



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Aislamiento e Identificación de Cepas de Bacterias Lácticas Productoras de
Nuevos Polisacáridos Extracelulares del Pulque”.

TESIS

Que para obtener el título de:

QUÍMICO DE ALIMENTOS.

Presenta.

Josué Rodrigo Conca Morales.



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Dra. Maria Del Carmen Wachter Rodarte
Secretario	Dr. José Adelfo Escalante Lozada
1er. Suplente	QFB. Aurora Irma Ortegón Ávila
2º . Suplente	Dra. Amelia Maria De Guadalupe Farrés González Saravia

Sitio en donde se desarrolló el tema: Laboratorio 4, Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos y Cepario del Dpto. de Biología. Facultad de Química, UNAM.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico de CONACYT **P46052-2** y con el apoyo de PAPIME-DGAPA **PE 205606**.

Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

Asesor

QFB. Martha Giles Gómez.

Supervisor Técnico

Josué Rodrigo Conca Morales

Sustentante

Agradecimientos:

*A la persona que más amo, mi madre **Yolanda Morales**, por todo el cariño, comprensión y apoyo que me brinda, por permitirme soñar y realizar el más hermoso de mis sueños, sin importar los sacrificios que ha realizado, gracias.*

*A mi hermanita, **Samy**, por sus cada uno de los consejos que ha brindado, por el cariño y el apoyo a lo largo de esta etapa. Te quiero mucho.*

A mi familia por su cariño y comprensión.

*A la primera persona que conocí al comenzar mi sueño, **Isabel**, por tu amistad, por creer siempre en mi y por tu cariño.*

*A mi primo **Jair**, aunque no tengamos ningún lazo de sangre eres parte de mi familia, gracias por permitirme convivir con la persona tan maravillosa que eres.*

*A **Kary** por su apoyo, cariño y la grandiosa amistad que me brindas; por cada uno de tus consejos, fue un placer compartir contigo muchas experiencias.*

*A **Ale** por la grandiosa amistad que me has brindado, por tu cariño, por el apoyo y por creer en mi siempre.
Gracias a el angelito que te cuida por permitir que nuestros caminos se cruzaran.*

*A **Olga**, por el apoyo que me brindaste en el Ceparío, fue un placer trabajar contigo, por el cariño y la amistad que a lo largo de este tiempo se ha hecho más sólida, por abrirme tu corazón.*

A **Sandra** por las palabras de aliento que me has brindado a lo largo del tiempo que nos hemos conocido, sobre todo por el apoyo que me brindaste durante la elaboración de la tesis.

A **Armando** por la amistad y la comprensión que me has brindado; por cada una de las experiencias que hemos compartido, nunca las cambiaría.

A **Belem** por tu apoyo, amistad y cariño que me has brindado; por la forma tan peculiar de ver la vida.

A mi chico de servicio **Rafa**, aunque el tiempo que nos hemos conocido ha sido muy corto te agradezco tu amistad, tu apoyo, en verdad muchas gracias.

A mis amigos que me han apoyado y que siempre han estado ahí, a Laura, Fabián, Mirna, Gil, Norma, Adán, Emmanuel, Jorge, Karen.

A la profesora **Lucia Cornejo**, por brindarme una amistad sincera, por su cariño y por todo lo que me ha enseñado.

A las personas tan maravillosas del Cepario, principalmente Laura Ortiz, QFB. Antonieta Silva, Olga Ríos y Rafael Figueroa.

A mi querida Facultad de Química que me ha visto crecer, que me ha cobijado, que me enseñó un sin fin de cosas y que me permitió conocer personas que me ayudaron a formarme como profesional.

Agradecimientos especiales:

Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada y a la QFB. Martha Giles Gómez por su asesoría.

A la M. en C Georgina Hernández Chávez del Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBT, UNAM, por su apoyo en el análisis por HPLC de los productos de fermentación y azúcares.

A la M. en B. Maria Elena Rodríguez Alegría del Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBT, UNAM, por su apoyo en la producción y caracterización del polímero.

A la Dra. Marisol Soledad Cordova del Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBT, UNAM, por su apoyo en el análisis reológico durante la fermentación del pulque y de los polímeros producidos.

Al Dr. Adolfo Miranda Molina del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM por el apoyo en el análisis por RMN de los polímeros.

A la Dra. Araceli Patrón y la M. en C. Rosa Maria Pizasso de la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su apoyo en el análisis por MEB de los cultivos productores de polímero.

A Mario Caro de la planta piloto del IBT, UNAM, por su apoyo para la liofilización del polímero.

Índice

	Página
1. Resumen10
2. Introducción12
3. Generalidades13
3.1 Pulque13
3.1.1 Microbiología15
3.1.2 Fermentación17
3.1.2.1 Fermentación alcohólica17
3.1.2.2 Fermentación ácida22
3.1.2.3 Fermentación viscosa23
3.2 Polisacáridos extracelulares24
3.2.1 Clasificación25
3.2.1.1 Homopolisacáridos26
3.2.1.1.1 Dextranacararas27
3.2.1.1.2 Fructosiltransferasas33
3.2.1.2 Heteropolisacáridos.34
4. Justificación36
5. Objetivos37
5.1 Objetivo general37
5.2 Objetivos particulares37
6. Material y métodos38
6.1 Desarrollo de la fermentación de pulque bajo condiciones de laboratorio38
6.1.1 Cuantificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos de aguamiel y pulque39
6.1.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos39
6.2 Aislamiento de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos de aguamiel y pulque40
6.2.1 Selección de colonias con tipos de polímeros únicos por morfología40
6.2.2 Conservación de cepas únicas productoras de exopolisacáridos40
6.3 Identificación de las cepas productoras de exopolisacáridos41
6.3.1 Identificación bioquímica utilizando el sistema API 50CH41
6.3.2 Identificación por análisis de secuencias de ADNr 16S41
6.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido de los cultivos que presentaron mayor producción de exopolisacárido44
6.5 Caracterización de los polímeros producidos44
a. Análisis reológico de cultivos de las cepas productoras de exopolisacáridos44
b. Determinación del peso molecular y los componentes de los exopolisacáridos por cromatografía líquida de alta eficiencia45
c. Análisis por resonancia magnética nuclear47

7. Resultados y discusión50
7.1 Determinaciones microbiológicas en aguamiel y durante la fermentación del pulque50
7.2 Determinaciones fisicoquímicas en aguamiel y durante la fermentación del pulque51
7.3 Selección de colonias productoras de exopolisacáridos53
7.4 Identificación de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos a partir de sacarosa55
7.4.1 Identificación bioquímica utilizando el sistema API 50CH55
7.4.2 Identificación basada en el análisis de secuencia de ADNr 16S55
7.5 Análisis por microscopia electrónica de barrido de cultivos de la cepa EPS A y EPS B60
7.6 Análisis reológico61
7.7 Determinación del peso molecular y componentes de los diferentes polímeros62
7.7.1 Determinación del peso molecular de los diferentes polímeros63
7.7.2 Componentes de los exopolisacáridos obtenidos64
7.7.2.1 Composición del EPS A65
7.7.2.2 Composición del EPS B66
7.8 Análisis por resonancia magnética nuclear67
8. Conclusiones71
9. Perspectivas72
10. Bibliografía73
Apéndice I. Medios de cultivo, soluciones, técnicas microbiológicas, técnica para determinar azúcares reductores.80
Apéndice II. Sistema API 50 CH84

Índice de tablas.

	Página
Tabla 1. Composición química del aguamiel y pulque14
Tabla 2. Microorganismos presentes en diferentes muestras de pulque determinados por análisis de secuencia de ADNr 16S16
Tabla 3. Substituyentes no carbohidratos en exopolisacáridos25
Tabla 4. Características de algunos homopolisacáridos extracelulares26
Tabla 5. Especies de bacterias que son capaces de sintetizar dextrana28
Tabla 6. Proporción de enlaces que presentan los glucanos producidos por dextransacarasas29
Tabla 7. Microorganismos productores de fructanas34
Tabla 8. Determinación de cuentas de bacterias lácticas y parámetros fisicoquímicos en aguamiel, pulque fermentado y durante la fermentación52
Tabla 9. Concentración de carbohidratos y productos de fermentación53
Tabla 10. Propiedades reológicas de cultivos de la cepa EPS A y EPS B62

Índice de figuras.

	Página
Figura 1. Vía Entner-Doudoroff utilizada por <i>Z. mobilis</i> para la producción de etanol18
Figura 2. Vía de Embder-Meyerhof20
Figura 3. Conversión de piruvato a etanol en la fermentación alcohólica21
Figura 4. Fermentación ácido acética23
Figura 5. Esquema de las determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas realizadas a las muestras de aguamiel, pulque previamente fermentado y durante la fermentación de pulque.38
Figura 6. Esquema de la producción del EPS A y EPS B46
Figura 7. Esquema para el análisis por RMN del EPS A y EPS B48
Figura 8. Morfología de los exopolisacáridos aislados del pulque54
Figura 9. Alineamiento de las secuencias de los ADNr 16S de las cepas de <i>Leuconostoc citreum</i>58
Figura 10. Árbol filogenético de cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Leuconostoc citreum</i>59
Figura 11. Microscopia electrónica de barrido de la cepa EPS A60
Figura 12. Microscopia electrónica de barrido de la cepa EPS B61
Figura 13. Cromatograma obtenido del EPS A y EPS B63
Figura 14. Curva estándar de t_r vs. log peso molecular64
Figura 15. Cromatograma obtenido de una alícuota de la mezcla de reacción para la producción del EPS A65
Figura 16. Cromatograma obtenido del EPS B66
Figura 17. Espectro de RMN obtenido del EPS B a 400MHz68
Figura 18. Espectros por RMN de diferentes dextranas69

1. Resumen.

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional elaborada a partir del aguamiel extraído de varias especies de maguey. Para su elaboración, al aguamiel fresco se le adiciona una cantidad conocida de pulque previamente fermentado. El tiempo en que transcurre este proceso varía, siendo el desarrollo de viscosidad uno de los principales criterios utilizados para considerar que ha llegado a su fin. La fermentación se desarrolla como resultado de la actividad de los microorganismos presentes durante el proceso de recolección, transporte y manipulación en condiciones ambientales no asépticas.

Diversos reportes señalan el desarrollo de tres tipos de fermentación que definen las características de esta bebida: fermentación alcohólica (desarrollada principalmente por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismos responsables de la producción de etanol), fermentación ácida (desarrollada por bacterias lácticas y que genera la producción de ácido láctico y microorganismos del género *Acetobacter*, productores de ácido acético) y fermentación viscosa (desarrollada principalmente por *Leuconostoc mesenteroides*, responsable de la producción de exopolisacáridos).

El exopolisacárido (EPS) que ha sido reportado por diversos autores asociado a esta bebida es la dextrana, que es un polímero formado por residuos de glucosa y es sintetizado por la enzima dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides*. En nuestro grupo de trabajo se reportó previamente la presencia de un EPS de tipo fructana en esta bebida después de seis horas de fermentación. Con base en esta información el presente trabajo tiene como finalidad la búsqueda y caracterización de nuevos EPS producidos por bacterias lácticas aisladas de muestras de aguamiel y pulque.

Se realizó el aislamiento de bacterias lácticas productoras de EPS en agar APT + sacarosa al 10% a partir de muestras de aguamiel y durante la fermentación de pulque en condiciones de laboratorio. A partir del aislamiento de 100 colonias identificadas como productoras, se detectaron dos tipos de EPS, designados como EPS A y EPS B. El análisis de los componentes de estos polímeros mostró que ambos están constituidos por residuos de glucosa. La determinación del peso molecular por HPLC indicó un peso molecular de 695.2 kDa para el EPS A y de 583.6 kDa para el EPS B, respectivamente. El análisis reológico de ambos polímeros indicó un comportamiento de fluido no newtoniano (pseudoplástico), aunque el EPS A presentó una fuerza de deformación de $9.20 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ mayor que la obtenida para el EPS B ($5.60 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) lo que indicó que el EPS A es más viscoso. Durante la separación de ambos polímeros a partir de cultivos en medio líquido se determinó que el EPS A se encuentra asociado a pared celular, situación que dificultó su posterior análisis. El análisis del EPS B por resonancia magnética nuclear, indicó la presencia de una dextrana muy ramificada. El análisis por microscopía electrónica de barrido de ambos cultivos mostró una organización celular distintas para ambas cepas productoras, determinada muy probablemente por el tipo de EPS.

La identificación de las cepas EPS A y EPS B por análisis de secuencia de ADNr 16S permitió identificarlas como *Leuconostoc citreum*. Esta es la primera vez que se reporta a este microorganismo como productor de un EPS de tipo dextrana en el pulque.

2. Introducción.

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional mexicana, elaborada a partir de la savia o aguamiel de varias especies de maguey (agave) (*Agave atrovirens*, *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookeri*, *A. americana*). La extracción del aguamiel se realiza a partir de plantas maduras, debido a que de ellas se obtiene un aguamiel con las características adecuadas, para la elaboración de pulque. Entre las características que definen al aguamiel, se puede mencionar que es un líquido azucarado, transparente, presentando un cierto grado de olor herbáceo, con sabor dulce agradable. Entre sus componentes, se encuentra el agua, sacarosa, glucosa, fructosa, gomas, proteínas, minerales y vitaminas (Martínez del Campo, 1999).

Una vez extraído el aguamiel del maguey se coloca en recipientes para ser transportado hasta el sitio donde desarrolla la fermentación. El proceso inicia propiamente cuando se agrega al aguamiel una determinada cantidad de pulque previamente producido. El tiempo que tarda dicha fermentación es variable, siendo el desarrollo de viscosidad uno de los principales criterios utilizados para considerar que la fermentación ha llegado a su fin (Escalante, *et al.* 2004).

Diferentes reportes señalan que la viscosidad desarrollada en esta bebida se debe a la producción de polisacáridos extracelulares del tipo de las dextranas, formados por residuos de glucosa provenientes de la hidrólisis de la sacarosa presente en el medio, como resultado de la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Chellapandian, *et al.* 1988). Recientemente en nuestro grupo de trabajo se determinó la presencia de un exopolisacárido constituido por residuos de fructosa, probablemente inulina o levana en una muestra de pulque con seis horas de fermentación. (Escalante, *et al.* en revisión) esto indica por primera vez la presencia de un exopolisacárido compuesto por fructosa y no por glucosa asociado a esta bebida.

3. Generalidades.

3.1 Pulque.

El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional mexicana, que presenta un grado alcohólico de 4 a 7°G. L., se elabora a partir del aguamiel (savia) extraído de varias especies de maguey. Las principales especies de magueyes productoras de pulque son *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookeri*, *A. americana*, siendo la especie pulquera más importante el maguey manso (*Agave atrovirens*) (Escalante, *et al.* 2004). El consumo de esta bebida data de 800 años a.C. hasta nuestros días principalmente en los estados centrales del país, en donde se concentra la mayor producción de magueyes (García-Garibay y López Munguía, 2005).

El maguey perteneciente a las Amarilidáceas y al género de los Agaves. Esta planta se cultiva en zonas áridas, desde el extremo meridional del Distrito Federal y los puntos que quedan a la misma altura por el Sur en los estados de México y Puebla, en la Mesa del Norte hasta las llanuras de San Luis Potosí y Saltillo; por el Oriente desde Tehuacan, Perote y Tezuatlán; por el Occidente hasta Zitácuaro y Morelia. El crecimiento de esta planta es lento y se encuentra constituida por raíz fibrosa, tallo grueso y corto, además de presentar crecimiento de hojas conocidas como pencas. Por lo general el maguey alcanza las condiciones apropiadas para la obtención de aguamiel en un periodo que va de 8 a 12 años, y en ocasiones hasta 20, dependiendo de las condiciones de cultivo, del suelo, del clima y variedad de maguey (Villalpando, 2003).

Las características del aguamiel están en función de la especie o variedad de agave de la que fue extraída, características del terreno, clima y los cuidados agrícolas que se le proporcionen a la planta. En general el aguamiel es un líquido incoloro transparente, azucarado, presenta un sabor agradable y un cierto olor herbáceo. Entre los principales componentes del aguamiel se encuentran:

agua, glucosa, fructosa, gomas, sacarosa, proteínas, minerales, vitaminas y otros azúcares en menor proporción como: xilosa, galactosa y arabinosa (Martínez del Campo, 1999; Victoria, 2003). En la tabla 1 se menciona el análisis químico de dicho líquido.

Tabla 1. Composición química del aguamiel y pulque.

Componentes	Aguamiel	Pulque
Humedad (g%)	94	97
Azúcares* (g%)	14	2
Etanol (g%)	2	6
Cenizas (g%)	0.4	0.2
Proteínas (g%)	0.3	0.44
Calcio (mg%)	20	10
Fósforo (mg%)	---	0.7
Hierro (mg%)	0.02	0.02
Tiamina (mg%)	0.03	0.02
Riboflavina (mg%)	0.03	0.02
Niacina (mg%)	0.4	0.3
Ácido ascórbico (mg%)	6.7	6.2

* glucosa, sacarosa, fructosa. Tomado de Martínez, 2004.

La obtención de aguamiel inicia desde la selección correcta del maguey, el cual debe presentar el cogollo adelgazado (hojas de la parte central de la planta) con espinas moradas oscuras y ausencia de espinas en los bordes de las hojas exteriores. Posteriormente se eliminan las hojas centrales de la planta y el tallo floral es extraído, esta etapa se conoce como castración o capazón, terminada esta etapa la planta es sometida durante varios meses a un añejamiento, lo que permite el aumento de azúcares presentes en el líquido. Cuando hay aparición de manchas en las hojas de la planta se da por terminado el añejamiento y se prosigue a la picazón, en donde se abre el tallo de la planta con la finalidad de lesionarla para que empiece a fluir el aguamiel. Finalmente se inicia la raspa, etapa de eliminación de las capas interiores de la planta, este punto es considerado como principio de la producción de aguamiel. El proceso para la obtención de aguamiel es

considerado como un proceso rudimentario y realizado en condiciones poco higiénicas (Martínez del Campo, 1999; Victoria, 2003; Pacheco, 2003).

Una vez obtenida la materia prima para la elaboración de pulque se realiza un inóculo mediante la fermentación natural del aguamiel, este proceso se efectúa durante 25 a 30 días. Una vez obtenido el inóculo se lleva a cabo la fermentación; para esto se inocula una cantidad conocida de pulque en el tinacal (lugar donde se desarrolla), con la finalidad de disminuir el tiempo del proceso hasta un día e incluso en unas cuantas horas. Uno de los parámetros que determinan el tiempo de fermentación además de la producción de etanol, es la presencia de viscosidad. Esta depende de los polisacáridos extracelulares producidos durante la fermentación, principalmente por *Leuconostoc mesenteroides*, siendo la dextrana el polisacárido reportado generalmente como asociado a esta bebida (García-Garibay y López-Munguía, 2005).

