



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

24

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

CARACTERIZACION QUIMICA DE UN  
POLISACARIDO EXTRACELULAR PRODUCIDO POR  
*Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A ;  
MARIA PATRICIA RIVERA BOLAÑOS



MEXICO, D. F.

1998

TRABAJO CON  
FALSA ORIGEN

263866



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ***JURADO ASIGNADO***

PRESIDENTE	PROF. BARZANA GARCIA EDUARDO
VOCAL	PROF. CAÑIZO SUAREZ MA. ELENA
SECRETARIO	PROF. GARCIA GARIBAY JOSE MARIANO
PRIMER SUPLENTE	PROF. BAEZ FERNANDEZ MARCOS FRANCISCO
SEGUNDO SUPLENTE	PROF. ORTEGON AVILA AURORA IRMA

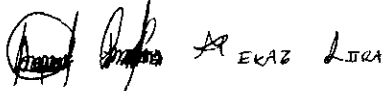
### **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA. UAM IZTAPALAPA  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA. FACULTAD DE QUIMICA



**ASESOR DEL TEMA:**

M. EN C. MARIANO GARCIA GARIBAY



**SUPERVISOR TECNICO:**

Q. JOSE LUIS MERAZ LIRA



**SUSTENTANTE:**

MARIA PATRICIA RIVERA BOLAÑOS

**JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	PROF BARZANA GARCIA EDUARDO
VOCAL	PROF. CAÑIZO SUAREZ MA ELENA
SECRETARIO	PROF GARCIA GARIBAY JOSE MARIANO
PRIMER SUPLENTE	PROF BAEZ FERNANDEZ MARCOS FRANCISCO
SEGUNDO SUPLENTE	PROF ORTEGON AVILA AURORA IRMA

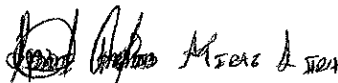
**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA UAM IZTAPALAPA  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA. FACULTAD DE QUIMICA



**ASESOR DEL TEMA:**

M. EN C. MARIANO GARCIA GARIBAY



**ASESOR TECNICO:**

Q. JOSE LUIS MERAZ LIRA



**SUSTENTANTE:**

MARIA PATRICIA RIVERA BOLAÑOS

## *Dedicatoria*

A ti mamá, por la confianza que me has brindado a lo largo de mi vida, por tu apoyo, por desearme siempre lo mejor.....y por que éste logro también es tuyo.

A mi familia por su comprensión y paciencia  
.....Gracias!

## *Agradecimientos*

A Mariano y a Lore por la confianza que depositaron en mí, por el apoyo que me brindaron en la realización de mi trabajo y por cultivar en mí la necesidad de ser mejor cada día. Mil gracias!

A mis compañeros de laboratorio, por todo el apoyo que me brindaron, por entregarme su amistad, y por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles. gracias de verdad!

A Julie por brindarme la oportunidad de colaborar con ella, por su amistad y su apoyo en todo momento. Tu también cuentas conmigo!

Por otro lado es necesario agradecer a José Luis Meráz por su asesoría, y su valioso apoyo en los momentos más difíciles del proyecto. También agradezco al profesor Agustín Reyo por su cooperación en la liofilización de las muestras.

A Vero, Rosalba y Alicia por su amistad sincera, y por los momentos que compartimos durante la carrera.

Al Sr. Arturo del laboratorio 4-A, al maestro Gumaro del Edificio D y a Eduardo de la biblioteca de posgrado por su valiosa ayuda y por brindarme su amistad.

No llores porque se ha  
metido el sol...

porque sí no..... tus  
lagrmas no te dejaran  
ver las estrellas.....

# INDICE

	Página
<b>1. RESUMEN</b>	3
<b>2. INTRODUCCION</b>	4
<b>3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS</b>	
<b>3.1. Yogurt</b>	
3 1.1 Tecnología en la elaboración de yogurt	5
3.1.2 Bacterias productoras de yogurt	6
<b>3.2 Propiedad filante</b>	
3.2 1 Definición de cepas filantes y características	7
3.2.2 Estudios de microscopía electrónica	8
3 2.3 Definición de exopolisacárido (EPS)	10
3 2.4 Factores que influyen en la producción de EPS producidos por cepas filantes	11
3 2 5 Funcionalidad de EPS	12
3 2 6 Métodos de separación del EPS producido en la fermentación láctica	13
3.2 7 Composición química de EPS	15
3 2 7 1 Composición química de EPS por <i>Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus</i>	16
<b>3.3. Técnicas de análisis para la identificación del EPS</b>	
3.3.1 Cromatografía	19
3 3 2 2 Cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) y sus aplicaciones	19
3 3 1.2 Proceso cromatográfico	21
3 3 2 Instrumentación en CLAR	21
3.3 2 1 Detector electroquímico	24
3 3.3 Análisis cuantitativo	25
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27



## **5. METODOLOGIA**

5.1 Microorganismos	28
5.2 Fermentaciones	28
5.2.1 Cultivo iniciador	28
5.2.2 Substratos	28
5.2.2.1 Preparación de substratos	29
5.2.3 Formación de productos de fermentación	30
5.3 Cuantificación de EPS	30
5.4 Purificación del EPS	31
5.5 Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el EPS aislado	31
5.5.1 Técnica de Lowry	32
5.5.2 Técnica de fenol-sulfúrico	32
5.6 Hidrólisis enzimática del EPS	33
5.7 Hidrólisis ácida del EPS	34
5.8 Determinación de monosacáridos por ( CLAR)	35

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

6.1 Cinética de fermentación	37
6.2 Cuantificación del EPS	41
6.3 Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el EPS aislado	42
6.4 Caracterización química del EPS	44
6.5 Perfil de monosacáridos en el EPS hidrolizado	47
6.6 Cuantificación de los monosacáridos en el EPS hidrolizado	59
6.7 Relación molar de los monosacáridos identificados en el EPS producido en los diferentes substratos	63

## **7. CONCLUSIONES**

## **8. RECOMENDACIONES**

## **9. BIBLIOGRAFIA**

## 1. RESUMEN

---

La tecnología en la elaboración de yogurt en los últimos años se ha valido del uso de cepas filantes, ya que éstas poseen la habilidad de producir polisacáridos extracelulares (EPS) que mejoran considerablemente las propiedades reológicas del yogurt, facilitando el manejo del mismo, disminuyendo considerablemente el fenómeno de desuerado o sinéresis.

Sin embargo, para desarrollar el potencial tecnológico de estas cepas se requiere de un conocimiento más detallado sobre la estructura del EPS producido por estas cepas y la interacción de éste con los componentes del sistema, en especial con la caseína de la leche. Por lo anterior, se planteó este proyecto con el objetivo de establecer si la fuente de proteína y la concentración de la misma utilizada durante la fermentación láctica, influían en la composición del polímero producido por una cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* (NCFB 2772). Para verificar el efecto del carácter filante se compararon los resultados con una cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* (NCFB 1489).

Se llevó a cabo una fermentación láctica en los substratos: suero, suero adicionado con caseína, leche descremada y retenido de leche, encontrándose diferencias entre la cepa filante y la no filante. La cepa filante generó una mayor producción de EPS en los substratos con mayor contenido de proteína. Al determinar la relación proteína-carbohidrato en el EPS aislado se observó que ésta era mayor en los substratos fermentados por la cepa filante, por lo que podemos concluir que a mayor porcentaje de proteína(caseína) en el substrato inicial, existirá una mayor interacción entre las proteínas del sistema y el exopolisacárido.

El análisis en la composición de monosacáridos por medio de CLAR nos reveló que independientemente de la cepa y substrato utilizado en la producción de EPS, éste estaba constituido en su mayor parte de galactosa y glucosa, y que en los sistemas donde la concentración de caseína era mayor la ramnosa se encontraba presente. Estas diferencias encontradas en la composición del EPS puede ser indicativo de diferencias microestructurales que se pueden reflejar en las características texturales del mismo.

## 2. INTRODUCCION

---

El yogurt es la leche fermentada que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en leche (García-Garibay *et al*, 1993).

Para la elaboración de diversos productos lácteos, incluyendo el yogurt, se emplean estabilizantes y/o emulsionantes, cuya utilización está regulada por la legislación vigente en la mayoría de los países Europeos, donde generalmente no está autorizado el uso de estos aditivos (García-Garibay *et al*, 1993)

Una alternativa interesante al uso de estos estabilizantes es la utilización de cepas productoras de polisacáridos extracelulares (llamadas filantes o mucoides) en la elaboración de yogurt, ya que estos polisacáridos mejoran la textura y apariencia del producto, aumentan la viscosidad y disminuyen notablemente la sinéresis o separación del suero (Wacher-Rodarte *et al*, 1993).

En la actualidad la importancia económica de estas bacterias ha despertado un gran interés en obtener un conocimiento más detallado acerca de la producción de polisacáridos por éstas cepas filantes, así como la interacción de éstos con los componentes del sistema. Recientes publicaciones mencionan que la composición de los polisacáridos influye sobre las propiedades reológicas de productos lácteos fermentados (Schellaass y Morris 1985, Teggatz y Morris, 1990)

Por todo lo anterior este trabajo pretende establecer si el del tipo de proteína y la concentración de la misma tienen efecto sobre la composición química del exopolisacárido producido por una cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* y a su vez tratar de explicar si la composición de los EPS influye sobre las características reológicas del sistema.

### *3. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS*

---

#### **3.1. YOGURT**

El yogurt es la leche fermentada que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. En México se elaboran tres tipos diferentes de yogurt firme, batido y líquido, cada uno de ellos en forma natural, o adicionado con sabores o con fruta (García -Garibay, 1990)

##### **3.1.1. Tecnología en la elaboración de yogurt**

El proceso de elaboración de yogurt es un arte muy antiguo que data de hace miles de años, pero hasta el siglo XIX apenas se conocían los fundamentos de las distintas fases de producción de este producto. No obstante, en las últimas décadas este proceso se ha racionalizado mucho, principalmente debido a los descubrimientos y avances tecnológicos en diversas disciplinas (Tamime y Robinson, 1991)

El yogurt se elabora con leche concentrada, ya sea por la adición de leche descremada en polvo u otros sólidos de leche como caseinatos, o por concentración por evaporación, por ósmosis inversa o por ultrafiltración. El propósito de tal modificación es mejorar la firmeza del producto y darle al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante el manejo normal del yogurt (García-Garibay, 1990).

En la industria mexicana es muy frecuente la utilización de estabilizantes, que proporcionan firmeza al gel, y esto hace que sea más resistente a los daños mecánicos, evitando así la sinéresis. Algunos muy comúnmente utilizados son: gretetina, almidón, carragenina, alginatos, goma guar, goma de algarrobo y pectina. El uso de estos aditivos en concentraciones superiores al 0.3% pueden tener efectos adversos en el sabor (García-Garibay *et al*, 1993)

El uso de estos aditivos es muy restringido. En México, como en la mayoría de los países europeos, la legislación prohíbe la adición de estabilizantes a estos productos.

El uso de estos aditivos proporciona básicamente dos funciones: aumentar la retención de agua y lograr un aumento en la viscosidad (Tamime y Robinson, 1991).

### 3.1.2. Bacterias productoras de yogurt

En la elaboración de yogurt se emplean dos especies de bacterias lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

*Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* es un bacilo homofermentativo gram positivo, largo, no móvil, el cual produce ácido D-(-)-láctico. Es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no así, maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45°C, pero su óptimo está en el intervalo de 40°- 43°C, y no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15° C. Posee la habilidad de crecer a pH ácidos y presenta metabolismo fermentativo aún en presencia de oxígeno (Holt *et al*, 1994).

*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 40-45°C y no crece a temperaturas menores de 20°C. Produce ácido L-(+)-láctico por homofermentación. Como fuente de carbono utiliza glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa (Holt *et al*, 1994).

## 3.2. PROPIEDAD FILANTE

### 3.2.1. Definición de cepas filantes y características

Las bacterias lácticas filantes son aquellas capaces de sintetizar polisacáridos, los cuales son caracterizados por su localización extracelular.

