentación no se debió a su relación C/P, que era igual a la de la leche, sino al grado de hidrólisis de la fuente de nitrógeno, por lo que su comportamiento será analizado más adelante.

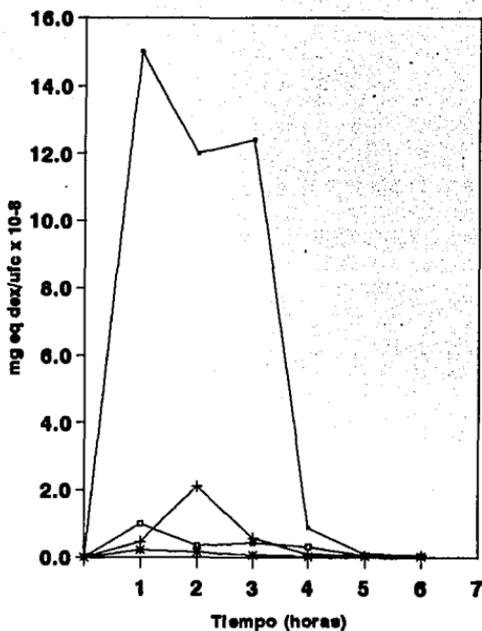


Figura 5.4 Producción específica de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en medios con diferente relación carbohidrato/proteína: suero con caseína C/P=2 (*), leche C/P=2 (+), concentrado proteico C/P=0.5 (^), suero C/P=6 ([]). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 1.1 \times 10^{-11}$ a $\pm 4.8 \times 10^{-7}$.

5.5 EFECTO DEL USO DE SUERO ULTRAFILTRADO ADICIONADO CON CASAMINOACIDOS, TRIPTONA O CASEINA EN LA PRODUCCION DE POLIMERO

Las bacterias lácticas requieren hidrolizar su fuente de nitrógeno para la utilización de los aminoácidos que necesitan para su crecimiento. En el experimento anterior se observó una mayor producción específica del polímero cuando el medio contenía la fuente de nitrógeno hidrolizada. Debido a esto se estudió el efecto de medios con diferentes fuentes de nitrógeno y se utilizó como medio base un suero lácteo ultrafiltrado (SUF) adicionado con: casaminoácidos, triptona, caseína y se comparó con leche. Los diferentes medios utilizados presentaron un efecto significativo ($p < 0.01$) sobre la producción total del polímero. En la Figura 5.5 se observa que la producción del polímero en el suero lácteo ultrafiltrado (SUF) con casaminoácidos y SUF con triptona durante las tres primeras horas de fermentación fue mayor comparada con la leche y con el SUF con caseína; sin embargo a partir de la cuarta hora la concentración permaneció prácticamente constante: de 0.040 a 0.044 mg eq dex/ml en el SUF con casaminoácidos y de 0.035 a 0.040 mg eq dex/ml en el SUF con triptona. En el caso de la leche y del SUF con caseína la producción del polímero no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$), por lo que la tendencia es similar. Durante las tres primeras horas de fermentación la producción de polímero fue mínima en estos dos medios y a partir de la cuarta hora se incrementó de 0.025 a 0.057 mg eq dex/ml en SUF con caseína y de 0.027 a 0.064 mg eq dex/ml en leche. Al finalizar la fermentación se encontró que la mayor concentración del polímero fue en la leche con 0.064 mg eq dex/ml, seguido de SUF con caseína con 0.057 mg eq dex/ml, SUF con casaminoácidos con 0.044 mg eq dex/ml y por último SUF con triptona con 0.040 mg eq dex/ml.

En lo referente al crecimiento, también existió un efecto significativo ($p < 0.01$) por las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas. En la primera hora de fermentación no existió

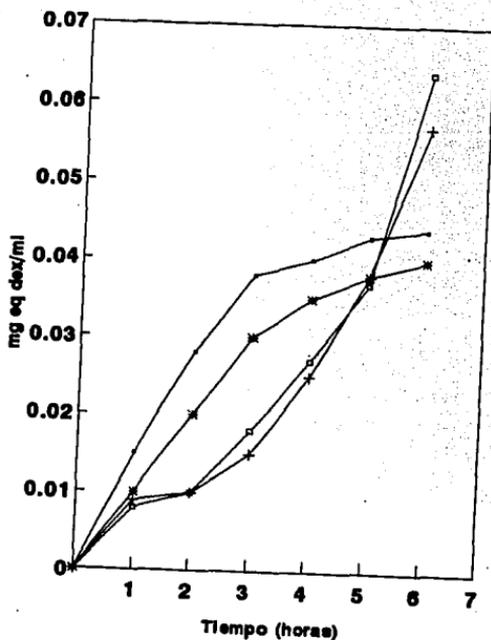


Figura 5.5 Producción total de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en diferentes fuente de nitrógeno: leche (II) y suero lácteo ultrafiltrado adicionado con caseína (°), triptona (*), caseína (+). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 5.2 \times 10^{-4}$ a $\pm 2 \times 10^{-3}$.

diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el crecimiento en SUF con triptona, SUF con caseína y SUF con casaminoácidos (Figura 5.6) pero a partir de la segunda hora y hasta el final de la fermentación el crecimiento registrado en la leche y SUF con caseína fue muy parecido y no presenta diferencia significativa. Por otro lado el crecimiento en los medios con la fuente de nitrógeno más hidrolizada: SUF con casaminoácidos y SUF con triptona, fue similar entre sí y no presentaron diferencia significativa durante las 6 horas de la fermentación. Al finalizar la fermentación se obtuvieron las siguientes cuentas: en el SUF con casaminoácidos de 2.9×10^7 ufc/ml, en el SUF con triptona de 9.1×10^7 ufc/ml, en el SUF con caseína de 1.5×10^8 ufc/ml y en leche 5.2×10^8 ufc/ml.