3.1.1 Microbiología.

El proceso para la elaboración de pulque se realiza bajo condiciones no asépticas, lo que determina la presencia de una gran cantidad de microorganismos, incluyendo los presentes en el aguamiel y los desarrollados durante todo el proceso de elaboración de esta bebida: recolección, transporte de la materia prima, inoculación y manipulación (Escalante, *et al.* 2004). Dentro de los principales microorganismos asociados a esta bebida podemos encontrar bacterias lácticas (8.0×10^8 a 1.5×10^9 UFC/mL aproximadamente) y levaduras (aproximadamente 3.0×10^9 a 6.0×10^9 UFC/mL). Los principales microorganismos identificados del pulque pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Diplobacter*, *Pichia*, *Candida* (antes *Torulopsis*), *Rhodotorula*, *Mycoderma* (Pacheco, 2003; García-Garibay y López-Munguía, 2005).

En nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio a tres muestras de pulque obtenidas de diferentes localidades (Estado de México, Hidalgo y Morelos), con la finalidad de determinar la diversidad bacteriana por medio del análisis de secuencias de ADNr 16S. Como resultado de dicha investigación se determinó la presencia de grupos bacterianos comunes presentes en las tres muestras analizadas y así como también la presencia de microorganismos específicos para cada muestra. Por primera vez se reportó la presencia en el pulque de *Lactobacillus acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei* (Tabla 2).

Tabla 2. Microorganismos presentes en diferentes muestras de pulque determinados por análisis de secuencia de ADNr 16S.

Microorganismo	Edo. de México (Aculco)	Morelos (Huitzilac)	Hidalgo (Tizayuca)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Presente	Presente	Presente
<i>L. kefir</i>	Presente	Presente	
<i>L. acetotolerans</i>	Presente	Presente	
<i>L. hilgardii</i>			Presente
<i>L. plantarum</i>		Presente	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Presente	Presente	Presente
<i>L. pseudomesenteroides</i>			Presente
<i>Microbacterium arborescens</i>		Presente	
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>		Presente	
<i>Acetobacter pomorium</i>			Presente
<i>Gluconobacter oxydans</i>			Presente
<i>Zymomonas mobilis</i>		Presente	Presente
<i>Hafnia alvei</i>	Presente	Presente	

Tomado de Escalante, et al. 2004.

3.1.2 Fermentación.

Durante la fermentación del pulque se desarrollan tres tipos diferentes de fermentación que determinan las características fisicoquímicas y sensoriales del producto: fermentación alcohólica, fermentación ácida y fermentación viscosa.

Los microorganismos asociados a esta bebida que son considerados como más importantes son *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, responsables de la producción de etanol; *Leuconostoc mesenteroides*, asociado a la producción de dextranas y responsable de la viscosidad del pulque, al ser un microorganismo heteroláctico, es también parcialmente responsable de la producción de ácido láctico y de etanol y *Lactobacillus* sp., productores de ácido láctico (Swings y De Ley, 1977; García-Garibay y López Munguía, 2005).

3.1.2.1 Fermentación alcohólica.

Zymomonas mobilis es un bacilo Gram-negativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo, inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos, catalasa positivo y oxidasa negativo, anaeróbico y microaerofílico. Las únicas fuentes de carbono que metaboliza son glucosa, fructosa y sacarosa (Swings y De Ley, 1977; Martínez, 2004). El género *Zymomonas* solamente tiene una especie con dos subespecies; *Zymomona mobilis subsp. mobilis* y *Zymomona mobilis subsp. pomaceae*. En 1923, Linder realizó estudios sobre la fermentación del aguamiel, en donde estableció la presencia de una bacteria a la que el llamó *Termobacterium mobile* (*Zymomona mobilis subsp. mobilis*) capaz de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa para producir etanol, CO_2 y poco ácido láctico, pero era incapaz de fermentar maltosa, lactosa, manosa, arabinosa, dextrinas y manitol (Swings y De Ley, 1977). Es uno de los principales productores de etanol, razón por la cual es considerado como el responsable de iniciar la fermentación alcohólica durante el proceso de

elaboración del pulque. Puede producir 2 moles de etanol por cada mol de glucosa fermentada por la vía modificada de Entner- Doudoroff (Figura 1), generalmente utilizada por organismos aerobios estrictos (Swings y De Ley, 1977; Skotnicki, *et al.* 1981). En presencia de glucosa y fructosa en el medio como sustratos, los productos mayoritarios de la fermentación son etanol y CO₂ , o bien, cuando el sustrato es sacarosa, además de la producción de etanol, se produce sorbitol y levana.

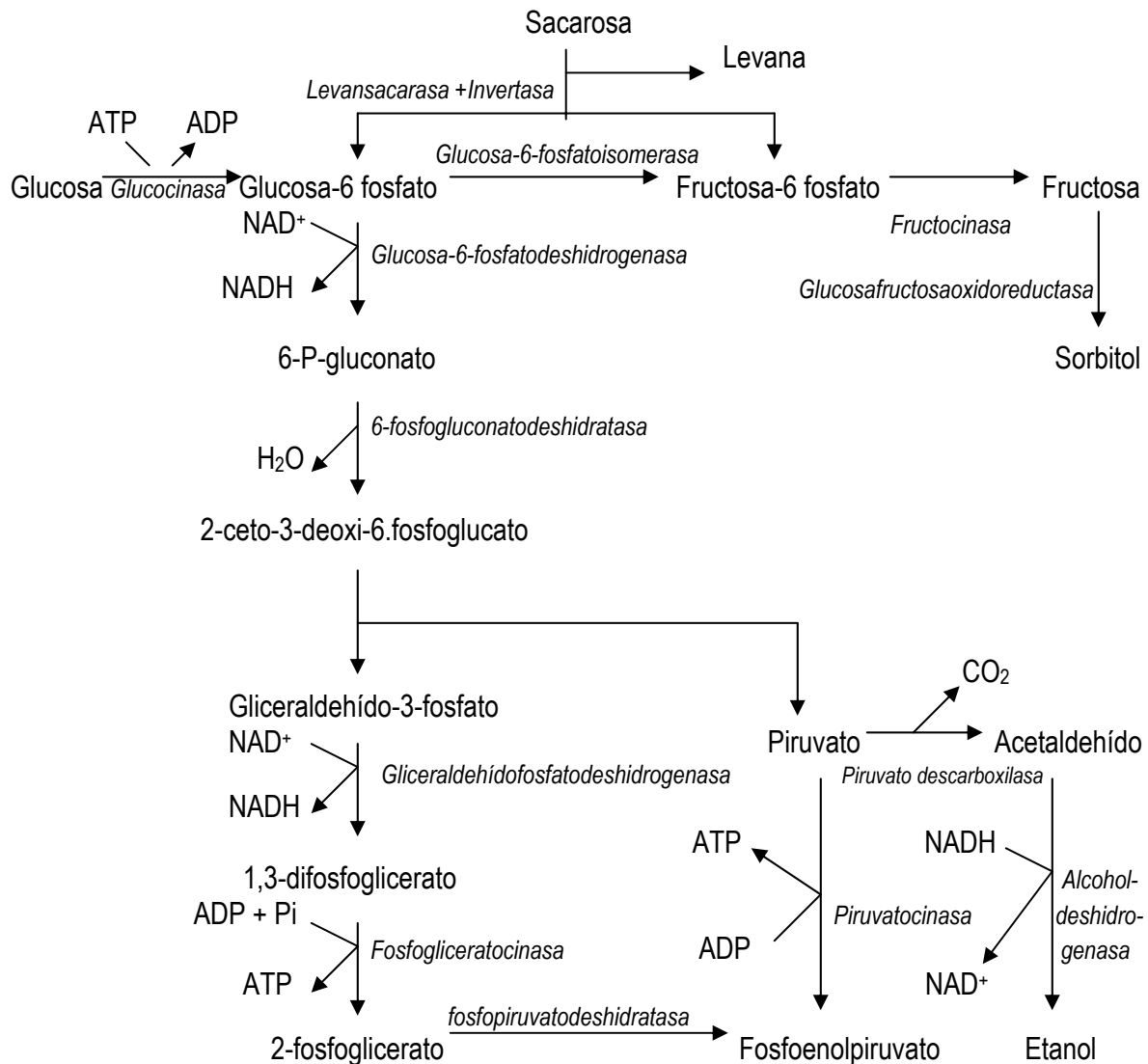
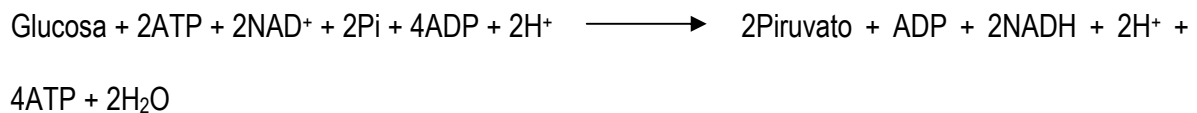


Figura 1. Vía Entner-Doudoroff utilizada por *Z. mobilis* para la producción de Etanol (Sprenger, 1996).

Otro microorganismo que participa en la fermentación alcohólica del pulque es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada industrialmente para la fabricación de cerveza, vino y pan, debido a su capacidad para sintetizar etanol y dióxido de carbono durante el proceso de fermentación (Skotnicki, *et al.* 1981; García-Garibay y López Munguía 2005).

Las necesidades mínimas para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* son azúcares como fuente de carbono; la fuente de nitrógeno puede obtenerse de sulfato de amonio, urea o aminoácidos; vitamina B₈ (biotina) y trazas de sales y elementos. Cuando se presenta una escasez de nutrientes *Saccharomyces cerevisiae* utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético sin llevar a cabo una fermentación.

La fermentación alcohólica inicia con la entrada de la glucosa a la célula, bajo el control de enzimas y coenzimas libres, dispuestas en la matriz citoplásmica; una vez dentro, la hexosa, inicia la vía central de degradación anaeróbica llamada Ruta de Embder-Meyerhof (Figura 2), este proceso se representa por la siguiente reacción global:



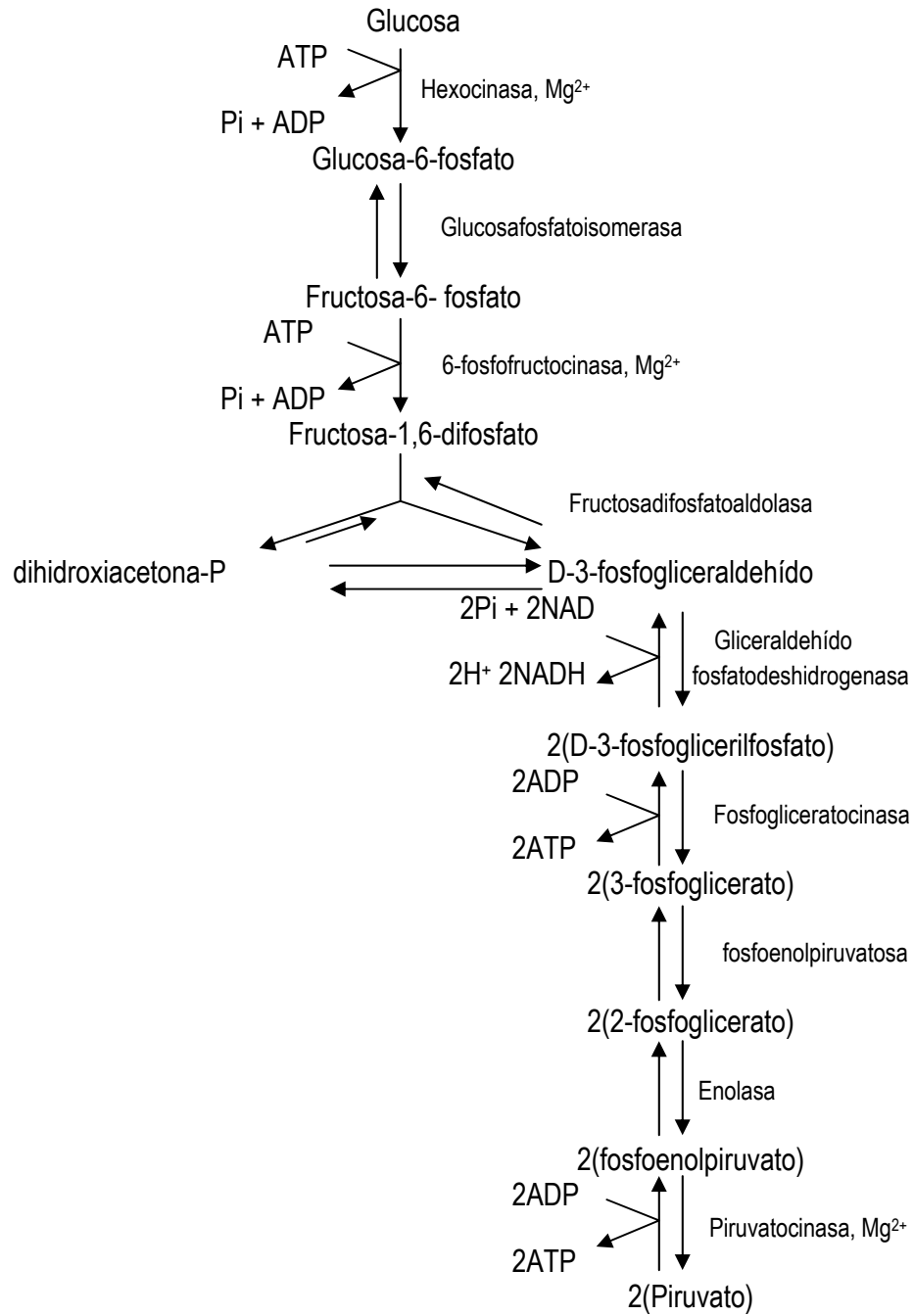


Figura 2. Vía de Embder-Meyerhof.

Para las levaduras fermentadoras, el producto final de la ruta de Embder-Meyerhof, el ácido pirúvico presenta una transformación que consiste en una descarboxilación para la posterior producción de acetaldehído y CO₂. Posteriormente se lleva a cabo la etapa final de la fermentación en donde se involucra la reducción del acetaldehído a etanol en presencia de NADH (Figura 3).

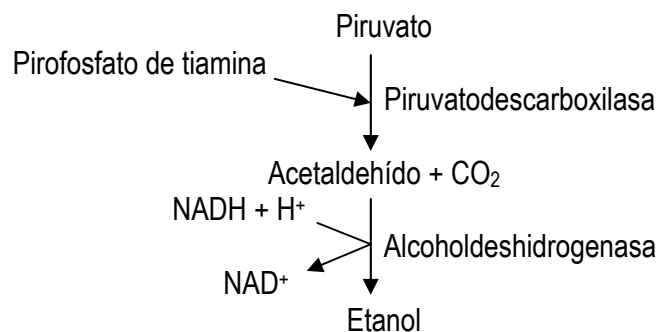
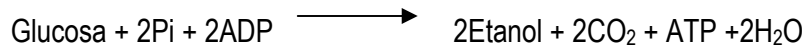


Figura 3. Conversión de piruvato a etanol en la fermentación alcohólica.

Zymomonas mobilis posee ventajas sobre *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol, debido a que presenta velocidades específicas de consumo de sustrato y una producción de etanol elevadas; rendimiento de etanol superior y rendimiento de biomasa inferior; no requiere de adición controlada de oxígeno durante la fermentación y existen mayores posibilidades de manipulación genética. La única limitación que presenta frente a levaduras productoras de etanol es que sus sustratos están restringidos a glucosa, fructosa y sacarosa (Martínez, 2004).

3.1.2.2 Fermentación ácida.

Las bacterias lácticas son cocos o bacilos Gram-positivos normalmente inmóviles, catalasa positivo, no esporulados, el principal producto de su metabolismo fermentativo es el ácido láctico. Este tipo de microorganismos se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas dependiendo del producto final de la fermentación. Dentro de las bacterias homofermentativas se encuentran incluidas las siguientes especies: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. thermophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. leichmanii*. Los homofermentativos son capaces de sintetizar dos moles de lactato por una mol de glucosa fermentada y pequeñas cantidades de ácido acético, a partir de algún azúcar como sustrato. Las bacterias heterofermentativas además de producir ácido láctico, sintetizan pequeñas cantidades de compuestos volátiles, como alcohol. Los principales géneros heterofermentativas son: *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, estos microorganismos producen una mol de lactato, de etanol y de CO₂ por una molécula de glucosa fermentada (Stiles y Holzapfer, 1997; Carr, *et al.* 2002).

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos de suma importancia en la industria alimentaria, en productos cárnicos se añaden con el fin de acelerar los procesos de fermentación, mejorando las características organolépticas. Algunas especies son capaces de fermentar la lactosa de la leche con producción de ácido láctico, estas son utilizadas en productos lácteos. En el pulque el principal papel que juegan este tipo de microorganismos en la elaboración de esta bebida, es la fermentación ácida a partir de la cual se produce ácido láctico principalmente. Los *Lactobacillus* homofermentativos degradan a la glucosa por la Ruta Embder-Meyerhof (Figura 2, 3), en donde el piruvato es reducido a ácido láctico por acción de la enzima lactato deshidrogenasa, en presencia de NADH como donador de protones. En la fermentación heterofermentativa, además de la síntesis de

ácido láctico, bacterias como *Leuconostoc* y ciertos *Lactobacillus* producen una variedad de compuestos reducidos además del lactato, como ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Figura 1). La energía producida es inferior en comparación con la fermentación homoláctica, representa la tercera parte por mol de glucosa fermentada.

En el pulque se puede llevar también la fermentación acética, producida por *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas, que transforma el alcohol en ácido acético (Roskoski, 2000). La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre los 28 y los 30°C. El proceso se describe en la figura 4.

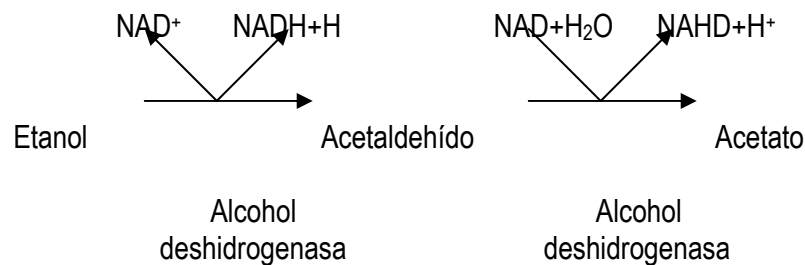


Figura 4. Fermentación ácido acética.

3.1.2.3 Fermentación viscosa.

Leuconostoc mesenteroides es una bacteria láctica heterofermentativa, Gram-positiva, anaeróbica facultativa y cocoide. A este microorganismo se le ha atribuido la fermentación viscosa del pulque, en la cual se produce dextrana a partir de sacarosa como sustrato por medio de la enzima dextransacarasa (García-Garibay y López Munguía, 2005). Diferentes especies de *Leuconostoc mesenteroides* pueden sintetizar hasta siete tipos diferentes de dextrana, que presentan diferentes porcentajes de enlaces α -1,6 y α -1,3, lo que le confieren distintas características al polímero, como la solubilidad que presenta. En la sección 3.2.1.1.1 se detallan las

características de las dextransacararas para sintetizar dextrana y las características de dicho polímero.