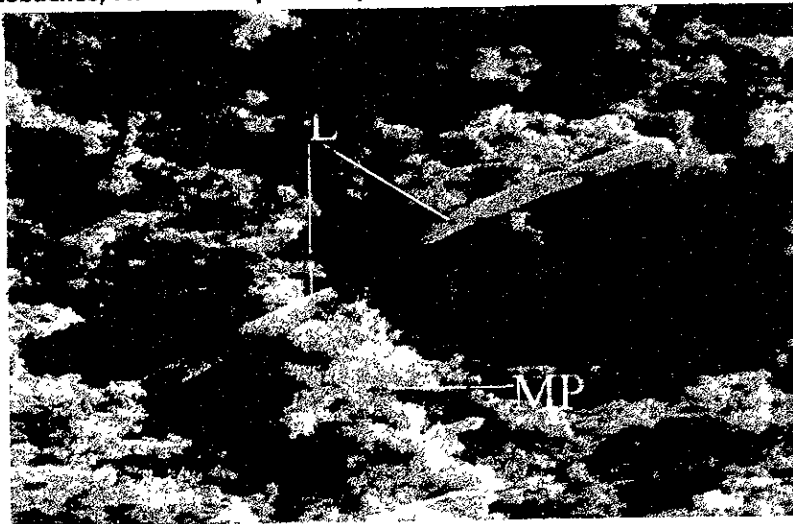
Existen diversas cepas lácticas productoras de polisacáridos, pero se ha estudiado poco acerca de ellas y de las condiciones óptimas de crecimiento, y de la producción de éstas, así como de su estabilidad y las características del polímero (Cerning *et al*, 1986; García Garibay y Marshall, 1991). En lo que se refiere a la utilización de cepas filantes de las especies de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* se ha comprobado que los geles producidos por estas cepas mejoran considerablemente la textura y previene la sinéresis (Wacher-Rodarte *et al*, 1993; Cerning *et al*, 1990) En los últimos años ésto ha despertado un gran interés en estudiar más a detalle estos microorganismos para la elaboración de yogurt

Debido a ésto, las cepas filantes de bacterias lácticas como iniciadores en yogurt tienen una creciente demanda e importancia, sin embargo, esta característica es inestable, por lo que, para desarrollar el potencial tecnológico de estas bacterias en todas su capacidad se requiere un profundo conocimiento de las variables fisiológicas y genéticas involucradas en la producción de polímero (Cerning, 1995) Por otra parte, la interacción entre estos polímeros y los componentes de la leche no han sido estudiados en detalle, aunque hay algunos estudios sobre las propiedades reológicas del sistema, lo que indica posibles interacciones con los componentes del sistema, específicamente con las caseínas de la leche (Wacher-Rodarte *et al*, 1993).

### 3.2.2. Estudios de microscopía electrónica (SEM)

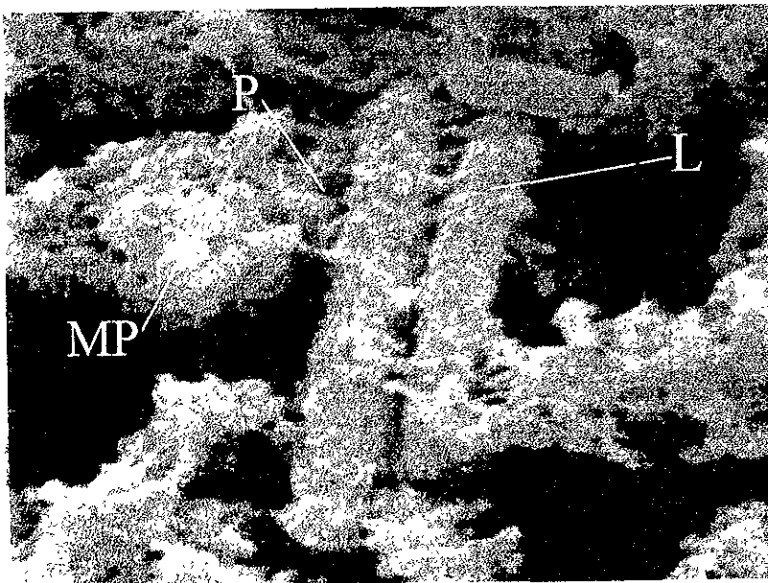
La microscopía electrónica de barrido y transmisión es una técnica que se ha enfocado en el estudio de la microestructura de sistemas alimenticios, entre los cuales se encuentran los productos lácteos como queso y yogurt (Kalab, 1979). El objetivo de la microscopía electrónica es relacionar la microestructura de estos productos con sus propiedades físicas y químicas. Algunos autores realizaron estudios de microscopía en geles fermentados en leche descremada, utilizando cepas filantes y no filantes de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus*, observándose en las micrografías que el polisacárido producido por los microorganismos se asociaba a la superficie celular y a su vez a la matriz proteica del sistema (Kalab, 1979; Teggatz y Morris, 1990). La Fig. 3.2.2.1. muestra una micrografía (SEM) de un gel de leche fermentada con una cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* NCFB 1489, mientras que en la fig. 3.3.2.2 se muestra el gel de leche producido por una cepa filante

**Fig. 3.2.2.1 micrografía de un gel producido en leche descremada por una cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* NCFB 1489 (L= Lactobacilos, MP= Matriz proteica , P= Polisacárido)**



Fuente: Dominguez-Soberanes, 1997

Fig. 3.2.2.2. Micrografía de un gel producido en leche fermentada por una cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii ss bulgaricus* NCFB 2772 (L= Lactobacilos, P= exopolisacárido y MP= matriz proteica).



Fuente: Dominguez-Sobranes, 1997



### **3.2.3. Definición de exopolisacáridos (EPS)**

El término exopolisacárido fué propuesto por Sutherland en 1972 englobando un término general para describir todas las formas de polisacárido localizados en el exterior de la superficie de las células bacterianas

Los exopolisacáridos bacterianos se encuentran básicamente en dos formas: como cápsulas adheridas a la superficie de las células por medio de enlaces covalentes, o como material viscoso desprendido de la superficie de las células bacterianas. La síntesis y secreción de exopolisacárido ocurre durante diferentes fases de crecimiento y es regulada por proteínas que se encuentran localizadas sobre la superficie de la célula (Whitfield, 1988, Sutherland, 1992)

### 3.2.4. Factores que influyen en la producción de EPS producidos por cepas filantes

La síntesis y secreción de EPS ocurre en diferentes fases de crecimiento, y su producción se ve influenciado por factores tales como las condiciones de crecimiento, temperatura, substratos utilizados y tiempo de incubación (Cerning *et al*, 1992; Gancel y Novel, 1994 a).

La fuente de carbono y nitrógeno parecen ser un factor muy importante en la producción de polímero, Grobбен *et al*, (1995) observó que la producción de EPS en medios químicos suplementados con lactosa y galactosa era mayor, que si se utilizaban fructosa y manosa como fuente de carbono. Mozzi *et al*, (1995) reportó que la producción de EPS en *Lactobacillus casei* se veía afectado por la fuente de carbono utilizando galactosa había mayor producción que usando lactosa como fuente de carbohidratos. Se ha reportado que el uso de substratos como ultrafiltrado de leche adicionado con caseína y casaminoácidos como fuente de nitrógeno estimula la producción de EPS (Cerning *et al*, 1990, García-Garibay y Marshall, 1991)

Para el caso específico de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* NCFB 2772 se ha observado que a mayor concentración de casaminoácidos en el medio de cultivo hay una mayor producción de polímero, que adicionando caseína sin hidrolizar (Trejo-Márquez, 1995)

Cuando se utilizan medios sintéticos o medios químicos en la producción de EPS en lugar de medios nativos (leche, hidrolizados de caseína, suero, etc.) se facilita notablemente el aislamiento y la separación del EPS del medio de cultivo, permitiendo el estudio de algunos componentes del medio (Grobбен *et al*, 1995; Cerning, 1995; Gassem *et al*, 1995).

Schellhaass & Morris (1985) observaron que a bajas temperaturas (32-37°C) había mayor producción de polisacárido, lo cual no coincide con otros estudios en los que se reportaba que a temperaturas de 42°C había mayor producción de polímero (Mozzi *et al*, 1995).

Por otro lado se observó que la adición de sales de calcio y magnesio estimulaba la producción de EPS (Trejo-Marquez, 1995).

En cuanto a los aspectos fisiológicos de producción de polisacáridos extracelulares, se ha reportado por ejemplo que la presencia de algunas fuentes proteicas en el medio de cultivo estimulaba la producción de polisacáridos extracelulares (Cerning *et al*, 1986, Cerning *et al*, 1990; García-Garibay y Marshall, 1991) ya que la adición de hidrolizados de caseína aumentaba la producción de lactobacilos en el medio. Investigaciones posteriores (Cerning *et al*, 1992) reportaron que la presencia de caseína estimulaba la producción de polímero, y el tamaño de los lactobacilos en el medio

### **3.2.5. Funcionalidad de exopolisacáridos (EPS)**

Una de las muchas funciones que se atribuyen a los EPS es la de protección natural contra la desecación o ataque de fagos y agentes antibacterianos. Mucho del desarrollo de supervivencia depende de la habilidad de los microorganismos para producir estos polisacáridos y adherirse a la superficie celular (Whitfield, 1988) Los EPS parecen no funcionar como fuentes de energía, ya que las bacterias formadoras de polímero usualmente no son capaces de metabolizar el polímero que sintetizan (Cerning, *et al* 1990).

El uso de EPS producidos por bacterias ha sido aplicado en el ámbito comercial ya que son biodegradables y proporcionan alternativas que mejoran los procesos tradicionales en la elaboración de diversos productos (Tamime y Robinson, 1991).

### **3.2.6. Métodos de separación del polisacárido formado durante la fermentación láctica.**

Los métodos de separación de polisacáridos son muy complicados ya que no se encuentran en un sistema puro sino en medios heterogéneos muy complejos. La preparación de polisacáridos producidos por microorganismos para su caracterización requiere de técnicas especiales de separación. Una lista de procedimientos basados en diferentes principios de aislamiento se presenta en la tabla 3.3.6.1

**Tabla 3.2.6.1. Métodos de aislamiento de polisacáridos**

---

1. Solubilidad
    - a) Precipitación fraccional
    - b) Separación por uso de solventes no miscibles
  2. Ultracentrifugación
    - a) Técnicas por densidad de gradientes
  3. Ultrafiltración por membrana
  4. Cromatografía
    - a) Adsorción
    - b) Intercambio iónico
    - c) Cromatografía de partición
  5. Filtración en gel
- 

Chaplin y Kennedy, 1987

Se han propuesto diversos métodos de separación de polisacáridos producidos por bacterias lácticas y se ha visto que el método utilizado influye en la composición química de los mismos (Doco *et al*, 1991).

Un problema muy común en el aislamiento y purificación de polisacáridos son las proteínas y péptidos de la leche que se asocian con el carbohidrato, las cuales se pueden eliminar por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (García-Garibay y Marshall, 1991, Grobбен *et al*, 1995, Cerning, 1995, Gruter *et al*, 1993) La precipitación de proteínas se realiza por centrifugación y tiene la ventaja de ser más rápida, sin embargo, una gran proporción del polisacárido puede ser coprecipitado con el TCA, por lo que es necesario lavar dos veces más para recuperar la mayor cantidad posible de polisacárido (Cerning, 1995) Para evitar éstas pérdidas, otros autores han utilizado filtración en gel o intercambio iónico para la separación de polisacáridos con el fin de eliminar las proteínas y algunos otros componentes del producto fermentado (Cerning *et al*, 1990; Cerning *et al*, 1991, Doco, *et al*, 1991, Gruter *et al*, 1993; Manca de Nadra *et al*, 1985)

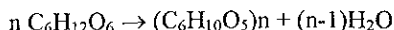
En la mayoría de las investigaciones se ha observado que la purificación del polisacárido después de eliminar la proteína se realiza por precipitación con etanol y algunas veces con acetona, y los precipitados son dializados contra agua destilada para eliminar sales y moléculas de tamaño pequeño (Cerning *et al*, 1990, Cerning *et al*, 1992, Doco *et al*, 1991, Gruter *et al*, 1993; Manca de Nadra *et al*, 1985; Gancel y Novel, 1994 b, Mozzi *et al*, 1995, García-Garibay y Marshall, 1991, Grobбен *et al*, 1995)

La proteína asociada al polisacárido es removida por varios métodos filtración en gel, hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática (Pronasa), esta última es la más utilizada, ya que se ha visto que degrada hasta un 80% de las proteínas presentes (Cerning, 1995)

El último paso para identificar y cuantificar los monosacáridos constituyentes consta de una hidrólisis ácida, utilizando ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético con el objetivo de romper el polisacárido en sus constituyentes básicos (Grobбен *et al*, 1995; Gruter *et al*, 1993). Algunos autores realizan hidrólisis enzimática en ésta última parte (Manca de Nadra *et al*, 1985)

### 3.2.7. Composición química de exopolisacáridos

Químicamente los polisacáridos bacterianos son carbohidratos de alto peso molecular siendo polímeros de monosacáridos neutros y otros derivados tales como ácidos urónicos y aminoazúcares, unidos por enlaces glicosídicos, que se forman por la eliminación de una molécula de agua (Pigman, 1979)



Los EPS bacterianos pueden ser divididos en dos grupos basados en su composición química. Pueden estar formados por un solo tipo de monosacáridos denominándose homopolisacáridos, o bien pueden estar formados por varios tipos de residuos, denominándose heteropolisacáridos (Pigman, 1979). Existen formas lineales y ramificadas. Los homopolisacáridos están constituidos por un solo carbohidrato, el cual generalmente es neutro, mientras que los heteropolisacáridos están constituidos por dos o más carbohidratos, y en ocasiones alguno puede ser de naturaleza aniónica (Chaplin y Kennedy 1987, Pigman, 1979)

Como se muestra en la tabla 3.2.7.1. los monosacáridos más frecuentes en varios EPS son glucosa y galactosa, pero ramnosa, fructosa, manosa, galactosamina y otros azúcares están también presentes (Robijn *et al*, 1995)

**Tabla 3.2.7.1. Principales monosacáridos constituyentes de polisacáridos bacterianos.**

Tipo	Compuesto
Pentosas	D-xilosa, L-arabinosa
Hexosas	D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-fructosa
Hexosaminas	N-acetyl-D-glucosamina, N-acetyl-D-galactosamina
Ácidos urónicos	Ácido D-glucorónico, ácido D-galacturónico
Deoxi hexosas	L-ramnosa, L-fucosa, 6-deoxy-L-talosa

Fuente: Chaplin y Kennedy, 1987

### **3.2.7.1. Composición química de exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus*.**

Como se muestra en la tabla 3.3.7.1. los azúcares constituyentes de EPS que se presentan con mayor frecuencia son glucosa, galactosa y ramnosa, sin embargo fructosa, manosa y arabinosa están presentes en algunos casos. En cuanto a la proporción en la que se encuentra cada uno de ellos observamos que se reportan valores muy diferentes.