Las mayores producciones específicas se registraron en los medios que tenían la fuente de nitrógeno más disponible: el SUF con casaminoácidos y el SUF con triptona, mientras que en leche y en SUF con caseína las producciones fueron menores.

En la Figura 5.7 se puede observar que durante las tres primeras horas de la fermentación la producción específica del polímero fue mayor en el SUF con casaminoácidos (5.24×10^{-8} mg eq dex/ufc) y en el SUF con triptona (3.95×10^{-8} mg eq dex/ufc). A partir de la cuarta hora ésta empezó a descender, y al llegar a la sexta hora las producciones específicas fueron de 0.15 y 0.039×10^{-8} mg eq dex/ufc en el SUF con casaminoácidos y SUF con triptona respectivamente. En el caso de la leche y SUF con caseína estas fueron mínimas durante las seis horas de fermentación. De esta manera, a las tres horas las producciones específicas fueron de 0.17 y 0.042×10^{-8} mg eq dex/ufc en SUF con caseína y leche respectivamente, y a las 6 horas se registraron producciones de 0.039 y 0.011×10^{-8} mg eq dex/ufc, respectivamente.

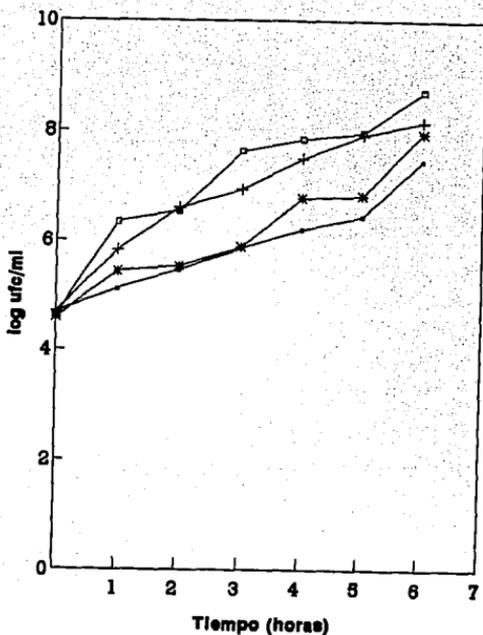


Figura 5.6 Cinética de crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en diferentes fuentes de nitrógeno: leche (□) y suero lácteo ultrafiltrado adicionado con casaminoácidos (*), triptona (+), caseína (x). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de ± 0.01 a ± 0.1 .

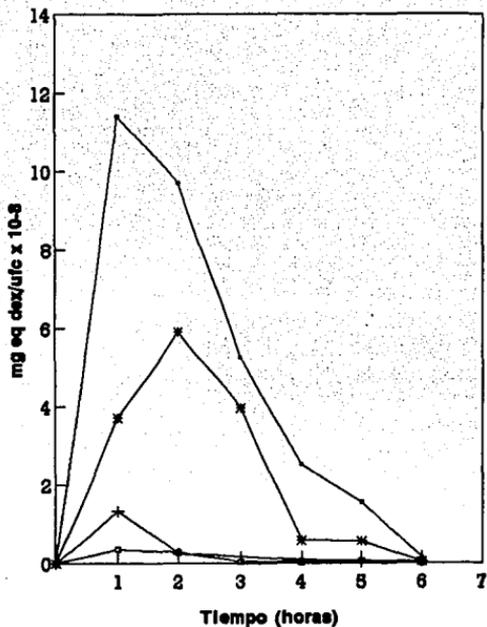


Figura 5.7 Producción específica de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en diferentes fuentes de nitrógeno: leche (II) y suero lácteo ultrafiltrado adicionado con caseinóidos (•), triptona (*), caseína (+). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 1.5 \times 10^{-11}$ a $\pm 4 \times 10^{-9}$.

Aunque no se conoce con exactitud el grado de hidrólisis de cada fuente de nitrógeno estudiada, es evidente que el de los casaminoácidos es mayor que el de la triptona y el de la caseína. Se puede concluir que el grado de hidrólisis es importante en la producción del polímero, ya que en los medios en los cuales se utilizaron casaminoácidos y triptona se observó que el polímero se produjo en mayor cantidad durante las primeras horas de la fermentación. Estos resultados concuerdan con los de otro trabajo (22) con la cepa NCFB 2772 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en el cual se encontró que la hidrólisis de la caseína de la leche estimuló el crecimiento y la producción específica del polisacárido durante las primeras horas de fermentación.

5.6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CASAMINOACIDOS EN LA PRODUCCION DE POLIMERO

Se estudió el efecto de la concentración de casaminoácidos en la producción del polímero, encontrando que tiene un efecto significativo ($p < 0.01$).