3.2 Polisacáridos extracelulares.

Las bacterias son capaces de sintetizar exopolisacáridos (EPS) que presentan una amplia diversidad en su estructura, encontrándose polisacáridos bacterianos que están formados por un solo azúcar y unidos por un solo tipo de enlace, hasta moléculas más complejas que presentan un peso molecular mayor, conformadas por tres o más azúcares y distintas uniones (Sutherland, 1990; Stingle, *et al.* 1996). Los polisacáridos extracelulares son biopolímeros producidos extracelularmente por bacterias osmófilas. Estos polímeros se pueden presentar en dos tipos de formas: la primera se considera libre no adherido a la célula, este polisacárido imparte una consistencia pegajosa al crecimiento bacteriano en medio sólido, o bien presenta una textura viscosa, en ocasiones puede llegar a solidificar como un gel en medio líquido; el segundo tipo consiste en microcápsulas o cápsulas adheridas a la pared celular, presentan un límite y forma definida es posible separarlos por centrifugación (Sutherland, 1990).

En muchos EPS se encuentran presentes D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, en forma piranosa, frecuentemente se ha encontrado la presencia de 6-deoxyhexosa, L-fucosa y L-ramnosa. Además de los monosacáridos más comunes, algunos polisacáridos extracelulares pueden contener uno o más azúcares raros, incluyendo L-hexosas o la forma furanosa de hexosas como glucosa y galactosa, además hay presencia de varios N-acetilamino aunque no se encuentren en polímeros bacterianos de interés industrial. Este tipo de azúcares se encuentran presentes en polisacáridos producidos por *Escherichia coli*. Además de la presencia de varios azúcares pueden contener

substituyentes orgánicos como varios éster y quelatos de piruvato, o bien, inorgánicos como por ejemplo fosfatos y sulfatos (Tabla 3).

Los polisacáridos extracelulares se aplican en diferentes industrias como: la alimentaria, farmacéutica y en procesos de biodegradación. En la industria alimentaria una de sus aplicaciones es proporcionar estabilidad a productos lácteos, además da textura a muchos de los productos fermentados mejorando sus características reológicas (Kimmel, *et al.* 1999; Knoshaug, *et al.* 2007).

Tabla 3. Sustituyentes no carbohidratos en exopolisacáridos.

Substituyentes	Unión	Microorganismo productor de EPS
Ácidos orgánicos		
Acetato	éster	<i>Klebsiella aerogenes</i>
Glicerato	éster	<i>Pseudomonas elodea</i>
Hidroxibutanoato	éster	<i>Rhizobium trifolii</i> , <i>R. leguminosarum</i>
Propionato	éster	<i>Escherichia coli</i>
Piruvato	quelatos	<i>Klebsiella</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>E.coli</i>
Succinato	éster	<i>Rhizobium spp.</i> , <i>Agrobacterium spp.</i>
Aminoácidos		
L-glutamato		<i>Klebsiella aerogenes</i> K82
Serina		<i>E. coli</i> K40
Ácidos inorgánicos		
Fosfato		<i>Klebsiella</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthomonas</i> y <i>Pseudomonas</i>
Sulfato		Cianobacteria

Tomado de Sutherland, 1990.

3.2.1 Clasificación.

Los polisacáridos pueden ser clasificados en homopolisacáridos y en heteropolisacáridos, dependiendo del tipo de azúcares presentes en su estructura.

3.2.1.1 Homopolisacáridos.

Muchos exopolisacáridos microbianos, incluyendo algunos de importancia industrial, son homopolisacáridos. Estos polímeros presentan un alto peso molecular, muchos incluyen varios glucanos que muestran propiedades diferentes debido a la presencia distintas estructuras (Tabla 4).

Tabla 4. Características de algunos homopolisacáridos extracelulares.

Homopolisacárido extracelular bacteriano	Microorganismos productores	Azúcar que lo compone	Tipo de unión*
Celulosa	<i>Acetobacter</i> y bacterias gram–negativas	Glucosa	β -1,4
Curdiano	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> , especies de <i>Agrobacterium</i> y <i>Rhizobium</i>	Glucosa	β -1,3
Escleroglucano	<i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Schizophyllum commune</i> .	Glucosa	β -1,3 (β -1,6)
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Tremella mesenterica</i> y <i>Citaria hariatii</i>	Maltotriosa	α -1,6 o α -1,4
Elsinano	<i>Elsinoe leucospila</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	Maltotriosa	α -1,3
Dextrana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Glucosa	α -1,6 (α -1,2; α -1,3; α -1,4)
Levana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. reuteri</i>	Fructosa	β -2,6 (β -2,1)

*En los paréntesis se mencionan los tipos de uniones que puede presentar las ramificaciones de cada polímero. Tomado de Sutherland, 1990.

Normalmente se piensa que la celulosa es un polímero de las paredes de plantas eucariontes y algas, entre la bacterias es producido principalmente por *Acetobacter* y bacterias Gram–negativas, estos microorganismos secretan el exopolisacárido. Aunque la producción de celulosa de las bacterias no es ningún proceso comercial, proporciona una fuente de obtención de polímero puro. Esto puede ser útil para los propósitos experimentales y también puede tener la ventaja que puede prepararse de manera rápida. Las bacterias mantienen un valioso sistema de estudio de síntesis de celulosa. El curdlano es un exopolisacárido que presenta una estructura simple y un peso molecular relativamente bajo, está formado por 1,3- β -D-glucosa que es insoluble

en agua, es producido por un gran número de bacterias, incluyendo *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, especies de *Agrobacterium* y *Rhizobium*. El escleroglucano y los β -D-glucanos relacionados son producidos por varias especies de hongos filamentosos, incluyendo *Sclerotium rolfsii* y *Schizophyllum commune*. Estos EPS presentan una estructura similar a la de los curdlanos, aunque son polímeros solubles. El pululano es un polisacárido extracelular compuesto de maltotriosa con uniones α -1,6, lo que lo hace un polímero de alto peso molecular, las principales especies que lo producen son *Aureobasidium pullulans*, *Tremella mesenterica* y *Citaria harioti*. El elsinano presenta una estructura similar al pululano, formada por maltotriosa con uniones α -1,3; producido por especies *Elsinoe leucospila* y *Aspergillus niger* (Sutherland, 1990).

Uno de los homopolisacáridos microbianos más estudiado es la dextrana, compuesta por unidades α -D-glucopiranosas unidas por α -1,6 presentando ramificaciones α -1,3. el principal microorganismo que la sintetiza es *Leuconostoc mesenteroides* por acción de la enzima dextranasa. La dextrana presenta un peso molecular muy variado que se encuentra entre 4 a 2000 kDa, esto se debe a las características de la enzima que sintetiza este tipo de polímeros (Dols, et al. 1998; Tallgren, 1999).

3.2.1.1.1 Dextranetas.

Las glucosiltransferasas son enzimas que sintetizan polisacáridos con diferentes estructuras, conocidos como dextranas, debido a que catalizan reacciones de transferencia de residuos glucosilo, utilizando como único sustrato a la sacarosa (Khalikova, et al. 2005). Las dextranetas (1,6- α -D-glucan-6- α -D-glucosiltransferasa) se encuentran principalmente en bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Tabla 5).

Tabla 5. Especies de bacterias que son capaces de sintetizar dextrana.

Streptococcus	Leuconostoc	Lactobacillus
<i>S. bovis</i>	<i>L. dextranicum</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>S. challis</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. brevis</i>
<i>S. faecalis</i>		<i>L. casei</i>
<i>S. mutants</i>		<i>L. musicus</i>
<i>S. sanguis</i>		<i>L. pastorianus</i>
<i>S. viridans</i>		<i>L. viridescens</i>

Tomado de Sidebotham, 1974; Khalikova, *et al.* 2005.

La dextransacarasa más estudiada debido a su importancia comercial es la producida por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, esta sintetiza un solo tipo de dextrana que presenta en su cadena principal 95% de uniones α -1,6 y 5% en sus puntos de ramificación α -1,3. Se pueden presentar dos tipos de ramificaciones de dicha especie: cadenas relativamente largas con uniones α -1,6 enlazadas a estructuras principales mediante ramificaciones α -1,3 o simples unidades de glucosa (Monchois, *et al.* 1998; Quirasco, *et al.* 1999).

Las cepas B-1355, B-742 y B-1299 a diferencia de la B-512F tienen la capacidad de producir dos tipos de dextrana. *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 presenta dos glucosiltransferasas; la primera enzima sintetiza una dextrana que presenta estructura similar a la producida por la cepa B-512F, mientras que la segunda enzima (alternansacarasa) produce un polímero llamado alternana que presentan variaciones en la cadena principal, hay una alteración consecutiva de las uniones α -1,3 con α -1,6 y se presenta 11% de uniones α -1,3 en los puntos de ramificación (Smith, *et al.* 1994).

La dextrana soluble (S) producida por la cepa B-742 tiene 50% de uniones α -1,6 en la cadena principal y 50% de α -1,3 en los puntos de ramificación, esto representa el mayor grado de ramificaciones que puede presentar este polímero. Esta estructura es conocida como "peine

bifurcado” en donde el eje esta representado por la cadena principal y cada uno de los azúcares unidos a dicha cadena corresponden a los dientes de dicho peine. La segunda dextrana sintetizada por este tipo de cepa representa un 7% de uniones α -1,4 en lugar de los α -1,3 en los puntos de ramificación (Monchois, *et al.* 1998).

La bacteria *Streptococcus mutants* 6715 produce dos tipos diferentes de glucansacarasa: dextranacarasa (glucosiltransferasa-soluble o GTF-S) la cual sintetiza dextrana soluble en agua con 35% de ramificaciones con uniones α -1,3 a la cadena principal, uno de cada dos residuos de glucosa de la cadena principal contiene ramificación. La segunda glucansacarasa de esta cepa produce un polímero insoluble en agua que presenta cadena principal con uniones α -1,3 (94%), esta enzima se conoce como mutansacarasa (glicosiltransferasa insoluble o GTF-I) y el polímero no es considerado dextrana sino mutana (Kuramitsu, 1975; Germaine y Schachtele, 1976; Meulenbeld, *et al.* 1999). En la tabla 6 se presenta la conformación de las diferentes dextranas.

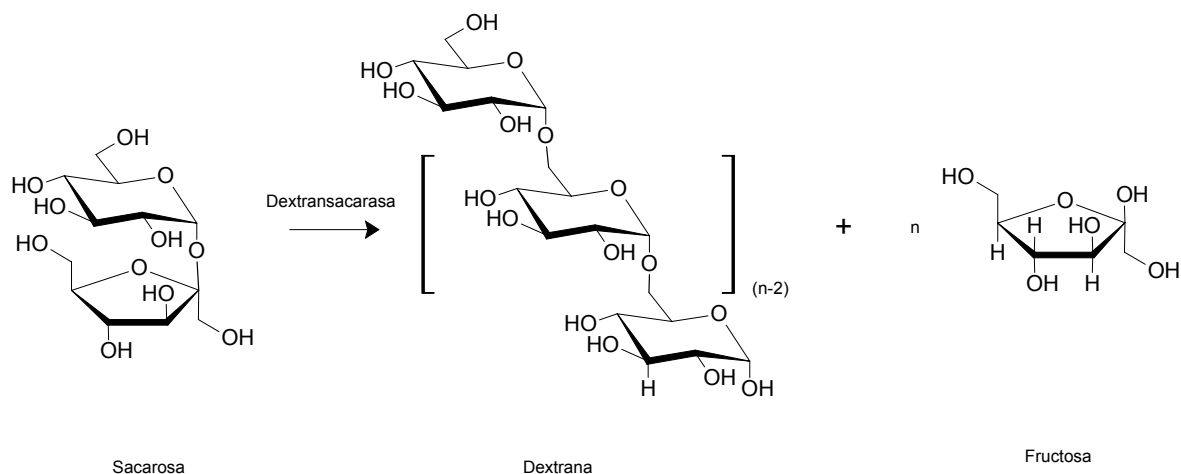
Tabla 6. Proporción de enlaces que presentan los glucanos producidos por dextranacarasas.

Microorganismo	Porcentaje de uniones				
	Cadena principal		Ramificaciones		
	α -1,6	α -1,3	α -1,3	α -1,2	α -1,4
DEXTRANA SOLUBLE					
<i>L. mesenteroides B-512F</i>	95		5		
<i>L. mesenteroides B-742</i>	50		50		
<i>L. mesenteroides B-1299</i>	65			35	
<i>L. mesenteroides B-1355</i>	54	35	11		
<i>S. mutants 6715</i>	64		36		
DEXTRANA LIGERAMENTE INSOLUBLE					
<i>L. mesenteroides B-742</i>	87				13
<i>L. mesenteroides B-1299</i>	66		7	27	
<i>L. mesenteroides B-1355</i>	95		5		
MUTANA INSOLUBLE					
<i>S. mutants 6715</i>	4	94	2		

Tomado de (García-Garibay y López Munguía, 2005).

La dextransacarasa de la cepas de *Leuconostoc mesenteroides* es considerada como una enzima inducible, debido a que necesita sacarosa en el medio de cultivo para inducir la formación de la misma, mientras que la enzima producida por *Streptococcus* sp. no requiere sacarosa para síntesis de la enzima, razón por la cual dicho catalizador se considera constitutivo (Dols, *et al.* 1997). Debido a la inducción con sacarosa, la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* presenta una gran cantidad de dextrana envolvente, que le permite aparecer en tres distintas formas simultáneamente: 1) Asociación enzima-dextrana, forma de complejo estable dextranosil-enzima; 2) Asociada célula-dextrana-enzima, receptores proteicos fijan dextrana a la superficie celular; 3) Agregados intermoleculares, una forma enzimática monomérica permite la formación de estructuras de tamaño superior, debido a la asociación con moléculas de dextrana y por uniones con otras moléculas de enzima. A pesar de que la sacarosa es el único sustrato natural utilizado por estas enzimas, es posible encontrar otros sustratos como el p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido y el fluoruro de α -D-glucopiranosilo, aunque estos son utilizados con menor velocidad por la enzima (Quirasco, 1997).

La reacción que se lleva a cabo para la síntesis extracelular de dextrana se describe a continuación:



La reacción es esencialmente irreversible. La glucosa se produce mediante una reacción de aceptor con agua. La síntesis de dextrana se basa en la formación de complejos covalentes glucosil o dextranosil-enzima a partir de la sacarosa. El mecanismo de reacción sigue un modelo *ping-pong bi bi*, es un mecanismo de inserción de dos sitios que permite la transferencia de unidades glucosilo desde la sacarosa, al extremo reductor de la cadena de dextrana en crecimiento (Funane, 1993). El centro activo de la dextransacarasa presenta dos sitios de unión de sacarosa y dos lugares de polimerización de la dextrana. En estos dos últimos se encuentran dos nucleófilos (aniones carboxilato), que atacan a las dos moléculas de sacarosa produciendo dos intermediarios covalentes glucosil-enzima, que presentan uniones tipo éster entre el hidroxilo del carbono uno de la glucosa y el grupo carboxilo del nucleófilo, liberando fructosa como subproducto. A continuación, se lleva a cabo la formación del enlace glucosídico α -1,6 y el intermediario isomaltosil-enzima, debido a que el hidroxilo del carbono seis de uno de los intermediarios glucosil-enzima efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbono uno del intermediario vecino. El nucleófilo vecino quedara libre para atacar a una nueva molécula de sacarosa, dando lugar a otro intermediario glucosil-enzima. Posteriormente, el hidroxilo del carbono seis del nuevo intermediario atacará al carbono uno del intermediario isomaltosil-enzima, formando una segunda unión α -1,6 y un intermediario isomaltosil-enzima. Este proceso continua entre los dos sitios, debido a la inserción de unidades de glucosa entre la enzima y el extremo reductor de la cadena de dextrana en crecimiento. Este mecanismo supone que la cadena de dextrana es transferida de un sitio a otro del centro activo, conforme se va polimerizando (Tanriseven, 1993).

Para la síntesis de las ramificaciones, una cadena de dextrana ataca a un complejo dextranosil-enzima, liberando una estructura final en donde la dextrana aceptora representa la cadena principal y el punto de ramificación es la dextrana unida a la enzima, es decir, el hidroxilo del

carbono tres de un residuo interior de glucosa de una dextrana aceptora efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbono uno de un complejo dextranosil-enzima, o bien, sobre el carbono uno de un complejo glucosil-enzima, formándose una unión α -1,3, debido al desplazamiento de la dextrana o de la glucosa del nucleófilo del centro activo de la enzima (Dols, *et al.* 1997).

La introducción de algunos azúcares en la mezcla de reacción de la dextranasa en presencia de sacarosa, permite la síntesis de oligosacáridos, los residuos de glucosa de la sacarosa son transferidos por la enzima a los hidroxilos libres de aquellos azúcares, que se conocen como aceptores. El centro activo de la dextranasa, además de los dos sitios de unión de la sacarosa y de los dos sitios de polimerización, presenta un sitio de unión de aceptor, el cual es dependiente de uno de los sitios de unión de sacarosa. Se presentan dos tipos de aceptores, los que sintetizan un solo producto que presenta un residuo de glucosa más que el aceptor inicial y los que forman una serie homóloga de oligosacáridos, es este último, el aceptor suele ser un monosacárido o un disacárido, produciéndose una serie de oligosacáridos nombrados productos de aceptor. Un aceptor de bajo peso molecular desplaza la reacción desde la síntesis de dextrana hacia la formación de productos de aceptor (Dols, *et al.* 1998).

En estudios recientes se menciona otro mecanismo de reacción de la dextranasa para la formación de glucanos. La dextranasa presenta dos regiones de dominio: una región centro (1000 aminoácidos) en donde se encuentra sacarosa ligada y un dominio de C-terminal (500 aminoácidos). La dextranasa cataliza la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa ligada, los productos obtenidos dependerán del destino de estos residuos. La formación de la dextrana ocurre por el traslado sucesivo de los residuos glucosilo al polímero, en el traslado se propone la formación de un complejo covalente de enzima-glucosilo (Monchois, *et al.* 1999).

3.2.1.1.2 Fructosiltransferasas.

Las enzimas fructosiltransferasas son aquéllas que sintetizan polisacáridos extracelulares llamados fructanas compuestos por fructosa usando como sustrato a la sacarosa. El peso molecular de las fructanas es muy variado va de los 2×10^4 a 5×10^7 Da, el cual es dependiente de las condiciones de crecimiento, como temperatura, concentración de sacarosa utilizada (Rossi, *et al.* 2005; Hijum, *et al.* 2006).

Existen dos tipos de fructansacarosas, la levansacarasa que produce un polímero constituido principalmente por residuos de fructosa unidos por enlaces β -2,6, ocasionalmente presentan puntos de ramificación con enlaces β -2,1, llamado levana y la inulinsacarasa que forma polímeros conocidos como inulina, conformados por una cadena principal con uniones β -2,1 y ramificaciones unidas por enlaces de tipo β -2,6.

La levansacarasa se encuentra distribuida en una gran cantidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, principalmente en los géneros *S. salivarius* (enzimas grandes de 140 kDa), *Bacillus sp.*, *Zymomonas sp.*, *Lactobacillus sp.* (enzima más pequeña), *Streptococcus sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. reuteri 121* y *Lactobacillus sanfranciscensis*. *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. panis* y *Weissella confusa*. La enzima inulinsacarasa se encuentra únicamente presente en bacterias ácido lácticas principalmente en los géneros *S. mutans*, *S. salivarius*, *Leuconostoc citreum* CW28 y *L. reuteri 121* (Tabla 7).