Básicamente los métodos de análisis para la identificación y cuantificación de los azúcares reportados son métodos cromatográficos, entre los cuales están, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Como se observa en la tabla 3.3.7.1 los substratos que se utilizan con mayor frecuencia para el estudio de EPS son leche descremada, suero de leche y casaminoácidos, aunque también se utilizan medios químicos. Los monosacáridos presentes en polisacáridos producidos en medios nativos y sintéticos son básicamente los mismos, pero la proporción en la que se encuentran no es comparable del todo ya que las condiciones de crecimiento (temperatura, composición del medio y tiempo de incubación) así como la fuente de carbono y proteína tienen una gran influencia sobre la composición de los mismos, pero los resultados también dependen de la cepa utilizada, ya que diferentes cepas de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* presentan la capacidad de producir distintos tipos de EPS, inclusive la misma cepa presenta cierta inestabilidad.

Tabla 3.2.7.1. Composición química de EPS producidos por *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus*

Autor	Cepa	Substrato	Composición	Proporción	Método de análisis
García Garibay y Marshall, 1991	<i>Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus</i> NCFB 2772	Leche descremada	Se sugiere que el polímero es una glicoproteína débilmente asociada al azúcar	-----	-----
Grobben <i>et al.</i> , 1995	<i>Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus</i> NCFB 2772	Medio químico definido adicionado de lactosa o glucosa	Glucosa, galactosa y ramnosa	1 6 8 0 7	CLAR (detector índice de refracción)
Grobben <i>et al.</i> , 1996		Fructosa como fuente de carbono	Galactosa y Glucosa	2:1	
Manca de Nadra <i>et al.</i> , 1985	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CRL 420	Medio LAPT adicionado al 0.5% con glucosa, fructosa y sacarosa	Glucosa y fructosa	1:2	Glucosa (Método de glucosa oxidasa) Fructosa (Método de Roe) Cromatografía en placa
Cerning <i>et al.</i> , 1994.	<i>Lactobacillus casei</i>	Medio basal mínimo	Glucosa y ramnosa	3 1	-----Cromatografía de gases -----
Cerning <i>et al.</i> , 1988	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche descremada	Glucosa y galactosa	1:1	CLAR
Grueter <i>et al.</i> , 1993	<i>Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus</i> II.	Leche descremada	Galactosa, Glucosa y ramnosa	5 1:1	Resonancia magnética nuclear
Cerning <i>et al.</i> , 1986	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> rr	Leche descremada	Galactosa, glucosa y ramnosa Poca cantidad de manosa, arabinosa y pentosa	4: 1.1	HPTLC



Continuación de la tabla 3.2.7.1.

Autor	Cepa	Substrato	Composición	Proporción	Método de análisis
Gassem <i>et al.</i> , 1997	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sbsp. <i>bulgaricus</i> rr.	Suero dulce adicionado con lactosa, fosfatos, cloruro de amonio, casaminoácidos y sales minerales	Glucosa, galactosa, lactosa y ácido láctico	-----	CLAR
Doco <i>et al.</i> , 1991	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Leche descremada	Galactosa y glucosa	2:1	CLAR
Groux (1973)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-----	Galactosa, glucosa, manosa y arabinosa	-----	-----
Schellhaass (1983)	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Leche descremada	Galactosa y glucosa	2:1	
Bouzar <i>et al.</i> , 1995	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i> CNRZ 1187	Leche descremada	Galactosa, glucosa y manosa		
Robin <i>et al.</i> , 1991	<i>Lactobacillus helveticus</i> 766	Leche descremada	Glucosa y galactosa	2:1	Cromatografía de gases

### **3.3. TECNICAS DE ANALISIS PARA LA IDENTIFICACION DEL POLISACARIDO**

#### **3.3.1 Cromatografía**

La cromatografía es un método físico-químico de separación y puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose ésta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de ellos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento (Abbott, 1970)

Los métodos cromatográficos tienen varias modalidades de acuerdo a ciertos parámetros, como fase móvil, fase estacionaria, el propio fenómeno que ocurre en la columna y la cantidad de muestra aplicada. Cuando se utilizan gases como fase móvil, se llama cromatografía de gases, cuando se utilizan líquidos con alta presión como fase móvil, se llama cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la cual no está limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de las muestras o componentes a estudiar y de la cual se explicará más a detalle (Covarrubias-Herrera y Flores-Prado, 1996)

##### **3.3.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y sus aplicaciones.**

Hoy en día existen múltiples aplicaciones que la cromatografía de líquidos abarca en diversas áreas de la ciencia, entre ellas están las químico-biológicas, médicas, etc. La técnica de CLAR hace posible los análisis rápidos de compuestos no volátiles, iónicos y termolábiles que anteriormente era muy difícil determinar

El perfeccionamiento de detectores, registradores, sistemas de bombeo, etc junto con la disponibilidad de nuevos soportes, han hecho posible que la cromatografía de líquidos resulte un método rápido y eficaz para análisis tan difíciles y variados, como se muestra en la tabla 3 4 2 1 (Bermejo, 1991)

**Tabla 3.3.1.1 Usos típicos de CLAR**

**Investigaciones Químicas y Bioquímicas**

- Análisis de mezclas complejas
- Purificación de compuestos químicos
- Desarrollo de procesos para la síntesis de compuestos orgánicos
- Aislamiento de productos naturales que poseen características biológicas benéficas
- Medición de propiedades físicas (distribución de pesos moleculares de polímeros)

**Control de calidad**

- Asegurar la pureza de los materiales
- Procesos de mejoramiento en el rendimiento del producto
- Ensayos cuantitativos de productos finales para asegurar su especificación
- Evaluación de la estabilidad del producto

Fuente Brian, 1992

La determinación de azúcares ha cobrado un gran interés en la industria de los alimentos. Diferentes métodos de CLAR han sido propuestos para su análisis. Los azúcares son analizados usando generalmente columnas aminadas de sílica gel. La detección es principalmente por índice de refracción gracias a la propiedad que presentan la mayoría de las moléculas de desviar la luz a la derecha o la izquierda. La limitación de este tipo de análisis es la preparación de la muestra (ya que no debe presentar compuestos de alto peso molecular como proteínas, grasa, polisacáridos etc) (Vérette *et al*, 1995).

### **3.3.1.2. Proceso cromatográfico**

La cromatografía líquida separa los compuestos de acuerdo a sus funciones moleculares. El mecanismo mediante el cual se separa un compuesto de otro, implica una interacción selectiva entre las moléculas del soluto (muestra) y dos fases, una estacionaria (columna) y una móvil. El solvente o fase móvil comienza a fluir a través de la columna, dando como resultado el movimiento de las moléculas de la muestra a lo largo de la columna. El proceso de separación de los componentes de la mezcla será el resultado de la adhesión o difusión de dichos componentes en las partículas que forman el empaque de la columna. La diferente velocidad de migración de un compuesto individual a través de una columna depende del equilibrio de distribución de cada compuesto entre la fase estacionaria y móvil. Sin embargo la velocidad de migración es determinada por diversas variables experimentales que afectan su distribución, entre ellas se encuentran las siguientes:

- La composición de la fase móvil
- La composición de la fase estacionaria
- La temperatura de separación
- La afinidad de los compuestos a separar con la fase estacionaria y móvil

La presión en la columna afecta el equilibrio de distribución y la velocidad de migración, por lo que se recomienda utilizar la presión en un intervalo de 500 a 3000 psi.

### **3.3.2. Instrumentación en CLAR**

Los componentes fundamentales de un sistema cromatográfico son muy específicos y cada uno de ellos realiza una función propia, a continuación se mencionan sus principales características.

- a) Recipiente para la fase móvil
- b) Bomba
- c) Inyector
- d) Columna cromatográfica
- e) Detector
- f) Integrador

a) Los cromatógrafos de líquidos están equipados con uno ó más recipientes, generalmente de vidrio para el suministro de las fases móviles; en las mangueras de entrada de la fase móvil se instala un filtro para evitar el uso de partículas al sistema

b) Las bombas son sistemas que alcanzan presiones superiores a los 340 bares, y es conveniente que no haya pulsaciones porque se manifestarían como ruido en el detector. Las bombas deben ser de acero inoxidable o materiales no corrosivos (aleaciones de titanio)

c) Las válvulas de inyección son los dispositivos más utilizados para la introducción de la muestra al sistema cromatográfico, deben ser fáciles de operar, ser inertes a ataques químicos, soportar altas presiones y ser precisas en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema.

d) La columna es la parte principal de un cromatógrafo, por tanto es fundamental optimizar su eficiencia y tener los cuidados de protegerla de contaminantes y alargar su utilidad. La columna tiene el empaque necesario para la separación deseada, puede ser de sílice, fases enlazadas, grupos funcionales de intercambio iónico, geles de porosidad específica, etc

La tabla 3.3.2.1. muestra los principales tipos de columnas, las condiciones en que se usan, y sus aplicaciones

**Tabla 3.3.2.1. Columnas y condiciones típicas para análisis de carbohidratos en CLAR**

Tipo de columna	Fase móvil	Temperatura (°C)	Velocidad de flujo (ml/min)	Análisis
Intercambio aniónico (amonio cuaternario)	Sol. amortiguadoras	65	1.0	Alditoles, monosacáridos y ácido siálicico
Intercambio aniónico (amino OH)	Acetonitrilo/agua	25	2.5	Monosacáridos y polisacáridos
Intercambio catiónico (sulfonatos H <sup>+</sup> )	Acetonitrilo/agua	30	0.6	Glicoproteínas y derivados de carbohidratos
Intercambio catiónico (sulfonatos Ca <sup>+</sup> )	Agua	85	0.6	Alditoles y monosacáridos
Sílica, fase normal	Acetonitrilo /agua	25	0.54	Derivados de carbohidratos
Sílica, fase normal	Acetonitrilo/agua+ diaminoalcanos	25	1.0	Monosacáridos y oligosacáridos
Sílica, fase reversa	Acetonitrilo/agua	28	1.0	Derivados de carbohidratos

Fuente Chaplin y Kennedy 1985.

e) Los detectores son sensibles a diferentes propiedades; por ejemplo, absorbancia, índice de refracción, radioactividad, conductividad, fluorescencia, amperaje, etc.,

Los detectores más comunes son los siguientes y sus características se presentan en la tabla 3.3.2.2

- Fotómetros y espectrofotómetros de ultravioleta y visible.
- Detector fluorométrico
- Índice de refracción
- Detector Electroquímico

**Tabla 3.3.2.1.1. Principales características de los detectores más comunes**

Tipo	Respuesta	Nivel de ruido	$C_N$ $g\ cm^{-3}$	Rango lineal	Volumen de inyección ( $\mu l$ )
UV-visible	Selectivo	$10^{-4}$ a.u	$10^{-8}$	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	1-100
Fluorescente	Selectivo	$10^{-7}$ a u	$10^{-12}$	$10^3$ - $10^4$	1-30
Conductividad	Selectivo	$10^{-2}$	$10^{-7}$	$10^3$ - $10^1$	1-5
Amperométrico	Selectivo	0 InA	$10^{-10}$	$10^4$ - $10^5$	0.5-5
Índice de Refracción	Universal	$10^{-7}$ r.i.u.	$10^{-6}$	$10^3$ - $10^4$	100-500

Fuente Lindsay, 1992

Nota a u = absorbancia, r i u. = unidades de índice de refracción,  $C_N$  = concentración del soluto que puede ser detectada, nA = nanoamperes

f) El integrador no sólo obtiene un registro gráfico (cromatograma), sino también su tratamiento matemático para el cálculo de las concentraciones

En el presente trabajo se utilizó un detector electroquímico por lo cual se explican sus fundamentos más adelante.