En la Figura 5.8 se puede observar que a mayor concentración de casaminoácidos en el medio de cultivo, la producción total del polímero por *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* fue mayor. Cuando la concentración fue de 3.5% se registraron las mayores producciones totales del polímero, siendo de 0.025 mg eq dex/ml en la primera hora a 0.061 mg eq dex/ml en la sexta hora; con las concentraciones de 1.5% y 2.5% no se registraron diferencias significativas entre sí y se encontraron producciones de 0.040 y 0.042 mg eq dex/ml a la sexta hora respectivamente; con la concentración de 0.5% se registraron producciones de 0.033 mg eq dex/ml al finalizar la fermentación y las menores fueron en las concentraciones de casaminoácidos de 0.1% y

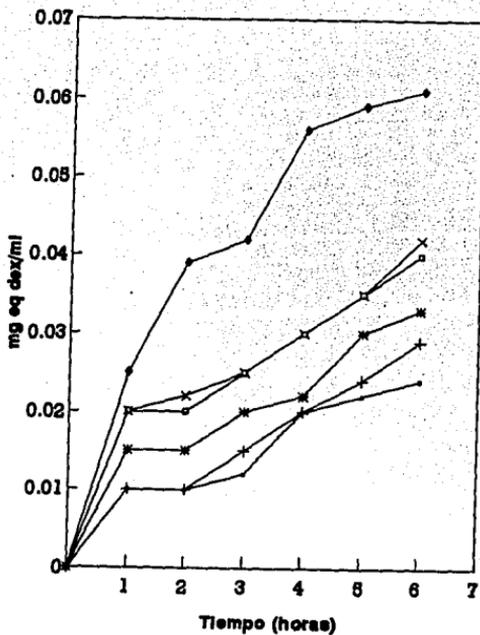


Figura 5.8 Producción total de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* a diferentes concentraciones de casaminoácidos: 0.1% (●), 0.25% (+), 0.50% (*), 1.5% (□), 2.5% (x), 3.5% (◊). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 6 \times 10^{-4}$ a $\pm 2.5 \times 10^{-3}$.

0.25%, sin existir diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambas durante las seis horas de fermentación.

En lo referente al crecimiento de la bacteria, existió también un efecto significativo ($P < 0.01$) de la concentración de casaminoácidos. En la Figura 5.9 se observa que durante las tres primeras horas de la fermentación los mayores crecimientos se encuentran a las concentraciones de casaminoácidos de 3.5%, 2.5% y 1.5% (3.3×10^4 , 2.1×10^5 y 1.2×10^5 ufc/ml respectivamente) y no existió diferencia significativa entre éstas; los menores crecimientos se encontraron a las concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.1% (2.5×10^4 , 2.1×10^4 , y 1.5×10^4 ufc/ml respectivamente) y no existen diferencias significativas entre éstas. A partir de la tercera hora de fermentación, a la concentración de 3.5% se registraron los mayores crecimientos de 3.3×10^5 a 4.8×10^6 ufc/ml a la sexta hora, mientras que el comportamiento de la bacteria en las otras concentraciones permaneció casi constante. Al finalizar la fermentación no existió diferencia significativa entre los crecimientos registrados en las concentraciones de 0.1% y 0.25%, (3.5×10^4 y 6.7×10^4 ufc/ml respectivamente) ni entre las concentraciones de 0.5%, 1.5% y 2.5% (1.8×10^5 , 2.1×10^5 y 3.2×10^5 ufc/ml).

Por otro lado, a pesar de que a las mayores concentraciones de casaminoácidos se registraron las mayores producciones totales del polímero, al analizar la cantidad de metabolito producido por microorganismo crecido, se encontró que el comportamiento fue diferente. En la Figura 5.10 se puede observar que a menor concentración de casaminoácidos, la producción específica puede aumentar más con el tiempo que a concentraciones mayores. En la segunda hora de la fermentación se encontró que las mayores producciones específicas fueron a las concentraciones de 0.5% (8.05×10^{-7} mg eq dex/ufc), 0.10% (6.91×10^{-7} mg eq dex/ufc) y 0.25% (5.01×10^{-7} mg eq dex/ufc); existiendo diferencia significativa ($p < 0.01$) entre éstas. Los menores

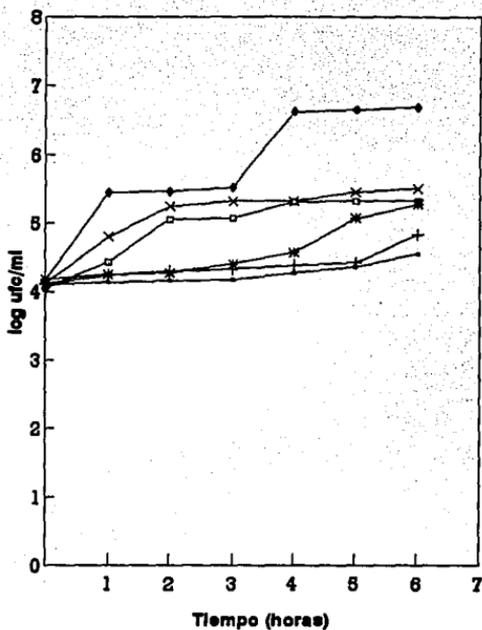


Figura 5.9 Cinética de crecimiento de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* a diferentes concentraciones de casein aminoácidos: 0.1% (*), 0.25% (+), 0.50% (*), 1.5% (□), 2.5% (x), 3.5% (◊). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de ± 0.01 a ± 0.15 .