Tabla 7. Microorganismos productores de fructanas.

Microorganismo	Tipo de EPS
<i>Leuconostoc reuteri</i> 121	Levana
<i>L. mesenteroides</i> B-1355	Levana
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Levana
<i>Streptococcus sobrunus</i> OMZ 176	Levana
<i>S. salivarius</i> ATCC 13419	Levana
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	Levana
<i>S. salivarius</i> HHT	Levana
<i>S. salivarius</i> 51	Levana
<i>S. salivarius</i> SS2	Levana
<i>Leuconostoc reuteri</i> 121	Inulina
<i>L. citreum</i> CW 28	Inulina
<i>Streptococcus criceti</i> AHT	Inulina
<i>S. ratii</i> BHT	Inulina
<i>S. mutants</i> GS-5	Inulina
<i>S. mutants</i> Ingbritt	Inulina
<i>S. mutants</i> JC 1	Inulina
<i>S. mutants</i> JC 2	Inulina
<i>Lactobacillus frumenti</i> (5 especies)	Fructana
<i>L. pontis</i> 1.1115 y 1.675	Fructana
<i>L. panis</i> 1.649	Fructana
<i>Weissella confusa</i> 1.934	Fructana

Tomado de Hijum, *et al.* 2006.

3.2.1.2 Heteropolisacáridos.

Los heteropolisacáridos microbianos son polímeros compuestos por más de dos componentes de azúcar. El posible rango de estructuras y el resultado de diferentes propiedades es de hecho muy grande debido al número de uniones y configuraciones, cada hexosa puede presentar unión α - ó β -, en la forma piranosa o furanosa y se puede unir a través de la posición 1, 2, 3, 4 o 6. Los heteropolisacáridos microbianos son casi todos compuestos de unidades repetidas que varían de tamaño de disacárido a octopolisacárido (Mozzi, *et al.* 2006). En algunos casos contienen una mol de ácido uránico, normalmente ácido D-glucónico, de vez en cuando se encuentran presentes

dos ácidos uránicos. Los heteropolímeros normalmente presentan cadenas cortas que varían de uno a cuatro azúcares de longitud, es raro que estos extremos presenten ramificaciones (Sutherland, 1990).

Los principales heteropolisacáridos son: alginatos bacterianos, los cuales son polímeros compuestos por ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. Las principales especies que sintetizan alginato bacteriano son *Azotobacter vinelandii* el cual produce tres tipos diferentes de polímero, una secuencia de ácido poli-D-manurónico, una secuencia de ácido poli-D-gulurónico y una secuencia mixta. *Azotobacter chroococcum* sintetiza dos tipos de polisacáridos, un polímero de alginato acetilado con gran cantidad presente de ácido D-manurónico. Las especies del género *Pseudomonas* solo producen polisacáridos compuestos únicamente por ácido D-manurónico (Stingele, et al. 1996).

Ciertas bacterias lácticas tiene la capacidad de sintetizar dos tipos de EPS, homopolisacáridos (compuestos por un tipo de monosacárido) y heteropolisacáridos (constituidos por unidades repetidas de dos o más monosacáridos). La producción de heteropolisacáridos por este grupo de microorganismos es muy compleja, incluyendo procesos a nivel celular. Las bacterias lácticas productoras de heteropolisacáridos se dividen en dos grupos: LAB termofilas, en donde se encuentran 10 especies de *Lactobacillus delbrueckii* sub. *bulgaricus*, una especie de *L. delbrueckii* sub. *lactis*, una de *L. helveticus* y ocho de *Streptococcus thermophilus*; LAB mesofilas, las especies que presentan la capacidad de sintetizar este tipo de polímeros son de los géneros *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*) y *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) (Mozzi, et al. 2006).

4. Justificación

El único exopolisacárido asociado al pulque hasta el momento es la dextrana, como se ha mencionado con anterioridad *Leuconostoc mesenteroides* es el responsable de llevar a cabo la fermentación viscosa por medio de la enzima dextransacarasa.

Sin embargo en nuestro grupo de trabajo se observó que el EPS producido después de seis horas de fermentación está constituido por fructosa (Escalante, *et al.* en revisión). Por lo que el presente trabajo tiene como finalidad el aislamiento de posibles nuevos polisacáridos extracelulares a partir de muestras de aguamiel y pulque.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo general.

Aislar y caracterizar nuevos polisacáridos extracelulares producidos por bacterias lácticas a partir de una muestra de aguamiel y de pulque.

5.2. Objetivos particulares.

5.2.1. Realizar una fermentación del pulque bajo condiciones de laboratorio y determinar algunos parámetros fisicoquímicos de dicho proceso.

5.2.2. Aislar bacterias lácticas productoras de EPS a partir de una muestra de aguamiel y durante la fermentación del pulque.

5.2.3. Seleccionar y purificar colonias productoras de EPS de interés en medios con sacarosa como fuente de carbono.

5.2.4. Identificar cepas productoras de EPS.

5.2.5. Analizar cepas productoras de EPS por MEB.

5.2.6. Determinar el peso molecular y los componentes de cada EPS por HPLC.

5.2.7. Analizar los diferentes EPS por RMN.

6. Material y métodos.

6.1 Desarrollo de la fermentación de pulque bajo condiciones de laboratorio.

Se obtuvo una muestra de aguamiel fresco (recién colectada) y de pulque previamente fermentado en la localidad de Huitzilac, Morelos, México, que fueron utilizadas como sustrato e inóculo, respectivamente, para realizar una fermentación bajo condiciones controladas. Las muestras se transportaron al laboratorio (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM) en recipientes de plástico estériles.

La fermentación se realizó colocando en una jarra de vidrio estéril una muestra de aguamiel, la cual fue inoculada con pulque previamente fermentado, en una proporción 2 aguamiel:3 pulque V/V (de acuerdo a las especificaciones del proveedor). La fermentación se desarrolló durante seis horas a temperatura ambiente realizándose determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas en el aguamiel, en el pulque fermentado, después de inocular (T0), a las tres horas (T3) y a las 6 horas de fermentación (T6) (Figura 5).

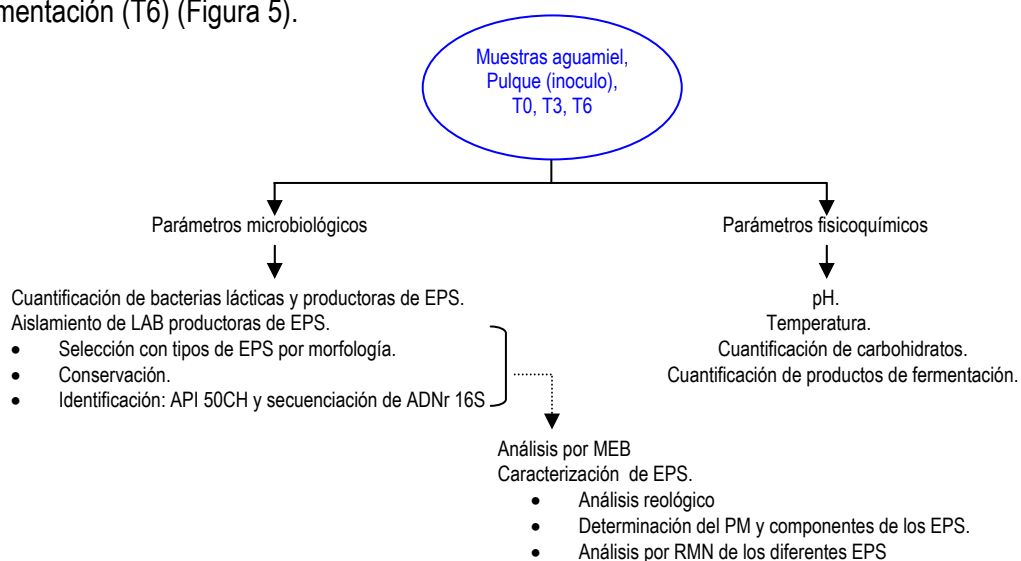


Figura 5. Esquema de las determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas realizadas a las muestras de aguamiel, pulque previamente fermentado y durante la fermentación de pulque.

6.1.1 Cuantificación de bacterias lácticas y bacterias lácticas productoras de EPS de aguamiel y pulque. A partir de cada una de las muestras se realizaron diluciones decimales seriales hasta 10^{-6} utilizando agua peptonada 0.1% P/V (*DIFCO*). A partir de cada dilución, se inoculó 0.1 mL por triplicado por extensión superficial en placas de agar APT (*DIFCO*) y APT + sacarosa al 10%, incubándose a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para cuantificar bacterias lácticas (BL) y bacterias lácticas productoras de EPS (BL-EPS) respectivamente. La cuantificación de colonias BL y BL-EPS se efectuó a las cajas que contenían entre 25 a 250 UFC/mL.

6.1.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos.

- a. **Temperatura y pH.** Para monitorear la temperatura interna del sistema de fermentación se colocó un termómetro en contacto directo con la muestra, realizándose lecturas cada hora durante toda la fermentación. La determinación de pH se realizó tomando una alícuota de 50 mL de cada muestra con un potenciómetro *Conductronic pH120* previamente calibrado a pH ~ 7.0.

- b. **Cuantificación de azúcares y productos de fermentación:** Se tomó una alícuota de 1.5 mL del aguamiel, de la muestra del pulque fermentado y de cada muestra durante la fermentación para la determinación de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa, etanol, ácido láctico, ácido acético. Cada alícuota fue centrifugada a 10,000 rpm / 1 min en una centrífuga *Eppendorf 5410*. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo y filtrado a través de una membrana con tamaño de poro de 0.40 μm . Se inyectaron 20 μL de cada muestra filtrada en un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), *Waters HPLC system*, usando una columna Aminex HPX-87H, flujo de 0.5 mL / min a 50°C , fase móvil H_2SO_4 5 M / H_2O . Se inyectaron previamente

estándares que correspondieron a cada uno de los metabolitos a cuantificar. Con cada uno de los estándares se obtuvo una curva patrón (concentración g/L vs. altura) para comprobar la linealidad de los datos. Los valores de altura para cada una de las muestras se ajustaron a los valores de la curva patrón.

6.2 Aislamiento de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos de aguamiel y pulque.

A partir de 100 colonias seleccionadas en placas de APT + sacarosa al 10% de cada muestra (aguamiel, pulque fermentado, To, T3 y T6), se determinó cuales fueron las que presentaron mayor crecimiento a las 24 horas de incubación, realizando inspección visual de las diferencias morfológicas presentes. Estas colonias se purificaron por agotamiento en cuadrantes. Se realizó tinción de Gram a cada colonia aislada y se consideraron como puras aquellas colonias homogéneas en forma y tamaño al ser observadas microscópicamente.

6.2.1 Selección de colonias con tipos de polímeros únicos por morfología. Como resultado de la evaluación visual de las 100 colonias, se identificaron dos tipos de EPS. Se seleccionó una colonia de cada tipo que presentó una mayor capacidad de producir polímero en medio APT con sacarosa 10%. Estas colonias que fueron designadas como EPS A morfología compacta y EPS B morfología mucoide.

6.2.2 Conservación de cepas únicas productoras de EPS. Las colonias EPS A y EPS B fueron conservadas en glicerol al 25% en ultracongelación a - 70°C. Para esto se realizó un cultivo en caldo APT + 10% de sacarosa incubando a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente se tomó 1 mL de cada cultivo y se mezcló con 1 mL de glicerol al 50%

en un criovial *Corning*. La mezcla se homogeneizó, se congeló en hielo seco y se almacenó a - 70°C.

6.3 Identificación de las cepas productoras de exopolisacáridos. La identificación de las colonias EPS A y EPS B se realizó por medio de dos técnicas: identificación bioquímica por el sistema API 50CH (*bioMerieux*) y análisis de secuencias de ADNr 16S.

6.3.1 Identificación bioquímica utilizando el sistema API 50CH. Se verificó la pureza de las colonias a identificar mediante microscopia observando el Gram, la uniformidad en morfología y el tamaño de cada una. Se realizó la suspensión de cada una en 50 mL de API 50 CHL Médium hasta igualar la turbidez equivalente al tubo 2 en la escala de McFarland utilizando un densitómetro *Densimat Biomeriux* y se inoculó en cada una de las cúpulas de la galería API 50CH. Se incubaron a 30°C y se interpretaron los resultados a las 24 y 48 horas conforme a las indicaciones recomendadas por el fabricante anotando en las hojas de resultados como positivo (cambio de color a amarillo, se realizó fermentación), negativo (color parecido al control, morado no se efectuó fermentación) o dudoso (cambio de color dudoso). La identidad de las colonias aisladas se determinó de acuerdo al mayor porcentaje de identidad obtenido con la fermentación de los 49 azúcares de la galería API depositados en la base de datos *API Lab Plus BioMérieux V 3.3.3*.

6.3.2 Análisis de secuencias de ADNr 16S. Se realizó un cultivo en 3 mL de caldo APT sin sacarosa de cada colonia (A y B), incubándose durante 24 horas a 30°C. Se utilizó el *UltraClean Microbial DNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc.)* para la extracción del ADN cromosomal de acuerdo a las indicaciones del proveedor. El ADN cromosomal extraído se

conservó a - 20°C. y se utilizó como templado para la amplificación de los genes que codifican los ADNr 16S por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), realizando una mezcla de reacción bajo las siguientes condiciones:

Templado	1 µL
Buffer 10x	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mL
dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100 mM)	1 µL
Primer Fw (EU530F, 0.5 µM)	0.1 µL
Primer Rv (EU1449R, 0.5 µM)	0.17 µL
Enzima DNA Taqpolymerase (5 U/ µL, <i>Altaenzymes</i>)	0.5 µL
H ₂ O	40.73 µL

Volumen final de reacción 50 µL.

El par de primer Eu530F (5'-TGA-CTG-ACT-GAG-TGC-CAG-CAG-CCG-CGG-3') y EU1449R (5'-TGA-CTG-ACT-GAG-GCT-ACC-TTG-TTA-CGA-CCT-3') utilizados, permiten la amplificación de un segmento de ADN de 1000 pares de bases correspondientes a la posición 530 y hasta 1449 del ADNr 16S de *E. coli* (Borneman, *et al*, 1996). La mezcla de reacción se colocó en un tubo de 0.2 mL y se realizó la amplificación en un termociclador *GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer*, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (95°C, 10 min, 1 ciclo), amplificación (95°C, 1 min; 42°C, 1 min; 72°C, 1.5 min, 30 ciclos) y amplificación final a 72°C 5 min, 1 ciclo.

Se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con 4 µL bromuro de etidio, 4 µL de cada reacción de PCR, en buffer de TBE 1X pH 8.0 a 150 Volts. El tamaño del fragmento se determinó utilizando un marcador de peso molecular O`Gene'ule™ 1kb, DNA ladder (*Fermentas*). El gel fue visualizado en un analizador de imágenes *Eagle Eye II* (*Stratagene*). El producto de PCR se purificó usando un kit Marligen Biosciences Inc. de acuerdo a las indicaciones del proveedor y fue utilizado como templado para la reacción de secuenciación.

Para la secuenciación se utilizó un kit Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing. La reacción para secuenciación se preparó de la siguiente manera:

Templado (PCR ADNr 16S purificado, 100 ng)	4 µL
Primer Fw (EU530F) 10 pmol	1 µL
H ₂ O	11 µL
Vol.final de reacción	16 µL

Cada reacción se analizó en un equipo DNA Analyzer, ABI PRISM 3700. La secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas en el programa Bioedit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) para determinar su calidad y se analizaron en la base de datos no redundante del National Center for Biotechnological Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando el programa BLAST, con la finalidad de verificar que se haya obtenido fragmento de la secuencia completa. La identidad de las secuencias se

determinó de acuerdo al mayor porcentaje de identidad obtenido con las secuencias depositadas en esta base de datos. Para corroborar el resultado obtenido, las secuencias se analizaron en el programa Sequence match de la Ribosomal Database Project II (rdp.cme.msu.edu). El criterio para determinar la identidad fue el mismo utilizado para el análisis en la base de datos del NCBI.

6.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los cultivos que presentaron mayor producción de EPS. Para la preparación de las muestras se tomó 1 mL de cada cepa de un cultivo en caldo APT-sacarosa 10% y se adicionó 1 volumen de una solución fijadora fresca de glutaraldehído al 50% en un amortiguador PBS al 3% (*amortiguador salino de fosfatos*). Cada muestra fijada se deshidrató sucesivamente en etanol al 30%, 50%, 70% y 100% V/V para ser congeladas al punto crítico del CO₂ en un equipo Sandri-780 (*Tousimis*) y cubiertos con partículas de oro en un equipo "ion sputter" JFC-110 (*JEOL*). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido *JEOL* modelo *JSM5410LV*. El análisis de MEB se realizó en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

6.5 Caracterización de los polímeros producidos. Se realizó la caracterización de los EPS aislados por medio de los siguientes análisis: a. Análisis reológico de los cultivos productores de EPS; b. Determinación del peso molecular y los componentes de cada EPS por HPLC; c. Análisis por RMN de los diferentes polímeros.

a. Análisis reológico de un cultivo de las cepas productoras de EPS. La reología ayuda a conocer la viscosidad de las sustancias analizadas, por medio de la deformación que se presenta al ser sometidas a un esfuerzo extremo. Se determinan

dos parámetros: el índice de consistencia (k), el cual indica que tan viscosas son las soluciones y el índice de flujo (n) que permite caracterizar un fluido en newtoniano (n igual a 1, k constante; presenta un comportamiento lineal) o no newtoniano ($n \neq 1$, variaciones de k ; la velocidad de deformación no es lineal).

Para este análisis se realizó un precultivo de cada una de las cepas productoras de EPS en caldo APT + sacarosa al 10% incubándose a 30°C toda la noche. Al día siguiente se inoculó un matraz Erlenmeyer con 500 mL de caldo APT + sacarosa al 10% y se incubó a 30°C, 200 rpm. Para el análisis reológico se tomó una alícuota de 1 mL del inóculo así como del tiempo cero, tres y seis horas de fermentación. Se utilizó un reómetro AR 1000 TA (New Castle, USA), con una configuración de cono y plato (60mm de diámetro y 1°). A cada una de las muestras se le determinó el índice de consistencia, K (Pa s^n) y el índice de flujo, n (-) siguiendo la Ley de la Potencia ($\tau = K\dot{\gamma}^n$).

- b. Determinación del peso molecular y los componentes de los EPS por HPLC.** Para la determinación del PM y los componentes de los EPS se requirió producir cada polímero. Para este fin, se siguió el protocolo de producción reportado por Quirasco (1997). Se realizó un precultivo en caldo APT + sacarosa al 20% incubando a 30°C toda la noche. Al día siguiente se inoculó en un matraz Erlenmeyer con 500 mL de caldo APT + sacarosa al 20% y se incubó a 30°C toda la noche en una incubadora con agitación orbital a 200 rpm. Al día siguiente a los cultivos de cada EPS (A de tipo compacto y B de tipo mucoide) se les ajustó el pH a 5.4 y fueron centrifugados a 4000 rpm a 4°C en una centrifuga *Sorvall Legend MaCH 1.6R*.