### 3.3.2.1 Detector Electroquímico

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector índice de refracción y altamente selectivo. La selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

La detección de compuestos con propiedades oxido-reductoras ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del eluido de la columna. Este detector emplea tres electrodos, el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar. La reacción redox es inducida en el electrodo de trabajo, mientras el electrodo auxiliar provee la carga de neutralización complementaria. Entre estos electrodos se fija el voltaje apropiado para la

detección El electrodo de referencia, por su parte, produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo, y un potenciostato provee una diferencia de potencial estable entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, la que se monitorea por retroalimentación desde el electrodo de referencia, causada por la transferencia de electrones del proceso de óxido-reducción Su principal limitación está dada por el tipo de fase móvil a emplear, que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa e intercambio iónico

Los electrodos que se emplean son de pasta de carbón cristalino, platino, oro y mercurio Como fases móviles se emplean soluciones amortiguadoras (ya que deben ser conductoras) a concentraciones no mayores de 0.02 M

### **3.3. Análisis cuantitativo**

La cromatografía líquida de alta resolución es una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. Como todo método de análisis cuantitativo, está compuesto de los siguientes pasos: muestreo, preparación de la muestra, inyección de la muestra, separación cromatográfica, detección, integración de la señal y el cálculo de la concentración del analito (Snyder y Kirkland, 1973)

La concentración del analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber.

- Normalización interna (estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno
- Estándar agregado



La selección del método de cuantificación más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia

Para la realización del análisis cuantitativo de este trabajo se utilizó el método de estándar externo, el cual consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración del analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. La concentración del analito puede obtenerse gráficamente utilizando para ello una curva de calibración, para lo cual es necesario que el método sea lineal y proporcional (Quattrocchi *et al.*, 1992)

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. Objetivo General

Analizar la composición química del exopolisacárido producido por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* en términos de los azúcares que lo constituyen por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

### 4.2. Objetivos particulares

- Estudiar el efecto del sustrato utilizado durante la fermentación en la producción de exopolisacárido.
- Estudiar la relación proteína-carbohidrato del polisacárido precipitado.
- Establecer la influencia del sustrato utilizado en la composición del exopolisacárido.
- Establecer si la composición del exopolisacárido influye sobre la propiedad filante.

## 5. MATERIALES Y METODOS

---

### 5.1 Microorganismos

Para la realización de este proyecto se utilizaron la cepa filante *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (NCFB 2772) y como control, la cepa no filante *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* (NCFB 1489) ambas de la National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra. Las cepas se resembraron en Litmus Milk (Difco, Detroit, Michigan, USA).

### 5.2 Fermentaciones

#### 5.2.1 Preparación del cultivo iniciador

Para la preparación de los inóculos se preparó leche descremada (Nestlé, México) al 10 % de sólidos totales y se esterilizó a 121°C por 5 min. Se inoculó con la cepa seleccionada al 5% (v/v), se incubó durante 12-15 horas a 37° C.

#### 5.2.2 Substratos

Para evaluar el efecto del sustrato sobre la producción y composición química del exopolisacárido, se utilizaron cuatro diferentes sustratos para la fermentación, los cuáles se describen en la tabla 5.2.2.1.

Se realizó la determinación de proteína por el método de Lowry y carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico para cada sustrato. En la siguiente tabla 5.2.2.1 se muestran también las principales características de los sustratos utilizados.

**Tabla. 5.2.2.1. Características de los sustratos utilizados en la producción de polisacárido**

Substrato	Marca	Tipo de proteína presente	Cantidad de proteína Método de Lowry	Cantidad de carbohidratos Método de Fenol-Sulfúrico
Leche descremada al 12% de sólidos totales (S.T.)	Nestlé, México	caseínas y proteínas de suero	9 074 mg/ml	8.80 mg/ml
Suero al 12 % de S T	Kerry, México	proteínas de suero	20 3 mg/ml	14 34 mg/ml
Suero al 12 % de S.T adicionado de caseínas al 1 5%	Kerry, México y Sigma, México	proteínas de suero y caseínas	27 73 mg/ml	9 97 mg/ml
Retenido de Leche por ultrafiltración al 12% de S T.	New Zeland Dairy Board, Nueva Zelanda	proteínas de suero y caseínas	36 87 mg/ml	5 94 mg/ml

### 5.2.2.1 Preparación de sustratos.

Se prepararon tres litros de leche descremada y se distribuyeron en partes iguales en ocho matraces erlenmeyer de 500 ml previamente estériles, donde 4 lotes se utilizaron para sembrar a la cepa filante *de Lactobacillus delbrueckii* ss *bulgaricus* (2772) y los restantes para la cepa no filante (1489)

Se pasteurizaron los matraces con la leche, sometiéndolos a un tratamiento térmico durante 5 minutos a aproximadamente 90 °C y se dejaron enfriar en una cama de hielo, esta operación se repitió dos veces. Se guardaron en el refrigerador para iniciar la fermentación al día siguiente. Posteriormente se inoculó el sustrato con el cultivo iniciador al 5% (v/v) Se incubó a 42°C hasta alcanzar un pH aproximado a 4.6.

### 5.2.3. Formación de productos de fermentación

#### Reactivos

- NaOH 0.1 N (Sigma, México).
- Fenofaleína al 1% (Sigma, México).

Sé midió el pH (Conductronic pH 20) y la acidez total expresada como porcentaje de ácido láctico, cada dos horas durante la fermentación, titulando con NaOH y fenofaleína al 1% como indicador

Este procedimiento se realizó para cada substrato con un volumen de muestra de 5 mL. La fermentación se realizó por cuadruplicado por lo que el tamaño de muestra fue de 32 lotes

### 5.3. Cuantificación de exopolisacárido (García-Garibay y Marshall 1991)

#### Reactivos.

- Ácido tricloroacético al 80% (TCA) (Baker, México)
- Etanol absoluto (J T Baker, México)
- Dextrana (Sigma D-3759, Dextrana Grado Industrial P.M.  $\approx$  71,500 daltones)

#### Técnica

A 6 mL de leche fermentada se le adicionó 1 mL de TCA y se agitó en vortex unos segundos. Posteriormente se centrifugó (centrifuga Beckman modelo J2-MI) a 10,000 rpm durante 30 min. Después sé tomaron 2 mL del sobrenadante y se adicionaron 2 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se dejó reposar 20 minutos. Después se midió la turbidez de la solución con un  $\lambda = 720$  nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV, 160A. Se interpolaron los valores obtenidos en una curva patrón de dextrana a diferentes concentraciones (0.12 – 1.0 mg/mL)

## 5.4. Purificación del polisacárido

### Reactivos

- Ácido tricloroacético (J T Baker, México)
- NaOH (Sigma, México) 4 N
- Etanol absoluto (J.T Baker, México)
- Membranas de celulosa (Sigma, México)

### Técnica

A 200 mL de leche fermentada se le adicionaron 333 mL de ácido tricloroacético, se centrifugaron a 10,000 r.p.m durante 31 minutos para precipitar las proteínas del suero. Posteriormente se decantó al sobrenadante y se ajustó el pH a 7 con NaOH 4N, después se mezcló con tres volúmenes iguales de etanol absoluto, se dejó reposar y se centrifugó a 4,000 r.p.m 21 min. se deshecho el sobrenadante y el pellet se disolvió en 80 ml de agua ajustándose el pH a 4 para disolver el polímero, éste último paso se repitió para obtener una mayor purificación. Posteriormente se dializó contra agua destilada en membranas de celulosa con un tamaño de poro de 12,000 daltones por 48 horas a 4°C con agitación continua y cambios frecuentes de agua destilada con el fin de eliminar sales y moléculas pequeñas.

## 5.5. Determinación de relación proteína-carbohidratos en el polisacárido precipitado.

La proteína se cuantificó por el método de Lowry (1951) y los carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico. Posteriormente se calculó la relación existente entre ambos y se expresó en mg proteína/mg de carbohidrato.

### 5.5.1. Determinación de proteína (Lowry)

El método de Lowry *et al*, (1951) y se basa en la formación del complejo cobre - proteína en condiciones alcalinas, seguida de una reacción óxido reducción con el reactivo de Folin

Se preparó una mezcla con los siguientes reactivos

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (J T Baker) 2% en NaOH 0.1 N 50 volúmenes
- $\text{CuSO}_4$  al 1% en agua (J.T Baker) 1 volumen
- Tartrato de Sodio y Potasio 2% en agua (J T Baker) 1 volumen
- Reactivo de Folin (Sigma, México)

#### Técnica

Se tomó 1 mL de muestra y se adicionaron 5 mL de la solución anterior, se agitaron en un vortex y se dejaron reposar en la obscuridad 10 min. Posteriormente se adicionó el reactivo de folin en un volumen de 0.5 ml se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos en la obscuridad debido a que el complejo formado es inestable si se expone a la luz y se leyó absorbancia a  $\lambda = 590 \text{ nm}$

### 5.5.2. Determinación de carbohidratos por el método de (Fenol-sulfúrico)

Generalmente todos los carbohidratos reaccionan con este reactivo produciendo un color estable. El reactivo es tan ácido que puede reaccionar con los polisacáridos, hidrolizándose hasta los monosacáridos que lo componen. La técnica es relativamente fácil y se utilizan los siguientes reactivos:

- Fenol al 5% (J.T.Baker, México) en agua destilada
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (J T.Baker, México)

Se adicionó 1 mL de muestra a un tubo de ensaye y se agregó 0.6 mL de fenol al 5%, se agitó en un vortex y se adicionó con mucho cuidado 3.6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se mezcló perfectamente y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 20 min) Se leyó a 480 nm contra un blanco preparado de la misma manera. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva patrón elaborada con glucosa (0-100 µg de glucosa/ml)

## 5.6. Hidrólisis enzimática del polisacárido

### Reactivos

- Hidroximetil aminometano (Tris) (Sigma, USA)
- Etilendinitrilotetracético (EDTA) (J.T. Baker, México) 0.01 M
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, México)
- Pronasa (proteínase from *Streptomyces griseus*, Boehringer, Mannheim, Germany) en una proporción 1:100

Se tomaron 30 mL de polisacárido precipitado de cada substrato y de ambas cepas, se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante 30 minutos, el pellet se redisolvió en solución amortiguadora que contenía Tris 0.1 M pH 7.5, EDTA 0.01 M y SDS 0.5%, la proteína asociada al polisacárido se hidrolizó con Pronasa a pH 7.5 y se incubaron a 40°C por 40 h. Posteriormente los hidrolizados se dializaron contra agua destilada durante 24 h y con cambios frecuentes de agua. Después de la diálisis se centrifugaron las muestras a 15,000 r.p.m. durante 30 minutos. El pellet se redisolvió en 5 mL de agua y se determinó proteína por el método de Lowry *et al*, 1951 para corroborar la ausencia de proteína en el polisacárido. También se determinó carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico.



## 5.7 Hidrólisis ácida del polisacárido

### Reactivos

- Ácido trifluoroacético (Sigma, USA)
- Nitrógeno gaseoso (Praxair, México)
- Metanol absoluto (J T Baker, México)
- NaOH (Sigma, México) 4 N

### Técnica

De las muestras liofilizadas, se pesaron 100 mg aproximadamente de cada una de ellas y se disolvieron en 0.5 mL de agua y se adicionaron 0.5 mL de ácido trifluoroacético para tener una concentración 2 M del ácido. Las muestras se sometieron a una temperatura de 120 ° C por un intervalo de tiempo de 2-3 h. Posteriormente se evaporó el ácido en un baño de agua a 50° C en corriente de nitrógeno. La muestra se trató 4 veces con 1 mL de metanol esperando que se evaporara después de cada adición en un baño de agua a 50°C en corriente de nitrógeno. La muestra se resuspendió en 5 mL de agua y se neutralizó con NaOH, se filtró y se lavó con agua y después se evaporaron las muestras en baño de agua con corriente de nitrógeno.