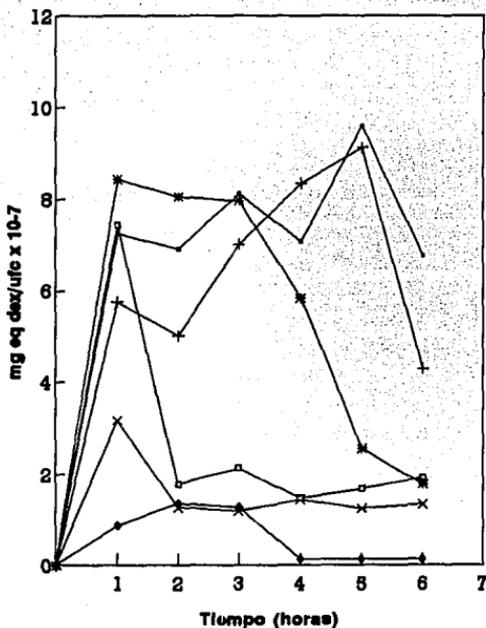


Figura 5.10 Producción específica de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* a diferentes concentraciones de casaminoácidos: 0.1% (○), 0.25% (+), 0.50% (*), 1.5% (□), 2.5% (x), 3.5% (●). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de 1.5×10^{-10} a 2.6×10^{-9} .

producciones se registraron al 1.5% (1.78×10^{-7} mg eq dex/ufc), 2.5% (1.27×10^{-7} mg eq dex/ufc) y 3.5% (1.35×10^{-7} mg eq dex/ufc), no existe diferencia significativa entre las dos últimas.

En la cuarta hora de fermentación se sigue observando el mismo comportamiento, las mayores producciones específicas corresponden a las concentraciones menores de la fuente de nitrógeno. De esta manera al 0.1%, 0.25% y 0.5% las producciones son 7.07, 8.34 y 5.83×10^{-7} mg eq dex/ufc respectivamente. Las menores producciones específicas se encuentran a las concentraciones de 1.5%, 2.5% y 3.5% y no son diferentes entre sí.

Al finalizar la fermentación se mantiene esta tendencia, las mayores producciones específicas son al 0.1%, 0.25% con 6.76 y 4.28×10^{-7} mg eq dex/ufc respectivamente, y las menores producciones específicas se registran en las concentraciones de 0.5% (1.77×10^{-7} mg eq dex/ufc), 1.5% (1.91×10^{-7} mg eq dex/ufc) 2.5% (1.33×10^{-7} mg eq dex/ufc) y 3.5% (0.12×10^{-7} mg eq dex/ufc). No existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las tres primeras.

Cowie (17) reporta que para la cepa Lb339 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, la producción de polisacárido no se afecta por la adición de 0.025% y 0.05% de casaminoácidos a la leche pero a concentraciones de 0.1% y 0.5% ésta se incrementa, para después disminuir a la concentración de 1%. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, sin embargo en dicho trabajo se estudiaron solamente concentraciones menores de 1% de casaminoácidos.

En otros trabajos con *Propionibacterium acidi-propionici* se reporta que la producción de polímero aumenta cuando el medio de cultivo contiene concentración baja de nitrógeno y es rico

en lactosa (43).

De los resultados anteriores se puede concluir que la concentración de casaminoácidos es importante para la producción del polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Es posible que el polímero sea producido cuando el crecimiento se limite o se inhiba por la disponibilidad de algunos nutrientes, que generalmente no es la fuente de carbono o cuando la bacteria se encuentre en situaciones de estrés.

5.7 EFECTO DE DIFERENTES GRUPOS DE AMINOACIDOS EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE POLIMERO

A diferencia de otras especies bacterianas, como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* las cuales, pueden crecer en un medio mínimo conteniendo solamente sales minerales y glucosa, las bacterias lácticas requieren aminoácidos para su crecimiento (10).

Una vez reconocida la importancia que tienen los aminoácidos en el crecimiento y producción del polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, se realizó un estudio para determinar si existía efecto de un aminoácido o un grupo de aminoácidos en la producción del polímero y en el crecimiento de esta bacteria.