Para el EPS B (mucoide) se decantó el sobrenadante, se precipitó el polímero y la enzima con un volumen de polietilenglicol (PEG) 5000 al 50%. La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm / 10min a 4°C. En este caso, el sobrenadante se decantó y desechó, mientras que el EPS fue separado del fondo de la botella de centrifuga con una espátula. Se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se resuspendió en un volumen mínimo de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.4. Debido a que el EPS A (compacto) no fue posible precipitarlo, se consideró que se encontraba asociado a pared celular. El paquete celular fue resuspendido en un volumen mínimo de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.4 (Figura 6).

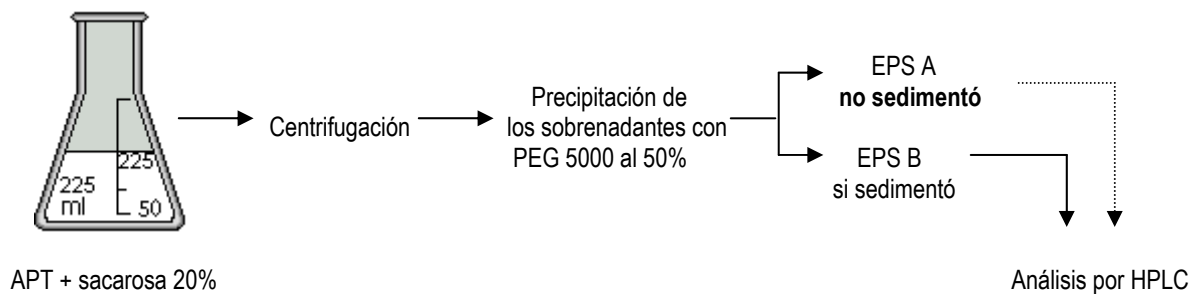


Figura 6. Esquema de la producción del EPS A y EPS B.

La determinación de peso molecular se realizó por HPLC. Se solubilizó cada una de las muestras con H₂O y se inyectaron 10 µL en el equipo de HPLC utilizando una columna Ultrahydrogel, sensibilidad IR = 64, flujo de 0.8 mL / min, fase móvil solución de nitritos 0.1 M, temperatura de 35°C, detector refractómetro diferencial. El tiempo en el que se dejó correr la muestra fue de 35 min. Con los tiempos de retención de cada uno de los polímeros se realizó el cálculo para determinar el PM, utilizando una curva estándar de polímero conocido de levana.

Para la determinación de componentes a los EPS se realizó la producción de los EPS *in vitro*, para ello se tomó 50 μL de enzima, 100 μL de sacarosa al 60% y 6 μL de CaCl_2 (100 mM), esta reacción se dejó durante 16 horas, posteriormente se analizaron alícuotas de 5 μL por HPLC usando una columna $\mu\text{Bondapak NH}_2$, flujo de 1 mL / min. a 35°C, fase móvil acetonitrilo / H_2O (80:20 V/V).

- c. Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de los diferentes polímeros.** La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica empleada principalmente en la explicación de estructuras moleculares, es decir, es la firma de los compuestos analizados. Se basa en la capacidad de que algunos núcleos atómicos sometidos a un [campo magnético](#) externo absorben [radiación electromagnética](#) en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos.

Para el análisis de RMN se requiere una concentración mínima de 10 mg de EPS liofilizado. Para obtener esta cantidad se siguió la siguiente metodología (figura 7): para el caso del EPS A (compacto) se separaron las células como se describe en la sección 6.5.b. En el caso del EPS B (mucoide) se produjo en un sistema *in vitro* en el cual la enzima separada se encuentra libre de células, (obtenida durante la precipitación del polímero con PEG 5000 al 50%). Se tomó una alícuota de 50 μL de suspensión del EPS A y EPS B y se le adicionó 100 μL de sacarosa al 60%, incubándose 15 min a 30°C. Al día siguiente se cuantificaron azúcares reductores por la técnica del reactivo ácido

dinitrosalicílico (DNS). Con los valores de absorbancia obtenidos a 540nm se determinó la cantidad de unidades (U) de enzima presentes en cada muestra. Con base a esta información se realizó la producción de EPS en un volumen de 500 mL, ajustando la concentración de la enzima a 1 U / mL en una solución de sacarosa 10%, CaCl₂ 1 mM y buffer de acetatos 50 mM, pH 5.4. La mezcla se incubó a 30°C a 70 rpm por 12 horas. Cada EPS fue precipitado por la adición de 1 volumen de etanol absoluto y centrifugación a 4000 rpm/10min a 4°C.

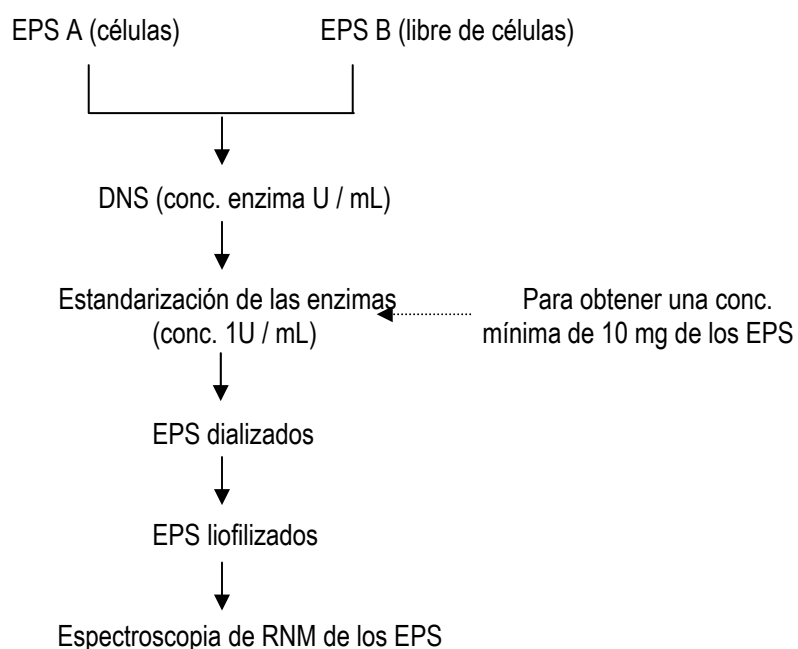


Figura 7. Esquema para el análisis por RMN del EPS A y EPS B.

Los EPS producidos fueron dializados de acuerdo a la siguiente metodología: cada EPS fue transferido a una bolsa de diálisis m.w. cut off 12000-14000 (*Wet cellulose*) y se dializaron contra 2 L de agua miliQ con agitación durante 12 horas, realizando cambios

de agua cada hora durante las primeras cuatro horas y un último cambio al día siguiente. La diálisis se realizó a temperatura ambiente.

Las muestras dializadas se recuperaron en un tubo Falcon de 50 mL, se congelaron en una mezcla de hielo seco en etanol y se liofilizó en un equipo *LaBconco Freezone 4.5* por una hora. Se tomaron 10 mg de cada EPS liofilizado se analizaron por RMN en dos equipos, a 200MHz *Mercury Varian* y a 400MHz *Oxford*. El análisis de RMN se realizó en el Centro de Investigaciones Químicas, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

7. Resultados y Discusión.

7.1 Determinaciones microbiológicas en aguamiel y durante la fermentación del pulque.

Durante la fermentación del pulque bajo condiciones controladas de laboratorio se observó que el aguamiel presentó una cuenta de bacterias lácticas y bacterias lácticas productoras de EPS de 3.4×10^6 UFC/mL y 1.6×10^6 UFC/mL, respectivamente. Después de la inoculación y durante el desarrollo de la fermentación se presentó una disminución de bacterias lácticas y bacterias lácticas productoras de EPS (1.8×10^6 UFC/mL y 9.0×10^5 UFC/mL respectivamente) (Tabla 8). En un estudio realizado con anterioridad (Lozano, 2007; Escalante, *et al.* en revisión), a pesar de que se encontraron las bacterias lácticas en dos ordenes de magnitud superior, se observó un comportamiento similar en los resultados reportados, una cuenta elevada de bacterias lácticas totales en el aguamiel (3.2×10^8 UFC/mL), mientras que al final de una fermentación de 6 horas se observó que las cuentas totales de este grupo microbiano permaneció sin cambios (1.5×10^8 UFC/mL), respecto a su valor al inicio de la fermentación (1.5×10^8 UFC/mL). La abundancia de bacterias lácticas en el aguamiel y durante el desarrollo de la fermentación se puede explicar debido a que el aguamiel es un medio rico en nutrientes, principalmente azúcares que permiten el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos (además de favorecer el crecimiento de algunas bacterias Gram-negativas y levaduras). Las bacterias lácticas presentan capacidades distintas de tolerar ambientes ácidos (Stiles y Holzapfel, 1997; Carr, *et al.* 2002), por otro lado se ha reportado que la abundancia de especies a lo largo de la fermentación cambia, al inicio del proceso hay mayor presencia de *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchi*, a las primeras horas esta abundancia cambia siendo la principal especie *L. acidophilus* (Escalante, *et al.* 2004, Escalante, *et al.* en revisión). Durante la fermentación realizada se observó una proporción de bacterias lácticas productoras de EPS alrededor del 50% con respecto a las bacterias lácticas totales presentes (Tabla 8).

7.2 Determinaciones fisicoquímicas en aguamiel y durante la fermentación del pulque.

El análisis de la concentración de carbohidratos indicó un mayor consumo de fructosa (1053.97 C mM; 31.64 g / L), seguido de sacarosa (309.27 C mM; 4.41 g / L) y glucosa (162.22 C mM; 4.48 g / L) al final de la fermentación realizada (Tabla 9), este comportamiento fue el observado en una fermentación realizada con anterioridad en donde se presentó un consumo de fructosa de 1053.72 C mM (31.63 g / L) y glucosa de 162.24 C mM (4.87 g / L) (Lozano, 2007; Escalante, *et al.* en revisión), indicando una reproducibilidad que se presentó en las condiciones utilizadas para el proceso realizado. Estos carbohidratos juegan un papel importante durante la fermentación, ya que los microorganismos presentes en el medio los utilizan como fuente de carbono para que se lleve a cabo las tres diferentes fermentaciones dentro de la elaboración de pulque, alcohólica, ácida y viscosa (García-Garibay y López Munguía, 2005). Se observó una producción de los siguientes metabolitos después de seis horas de fermentación: etanol (284.34 C mM; 6.5 g / L), ácido láctico (18.99 C mM; 0.57 g / L) y ácido acético (5.33 C mM; 0.16 g / L), como resultado de la actividad de la diversidad metabólica global de los microorganismos presentes durante la fermentación. Escalante, *et al.* (en revisión) señalan la presencia de bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* y de bacterias ácido acéticas (*Acetobacter*) los cuales son los responsables del desarrollar la fermentación ácida: ácido láctico y ácido acético y finalmente se desarrolló una fermentación viscosa, produciéndose EPS (166.55 C mM; 5.0 g / L) a partir de sacarosa como resultado de la actividad de bacterias del género *Leuconostoc*. La fermentación alcohólica se propone que la desarrollan *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* produciendo principalmente etanol.

Al final de la fermentación del pulque se observó que el consumo total de los carbohidratos cuantificados por HPLC fue de 1525.46 C mM (40.92 g / L), a partir de los cuales se produjo 764.89

C mM (18.99 g / L) de productos de fermentación (acético, láctico, etanol, CO₂ y EPS), lo que indica que durante el proceso realizado se obtuvo una recuperación de carbono del 50.14% (Tabla 9), similar al valor obtenido (Lozano, 2007; Escalante, *et al.* en revisión).

Durante la fermentación se observó una disminución de pH de 4.89 hasta 4.02 al final del proceso de elaboración del pulque y un incremento en la temperatura del sistema de 17°C al inicio de la fermentación hasta 29°C a las seis horas. Escalante, *et al.* en revisión, reporta una disminución de pH de 6.0 hasta 4.3 final y aumento de temperatura de 20°C hasta 24°C, lo que indica que los resultados obtenidos presentaron un comportamiento similar, sin embargo, el valor inicial de pH fue inferior al observado en estudios anteriores ,debido a que la muestra utilizada ya había empezado a fermentar.

Tabla 8. Determinación de cuentas de bacterias lácticas y parámetros fisicoquímicos en aguamiel, pulque fermentado y durante la fermentación.

Muestra	Microbiología			Temperatura (°C)	PH
	BL (UFC/mL)	BL-EPS (UFC/mL)	%BL-EPS		
Pulque	3.0 X 10 ⁶	1.6 X 10 ⁶	54.84	17	3.96
Aguamiel	3.4 X 10 ⁶	1.6 X 10 ⁶	48.09	17	4.89
T0	6.5 X 10 ⁶	3.3 X 10 ⁶	50.46	17	4.13
T3	2.7 X 10 ⁶	1.9 X 10 ⁶	68.75	25	4.07
T6	1.8 X 10 ⁶	9.0 X 10 ⁵	51.01	29	4.02

BL: bacterias lácticas; BL-EPS: bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos;
%BL-EPS: porcentaje de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos

Tabla 9. Concentración de carbohidratos y productos de fermentación.

Muestra	Consumo de carbohidratos									
	Fructosa		Glucosa				Sacarosa			
	C mM	g / L	C mM	g / L	C mM	g / L	C mM	g / L	C mM	g / L
Pulque	217.85	6.54	122.58	3.68	349.23	4.98				
Aguamiel	3200.86	96.09	501.33	15.05	820.50	11.7				
T0	1128.58	33.88	185.20	5.56	669.72	9.55				
T3	427.38	12.83	169.22	5.08	421.47	6.01				
T6	74.61	2.24	22.98	0.69	360.45	5.14				
Consumo durante la fermentación	1053.97	31.64	162.22	4.87	309.27	4.41				
Total	1525.46 C mM (40.92 g / L)									
Productos de fermentación										
	Acético		Láctico		Etanol		CO ₂ *		EPS	
	C mM	g / L	C mM	g / L	C mM	G / L	C mM	g / L	C mM	g / L
Pulque	39.97	1.2	179.21	5.38	673.75	15.52	713.73	16.72		
Aguamiel	29.98	0.9	46.96	1.41	4.34	0.1	34.32	1.0		
T0	35.97	1.08	87.27	2.62	655.09	15.09	691.06	16.17		
T3	37.64	1.13	95.93	2.88	749.29	17.26	786.93	18.39		
T6	41.30	1.24	106.26	3.19	939.43	21.64	980.74	22.88	166.55	5.0
Producción durante la fermentación	5.33	0.16	18.99	0.57	284.34	6.55	289.68	6.71	166.55	5.0
Total	764.89 C mM (18.99 g / L)									

* CO₂ = Etanol + Acético

$$\% \text{ C recuperado} = (764.89 \text{ C mM} \times 100) / 1525.46 \text{ C mM} = 50.14$$

7.3 Selección de colonias productoras de EPS.

A partir de las 100 colonias aisladas y resembradas en placas de APT + sacarosa al 10%, se seleccionaron visualmente aquellas colonias de ambos tipos que presentaron una mayor producción en placas de APT + sacarosa 20% para su posterior caracterización. Se identificaron únicamente dos morfologías distintas: (A) una de consistencia compacta y con menor capacidad de producción con respecto a otra morfología identificada, denominada como EPS A y (B) una mucoide y con mayor capacidad de formar EPS, denominada EPS B (Figura 8).

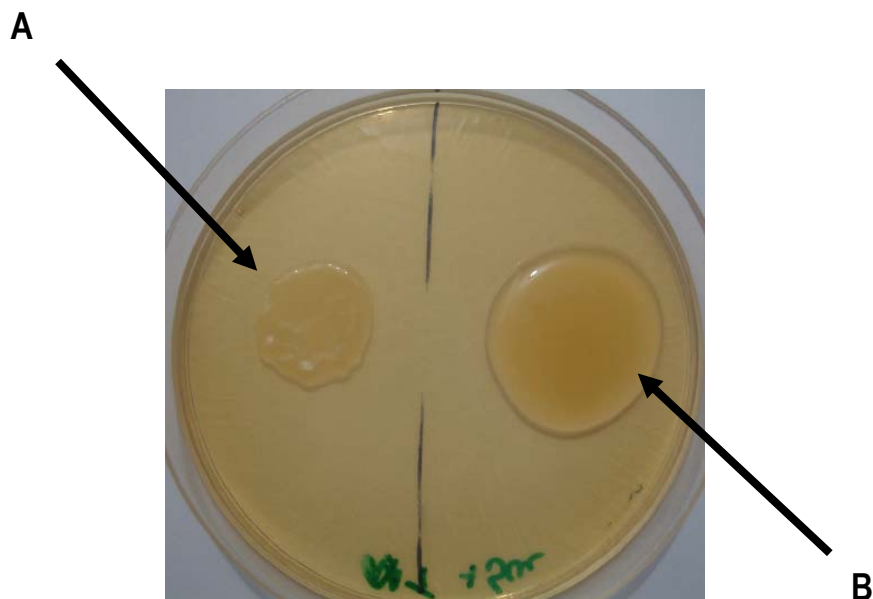


Figura 8. Morfologías de los EPS aislados del pulque. **A.** Cepa productora del polímero designada como EPSA. **B.** Cepa productora designada EPS B.

La colonia denominada como EPS A se aisló de la muestra de pulque fermentado utilizado como inóculo, mientras que la colonia denominada como EPS B se aisló de la muestra tres horas de fermentación. La tinción de Gram mostró que ambos aislados (EPS A y EPS B) son bacterias Gram-positivas. La colonia EPS A, se observó al microscopio como diplococos de menor tamaño, mientras que la colonia EPS B se observó como diplococos mayor tamaño. Es posible que estas diferencias en tamaño se deban al tipo de EPS producido. En el pulque se ha registrado la presencia de bacterias Gram-positivas que presentan morfología de diplococos delgados y gruesos (Lozano, 2007), lo cual indica que en el resultado obtenido se observó una reproducibilidad en cuanto a tipo morfológico.

7.4 Identificación de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos a partir de sacarosa.

7.4.1 Identificación bioquímica utilizando el sistema API 50CH.

La identificación bioquímica de la colonia productora de EPS A utilizando el sistema API 50CH permitió la identificación de la colonia aislada como *Lactobacillus delbrueckii* con un 64% de identificación. Este resultado no es congruente con la tinción de Gram y la MEB (como se muestra en la siguiente sección) observada para esta cepa, en ambos casos se observó la presencia de diplococos. Esta discrepancia se puede explicar debido a que la base de datos disponible utilizada para el análisis de los resultados obtenidos *API Lab Plus BioMérieux* es una versión no reciente (v 3.3.3, 1990), por lo que diversidad de bacterias lácticas consideradas como referencia es muy pobre, generando ambigüedad en el resultado.

Para la colonia EPS B, la técnica utilizada permitió la identificación de esta cepa como *Leuconostoc mesenteroides sub. mesenteroides* con 96.1% de identificación, con un porcentaje de degradación de carbohidratos de: L-arabinosa 80%, melibiosa 95%, ribosa 75%, rafinosa 75%, D-xilosa 75%, maltosa 95% y gluconato 4%. Es importante mencionar que para que un aislado sea identificado adecuadamente en esta base de datos se debe de tener un porcentaje de identificación de 90%. La identidad obtenida por el sistema API 50CH concuerda con la morfología observada para esta cepa (diplococos), sin embargo, no correlaciona con la identidad basada en el análisis de ADNr 16S, como se describe en la siguiente sección (7.4.2).