*Una vez evaporadas las muestras se resuspendieron en 1 mL de la mezcla acetoniitrilo-agua (en una proporción 15-85), se dejaron reposar 30 min., y se centrifugaron a 10000 r.p.m. por 10 min. El sobrenadante se guardó en viales de 2 ml y se congelaron hasta su análisis en HPLC.*

## 5.8 Determinación de monosacáridos por cromatografía de líquidos de alta resolución

### Reactivos:

- Estándar de glucosa (Aldrich, México)
- Estándar de galactosa (Sigma, México)
- Estándar de ramnosa (Sigma, México)
- Fase móvil Acetonitrilo (Prolabo, Francia)
- Ácido fórmico/formiato de sodio
- Agua desionizada

### Equipo:

- Equipo HPLC Polymers Laboratories, modelo LC 1150 (GBC Equipo científico Pty Ltd., Australia)
- Se utilizó un detector electroquímico Modelo 141 (Gilson, Villiers Le Bel, Francia)
- Se utilizó una columna de  $\beta$ -ciclodextrina Cyclobond I 2000, (Avances en tecnología de separación Inc, Whippany NBJ, USA)
- Un sonicador (Modelo SC100, USA)

### Condiciones de Trabajo:

- Se fijó un potencial redox  $E^{\circ} = -0.48$  v con un electrodo de carbono
- La fase móvil utilizada fue acetonitrilo-agua en una proporción (15:85). Se adicionó a la fase un buffer de ácido fórmico/formiato de sodio (Merck, México) en una concentración de 0.02 M y un pH = 3.82
- El volumen de flujo fue de 0.5 mL/min
- Temperatura 25° C

## Técnica

Se prepararon soluciones estándar de glucosa, galactosa y ramnosa en una concentración de 3 mg /mL y se procedió a realizar las diluciones correspondientes. Se realizó una curva patrón para cada estándar con las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5 8 1 Concentraciones utilizadas para la elaboración de las curvas patrón para cada estándar

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
3
10
30
50
247.5
350
495

Primero se inyectó cada uno de los estándares por separado para obtener los tiempos de retención de cada uno de ellos. Posteriormente, una vez establecidas las condiciones de trabajo, se procedió a inyectar una mezcla de los estándares en una concentración igual para cada uno. Después se inyectaron las muestras problemas, el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{l}$  en todas las muestras.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Cinética de fermentación

Se sabe que el crecimiento de bacterias lácticas depende de diversas variables como la temperatura, pH, osmoralidad y características del substrato utilizado durante la fermentación láctica (García-Garibay *et al.*, 1993).

Existen pruebas indirectas para medir el crecimiento de bacterias lácticas como el cambio de pH y el desarrollo de acidez (% de ácido láctico) La formación del coágulo se debe a la disminución del pH a un valor cercano a 4.6 y por la producción de ácido láctico lo cual desestabiliza las micelas de caseína coalesciendolas en forma de conglomerados (Amiot, 1991)

A continuación se muestra la tabla 6.6.1 donde se compara el porcentaje de ácido láctico producido al final de la fermentación por la cepa filante y la no filante en los substratos: suero, suero con caseína, leche y retenido de leche.

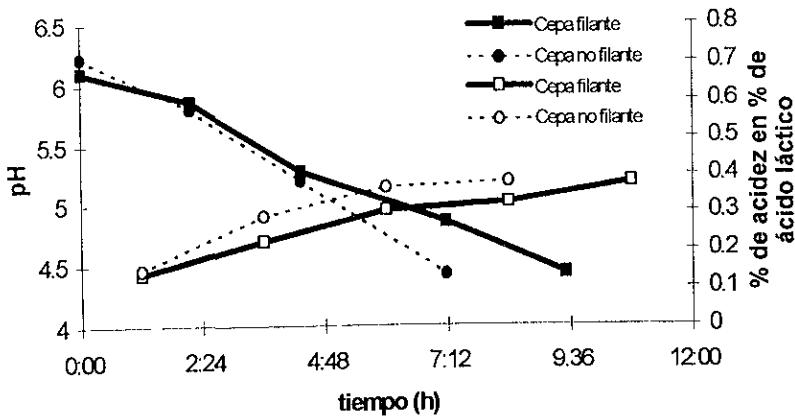
**Tabla 6.6.1 Porcentaje de ácido láctico producido por la cepa filante y la no filante al final de la fermentación.**

SUSTRATO	CEPA FILANTE	CEPA NO FILANTE
	% DE ÁCIDO LÁCTICO	
Suero	0.3678	0.3796
Suero adicionado con caseína	0.4500	0.3180
Leche descremada	0.5478	0.5808
Retenido de leche	0.7200	0.6300

Los resultados que se observan en la tabla 6.6.1 nos demuestran a grandes rasgos que el tipo de sustrato utilizado en la fermentación láctica tiene influencia sobre la producción de ácido láctico

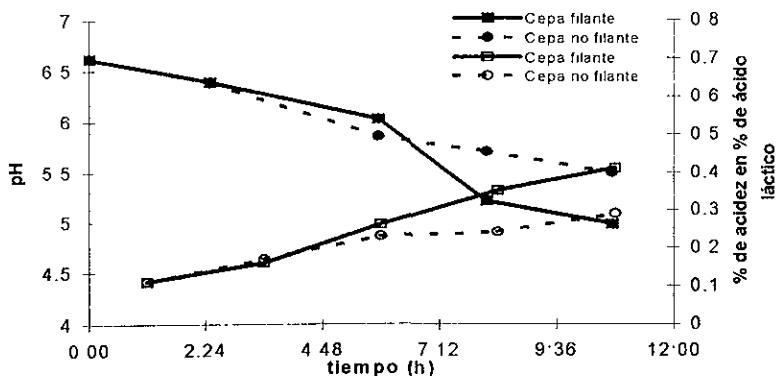
La figura 6.1.1 nos muestra la cinética de fermentación en suero de leche, observando que el porcentaje de ácido láctico aumenta de manera proporcional con respecto al tiempo, llegando a un valor de 0.38% aproximadamente para la cepa filante y la no filante, lo que nos podría sugerir que las proteínas del suero son igualmente asimilables por ambas cepas. También podemos observar en la gráfica que el tiempo para llegar a un pH cercano a 4.6 fue más corto para la cepa filante.

Figura 6.1.1. Cinética de fermentación en suero usando como inóculo una cepa filante y una no filante.



La figura 6.1.2. nos muestra la cinética de fermentación en el sustrato suero con caseína, observándose una tendencia en la disminución de pH y por consiguiente un aumento en la producción de ácido láctico por ambas cepas, sin embargo este último fue mayor para la cepa filante (0.45) que para la no filante (0.32). También se observa en la tabla 6.6.1 que la producción de ácido láctico es mayor en este sustrato que en suero, debido posiblemente a la presencia de caseína, lo que podría sugerirnos que la fuente de proteína influye sobre la producción del mismo

**Figura 6.1.2. Cinética de fermentación en suero adicionado con caseína en una proporción de 1.5%, usando como inoculo una cepa filante y una no filante**



En la figura 6.1.3 y en la figura 6.1.4 se muestran la cinética de fermentación en leche descremada y retenido de leche respectivamente. El porcentaje de ácido láctico producido en leche descremada fue de 0.56% para la cepa filante y 0.58% para la no filante. En retenido de leche 0.72% para la cepa filante y 0.63% para la no filante (Tabla 6.6.1). De estos dos últimos sustratos se observó que la cantidad producida de ácido láctico fue mayor a medida que aumentó la concentración de caseína en los sustratos

Figura 6.1.3. Cinética de fermentación en leche descremada, usando como inóculo una cepa filante y una no filante.

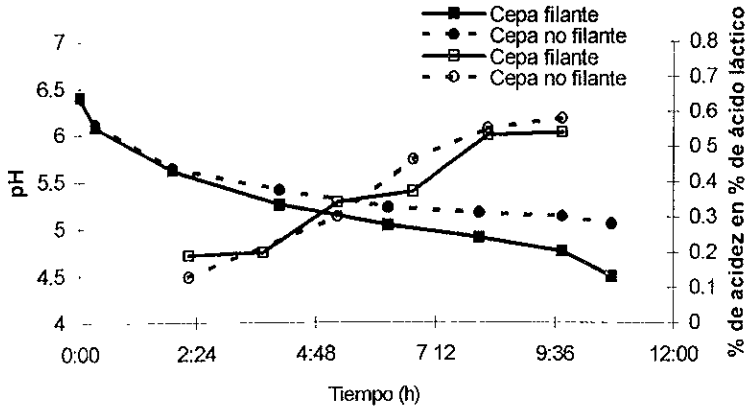
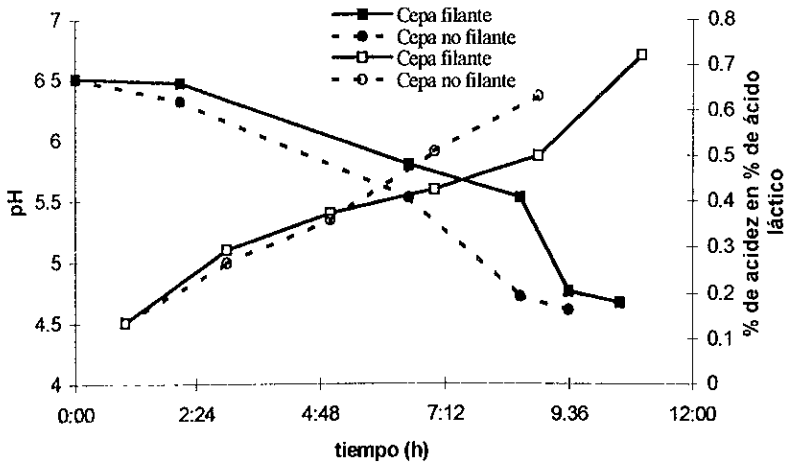


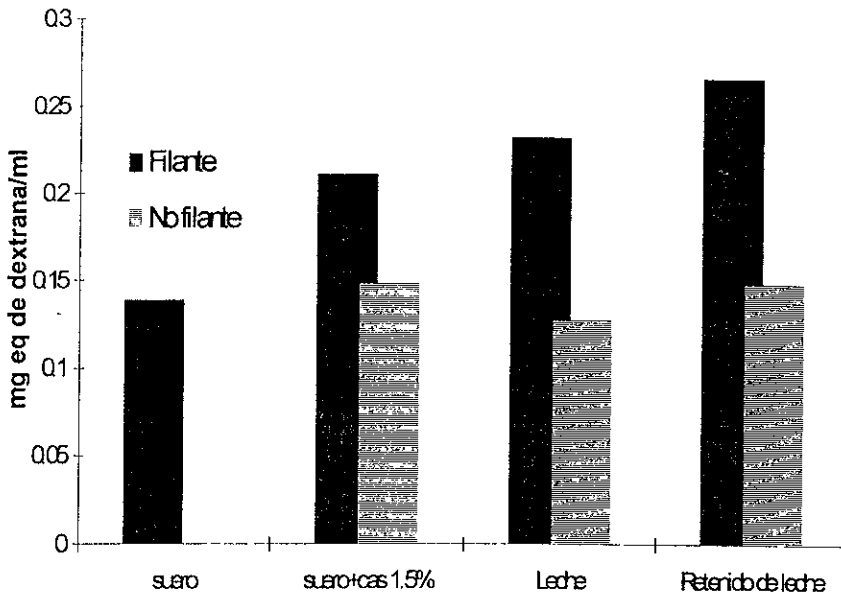
Figura 6.1.4. Cinética de fermentación en retenido de leche por ultrafiltración, usando como inóculo una cepa filante y una no filante



## 6.2. Cuantificación del exopolisacárido

Como se observa en la Fig. 6.2.1, la producción de polímero fue mayor (0.26 mg eq de dextrana/ml) en retenido de leche mientras que en suero la producción fue la mitad (0.13). En los substratos donde la principal fuente de proteína es la caseína se ve favorecida la producción de éste, por lo que la cantidad y el tipo de proteína presente en los substratos tiene influencia sobre la cantidad de EPS producido. También se observó que la cepa filante produce una mayor cantidad de polímero que la no filante en todos los substratos; en suero no se detectó la cantidad de EPS producido por la cepa no filante.

Figura 6.2.1 Cuantificación del exopolisacárido producido en diferentes substratos.