En la Figura 5.11 se presentan el crecimiento y la producción del polímero en cada uno de los grupos de aminoácidos mencionados en materiales y métodos (Tabla 4.3). El tipo de aminoácido no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) en la producción del polímero; sin embargo

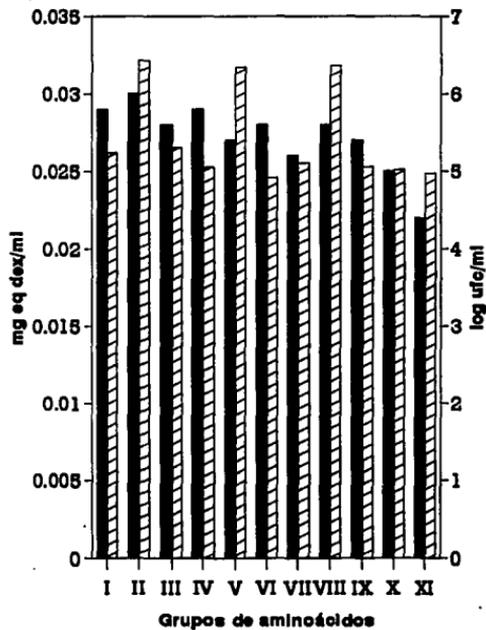


Figura 5.11 Crecimiento y producción de polímero por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en un medio con diferentes grupos de aminoácidos. Para cada grupo de aminoácidos ver materiales y métodos. Producción de polímero (▨), crecimiento (■). Cada punto es la media de tres repeticiones.

en el caso del crecimiento sí existió un efecto significativo ($p < 0.01$) para algunos grupos específicos de aminoácidos. Se encontró que en los grupos que contienen en común a la tirosina y a la prolina (II, V y VIII) se registraron los mayores crecimientos. Esto indica que la cepa 2772 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* es estimulada por estos aminoácidos para su crecimiento.

Otros estudios (51) indican que *Lactobacillus* no puede utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno y que para su crecimiento son esenciales de 7 a 15 aminoácidos. También se han reportado requerimientos de distintos aminoácidos y de otros nutrimentos en un medio sintético para distintos géneros de *Lactobacillus* (40). La arginina, la tirosina, el ácido aspártico, la treonina y la cisteína estimulan el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. En el caso de *L. casei* se reportó que la lisina, la treonina, la metionina y la serina estimulan su crecimiento mientras que para *L. helveticus* lo hacen la alanina, la cisteína, la glicina y la serina. La alanina, la glicina y la lisina estimulan el crecimiento de *L. acidophilus*. Estos requerimientos de aminoácidos pueden ser debido a la ausencia de genes específicos para la biosíntesis de estos aminoácidos.

Diversos estudios acerca de la hidrólisis de las proteínas de la leche muestran la importancia de la tirosina y de la prolina para las bacterias lácticas. Se ha encontrado que la tirosina es el único aminoácido libre identificado después de la hidrólisis de la β -caseína por proteinasas de la cepa AC1 de *Lc. lactis ssp. cremoris* (48). También se reporta que para la cepa LC330 de *Lc. lactis ssp. cremoris* en un cultivo batch, la ausencia de tirosina disminuye el crecimiento en 52% (12). Para *L. cremoris* y *L. helveticus* también se reporta el requerimiento de tirosina (10,40).

Un aspecto de la importancia de la prolina es el hecho de que en la hidrólisis de la β -caseína el contenido de este aminoácido en los péptidos liberados por la acción de proteinasas de *L. lactis* es muy alto comparado con otros aminoácidos presentes. Los péptidos identificados presentan altos contenidos de prolina, dependiendo de la cepa: 21.2%, 21.6% y 23.4% para las cepas HP, NCDO 763 y AC1 respectivamente. La prolina libre puede entrar a la célula solamente por difusión pasiva a través de la membrana citoplasmática en *Lactococcus* (48).

La prolina suele ser importante para *Lactococcus*. Se libera de la caseína por la acción de X-Pro dipeptidasas (48). En estudios realizados en 50 cepas de *Lc. lactis ssp. cremoris* y *L. helveticus* se reporta que la prolina se requiere para su crecimiento (48).

El estudio de las rutas biosintéticas de los aminoácidos pueden ayudar a entender la razón por la cual las bacterias lácticas son sumamente exigentes en cuanto a los nutrientes que requieren.

5.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CEPAS FILANTES Y NO FILANTES DE *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*

El objetivo de este experimento fue determinar si la capacidad de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* de hidrolizar las proteínas de la leche está relacionada con su capacidad de producir polímero exocelular.

Las bacterias lácticas son débilmente proteolíticas, comparadas con otros grupos o géneros de bacterias como *Bacillus* o *Pseudomonas*; sin embargo, presentan una actividad

proteolítica que les permite abastecerse de los aminoácidos que requieren.

En la Figura 5.12 se muestra la actividad proteolítica específica de las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483, y una no filante, la NCFB 1489 de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Se puede observar cómo desde las primeras horas de la fermentación existió diferencia significativa ($p < 0.01$) entre las actividades registradas para las cepas filantes y la no filante. Cuando inicia la fermentación la cepa no filante NCFB 1489 presenta una actividad proteolítica de 13.1×10^{-7} mg tyr/ufc, mientras que las filantes NCFB 2772 y NCFB 2483 de 6.36×10^{-7} mg tyr/ufc y 8.61×10^{-7} mg tyr/ufc respectivamente. Durante las seis horas de la fermentación el comportamiento de las bacterias es el mismo, y así a la sexta hora, la cepa NCFB 2772 presenta actividades de 5.44×10^{-7} mg tyr/ufc, la NCFB 2483 de 7.59×10^{-7} mg tyr/ufc y la NCFB 1489 de 1×10^{-6} mg tyr/ufc.