7.4.2 Identificación basada en el análisis de secuencia de ADNr 16S.

La comparación de las secuencias obtenidas (aproximadamente 1000 pb) mostró que las cepas EPS A y EPS B son dos microorganismos con secuencias de ADNr 16S diferentes (Figura 9). El

resultado del análisis de secuencia de ADNr 16S de las colonias productoras de EPS aisladas en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) permitió la identificación de la colonia EPS A como *Leuconostoc citreum*, siendo la secuencia de ADNr 16S de *L. citreum* cepa IH22 (No. accesión: AF111949; cepa aislada del *kimchi*, plato típico de la gastronomía coreana) con la que presentó un mayor porcentaje de identidad (98%). La cepa EPS B fue identificada también como *Leuconostoc citreum* cepa HJ-P4 (No. accesión: EU126916; aislada de vegetales) con un 95% de identidad. Las cepas *L. citreum* cepa IH22 y *L. citreum* cepa HJ-P4 juegan un papel principal en la fermentación del *kimchi* permitiendo que se desarrolle la acidez del producto final, este mismo papel juega *L. citreum* en el pulque que se lleva a cabo la fermentación ácida ayudando a desarrollar el sabor característico que se presenta (Lozano, 2007; Escalante, *et al.* en revisión). Por otra parte en diversos estudios se reporta la capacidad de *L. citreum* de producir un polisacárido extracelular formado de fructosa de tipo levana, que ayuda a desarrollar la viscosidad de bebidas (Hijum, *et al.* 2006). Para verificar la identidad obtenida, se realizó un análisis en la base de datos RDP II (rdp.cme.msu.edu), obteniéndose la misma identidad y los porcentajes de identidad mayores para la secuencia de ADNr 16S de las mismas cepas de *L. citreum*. La presencia de *L. citreum* se observó en el análisis filogenético realizado en secuencias obtenidas de la fermentación del pulque por Escalante, *et al.* (en revisión), de acuerdo con el resultado obtenido se asocia la presencia de *L. citreum* a esta bebida.

Debido a que surgieron diferencias al identificar las cepas por criterios genotípicos (ADNr 16S) y criterios fenotípicos (características microscópicas y API50CH), con la finalidad de obtener un criterio adicional en el análisis de identificación molecular de la cepa EPS B, se realizó un alineamiento de las secuencias de ADNr 16S de esta cepa con secuencias de cepas de *L. citreum* y de *L. mesenteroides* depositadas en la base de datos del NCBI (región de la posición 500 a 1400-1500

de las secuencias de ADNr 16S respectivas), en la aplicación ClustalW del programa BioEdit. El archivo generado fue utilizado para realizar un análisis filogenético en el programa Phylip (Felsenstein, 1989), en el cual se realizó un análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas. El archivo de salida se utilizó para obtener una matriz de distancia en el programa DNAdist y se construyó un árbol filogenético en el programa Neighbor. Finalmente se obtuvo un árbol consenso el cual fue visualizado en el programa Treeview (Page, 1996). La figura 10, muestra el árbol obtenido y se puede observar una distribución de las cepas de *L. mesenteroides* incluidas en el análisis en un grupo muy bien definido de las cepas de *L. citreum*, que se mantiene en las 1000 réplicas generadas en el programa Bootstrap. En el árbol filogenético se observaron claramente los grupos de las especies *L. mesenteroides* y *L. citreum*. Las secuencias de las cepas EPS A y EPS B se encontraron dentro del grupo de los *L. citreum*, corroborando con este resultado la identidad obtenida por la comparación de secuencias en dos bases de datos y se confirmó que el uso de la base de datos del sistema API 50CH, v 3.3.3, 1990, no resultó adecuado para la identificación de los microorganismos aislados en este trabajo.

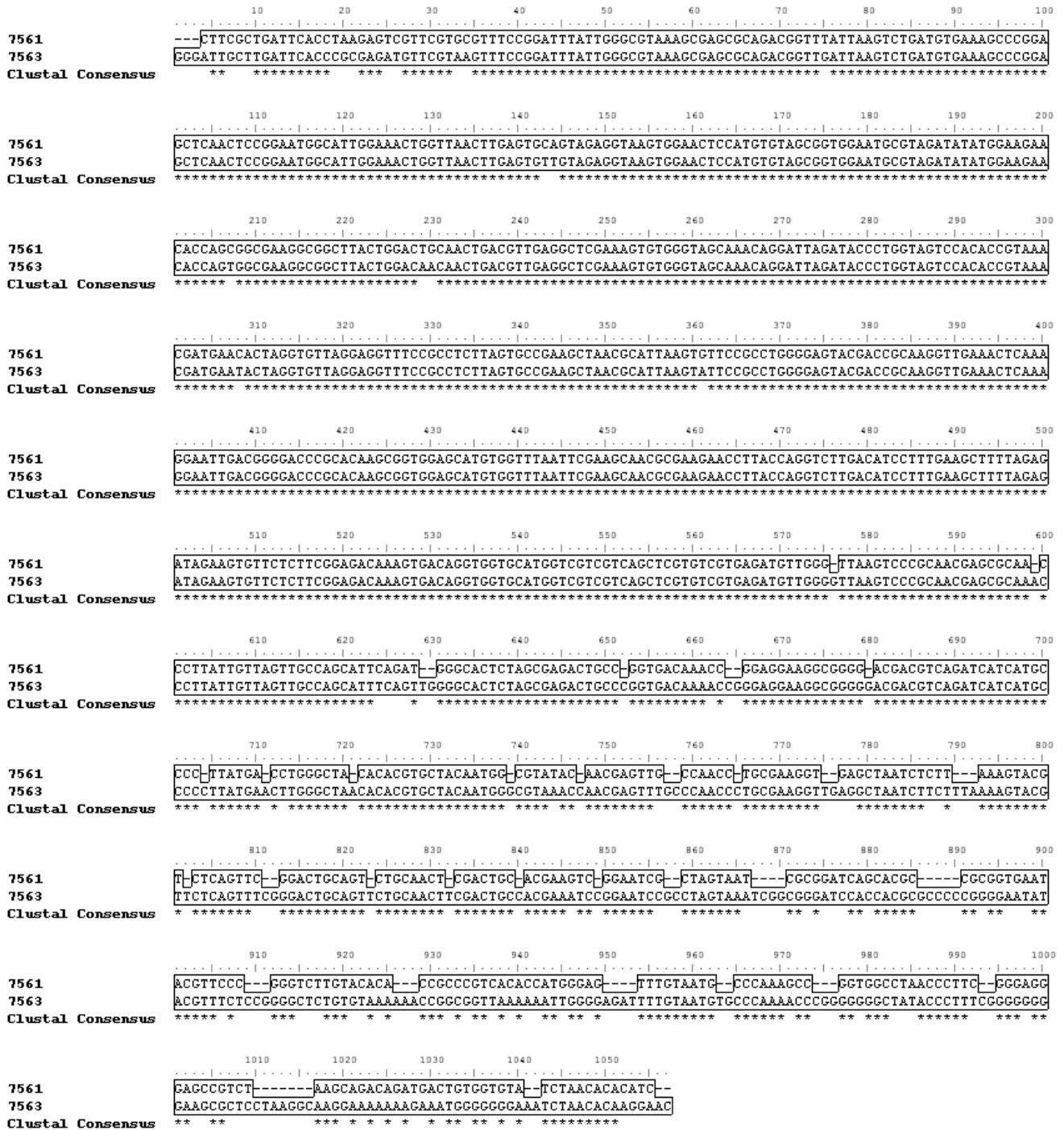


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de los ADNr 16S de las cepas de *Leuconostoc citreum*.

Secuencia 7561 corresponde a ADNr 16S de EPS A y secuencia 7563 corresponde a EPS B. Los asteriscos en la figura representan el consenso.

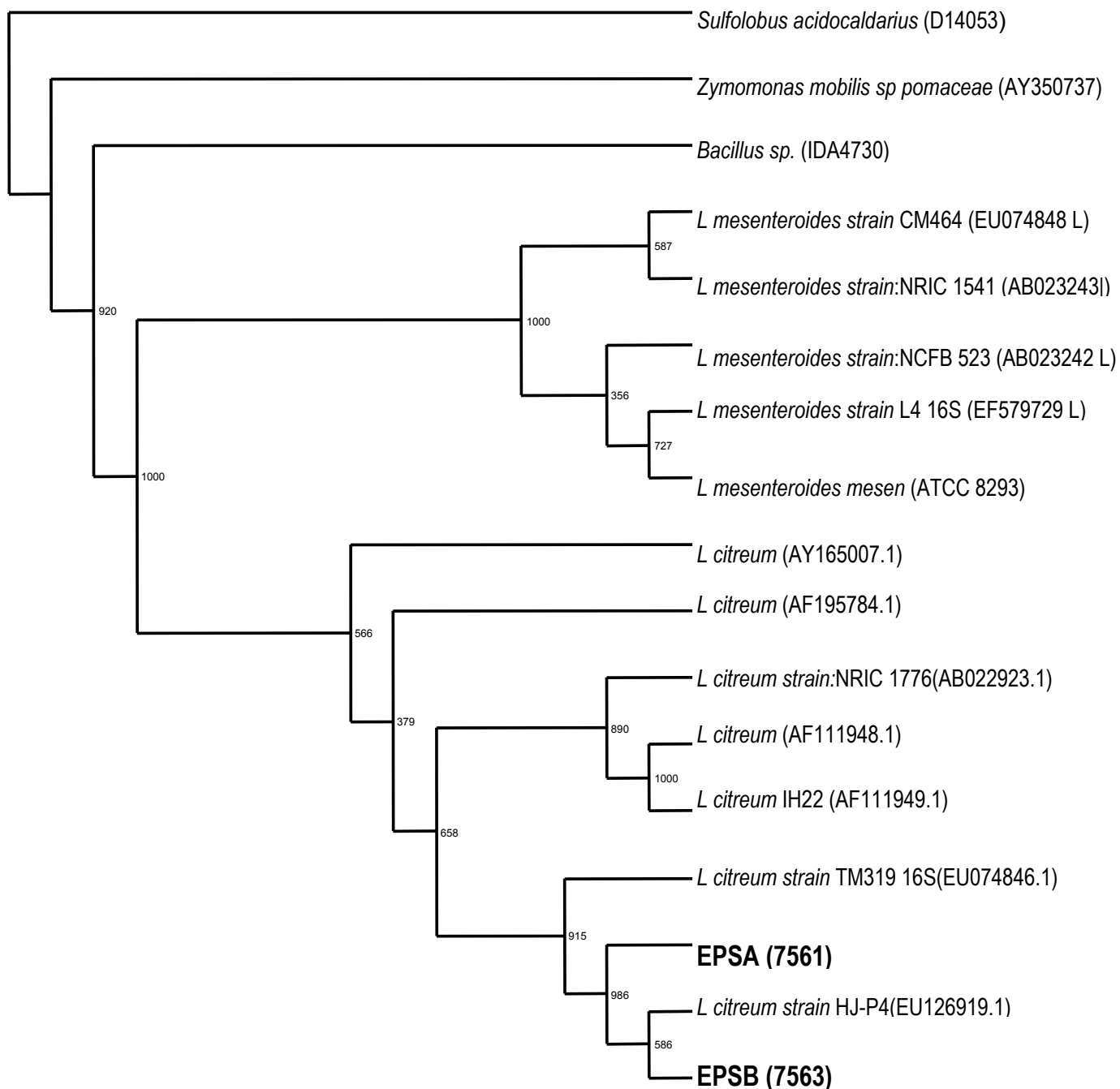


Figura 10. Árbol filogenético de cepas de *L. mesenteroides* y *L. citreum*, obtenido por Neighbor-Treeview (NJ) en el programa Phylip. Se incluyen en el análisis a la secuencia de *Bacillus* sp. y de *Zymomonas mobilis*. Se utiliza a la secuencia de *Sulfolobus acidocaldarius* como grupo externo. Los números de accesoión en la base de datos del NCBI de las secuencias utilizadas se indican en paréntesis. El valor de bootstrap sobre 1000 replicas, se muestra en las ramas del árbol.

7.5 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de cultivos de la cepas EPS A y EPS B.

La figura 11 muestra la morfología observada por MEB de un cultivo en APT + sacarosa 20% de la cepa EPS A. Se observó una morfología de diplococos los cuales se encuentran embebidos en una matriz posiblemente del EPS, que los mantiene unidos.

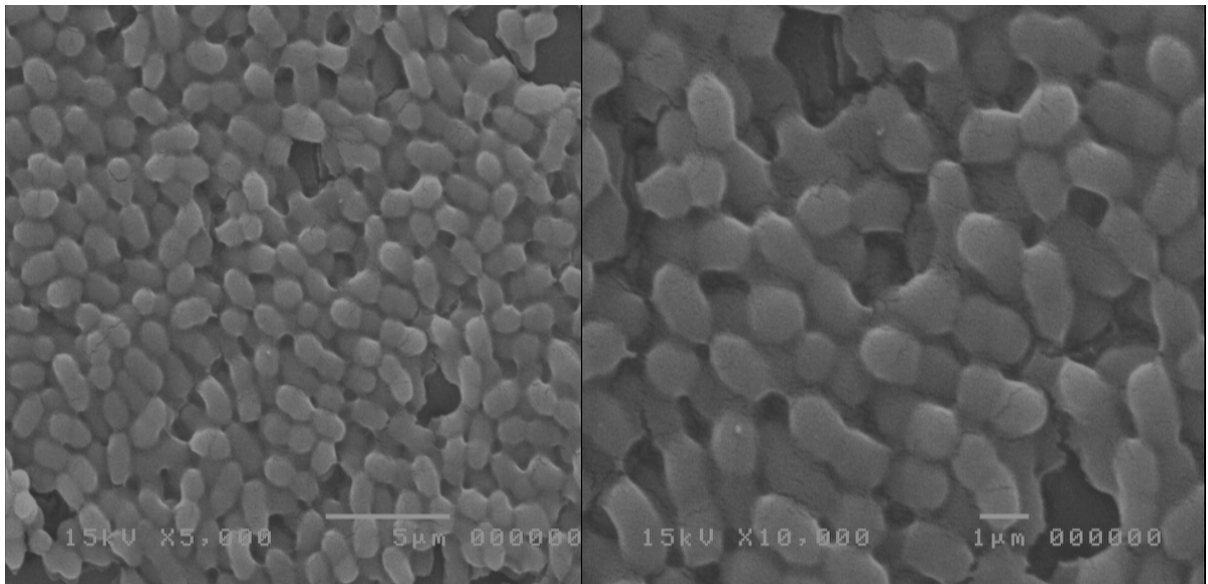


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de la cepa EPS A aislado de una muestra de pulque. Izquierda X 5000 referencia de 5 µm, derecha X 10000, referencia 1 µm.

La figura 12 muestra la morfología observada por MEB de un cultivo en APT + sacarosa 20% de la cepa EPS B. Al igual que para la cepas EPS se observaron diplococos gruesos los cuales presentan una organización distinta a la observada para la cepa EPS A. Se puede observar una superficie celular tipo “aterciopelada”. El EPS no pudo ser observado a pesar de este se libera al medio y pudiera tener alguna relación con las células. Quizás la textura aterciopelada observada sea el EPS. Esta cepa podría ser analizada a un mayor acercamiento.

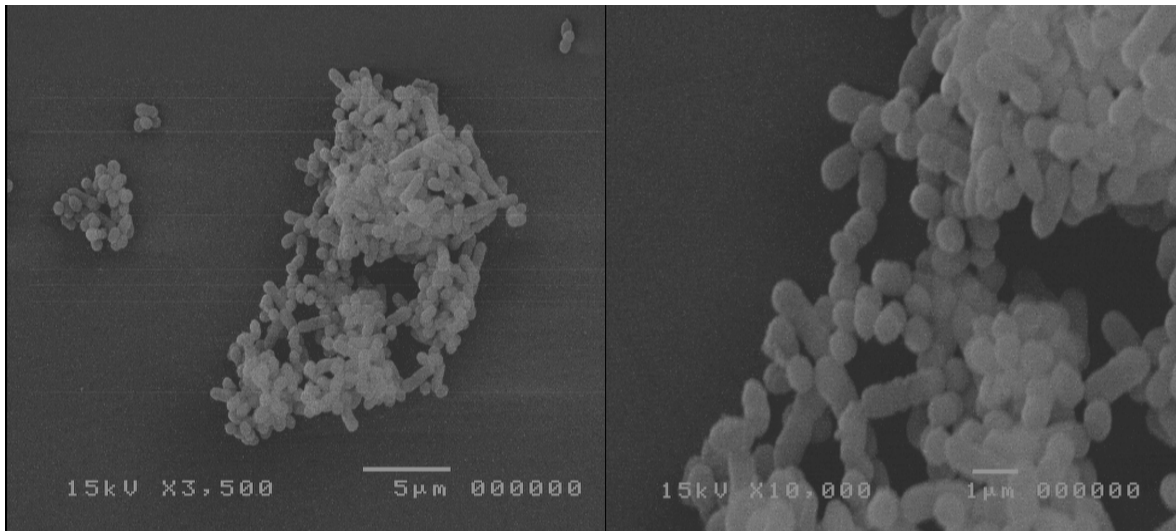


Figura 12. Microscopia electrónica de barrido de la cepa EPS B aislado de una muestra a las tres horas de fermentación. Izquierda X 3500 referencia de 5 µm, derecha X 10000, referencia 1 µm.

En estudios realizados con anterioridad al pulque se observa la presencia abundante de diplococos principalmente de la especie *Leuconostoc* (Lozano, 2004; Escalante, *et al.* en revisión).

7.6 Análisis reológico.

A los cultivos de las cepas A y B se les determinó el índice de flujo (n) y el índice de consistencia (K). En la tabla 10 se observan los datos obtenidos de este análisis. Los polímeros presentes durante la fermentación de pulque presentan un comportamiento de fluidos no newtonianos. Se observó que el inóculo tomado para este análisis tiene un comportamiento no newtoniano de tipo pseudoplástico debido a que el índice de flujo es menor a 1. A las tres horas de incubación se comportó como newtoniano ($n \approx 1$), la razón de este cambio es por que el polímero presentado en el inóculo se encuentra diluido. Finalmente a las seis horas de incubación se observó

que el EPS A y EPS B presentaron un comportamiento de fluido no newtoniano (pseudoplástico), similar al observado en el inóculo, corroborando la formación del EPS para ambos casos. Sin embargo ambos EPS presentan diferente índice de consistencia (k), el EPS A presenta un valor mayor ($9.20 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) lo que indica que este polímero es más viscoso que el EPS B. Los polisacáridos extracelulares principalmente las dextranas presentan un comportamiento de fluido no newtoniano pseudoplástico (Padmanadhan, *et al.* 2003).

Tabla 10. Propiedades reológicas de cultivos de la cepa EPS A y EPS B.