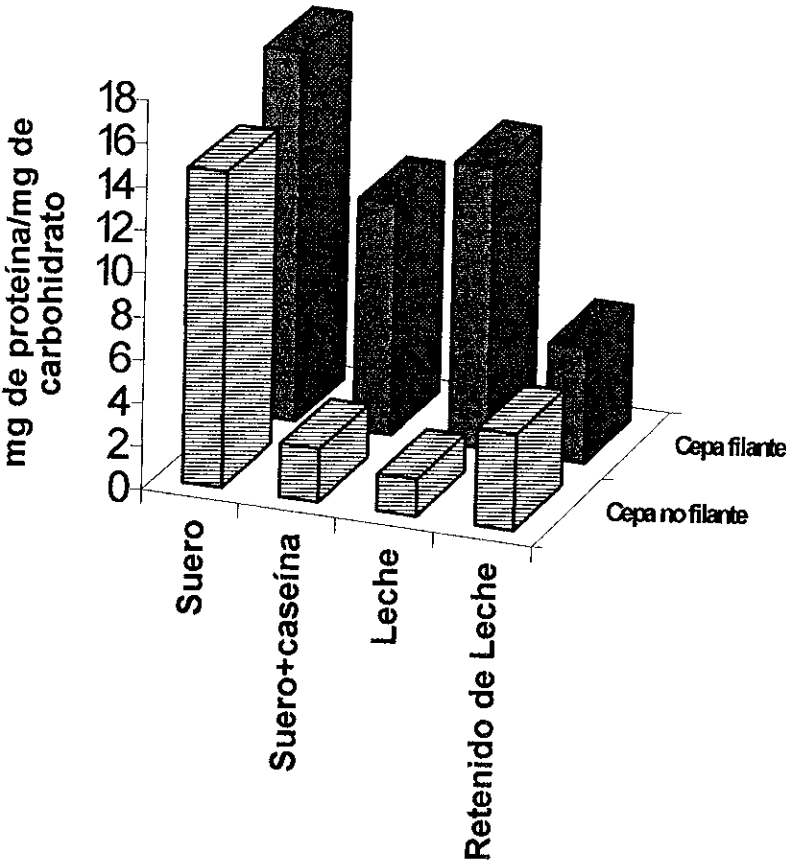




### 6.3. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en extracto puro.

Después de aislar y purificar el polisacárido producido en los diferentes substratos por ambas cepas, se determinó la relación proteína-carbohidrato para cada muestra, encontrándose diferencias entre ellas. En la figura 6.3.1 se muestra que hay una tendencia para cada substrato, de una mayor relación proteína-carbohidrato en la cepa filante que en la no filante, por ejemplo, en leche la relación mg proteína/mg carbohidrato fue de 13 para la cepa filante, mientras que para la cepa no filante de 1,7, lo cual sugiere que el carácter filante podría influir en las interacciones que existen entre el EPS y las proteínas de la leche, específicamente con las caseínas, y que la cepa no filante produce un EPS que no las asocia. También se observa que en retenido de leche, donde la concentración de caseína es mayor, la relación proteína-carbohidrato es similar para ambas cepas.

Figura 6.3.1. Determinación de la relación proteína-carbohidrato en el extracto puro.



## 6.4. Caracterización química

La caracterización química del polisacárido producido por *Lactobacillus delbrueckii* ss *bulgaricus* se realizó por Cromatografía de líquidos de alta resolución. Las condiciones de trabajo se explicaron en la parte experimental de este proyecto. A continuación se presentan las curvas patrón elaboradas para la identificación y cuantificación de los monosacáridos constituyentes del exopolisacárido (Fig 6.4.1 a 6.4.3 y tablas 6.4.1 a 6.4.3)

Fig. 6.4.1 Curva patrón de ramnosa

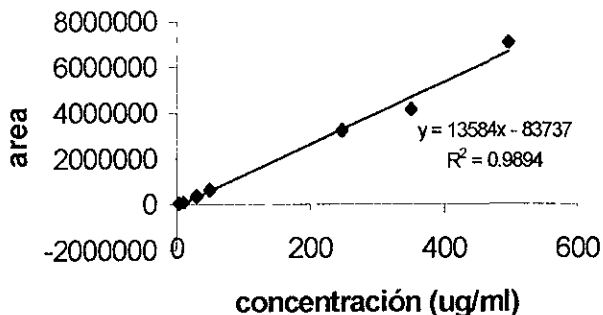


Tabla 6.4.1 Rango de concentraciones para la curva patrón de ramnosa

Concentración (µg/ml)	Área
3	51185
10	87394
30	363214
50	622654
247.5	3207920
350	4143490
495	7041997

Fig. 6.4.2 Curva patrón de glucosa

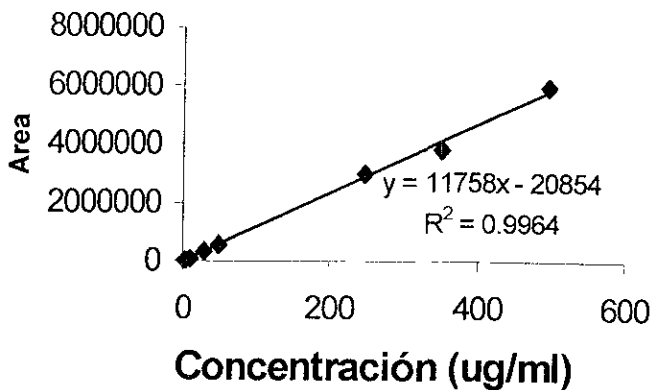


Tabla 6.4.2. Rango de concentraciones para la curva patrón de glucosa

Concentración (µg/ml)	Área
3	40458
10	84005
30	344147
50	573367
247.5	2996450
350	3807037
495	5947760

Fig. 6.4.3. Curva patrón de galactosa

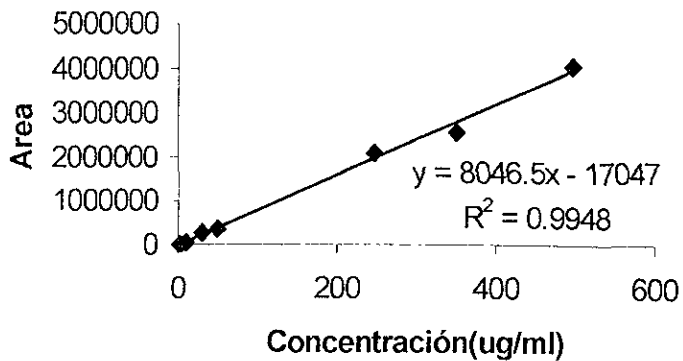


Tabla 6.4.3. Rango de concentraciones para la curva patrón de galactosa

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area
3	60166
10	267519
30	360537
50	2091688
247.5	2571509
350	4068320

## 6.5. Perfil de monosacáridos encontrados en el polisacárido hidrolizado en los diferentes sustratos

La Fig No 6.5.1 corresponde a un blanco que se utilizó como referencia para comparar las señales obtenidas en las muestras. Como se puede observar no se detecta ningún compuesto que interfiera en el análisis. La señal que se observa es solamente la debida al efecto de inyección por el solvente.

La Fig No 6.5.2 corresponde a un control (dextrana) que se utilizó para comprobar si la hidrólisis de un polisacárido se podría efectuar adecuadamente. Solo se identifica un monosacárido: 1) glucosa, el cual es el único constituyente de la dextrana.

La Fig No 6.5.3 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* (NCFB 2772) en suero de leche. Se identifican los siguientes monosacáridos: 1) glucosa y 2) galactosa.

La Fig No 6.5.4 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* (NCFB 1489) en suero de leche. Se identifican los siguientes monosacáridos: 1) glucosa, 2) galactosa.

La Fig. No.6.5.5 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* (NCFB 2772) en suero con caseínas. Se identifican los siguientes monosacáridos: 1) glucosa, 2) galactosa.

La Fig. No.6.5.6 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* (NCFB 1489) producido en suero con caseínas. Se identifican los siguientes monosacáridos: 1) glucosa, 2) galactosa.

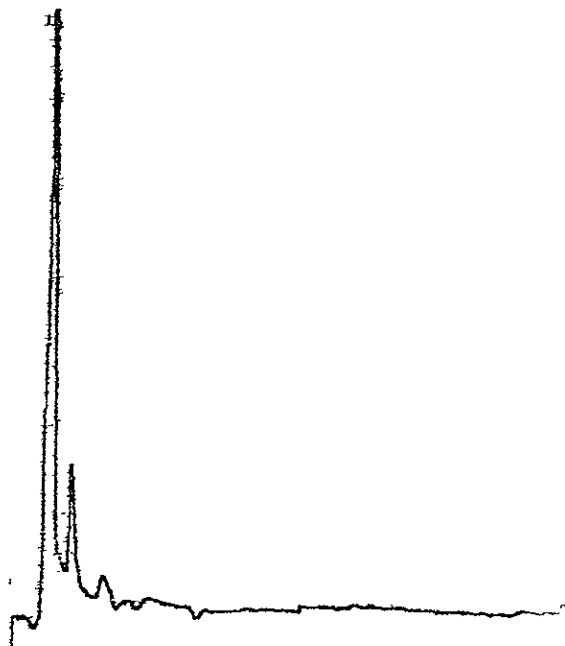
La Fig No.6.5.7 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* (NCFB 2772) en leche descremada. Se identifican los siguientes monosacáridos: 1) desconocido; 2) ramnosa, 3) glucosa, 4) galactosa.

La Fig No 6 5 8 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* producido (NCFB 1489) en **leche descremada**. Se identifican los siguientes monosacáridos 1) desconocido, 2) glucosa y 3) galactosa

La Fig No 6 5 9 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* (NCFB 2772) en **retenido de leche**. Se identifican los siguientes monosacáridos 1) ramnosa, 2) glucosa y 3) galactosa

La Fig No 6 5 10 muestra los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa no filante de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* (NCFB 1489) en **retenido de leche**. Se identifican los siguientes monosacáridos 1) desconocido 2) ramnosa, 3) glucosa y 4) galactosa

## 6.5. Cromatogramas del polisacárido hidrolizado en los diferentes sustratos

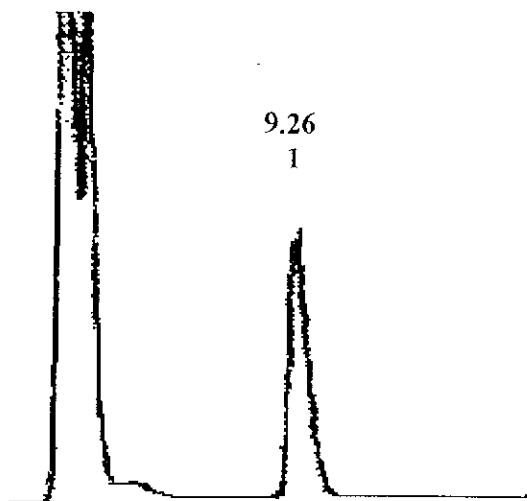


**Fig. 6.5.1. Corresponde a un blanco y la señal que se observa es solamente debida al solvente.**

Condiciones de trabajo

Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil = Acetonitrilo-Agua (85:15) Flujo = 0.5 ml/min, volumen de inyección = 5  $\mu$ l

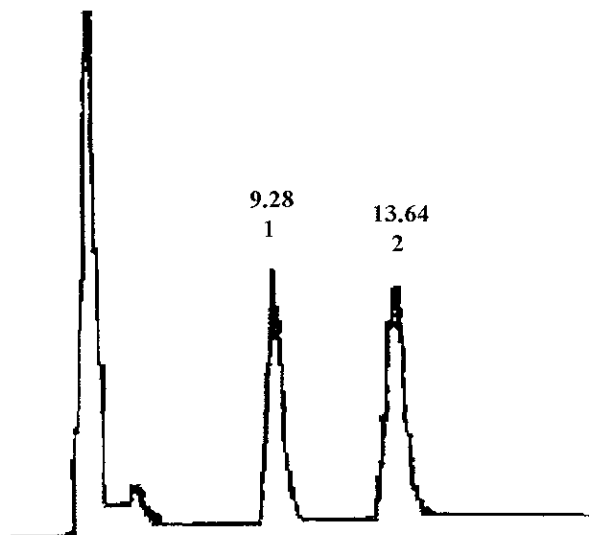




**Fig. No. 6.5.2. Corresponde a un control que se utilizó para comprobar si la hidrólisis se había efectuado. El primer pico corresponde al solvente. Se identifica el siguiente monosacárido: 1) glucosa**

Condiciones de trabajo.