No se encontraron en la literatura reportes de actividades proteolíticas de bacterias filantes y sólo se pueden comparar con trabajos en bacterias no filantes. Se han reportado (50) actividades proteolíticas específicas de diferentes cepas de *Lactococcus lactis ssp. cremoris*: 1.74×10^{-7} mg tyr/ufc para la cepa 103, 2.80×10^{-7} mg tyr/ufc para la cepa 108 y la de la cepa 208 es de 7.63×10^{-7} mg tyr/ufc. Estas son comparables con las actividades proteolíticas de la cepa no filante NCFB 1489 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* de este trabajo.

En la Figura 5.13 se muestra la cinética de crecimiento de las tres cepas de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Se puede observar que desde el inicio de la fermentación la cepa no filante NCFB 1489 presentó el mayor crecimiento, comparado con las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483. Al finalizar la fermentación, la cepa no filante NCFB 1489 alcanzó poblaciones de 1×10^9 ufc/ml, mientras que las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483 de 1×10^8 y 1.25×10^8 ufc/ml respectivamente.

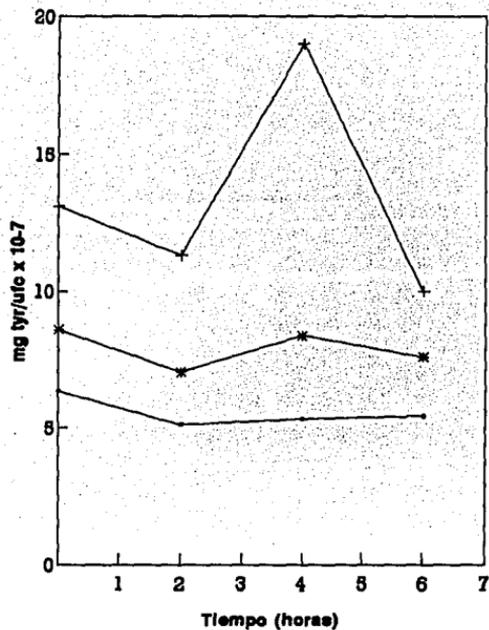


Figura 5.12 Actividad proteolítica específica de tres cepas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en leche descremada: filante NCFB 2772 (*), no filante NCFB 1489 (+), filante NCFB 2483 (o). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de $\pm 5.8 \times 10^{-9}$ a $\pm 4 \times 10^{-9}$.

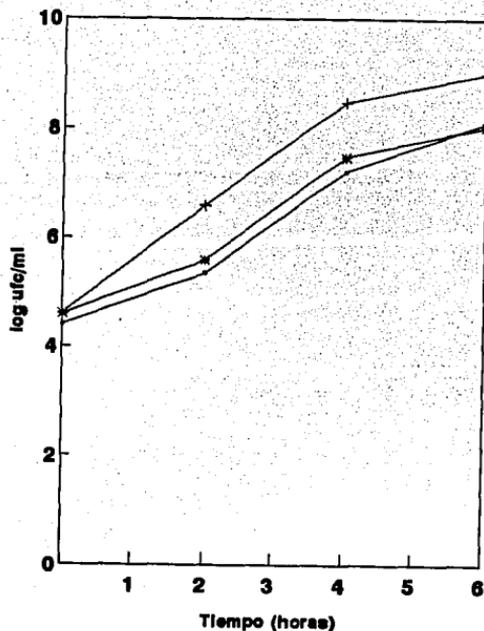


Figura 5.13 Cinética de crecimiento de tres cepas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en leche descremada: filante NCFB 2772 (•), no filante NCFB 1489 (+), filante NCFB 2483 (*). Cada punto es la media de tres repeticiones y las desviaciones estándar varían de ± 0.01 a ± 0.012 .

En la Figura 5.14 se muestra la producción de polímero registrada para las cepas filantes: NCFB 2772 y NCFB 2483 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, mientras que para la cepa no filante NCFB 1489 no se detectó producción de polímero. Al comparar el comportamiento de las bacterias filantes y las no filantes se puede suponer que las primeras producen polímero debido a que no pueden hidrolizar efectivamente la proteína para obtener un buen crecimiento. Esto no concuerda con lo reportado por otros autores (5) para el caso de *S. salivarius ssp. thermophilus* ya que establecen que la característica filante no está ligada a la producción de ácido, la capacidad proteolítica o síntesis de acetaldehído.

Las bacterias lácticas no filantes presentaron actividades proteolíticas mayores que las cepas filantes de la misma especie, presentando estas últimas menor crecimiento. Es posible que este menor crecimiento se deba precisamente a la baja actividad proteolítica, la cual es muy importante para el metabolismo de estas bacterias, ya que los aminoácidos libres presentes en la leche no son suficientes para permitirles un buen crecimiento, por lo que requieren hidrolizar la caseína (31).

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

1. El uso de medios de crecimiento con diferente relación carbohidratos/proteínas no afecta la producción total del polímero, ni su producción específica por *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

2. El uso de diferentes fuentes de nitrógeno afecta la producción del polisacárido, registrándose mayores producciones específicas con las fuentes más hidrolizadas, durante las tres primeras horas de fermentación.

3. La concentración de casaminoácidos afecta la producción del polímero; a menores concentraciones se obtienen mayores producciones del polisacárido por microorganismo crecido.