Cultivo	INÓCULO		3 HORAS		6 HORAS	
	K (Pa*s)	n	K (Pa*s)	n	K (Pa*s)	n
A	5.67×10^{-3}	0.782	1.30×10^{-3}	1.002	9.20×10^{-3}	0.749
B	4.81×10^{-3}	0.849	1.45×10^{-3}	0.996	5.60×10^{-3}	0.8181

Los valores presentados son valores promedios.

7.7 Determinación del Peso Molecular y componentes de los diferentes polímeros.

Para la separación de los EPS A y EPS B a partir de los cultivos realizados en caldo APT + sacarosa 20%, en un principio se utilizó el mismo método: centrifugación del cultivo y precipitación del EPS a partir del sobrenadante con PEG 5000 al 50% y su posterior separación por centrifugación. Sin embargo, para el caso del EPS A no se observó en un primer intento la sedimentación del polímero como se observó para el EPS B. Este resultado nos indicó que el EPS A es un polímero asociado a pared celular. Por esta razón, para la producción de este polímero se utilizaron a las células centrifugadas, tal y como se describió en la sección de Material y Métodos (6.5.b).

7.7.1 Determinación del peso molecular de los diferentes polímeros.

Una vez producido el EPS A y B, se determinó su peso molecular por HPLC. En la figura 13 se muestran los cromatogramas de cada uno de los polímeros. Para el EPS A se observa un pico con un tiempo de retención de 15 minutos aproximadamente, correspondiente a los polímeros. Alrededor de los 22 minutos se detectaron oligosacáridos y arriba de los 25 minutos de tiempo retención se observaron otros azúcares presentes en mezcla (sacarosa, glucosa y fructosa). El EPS A presentó un tiempo de retención (t_r) de 14.588 min, mientras que el t_r del EPS B es de 14.818 min.

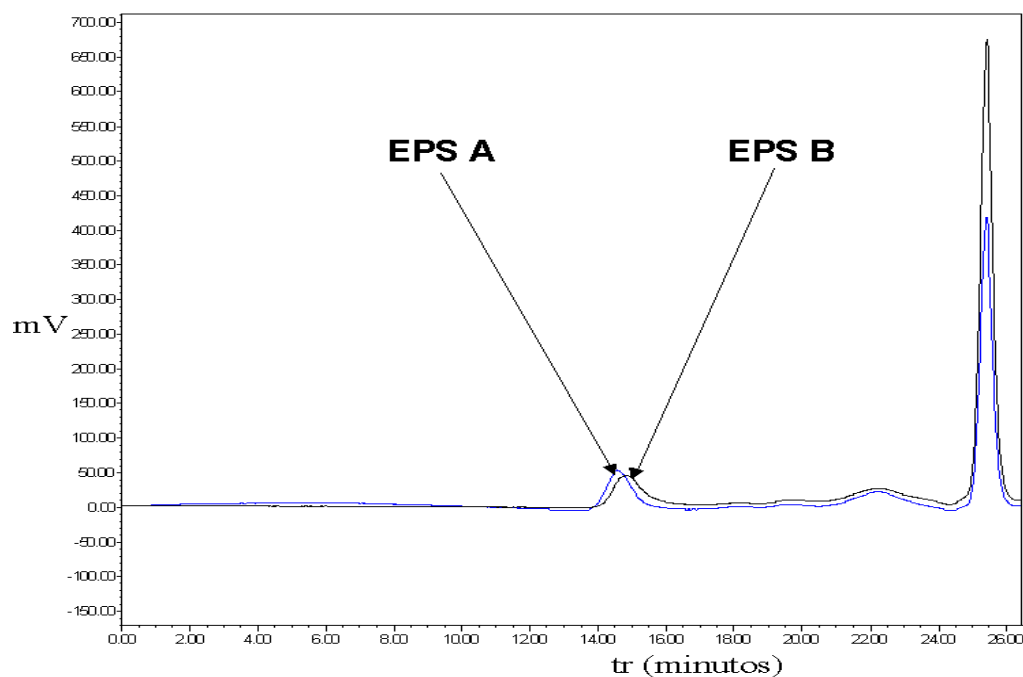


Figura 13. Cromatograma obtenido del EPS A y EPS B, en el que se muestra el t_r de ambos EPS. Disolvente H_2O , inyección $10 \mu L$, columna Ultrahydrogel, sensibilidad IR = 64, flujo de $0.8 mL / min$, fase móvil solución de nitritos $0.1M$, temperatura de $35^\circ C$, detector refractómetro diferencial.

El t_r de cada uno de los polímeros se utilizó para conocer su peso molecular. Este valor se ajustó a una curva patrón realizada con polímeros conocidos de levadura (Figura 14). Al interpolar el t_r

de los EPS A y EPS B en la curva estándar de la figura 14, se determinó que el EPS A presentó un peso de 695.2 kDa, mientras que el EPS B tiene un peso de 583.6 kDa. Las dextranas presentan un peso molecular muy variado que se encuentra entre 4 a 2000 kDa, esto depende de las características que presenta la enzima dextranasa, la cual sintetiza este tipo de polímeros (Dols, *et al.* 1998; Khalikova, *et al.* 2005; Hijum, *et al.* 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos se obtuvieron dos dextranas con peso molecular dentro del rango que define a este tipo de polímeros.

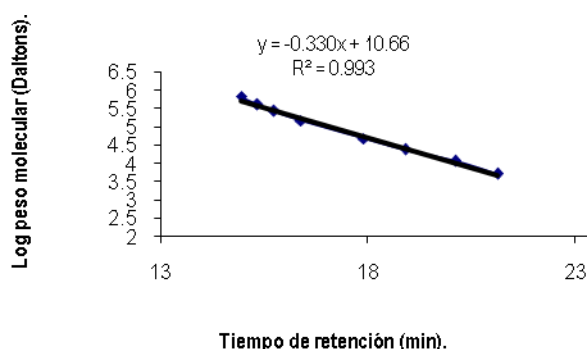


Figura 14. Curva estándar de t_r vs. log peso molecular (Mol wt Daltons) para polímeros conocidos.

7.7.2 Componentes de los EPS obtenidos.

Para determinar el tipo de azúcares que conforman al EPS A y el EPS B, se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción en la que se produjo el EPS *in vitro* tal como se menciona en Materiales y Métodos (sección 6.5.b). El análisis por HPLC de estas muestras permitió entonces identificar si la glucosa o la fructosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa, se acumuló en el medio de reacción y por lo tanto, permitió identificar que azúcar utiliza la enzima para sintetizar el polímero.

7.7.2.1 Composición del EPS A.

En la figura 15 se observa el estándar inyectado en la columna de HPLC, se presentaron cuatro picos: el disolvente, fructosa, glucosa y sacarosa. Una vez realizada la reacción se determinó la presencia del azúcar presente en el medio de reacción, se observó que el azúcar detectado es fructosa, lo que indica que se hidrolizó por completo la sacarosa presente en el medio y la glucosa proveniente de dicha hidrólisis permitió la formación del polímero constituido por glucosa, motivo por el cual dicho azúcar no fue posible detectarlo. Además se aprecia un pico entre la glucosa y la sacarosa, el cual corresponde a manitol, proveniente de la transformación de una parte de fructosa. Este resultado indicó que la cepa EPS A identificada como *L. citreum* produce un EPS de tipo glucana.

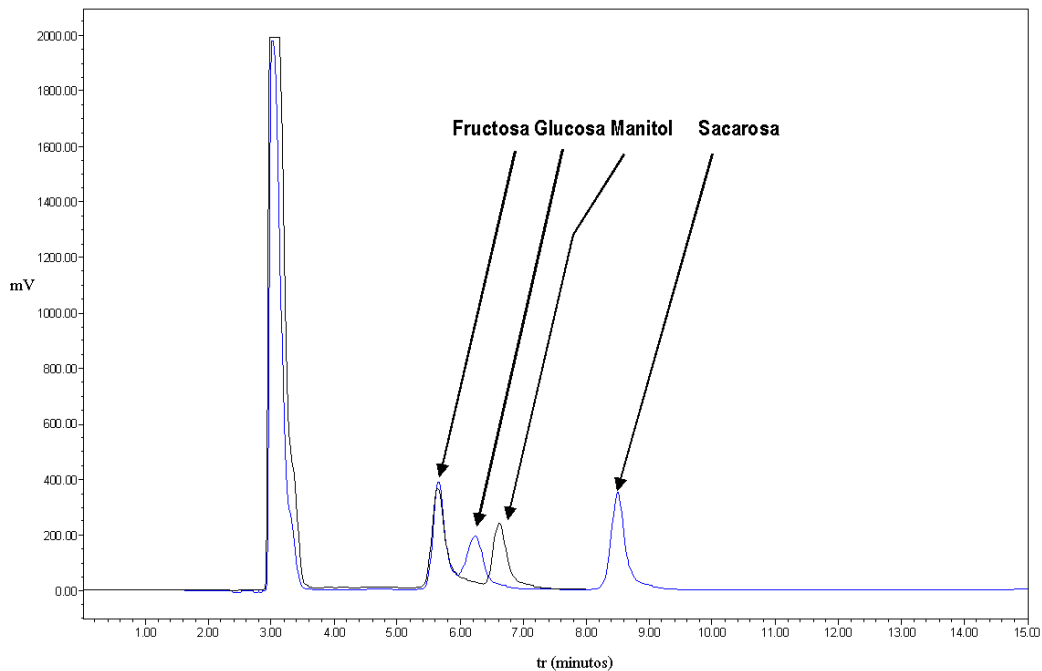


Figura 15. Cromatograma obtenido de una alícuota de la mezcla de reacción para la producción del EPS A. Se observa la presencia de fructosa, glucosa y sacarosa. Inyección 5 μ L, columna μ Bondapak NH₂, flujo de 1 mL / min. a 35°C, fase móvil acetonitrilo / H₂O (80:20 V/V).

7.7.2.2 Composición del EPS B.

El análisis del EPS B producido por la cepa EPS B e identificada como *L. citreum*, se muestra en la figura 16. Se presenta el estándar colocado en la columna de HPLC, constituido por disolvente, fructosa, glucosa y sacarosa. Una vez llevada a cabo la reacción se observó la presencia únicamente de fructosa proveniente de la hidrólisis de sacarosa. La sacarosa no es detectada debido a que probablemente toda ha sido hidrolizada. La presencia de fructosa en el medio de reacción indica que la glucosa obtenida de la hidrólisis ha sido utilizada para la formación del glucano. Para el caso del análisis del EPS B, la detección únicamente de residuos de fructosa en el medio de reacción, indicó que la cepa produce también una glucana.

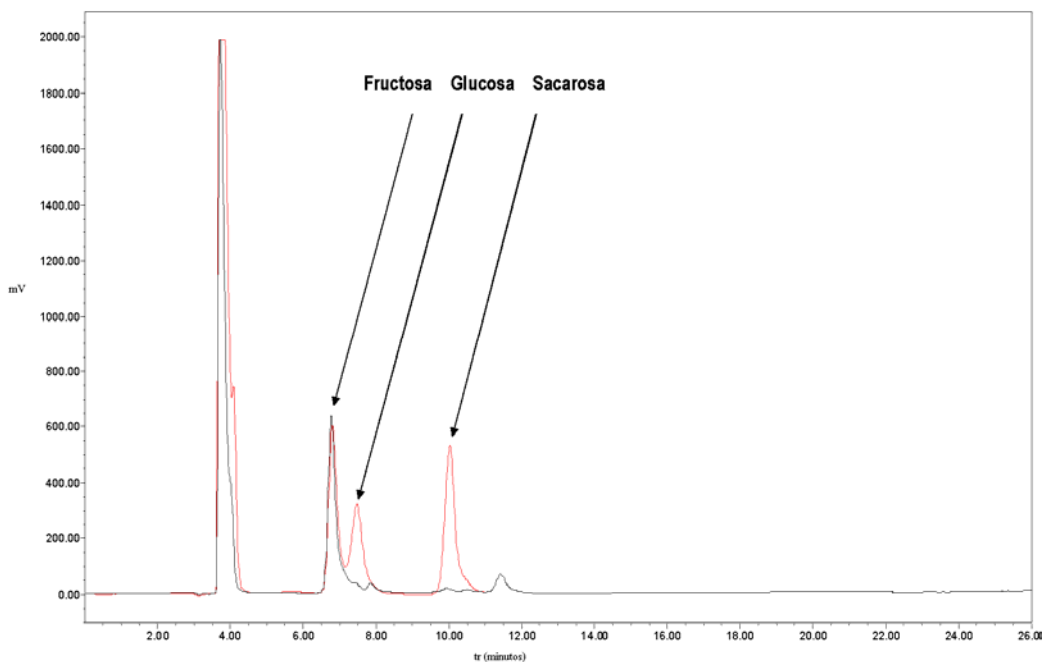


Figura 16. Cromatograma obtenido del EPS B. Inyección 5 μ L, columna μ Bondapak NH₂, flujo de 1mL / min. a 35°C, fase móvil acetonitrilo / H₂O (80:20 V/V).

En el análisis de los componentes del EPS A y del EPS B arrojó que ambos están compuestos por glucosa, indicando que ambos se tratan de una dextrana sintetizada por acción de

la enzima dextransacarasa. Hasta el momento los únicos microorganismos que se han reportado que presentan la enzima dextransacarasa son: *Streptococcus bovis*, *S. challis*, *S. faecalis*, *S. mutants*, *S. sanguis*, *S. varidans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. musicus*, *L. pastorianus*, *L. viridescens* (Khalikova, 2005). El resultado obtenido en este trabajo de que *L. citreum* es el responsable de la producción de las dos dextranas obtenidas es importante, debido a que no se encuentra dentro de los microorganismos productores reportados de este polisacárido extracelular, cabe señalar que estudios señalan a *L. citreum* como productor de inulina (Hijum, *et al.* 2006).

7.8 Análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de los diferentes polímeros.

El EPS A no fue posible analizarlo por RMN debido a que no se logró la solubilización de la preparación liofilizada, condición necesaria para poder realizar el estudio. Como se ha mencionado con anterioridad este EPS se encuentra asociado a pared celular. Es posible que la preparación obtenida no se encuentre pura y que la baja solubilidad observada para esta muestra se deba a la presencia de células.

En la figura 17, se muestra el espectro obtenido por RMN de carbono del EPS B. Un espectro de dextrana esta dividido en cuatro zonas diferentes: (a) la región anomérica de 85 a 105 ppm (principalmente 97-103 ppm es la porción infinitésima de reducción del polímero), (b) región de 70-75 ppm normalmente asociada a C-2, -3, -4 y -5 (CH), (c) región 60-70 ppm asociada a la unión o no unión del C6 (CH₂-), (d) región 75-85 representa la unión que puede presentar los C-2, -3, -4 y -5 con otro átomo (Seymour, *et al.* 1976). Para el EPS B se observó la presencia de cinco carbonos anoméricos situados en la región de bajo campo (90-105 ppm), lo que indicó la presencia de un polímero muy ramificado. Se observó presencia de CH (70-75ppm) y CH₂ (60-70 ppm) contenidos en

dicho EPS. En 81.5 ppm representa la unión interglucosídica del polímero. Este tipo de espectros son considerados como la firma del EPS. Los espectros de RMN obtenidos del EPS de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (Quirasco, *et al.* 1999) y de *L. mesenteroides* NRRL B-1299 (Dols, *et al.* 1998) solo presentan en la zona de bajo campo un solo pico, a 99.9 ppm y 98.3 ppm respectivamente, indicando que las dextranas analizadas presentan una configuración lineal formada por enlaces α -1,6. De acuerdo con el espectro observado del EPS B (Figura 17) y comparado con los espectros anteriores (Figura 18), se observó que en la zona de bajo campo lo que indicó que la dextrana obtenida presenta un mayor grado de ramificación por la presencia de cinco picos (103.7, 97.8, 97.7, 92.7, 92.2 ppm).

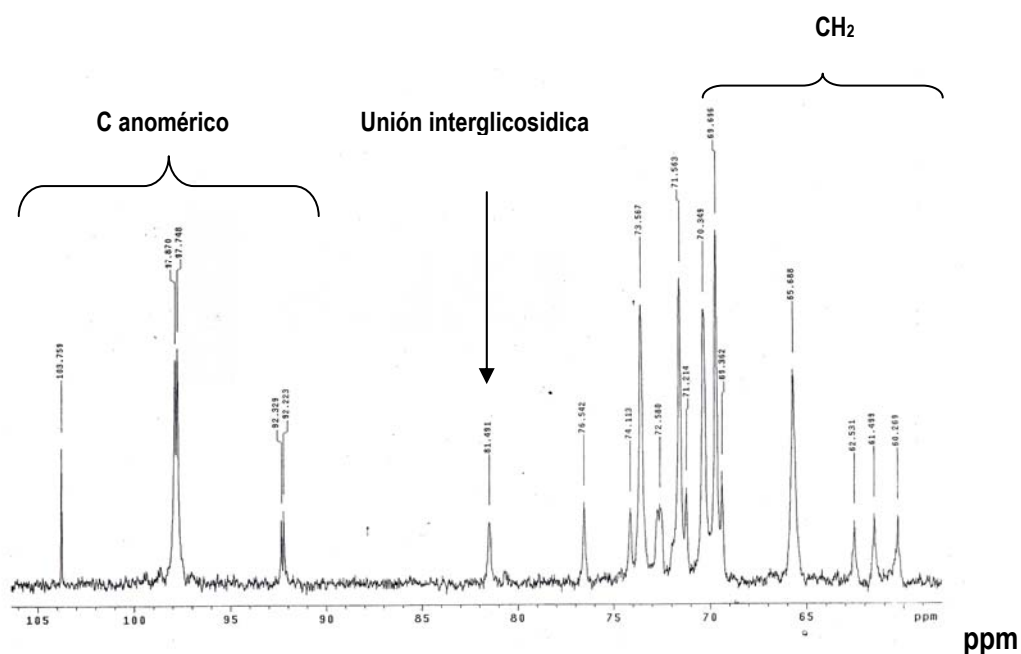


Figura 17. Espectro por RMN obtenido del EPS B a 400MHz. Muestra: 10 mg de EPS liofilizado, equipo Oxford.