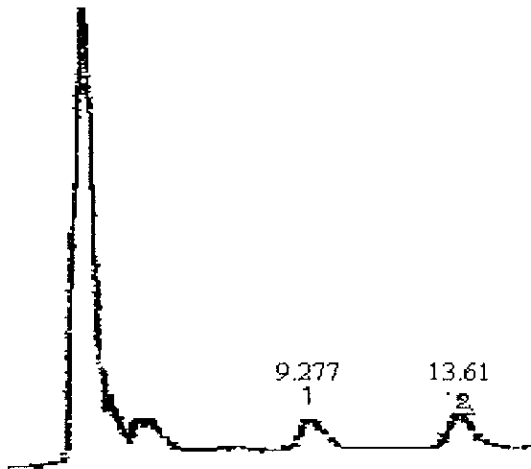
Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85/15) Flujo = 0.5 ml/min, volumen de inyección = 5  $\mu$ l



**Fig. No.6.5.3. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en suero por la cepa filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) glucosa; 2) galactosa.**

Condiciones de trabajo:

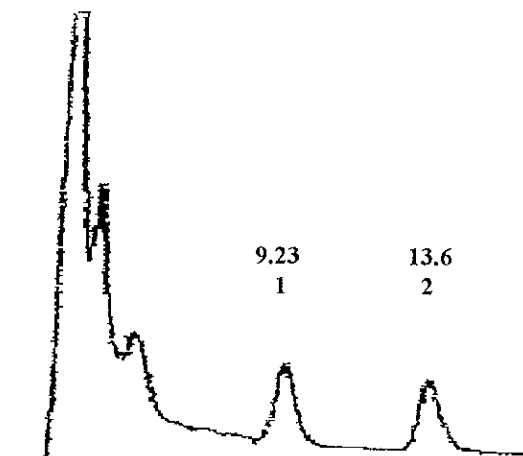
Detector electroquímico  $E = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85:15) Flujo = 0.5 ml/min, volumen de inyección = 5  $\mu$ l



**Fig. No.6.5.4. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en suero por la cepa no filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) glucosa; 2) galactosa**

Condiciones de trabajo:

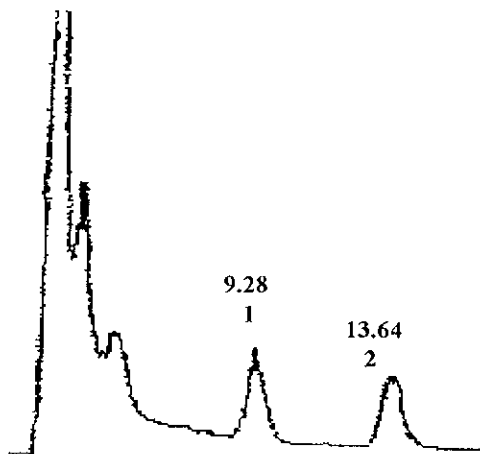
Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85:15) Flujo=0.5 ml/min, volumen de inyección=5  $\mu$ l



**Fig. No.6.5.5. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en suero adicionado con caseína por la cepa filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) glucosa; 2) galactosa**

Condiciones de trabajo.

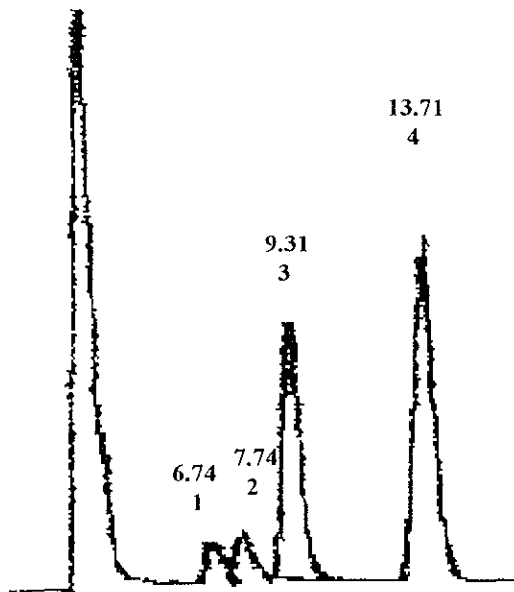
Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil Acetonitrilo-Agua (85:15) Flujo=0.5ml/min, volumen de inyección=5 $\mu$ l



**Fig. No.6.5.6 Monosacáridos constituyentes del EPS producido en suero adicionado con caseína por la cepa no filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) glucosa; 2) galactosa**

Condiciones de trabajo:

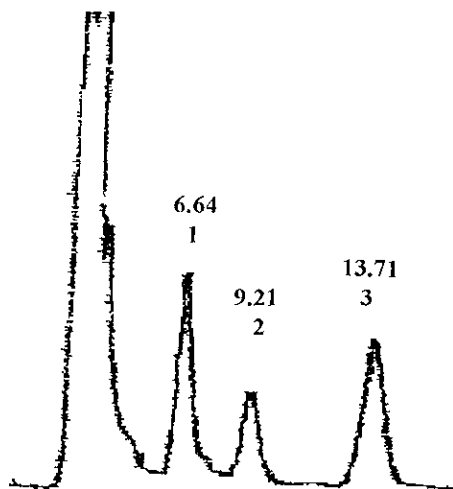
Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil Acetonitrilo-Agua (85:15) Flujo = 0.5 ml/min, volumen de inyección = 5  $\mu$ l



**Fig. No.6.5.7. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en leche descremada por la cepa filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) desconocido; 2) ramnosa ; 3) glucosa; 4) galactosa.**

Condiciones de trabajo:

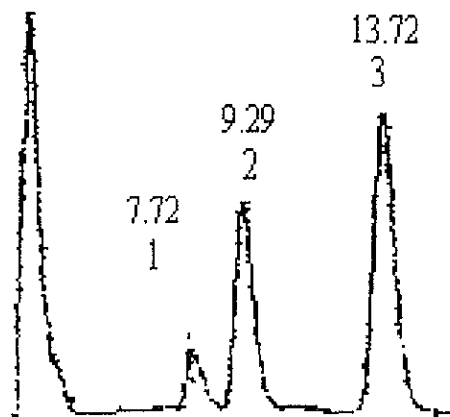
Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85:15) Flujo=0.5ml/min, volumen de inyección=5 $\mu$ l



**Fig. No.6.5.8. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en leche descremada por la cepa no filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) desconocido; 2) glucosa; 3) galactosa**

Condiciones de trabajo:

Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85:15) Flujo=0.5 ml/min, volumen de inyección=5  $\mu$ l

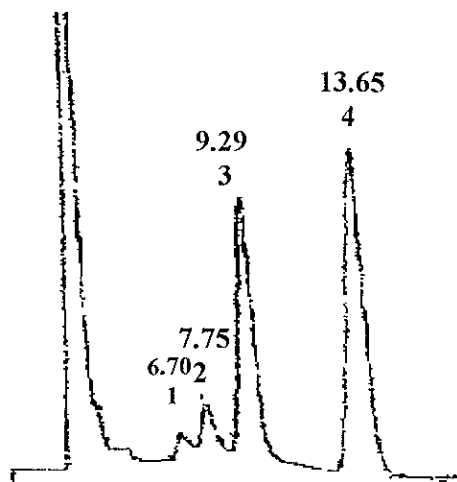


**ig. No.6.5.9. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en retenido de leche por la cepa filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) ramnosa; 2) glucosa; 3) galactosa**

Condiciones de trabajo:

Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85 15) Flujo=0.5ml/min, volumen de inyección=5 $\mu$ l





**Fig. No. 6.5.10. Monosacáridos constituyentes del EPS producido en retenido de leche por la cepa no filante. El primer pico corresponde al solvente; 1) desconocido; 2) ramnosa; 3) glucosa; 4) galactosa**

Condiciones de trabajo

Detector electroquímico  $E^{\circ} = -0.48$ , Fase móvil acetonitrilo-agua (85:15) Fujo=0.5ml/min, volumen de inyección=5 $\mu$ l

## 6.6. Cuantificación de los monosacáridos encontrados en el polisacárido hidrolizado

La cuantificación de los monosacáridos constituyentes del polisacárido producido en los sustratos suero, suero adicionado con caseína, leche y retenido de leche se determinó por interpolación de las áreas obtenidas de cada muestra en la curva patrón para cada estándar. En la tabla 6.6.1 se muestran las áreas obtenidas así como las concentraciones para suero.

**Tabla 6.6.1. Concentración de los monosacáridos encontrados en el polisacárido producido en suero.**

SUERO		
CEPA FILANTE(2772)	Area	Concentración
glucosa	576508	49.89 µg/ml
galactosa	719778	89.77 µg/ml
CEPA NO FILANTE (1489)		
glucosa	290505	25.97 µg/ml
galactosa	308872	39.51 µg/ml

En la tabla 6.6.1 y en las fig. 6.5.3 y 6.5.4 se observa que el polisacárido producido en suero presenta una composición básicamente de glucosa y galactosa para ambas cepas, filante y no filante, lo cual coincide con estudios realizados por Gasseem *et al.*, (1997) donde caracterizaron un polisacárido producido por *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* en suero de leche y solo se identificaron glucosa y galactosa. En cuanto a la concentración de los monosacáridos presentes se observa que en este sustrato, están presentes en concentraciones muy bajas.

Los resultados indican que no hay una diferencia en la composición del EPS producido en suero entre la cepa filante y no filante, aunque sí hay diferencia en la cantidad de monosacáridos, siendo mayor en la cepa filante.

**Tabla 6.6.2. Concentración de los monosacáridos encontrados en el polisacárido producido en suero adicionado con caseína.**

SUERO CON CASEINA		
CEPA FILANTE(2772)	área	concentración
glucosa	801397	68 71 µg/ml
galactosa	802017	99 82 µg/ml
CEPA NO FILANTE (1489)		
glucosa	285156	25 52 µg/ml
galactosa	403868	51.13 µg/ml

En la tabla 6.6.2 y en las fig. 6.5.5 y 6.5.6 se observa que la composición del EPS producido en suero con caseína por la cepa filante y la no filante está constituido únicamente por glucosa y galactosa. La adición de caseína se realizó con el objetivo de analizar si se producía algún cambio en la composición, sin embargo, fue la misma que cuando se utilizó suero como sustrato. Esto podría deberse a que en suero adicionado con caseína, el sistema no era totalmente homogéneo y la caseína no se encontraba muy disponible o a la concentración de la caseína en el sistema. En cuanto a las concentraciones de los azúcares presentes, se observa que el componente mayoritario es la galactosa, seguido de glucosa.

**Tabla 6.6.3. Concentración de los monosacáridos encontrados en el polisacárido producido en leche descremada**

LECHE DESCREMADA		
CEPA FILANTE(2772)	área	concentración
ramnosa	378498	33 56 µg/ml
glucosa	1749008	147.8µg/ml
galactosa	2546181	313 148 µg/ml
CEPA NO FILANTE (1489)		
glucosa	854511	73 15µg/ml
galactosa	1651318	203 70µg/ml

Como se aprecia en la tabla 6.6.3 y en las fig 6.5.7 y 6.5.8 los monosacáridos constituyentes del EPS producido por la cepa filante en leche descremada son galactosa, glucosa y ramnosa, mientras que el exopolisacárido producido por la cepa no filante solo presenta galactosa y glucosa, siendo los constituyentes mayoritarios galactosa y glucosa

Los resultados obtenidos en este sustrato coinciden con varios autores que reportan que polisacáridos producidos en leche descremada están constituidos de glucosa, galactosa y ramnosa (Gruter *et al*, 1993, Cerning *et al*, Grobben *et al*, 1995; Groux, 1973, Bouzar *et al*, 1995)

**Tabla 6.6.4. Concentración de los monosacáridos encontrados en el polisacárido producido en retenido de leche.**

RETENIDO DE LECHE POR ULTRAFILTRACION		
CEPA FILANTE(2772)	área	concentración
ramnosa	315707	29 02 µg/ml
glucosa	2132734	180 071 µg/ml
galactosa	3133021	384 92 µg/ml
CEPA NO FILANTE (1489)		
ramnosa	310024	28 61 µg/ml
glucosa	1253962	106 54 µg/ml
galactosa	2122440	261.32 µg/ml

En la tabla 6.6.4 y en las fig. 6.5.9 y 6.5.10 se muestran los monosacáridos constituyentes del EPS producido por la cepa filante y no filante, encontrándose esencialmente, galactosa, glucosa y ramnosa. El componente mayoritario es galactosa, seguido de glucosa y por último ramnosa que se encuentra en cantidades muy pequeñas. Además es el único substrato en donde el EPS producido por la cepa no filante presenta ramnosa, lo cuál nos podría sugerir que un mayor contenido de caseína, provoca un cambio en la composición, lo cual ha sido reportado por otros autores (Cerning *et al*, 1992). Para el caso específico de la cepa filante *Lactobacillus delbrueckii* *ss. bulgaricus* NCFB 2772 Grobber *et al*, (1995) reporta que el EPS ésta constituido de glucosa, galactosa y ramnosa, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en éste trabajo. La presencia de ramnosa, arabinosa y manosa en bajas concentraciones han sido reportadas también por varios autores (Groux, 1973, Gruter *et al*, 1993; Cerning *et al*, 1986, Bouzar *et al*, 1995), lo cual es comparable con la cantidad de ramnosa presente en los substratos leche descremada y retenido de leche, encontrada en este trabajo.