4. El crecimiento de la cepa NCFB 2772 de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* es estimulado por la presencia de la tirosina y la prolina, pero la producción de polímero no es estimulada por ningún aminoácido.

5. La actividad proteolítica baja que presentan las cepas filantes NCFB 2772 y NCFB 2483 de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* está relacionada con un menor crecimiento y con su capacidad de producción de polímero en leche, comparado con el comportamiento de la cepa no filante NCFB 1489 de esta misma especie bacteriana.

7. RECOMENDACIONES

Existen diversas alternativas para la continuación de este trabajo, ya que aún falta mucho para conocer profundamente el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de polímero. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda:

1. Determinar el efecto en la producción de polímero bajo condiciones de limitación de nitrógeno y de carbono.
2. Relacionar el consumo de lactosa y de proteína con la producción de polímero durante la fermentación.
3. Evaluar las actividades proteolíticas de un mayor número de cepas de bacterias lácticas filantes y no filantes incluyendo *S. thermophilus*, para comparar su comportamiento con la de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y encontrar la relación de la actividad proteolítica con la capacidad de producción del polímero.
4. Evaluar la actividad proteolítica de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* en medios con diferente grado de hidrólisis y relacionarlo con la producción de polímero.
5. Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno en la composición del polisacárido producido por *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

6. Determinar si el pH y/o la capacidad amortiguadora de los medios utilizados son las causas por las cuales se presenta una baja producción específica del polímero a medida que el tiempo de fermentación aumenta.

7. Relacionar la concentración de polímero obtenido como mg eq dex/ml con valores cuantitativos de carbohidrato utilizando un método como el del fenol-sulfúrico.

8. Determinar el efecto del calcio en la producción del polímero.

1. A.O.A.C. (1984) Association of the Official Analytical Chemistry. Official Methods of analysis of Foods. Ed Horwitz. 14a ed., U.S.A.
2. Atlan, D., Laloï, P. y Portalier, R. (1989) Isolation and characterization of aminopeptidase-deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1717-1723.
3. Bolckelmann, W., Fobker, M. y Teuber, M. (1991) Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal* **1**:51-66.
4. Bolckelmann, W., Schulz, Y. y Teuber, M. (1992) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal* **2**:95-107.
5. Bouillanne, C. y Desmazeaud, M. (1980) Etudes de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées en fabrication de yaourts et proposition d'une méthode de classement. *Le Lait* **60**:458-473.
6. Buchanan, R. y Gibbons, N. (Eds) (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
7. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. y Landon, M. (1986) Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Letters* **8**:625-628.
8. Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. y Desmazeaud, M. (1990) Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments* **10**:443-451.
9. Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **87**:113-130.

10. Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:21-38.
11. Christopherson, A. y Zottola, E. (1989) Growth and activity of mesophilic lactic acid Streptococci in ultrafilteres skim milk and reconstituted nonfat dry milk of differing total solid Contents. *Journal of Dairy Science* 72:2856-2861.
12. Cowie, E. (1993) Factors influencing texture modifying characteristics of selected strains of lactic acid bacteria. Tesis de Doctorado. Oxford Brookes University, Inglaterra.
13. Doco, T., Wieruszski, J., Fournet, B., Carcano, D., Ramos, P. y Loones, A. (1990) Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research* 198:313-322.
14. Driessen, A., Leeuwen, C. y Konings, W. (1989) Transport of basic amino acids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 171:1453-1458.
15. Eggimann, B. y Bachmann H. (1980) Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 876-882.
16. El Abboudi, M., El Soda, M., Pandian, S., Barreau, M., Trépanier, G. y Simard, R. (1992) Peptidase activities in dibittering and nondebittering strains of *Lactobacilli*. *International Dairy Journal* 2:55-64.
17. Escalante, A. (1994) Metabolismo de carbohidratos en *S. salivarius subsp. thermophilus* productora de exopolisacaridos. Tesis de maestría en Biotecnología. Facultad de Química, UNAM.
18. Exterkate, F.(1979) Accumulation of proteinase in the cell wall of *Streptococcus cremoris* AM, and regulation of its production. *Arch. Microbiol.* 120:247-254.

19. Fukumoto, J., Tsuru, D. y Tamamoto, T. (1967) Studies on mold protease I purification, crystallization and some enzyme properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol Chem* 37:710-717.
20. Galesloot, T. y Hassing, F. (1968) Manufacture of stirred yogurt of high viscosity. *Voeding & Techniek* 2: 246-448.
21. Galván, M. (1990) Estudio de la utilización de cepas de bacterias lácticas filantes en la elaboración de yoghurt. Tesis profesional. Universidad Iberoamericana. México.
22. García-Garibay, M. (1985) Studies on grown, slime production and slime composition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*. Tesis de maestría. University of Reading. Inglaterra.
23. García-Garibay, M. y Marshall, V. (1991) Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology* 70:325-328.
24. Gilliland, S. y Speck, M. (1974) Relationship of cellular component to the stability of concentrated lactic streptococcus cultures at -17°C. *Applied Microbiology* 27:793-796.
25. Hickey, M., Hillier, A. y Jago, R. (1986) Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology* 51:825-831.
26. Hugenholtz, J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:165-178.
27. Kanasaky, M., Breheny, S., Hillier, A. y Jago, G. (1975) Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. A rapid method for the estimation of bacterial populations. *The Australian Journal of Dairy Technology* 30:142-144.
28. Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.