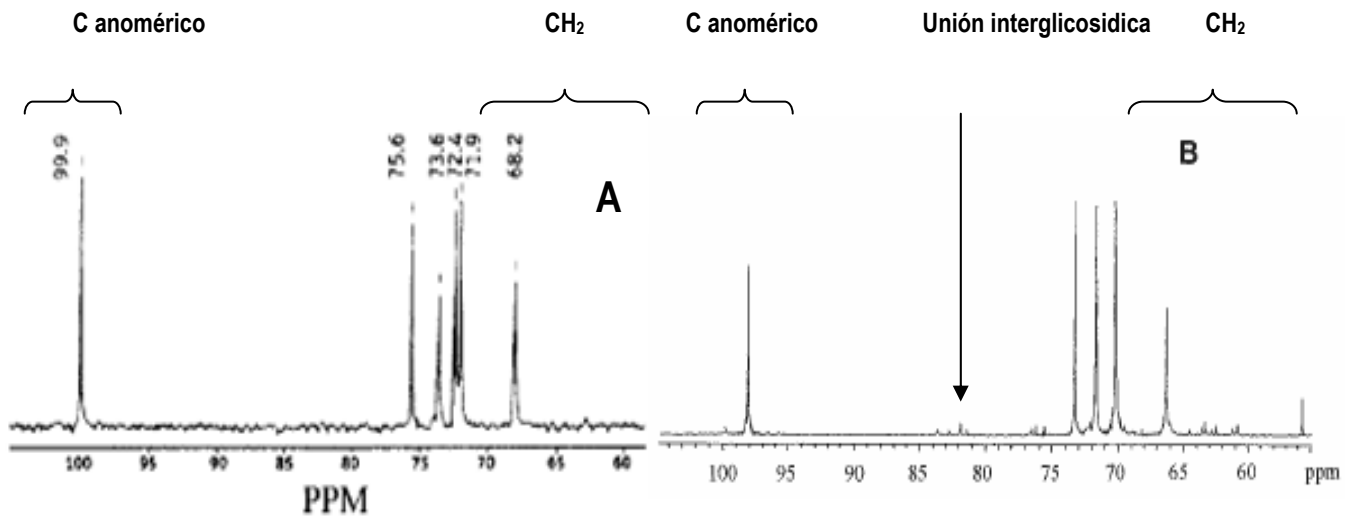


Figura 18. Espectro por RMN de diferentes dextrana. A dextrana obtenida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (Quirasco, et al. 1999); B dextrana producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (Dols, et al. 1998).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se aislaron e identificaron a dos cepas de *Leuconostoc citreum* a partir de una muestra de pulque de la localidad de Huitzilac, Morelos, productoras de una glucana, sin embargo el EPS A se consideró asociado a la pared. Esta relación del EPS A con la célula explica el tipo de morfología observada por microscopía electrónica de barrido (MEB), en donde se observó que las células se encuentran embebidas en una matriz de polímero, además de conferirle características de fluido pseudoplástico y mayor viscosidad. Por otro lado, la segunda cepa estudiada denominada como EPS B e identificada también como *L. citreum* es una bacteria productora de una glucana tipo dextrana muy ramificada no asociada a la célula y presenta un comportamiento de un fluido pseudoplástico.

Este resultado es muy importante ya que tradicionalmente en el pulque se había señalado que *L. mesenteroides* es el único microorganismo productor de la dextrana que confiere las características de

viscosidad típicas de esta bebida fermentada tradicional (Challapandian, *et al.* 1998). Aunque es importante señalar que en el estudio de análisis de diversidad durante la fermentación de una muestra de pulque proporcionada por el mismo proveedor, se identificó a *L. mesenteroides* como el microorganismo más abundante al final de una fermentación de seis horas (Escalante, *et al.* en revisión).

Leuconostoc mesenteroides y *Leuconostoc citreum* juegan un papel importante durante la fermentación de esta bebida, ayudando a obtener características sensoriales adecuadas al producto final como textura, debido a la viscosidad producida, también contribuyen al desarrollo del sabor característico participando en la fermentación ácida. Ambos microorganismos presentan actividad de dextranasa, sin embargo en la literatura se ha reportado únicamente que *Leuconostoc citreum* es capaz de producir levana (EPS formado por fructosa) a partir de sacarosa por actividad de la enzima fructosiltransferasa y dextrinas (Rossi, *et al.* 2005; Hijum, *et al.* 2006). Es importante señalar que este trabajo muestra por primera vez la presencia de un EPS formado de glucosa conocido como dextrana producida por *L. citreum* en el pulque.

8. Conclusiones

Se realizó la fermentación del pulque bajo condiciones de laboratorio utilizando una muestra de aguamiel y de pulque previamente fermentado de la localidad de Huitzilac, Morelos. De esta fermentación se aislaron 100 colonias de bacterias lácticas productoras de EPS y se identificaron dos tipos de EPS denominados como EPS A y EPB. La caracterización de las dos cepas seleccionadas y de los polímeros producidos permite concluir:

1. Ambos tipos de EPS son producidos por dos cepas de *Leuconostoc citreum*.
2. El EPS A es un polímero compuesto de por glucosa y tiene un peso molecular de 695.2 kDa. Este polímero esta asociado a pared celular y en cultivos de la cepa productora en sacarosa al 20% forma una matriz en la cual se encuentran embebidas las células.
3. El EPS B es una dextrana compuesta también por glucosa y con un peso molecular 583.6 kDa. Durante su producción, este polímero es liberado al medio de cultivo y es fácilmente separado por centrifugación y por precipitación con polietilenglicol (PEG) 5000.
4. Ambos EPS presentaron un comportamiento reológico distinto en cuanto a viscosidad, el EPS A presentó mayor fuerza de deformación.
5. El análisis por RMN del EPS B, indica una grado de ramificación mayor que otras dextranas producidas por *L mesenteriodes*.
6. El EPS A no pudo ser analizado por RMN debido a que no se logró solubilizar, es posible que no se haya encontrado puro.

9. Perspectivas de este trabajo.

Aislar el EPS A, así como la enzima que los sintetiza y producir este polímero en un sistema libre de células para facilitar su caracterización.

Determinar el tamaño de las enzimas productoras del EPS A y EPS B, así como su caracterización cinética e identificación de los genes que las codifican.

Determinar el tipo de enlaces que están presentes en la cadena principal y en las ramificaciones.

Realizar la búsqueda de otros polisacáridos extracelulares producidos por bacterias lácticas formados por residuos de fructosa a partir de muestra de aguamiel y pulque.

10. Bibliografía.

Borneman J., Skroch P., O'sullivan K., Palus J., Rumjanek N., Jansen J., Nienhuis J., Triplett E. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 1935-1943.

Carr F, Chill D, Maida N. 2002. The lactic acid bacteria. A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**: 281–370.

Cassani J. 1997. Estudio de la producción de polisacáridos de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de maestría, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. pp: 54.

Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M. and Lopez-Munguia, A. 1988. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **21**: 51–56.

Dols M., Chraïbi W., Remaud-simeon M., Lindley N., Monsan P. 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 2159-2165.

Dols M., Remaud-Simeon M., Willemot R., Vignon M., Monsan P. 1998. Characterization of the different dextransucrase activities excreted in glucose, fructose, or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 1298-1302.

Escalante. A. Rodríguez. M. E. Martínez. A. López-Munguía, A. Bolívar, F. Gosset, G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **235**: 273-279.

Escalante. A, Giles-Gómez. M, Hernández G, González. F, Córdova. M, López-Munguía. A, Gosset. G., Bolívar. F.. Analysis of bacterial community during the fermentation of *pulque*, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. En revisión. *International Journal of Food Microbiology*.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164-166.

Funane, K, Arai, T, Hashimoto, K, Ichishima E, Kobayashi, M. 1993. An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochemistry*. **32**: 13696–13702.

García-Garibay, M. y A. López Murguía. 2005. Bebidas alcohólicas no destiladas. En: *Biotechnología Alimentaria* (García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. and López-Munguía, A., Eds.), pp. 263–311. LIMUSA, México, DF.

Germaine G., Schachtele C. 1976. *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high molecular weight dextran and role in cellular aggregation. *Infection and Immunity*. **13**: 365-372.

Hijum S., Kralj S., Ozimek L., Dijkhuizen L., Geel-Schutten I. 2006. Structure-Function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and molecular Biology Reviews.* **70**: 157-176.

Khalikova E., Susi P., Korpela T. 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **69**: 306-325.

Kimmel S., Roberts R., Ziegler G. 1999. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology.* **64**: 659-664.

Knoshaug E., Ahlgren J., Trempy J. 2007. Exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Ropy352: Evidence for novel gene organization. *Applied and Environmental Microbiology.* **73**: 897-905.

Kuramitsu H. 1975. Characterization of extracellular glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity.* **12**: 738-749.

Lozano M. 2007. Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares. Tesis de licenciatura, Facultad de química, UNAM. pp: 9-58.

Martínez del Campo, P. 1999. Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. pp:10 - 20.

Martínez Chino, M. 2004. Producción de etanol por *Zymomonas mobilis*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. pp: 2-25

Meulenbeld G., Zuilhof H., Veldhuizen A., Heuvel R., Hartmans S. 1999. Enhanced (+) -Catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 4141-4147.

Monchois V., Reverte A., Remaud-simeon M., Monsan P., Willemot R. 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 1644-1649.

Monchois V., Reverte A., Remaud-simeon M., Monsan P., Willemot R. 1999. Glucansucrase: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiology Reviews*. **23**: 131-151.

Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R., Remaud-Siméon M., 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11**: 675-685.

Mozzi F., Vaningelgem F., Hébert E., Van der Meulen R., Foulquié M., Font de Valdez G., De Vuyst L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 4431-4435.

Pacheco E. 2003. Pulque y enterobacterias como factores predisponentes al daño hepático crónica. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. pp: 5-8.

Padmanabhan P., Kim D., Pak D., Sim S. 2003. Rheology and gelation of water-insoluble dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. Science direct. **53**: 459-468

Quirasco M, 1997. Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosiltransferasa, 1997. Tesis de Maestría, Facultad de Química. pp:2-40.

Quirasco M., López-Munguía A., Remaud-simeon M., Monsan P., Farrés A. 1999. Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Applied and Environmental Microbiology. **65**: 5504-5509.

Roskoski R. 2000. Integración del metabolismo (Cap. 25) En: Bioquímica. Ed. McGraw-Hill. México: 544-546.

Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zaroni S., Matteuzzi D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Applied and Environmental Microbiology. **71**: 6150-6158.

Seymour F., Knapp R., Bishop S. 1976. Determination of the structure of dextran by ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Carbohydrates Research. **51**: 179-194.

Sidebotham R. 1974. Dextrans. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **30**:371-444.

Skotnicki M., Lee J., Tribe D., Rogers P. 1981. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **41**: 889-893.

Smith M., Zahnley J., Goodman N. 1994. Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 2723-2731.

Sprenger G. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology letters*. **145**: 301-307.

Stiles M, Holzapel W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. **36**: 1-29.

Stingle F., Neeser J., Mollet B. 1996. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*. **178**:1680-1690.

Sutherland I. 1990. Introduction and definition.(Ch 1) En: *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University press: 1-11.

Swings J., De Ley J. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*. **60**: 1-46.

Tallgren A., Airaksinen U., Weissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J., Leisola M. 1999. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 862-864.

Tanriseven A. 1993. Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose conservation. *Carbohydrate Res.* **245**: 97-104.

Victoria O. 2003. Determinación de fructooligosacárido con potencial prebiótico en aguamiel. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. pp: 12-25.

Villalpando I. 2003. Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en aguamiel bajo proceso controlado. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. pp: 4-25.

APÉNDICE I. Medios de cultivo, soluciones, técnicas microbiológicas, técnica DNS.

AGUA PEPTONADA.

Composición (g / litro):

Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0

pH final 7.2±0.2.

Disolvente: H₂O

Medio utilizado como diluyente, además para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario. Recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a que ha sido sometido el alimento.

CALDO / AGAR APT:

Composición (g / litro):

Peptona de caseína	12.5
Extracto de levadura	7.5
D(+) glucosa	5.0
Citrato tri-sódico	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Hidrogenofosfato di potásico	5.0
Tween 80	0.2
Sulfato de magnesio	0.8
Cloruro de magnesio	0.14
Ion sulfato (II)	0.04
Dicloruro triaminio	0.001

pH final 6.7±0.1.

Disolvente: H₂O

Medio utilizado para la cuenta y cultivo de bacterias ácidas lácticas heterofermentativas incluyendo *Lactobacillus*, especies de *Leuconostoc*, *Streptococcus lactis* y otros microorganismos que requieren una concentración alta de tiamina en productos cárnicos, jugos de frutas, etc.

Amortiguador PBS (phosphate buffer saline):

PBS 10X (g / litro):

NaCl	80.0
KCl	2.0
NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O	11.5
KH ₂ PO ₄	2.0

pH ~ 7.3

Buffer de acetatos 0.1M pH 5.4. Sol. A 4.4 mL. Sol B 20.6 mL. Llevar a 100 mL con H₂O.

Solución A: Ácido glacial 11.55 mL/L.

Solución B: Acetato de potasio 19.6 g/L.

Prueba de catalasa:

Se basa en el principio químico de la actividad de la enzima catalasa, presente solo en algunas bacterias, dicha enzima descompone el H₂O₂ en agua y oxígeno gaseoso.

Tinción de Gram:

Tinción de Gram, método de identificación de bacterias mediante una tinción específica. En un primer momento las bacterias se tiñen con violeta de genciana (derivado metilado anilínico) y después se tratan con la solución de Gram (1 parte de yodo, 2 partes de yoduro potásico y 300 partes de agua); por último se lavan con alcohol etílico, unas bacterias retienen el fuerte color azul de la violeta de genciana, otras se decoloran por completo. Se denominan bacterias Gram-positivas a aquellas que retienen la tinción azul y bacterias Gram-negativas a las que quedan decoloradas. El mecanismo de coloración de Gram en general parece estar relacionado con el espesor de la pared celular, el tamaño de los poros y las propiedades de permeabilidad de la envoltura celular intacta. Las bacterias Gram-positivas presentan una sola capa, presentan una capa de peptidoglucano, que constituye del 20- 80%, con un grosor de 25-30 nm, contienen numerosos enlaces transversales entre cadenas de N-acetilmurámico y N-

acetilglucosamina, hay ausencia de capa de lipopolisacáridos. En el caso de las Gram-negativas presentan estructuras multilaminares complejas, presentan pocos peptidogucanos entre 5-10% con grosor de 10-15nm. y pocos enlaces transversales, los lípidos de la capa representa 20-35%. La técnica se realiza siguiendo la siguiente metodología:

1. Tomar un portaobjetos limpio, para colocar a las diferentes bacterias.
2. Esterilizar el asa bacteriológica con ayuda del mechero y con la otra mano tomar la caja petri que contiene a la bacteria, en el caso de caldo, colocar la muestra directamente sobre el portaobjetos, para el caso de las muestras sólidos, colocar previamente en el portaobjetos una gota de agua, colocando sobre ella la muestra. Realizar lo mismo para todas las bacterias.
3. Fijar las muestras, pasándolas por la flama tres veces. Colocar una gota de cristal violeta sobre cada una de las muestras, dejando que el colorante reaccione durante 1 minuto, enjuagar y colocar una gota de lugol sobre cada muestra dejándolo por 1 minuto.
4. Enjuagar las muestras con alcohol – acetona, hasta que la ultima gota salga transparente, dejar secar y colocar una gota de safranina dejándola por 1 minuto.
5. Dejar secar la preparación y observar con objetivo de 100x.

Técnica DNS:

Es un método químico colorimétrico de propiedades reductoras, en medio alcalino reduce rápidamente a iones oxidantes, debido a que la molécula se deshidrata y produce enolización dando como resultado un compuesto colorido.

Reactivo DNS.

Reactivo	Peso (g)
NaOH [0.35M]	1.4
Ácido 3,5-dinitrosalicílico. (DNS)	0.75
Tartrato de sodio y potasio	10
Fenol.	0.54
Metabisulfito de sodio	0.59

Las cantidades indicadas en la tabla son para preparar 100 mL del reactivo.

Primero se disuelve NaOH en 20 mL de agua, con agitación; aparte se disuelve el DNS en no más de 40 mL de agua; ya disuelto se agrega a la solución de NaOH, seguir agitando (la solución pasa de un color amarillo a naranja). Adicionar los siguientes reactivos en ese orden, esperar a que se disuelvan perfectamente para agregar el siguiente. Ya disueltos todos los reactivos, aforar a 100mL con agua destilada. Mantener en un frasco ámbar. Se basa en la cuantificación de azúcares reductores liberados y se compara con una curva patrón de glucosa. La técnica se realiza por medio de la siguiente metodología:

1. Realizar reacción:

50 μ L de muestra (glucosa: fructosa, 1:1; concentración final 2 g / L).

50 μ L de reactivo de DNS.

2. Colocar 5 minutos en ebullición, enfriar 5 minutos en hielo.
3. Agregar 1 mL de agua destilada y leer absorbancia a 540 nm.
4. Se realiza una curva estándar cada vez que se realizan determinaciones de muestras.

APÉNDICE II. Sistema API 50 CH.

API 50 CH.

Consiste en el estudio del metabolismo de hidratos de carbono que presentan los microorganismos. La prueba consiste en 50 microtubos, los cuales presentan dos zonas, la de anaerobiosis (tubo) en donde se realiza el estudio de fermentación y la de aerobiosis (cúpula) para estudios de oxidación y aislamiento.

El primer tubo sirve como control, los demás contienen una cantidad definida de substrato deshidratado, los cuales pertenecen a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Las rutas metabólicas que pueden presentar los substratos son los siguientes: Asimilación, crecimiento en la cúpula cuando el substrato se utiliza como única fuente de carbono; Oxidación, cambio de color en la cúpula por la presencia de ácido en aerobiosis; Fermentación, cambio en el tubo por la presencia de ácido en anaerobiosis.

Composición de los medios.

API 50 CHL Médium 10 mL	Polipéptidos	10 g
	Extracto de levaduras	5 g
	Tween 80	1 mL
	Fosfatos dipotásio	2 g
	Acetato de sodio 3H ₂ O	5 g
	Citrato diamónico	2 g
	Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.20 g
	Sulfato de maganeso 4H ₂ O	0.05 g
	Púrpura de Bromocresol	0.17 g
	Agua desmineralizada	1000 mL

API 50 CHL Médium.

Permite la identificación de microorganismos del género Lactobacillus y géneros próximos, ayudando a realizar el estudio de fermentación de 49 azúcares. Los microorganismos son colocados en

suspensión en el medio para ser inoculados en cada uno de los tubos. Se presenta un vire por efecto del indicador de pH, debido a que el catabolismo de los glucósidos produce ácidos orgánicos.

Composición de los medios.

Suspensión Medium 10 mL	Agua desmineralizada																				
API 50 CHL Médium 10 mL	<table> <tbody> <tr> <td>Polipéptidos</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>Extracto de levaduras</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>Tween 80</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>Fosfatos dipotásio</td> <td>2 g</td> </tr> <tr> <td>Acetato de sodio 3H₂O</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>Citrato diamónico</td> <td>2 g</td> </tr> <tr> <td>Sulfato de magnesio 7H₂O</td> <td>0.20 g</td> </tr> <tr> <td>Sulfato de maganeso 4H₂O</td> <td>0.05 g</td> </tr> <tr> <td>Púrpura de Bromocresol</td> <td>0.17 g</td> </tr> <tr> <td>Agua desmineralizada</td> <td>1000 mL</td> </tr> </tbody> </table>	Polipéptidos	10 g	Extracto de levaduras	5 g	Tween 80	1 mL	Fosfatos dipotásio	2 g	Acetato de sodio 3H ₂ O	5 g	Citrato diamónico	2 g	Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.20 g	Sulfato de maganeso 4H ₂ O	0.05 g	Púrpura de Bromocresol	0.17 g	Agua desmineralizada	1000 mL
Polipéptidos	10 g																				
Extracto de levaduras	5 g																				
Tween 80	1 mL																				
Fosfatos dipotásio	2 g																				
Acetato de sodio 3H ₂ O	5 g																				
Citrato diamónico	2 g																				
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.20 g																				
Sulfato de maganeso 4H ₂ O	0.05 g																				
Púrpura de Bromocresol	0.17 g																				
Agua desmineralizada	1000 mL																				