## 6.7. Proporciones de los monosacáridos identificados en el polisacárido producido en los diferentes sustratos por la cepa filante y la no filante

La relación molar de los monosacáridos encontrados en el EPS producido por la cepa filante y la no filante en suero, suero con caseína, leche y retenido de leche se muestra en la tabla 6.7.1

### 6.7.1. Proporciones de los monosacáridos identificados en el polisacárido hidrolizado

PROPORCION MOLAR				
Substrato	Cepa	Galactosa	Glucosa	Ramnosa
Suero	Filante	1.8	1	0
Suero	No filante	1.5	1	0
Suero con caseína	Filante	1.4	1	0
Suero con caseína	No filante	2	1	0
Leche	Filante	2	1	0.1
Leche	No filante	2.8	1	0
Retenido de leche	Filante	2.14	1	0.13
Retenido de leche	No filante	2.5	1	0.1

En la tabla 6.7.1 se observa que la relación molar de galactosa y glucosa para suero es de 1.8:1 para la cepa filante y 1.5:1 para la no filante. Para el caso de suero adicionado con caseína se observa una proporción menor 1.4:1 de galactosa y glucosa respectivamente, mientras que para la no filante 2:1. La ramnosa se encuentra en una proporción muy baja comparando con galactosa en una relación molar de 2:0.1 en leche descremada y retenido de leche. En suero y suero adicionado de caseína no ésta presente.

Los trabajos acerca de la composición de monosacáridos de EPS de *Lactobacillus delbrueckii ss bulgaricus* revela que estos polímeros están constituidos esencialmente de galactosa, glucosa y ramnosa. Cerning *et al*, (1986) reportan una relación molar de 4.1:1, y Gruter *et al*, (1993) reportan 5.1:1 para diferentes cepas. Schellhaass & Morris (1985) reportan una relación molar de galactosa y glucosa 2.1 para otra cepa. Grobber *et al*, (1995) analizan la composición del EPS producido por la misma cepa aquí estudiada (NCFB 2772) encontrando una relación molar de galactosa glucosa ramnosa de 6.8:1:0.7 cuando el EPS fue producido en un medio que contenía glucosa o lactosa como fuente de carbono. Posteriormente, estudios realizados por los mismos autores, cambiando la fuente de carbono de glucosa por fructosa encuentran un cambio en la proporción de 7.1:0.8 a 2.4:1 de galactosa y glucosa, pero sin ramnosa presente. Esto implica que la composición del EPS puede variar de acuerdo a la composición del medio, al menos en lo que a la fuente de carbono respecta. Sin embargo, de acuerdo a los datos de la tabla 6.7.1 el contenido de proteína en el sustrato utilizado podría también tener influencia en la composición y proporción de monosacáridos del EPS. Grobber *et al*, (1995,1996) utilizó medios químicos definidos como medio de crecimiento, lo cual podría explicar la diferencia de la composición del EPS producido por la misma cepa utilizada en este estudio. La composición del EPS de la cepa filante fue similar al EPS obtenido por la cepa no filante en suero y leche en el presente trabajo. Algunos autores mencionan que un cambio en la composición de EPS provoca un cambio en su estructura, dando como resultado productos con diferentes propiedades reológicas y texturales (Schellhaass y Morris, 1985; Doco *et al*, 1991; Cerning, 1995; Mozzi *et al*, 1995; Bouzar *et al*, 1995). Esto implica que en nuestro estudio, posiblemente las diferencias estructurales del EPS pudieran tener efecto sobre las interacciones entre los EPS y las proteínas de la leche, en particular con las caseínas, explicando así los resultados de la variación de la relación proteína carbohidrato de la gráfica 6.3.1. Adicionalmente podrían estos cambios explicar las propiedades reológicas del sistema que resulta entre las diferentes cepas y el contenido de proteína del sustrato, de acuerdo a lo reportado por Domínguez-Soberanes (1997).

## 7. CONCLUSIONES

---

Existe una correlación directa entre la cantidad de proteína presente en los substratos y la producción de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii ss. bulgaricus*. Se observó también que la producción de EPS se ve influenciada de una manera importante por la cantidad de proteína presente en el medio para cada una de las cepas, siendo mayor la producción en los substratos con un alto contenido de caseína.

Se observó que la relación proteína carbohidrato fue mayor en el EPS producido por la cepa filante, lo cual nos sugiere que el carácter filante puede ser resultado de la interacción que existe entre el EPS y las proteínas del sistema (caseínas)

De la caracterización química realizada por CLAR se puede concluir que el EPS producido en suero, suero con caseína, leche y retenido de leche por la cepa filante y no filante, esta esencialmente constituido de glucosa y galactosa

Por otro lado, el haber encontrado pequeñas cantidades de ramnosa en el EPS producido por la cepa filante en leche y retenido de leche, y por la no filante en este último substrato, nos sugiere que la síntesis de este monosacárido se favorece en sistemas en los cuales la concentración de caseína es alta, por lo que es probable que la presencia de la ramnosa influya en el carácter filante. Por todo lo anterior, este estudio nos permitió comprobar que la composición del medio, particularmente el contenido de caseína, así como el tipo de cepa, son factores que influyen en la composición del EPS.



## 8. RECOMENDACIONES

---

Determinar la identidad de las proteínas asociadas al polisacárido producido por *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus*

Determinar la secuencia de los monómeros constituyentes del EPS y la estructura del mismo, producido por la cepas filante y no filante en los diferentes substratos, con el fin de explicar más a detalle las interacciones que existen entre el EPS y las proteínas del sistema

Determinar las propiedades reológicas del EPS puro producido por ambas cepas en los diferentes substratos

Determinar los pesos moleculares del EPS producido por ambas cepas y relacionar estos resultados con las propiedades reológicas del mismo.

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

- Abbot, D y Andrews R S. (1970) **Introducción a la Cromatografía** (2ª ed.) Editorial Alhambra, S A Madrid, 5-20
- Amiot, J (1991) **Ciencia y Tecnología de la Leche: Principios y Aplicaciones**, Editorial Acribia, España, 364-366
- Armstrong, W.D y Heng L J (1988) **Evaluation of the Liquid Chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides trisaccharides, tetrasaccharides, desoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns**, Journal of Chromatography, 462, 219-232
- Berg, D J C., Robijn, W.G, Janssen, C.A , Giuseppin, L.F , Vreeker, R , Kamerling, P.J., Vliegthart, L F M., Ledebøer, M y Verrips, T C (1995) **Production of a novel Extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide**, Applied and Environmental Microbiology, 61 (8) 2840-2844.
- Bermejo, F (1991) **Analítica General, Cuantitativa e Instrumental**, (6ª ed.) Editorial Paraninfo, España, 1435-1448
- Bouzar, F , Cerning, J , y Desmazeaud, M (1995) **Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants**, Journal Dairy Science, 79, 205-211
- Brian, A (1992) **Practical HPLC Methodology and applications**, Editorial A. Wiley Interscience, USA 60,70-71, 90-91
- Cerning, J (1995) **Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria**, Lait, 75, 463-472
- Cerning, J., Boullianne, C , Landon, M y Desmazeaud, M. (1992) **Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria**, Sciences des Aliments, 10, 443-451
- Cerning, J., Boullianne, C , Desmazeaud, M.J. y Landon, M (1986) **Isolation and exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus***, Biotechnology Letters, 8(9) 625-628

Cerning, J, Boillane, C, Desmazeaud, MJ y Landon, M (1988) **Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus***, Biotechnology Letters, 10, 255-260

Cerning, J, Renard, C M G, Thibault, J F. Bouillanne, C, Landon, M, Desmazeaud, M, y Topisirovic, L (1994) **Carbon Source Requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structural analysis of the polymer**, Applied and Environmental Microbiology, 60 (11), 3914-3919

Covarrubias-Herrera, M.R, Flores-Prado, M G (1996) Cuadernos CBS 35 **Manual de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**. UAM Xochimilco, México, 3-15, 22-40

Doco, T., Carcano, D., Ramos, P, Loones, A y Fournet, B (1991) **Rapid Isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel permeation high-performance liquid chromatography**, Journal of Dairy Research, 58, 147-150.

Domínguez-Soberanes, J (1997) **Caracterización Reológica y de textura de un producto fermentado producido por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772**. Tesis de Maestría en Biotecnología UAM IZTAPALAPA

Chaplin, M F y Kennedy, J F (1987) **Carbohydrate Analysis a practical approach**, Editorial Air Press, Oxford-Washington, 15-89

Gancel, F. y Novel, G. (1994) **Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1 Conditions of Production**, Journal of Dairy Science, 70, 325-328.

Gancel, F y Novel, G (1994) **Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2 Distint Modes of polymer production and degradation among clonal variants**, Journal of Dairy Science, 77, 689-695.

García-Garibay, M (1990) **Yogurt, Aspectos Microbiológicos y de elaboración**. Tecnología Alimentaria, 21, 6, 6-12.

García-Garibay, M. y Marshall, V.M.E (1991) **Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus***, Journal of Applied Bacteriology, 70, 325-328

García-Garibay, M, Revah, S, Gómez Ruiz, L (1993) **Productos lácteos**. En **Biocología Alimentaria** ed por García-Garibay, M, Quintero Ramirez, R, López-Munguía Canales, A, Editorial Limusa, México, 166-174

Gassem, M.A, Schmidt, K A y Frank, J F (1997) **Exopolysaccharide Production in different Media by Lactic Acid Bacteria**, Cultured Dairy Products Journal, 30, 18-21

Gassem, M A., Schmidt, K A. y Frank, J F (1997) **Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus***, Journal of Food Science, 62(1) 171-173

Grobben, G J, Sikkema, J, Smith, M R y Bont, J A.M (1995) **Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricu* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium**, Journal of Applied Bacteriology, 79, 103-107.

Gruter, M, Leeflang, B R, Kuiper, J, Kamerling, J y Vliegenthart, J F.G (1993) **Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* rr. grown in skimmed milk**, Carbohydrate Research, 239, 209-226

Hess, S J, Roberts, R F, Ziegler, G R. (1997) **Rheological Propierties of Nonfat Yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer system**, Journal of Dairy Science, 80, 252-263.

Holt, J, Krieg, N R, Sneath, P H A., Staley, J H y William, S (1994) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (9<sup>ed</sup>) Editorial Williams and Wilkins U S A 532,557,566 y 668

Kalab, M (1979) **Microstructure of Dairy Foods. 1. Milk Productos Based on Protein**, Journal of Dairy Science, 62 (8), 1352-1364

Kalab, M (1993) **Practical aspects of Electron Microscopy in Dairy Research**, Food Structure, 12, 95-114

Manca de Nadra, M C, Strasser de Saad, A M., Pesce de Ruiz Holgado, A A y Oliver, G. (1985) **Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420**, Milchwissenschaft, 40 (7) 409-412

Marquez, T A. (1995) **Efecto de la Fuente de Nitrógeno en la producción de un polisacárido exocelular producido por *Lactobacillus delbreuckii ssp. bulgaricus*** Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. UNAM. México

Mozzi, F., Savoy de Giori, G , Oliver, G , Font de Valdez, G (1995) **Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II. Influence of the carbon source**, *Milchwissenschaft*, 50 (6) 307-309

Pigman, O (1979) **The carbohydrates Chemistry and Biochemistry** Vol II (2<sup>ed</sup>), Editorial Academic Press, Nueva York, 84-90, 384-400

Quattrocchi, A O., Andrizzi, S I , Laba, F R (1992) **Introducción a la HPLC Aplicación y Practica**, Editorial Artes Gráficas Farro SA, Argentina, 28-35

Robijn, G.W., Thomas, J R, Haas, H., Berg, D J C Vanden, Kamerling, J P y Vliegthart, J F G (1995) **The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766**, *Carbohydrate Research*, 276 (1) 137-154

Sandie, L (1992) **High Performance Liquid Chromatography**, (2<sup>a</sup> ed ) Editorial John Wiley Sons, Londres, 10-25

Schellhaass, S M. y Morris, H.A (1985) **Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria**, *Food Microstructure*, 4 (2) 279-287

Snyder, L.R y Kirkland (1973) **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, (2<sup>a</sup> ed ) Editorial A. Wiley-Interscience, USA 15-20, 550-560

Sutherland, I.W. (1992) **Biopolymers**. *Encyclopedia of Microbiology*, by Academic Press,. Volumen I, 339-349

Sutherland, I W., Andrew, F. D , Kennedy, F D. (1986) **Comparisson of bacterial lipopolysaccharides by High-Performance Liquid Chromatography**, *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 948-950

Tamime, A Y y Robinson, R.K. (1991) **Yogur, Ciencia y Tecnología**, Editorial Acribia, S A , España, 25-30

Teggatz, J.A. Morris, H.A. (1990) **Changes in the reology and microstructure of ropy yogurt during shearing**, *Food Structure*, 9(2) 133-138

Vérette, E , Quian, F , Mangani, F (1995) **On line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages**, Journal of Chromatography, 705, 195-203

Wacher-Rodarte, C., Galván, M V , Fárres, A , Gallardo, F , Marshall, V M E y García-Garibay, M (1993) **Yoghurt production form reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures**, Journal of Dairy Research, 60, 247-254

Whitfield, C. (1988) **Bacterial extracellular polysaccharides**, Canadian Journal Microbiology, 34, 415-420

Zourari, A , Accolas, J P y Desmazeaud, M.J (1992) **Metabolism and biochemical characteristic of yogurt bacteria. A.review**, Lat, 72,1-34