29. Kok, J. (1990) Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87:15-42.
30. Laloi, P., Atlan, D., Blanc, B., Gilbert, C. y Portalier, R. (1991) Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: differential extraction, purification and properties of enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:196-204.
31. Law, B. y Kolstad, J. (1983) Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:225-245.
32. Lowry, O., Rosebrough, W., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
33. Macura, D. y Townsley, P. (1984) Scandinavian ropy milk-identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* 67:735-744.
34. Manca de Nadra, M., Strasser, A., Pesce de Ruiz Holgado A. y Oliver, G. (1985) Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft* 40:409-411.
35. Marshall, V. (1986) The microflora and production of fermented milks. En: Adams M R. ed.: *Progress in Industrial Microbiology*. London: Elsevier, vol. 23, pp. 1-44.
36. Marshall, V. y Law, B. (1984) The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. Capítulo 3 en: Davis, F.L. y Law, B.A. (Eds) *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England, pp. 67-98.
37. Marshall, V. (1984) Flavour development in fermented milks. Capítulo 6 en: Davis, F.L. y Law, B.A. (Eds) *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Elsevier Applied Science Publishers, London, England, pp.67-98.
38. Mills, O. y Thomas, T. (1978) Release of cell wall-associated proteinase(s) from lactic streptococci. *Journal of Dairy Science Technology* 13:209-215.

39. Mistry, V. y Kosikowski, F. (1986) A naturally buffered bulk retentate starter from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science* 69:945.
40. Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. y Yura, T. (1981) Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology* 148:64-71.
41. Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. (1988) Plasmid encoded functions of ropy lactic strains from Scandinavian fermented milk. *Biochimie* 70:437-442.
42. Poolman, B. (1993) Energy transduction in lactic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:125-148.
43. Racine, M., Dumont, J., Champagne, C., y Morin, A. (1991) Production and characterization of the polisaccharide from *Propionibacterium acidipropionici* on whey-based media. *Journal of Applied Bacteriology* 71:233-238.
44. Reid, J., Ng, K., Moore, C., Coolbear, T., y Pritchard, G. (1991) Comparison of bovine β -casein hydrolysis by PI and PIII-type proteinases from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:344-351.
45. Salcedo, L. (1992) Factores genéticos relacionados con la expresión del fenotipo munoide de bacterias lácticas utilizadas en la elaboración del yoghurt. Tesis de maestría en Biotecnología. UACPyP, UNAM. México.
46. Shankar, P. y Davies, F. (1978) Proteinase and peptidase activities of yogurt starter bacteria. Proc. XX International Dairy Congress. Paris, pp. 467-468.
47. Sherman, F., Fink, G., y Lawrence, R. (1971) Isolation and characterization of auxotrophic, temperature-sensitive, and UV-sensitive mutants. Methods in yeast genetic laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory for Quantitative Biology, New York. pp. 4-8.
48. Smid, E., Poolman, B. y Konings, W. (1991) Casein utilization by *Lactococci*. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2447-2452.

49. Sorhaug, T. y Solberg, P. (1973) Fractionation of dipeptidase activities of *Streptococcus lactis* and dipeptidase specificity of some lactic bacteria. *Applied Microbiology* 25:388-395.
50. Srilaorkul, S., Ozimek, L. y Stiles, M. (1989) Growth and activity of *Lactococcus ssp. cremoris* in ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science* 72:2435-2443.
51. Strobel, H., Russell, J., Driessen, A. y Konings, W. (1989) Transport of amino acids in *Lactobacillus casei* by proton-motive-force. Dependent and non-proton-motive-force-dependent mechanisms. *Journal of Bacteriology* 171:280-284.
52. Sutherland, I. (1990) *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press. New York. pp. 163
53. Tersaghi, B. y Sandine, W. (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* 29:807-813.
54. Thomas, T. (1976) Regulation of lactose fermentation in group N Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* 32:474-478.
55. Thomas, T., Turner, K. y Crow V. (1980) Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products, and regulation. *Journal of Bacteriology* 144:672-682.
56. Thompson, J. y Thomas, T. (1977) Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 130: 583-595.
57. Thompson, J. (1987) Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 46: 221-231.
58. Vedamuthu, E. y Neville, J. (1986) Involvement of plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied and Environmental Microbiology* 51:677-682.

59. Vescovo, M., Scolari, G. y Bottazz, V. (1989) Plasmid-encoded ropiness production in *Lactobacillus casei ssp. casei*. *Biotechnology Letters* 11:709-712.
60. Wilkins, D., Schmidt, R. y Kennedy, L. (1986) Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 34:150-152.
61. Wohrab, Y. y Bockelmann, W. (1992) Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Dairy Journal* 2:345-361.
62. Wright, A. y Tynkkynen, S. (1987) Construction of *Streptococcus lactis ssp. lactis* strains with a single plasmid associated with mucoid phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1385-1386.
63. Zourari, A., Accolas, J. y Desmazeaud, M. (1992) Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *A review*. p.134.