



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Química

“Caracterización de polisacáridos de tipo
glucana producidos por dos cepas de
Leuconostoc citreum aisladas del pulque”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

INGRID TORRES RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Vocal: Dra. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
Secretario: Dr. José Adelfo Escalante Lozada
1er. Suplente: Dr. Elpidio García Ramírez
2do. Suplente: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 4, Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo económico de los donativos PAPIIT IN213508 y PAPIIT IN224110-2.

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Asesor

M. C. María Elena Rodríguez Alegría
Supervisor técnico

Ingrid Torres Rodríguez
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de su comunidad y darme los elementos necesarios para formarme como persona y profesionalista.

Al Dr. José Adolfo Escalante por darme la oportunidad de concluir mi licenciatura.

A la M. C. Ma. Elena Rodríguez Alegría por ser el ángel de este trabajo, compartirme su sabiduría, alegrarme con su sonrisa y tenerme paciencia.

A la Dra. María Soledad Cordova y a la Mtra. Julia Cassani por su valiosa contribución a este trabajo.

Al Dr. Ernesto Sánchez por compartirme su inmenso conocimiento. Por enseñarme que el ser paciente y perseverante siempre tendrá recompensa y por alentar día a día mis sueños. Gracias por todo el cariño y apoyo.

A los sinodales por todos sus consejos, sugerencias y tiempo dedicado.

A PAPIIT por el apoyo económico otorgado a los proyectos PAPIIT IN213508 y PAPIIT IN224110-2.

A mi mamá por darme la vida, por todos estos años de entrega incondicionales, por ayudarme a alcanzar mis metas sin caer en el intento y por enseñarme que la vida puede ser tan bella como quiera. Ojalá algún día pueda ser como tú, te quiero.

A mi padre por dedicar su vida a darme la oportunidad de superarme anteponiendo mis necesidades a las suyas. Gracias por todo tu apoyo, cariño y protección, te quiero papá.

A mi hermano por enseñarme con el ejemplo a ser gran persona. Gracias por motivarme a triunfar y por contagiarme tu alegría y liderazgo. Te quiero mucho.

A Carlos, Edson, Naholi y Pedro por sembrar en mi el gusto por la ciencia, por compartirme su conocimiento sin reservas y por abrirme su corazón.

A Ofelia, a Marco A. Jiménez y a Juan Carlos por darle un giro positivo a esta experiencia, por entregarme su amistad, por apoyarme, aconsejarme, escucharme y transmitirme su conocimiento.

A todas aquellas personas que he encontrado a lo largo de este camino con quienes he compartido momentos inolvidables.

Ingrid Torres Rodríguez

ÍNDICE	
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. GENERALIDADES	6
3.1. Pulque	6
3.1.1. Microbiología del pulque	6
3.1.2. Fermentación del pulque	7
3.2. Glucosiltransferasas.....	10
3.2.1. Dextransacararas	12
3.2.2. Mecanismo de reacción	12
3.3. Biopolímeros microbianos.....	14
3.3.1. Dextranas.....	15
3.3.1.1. Estructura de diversas dextranas.....	15
3.3.2. Aplicaciones	17
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	20
6.1. Objetivo general	20
6.2. Objetivos particulares.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1. Diagrama de la metodología	21
7.2. Cepas	21
7.3. Producción de enzimas.....	22
7.3.1. Condiciones de cultivo	22
7.3.2. Actividad enzimática	22
7.3.3. Recuperación de las enzimas.....	23
7.4. Caracterización bioquímica de las enzimas.....	23
7.4.1. Efecto de la temperatura, pH y termoestabilidad de las enzimas	23
7.4.2. Determinación de parámetros cinéticos	24
7.4.3. Electroforesis de proteínas	24
7.5. Producción de polímeros “ <i>in vitro</i> ”	25
7.6. Caracterización de los polímeros producidos.....	26
7.6.1. Análisis por resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C	26
7.6.2. Análisis reológico	26
7.6.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	26
7.7. Análisis de datos	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1. Morfología de las cepas EPS A y EPS B.....	28
8.2. Producción de las enzimas	28
8.2.1. Condiciones de cultivo	28
8.2.2. Caracterización bioquímica de las enzimas	31
8.2.2.1. Perfil de pH	31

8.2.2.2.	Perfil de temperatura	32
8.2.2.3.	Estabilidad a la temperatura	34
8.2.2.4.	Determinación de parámetros cinéticos	35
8.2.2.5.	Electroforesis de proteínas	37
8.3.	Caracterización del polímero	38
8.3.1.	Análisis de la estructura química por RMN ^{13}C y ^1H	38
8.3.2.	Análisis reológico	46
8.3.3.	Análisis por MEB de los cultivos de las cepas EPS A y EPS B.	48
9.	CONCLUSIONES	50
10.	PERSPECTIVAS	52
11.	BIBLIOGRAFÍA	53
	APÉNDICES	58
	APÉNDICE I. Espectros de RMN ^{13}C de los polímeros producidos por las cepas EPS A y EPS B.	58
	APÉNDICE II. Medios de cultivo, soluciones, técnica DNS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas con metabolismo homofermentativo y heterofermentativo.	9
Tabla 2. Algunas especies de bacterias que se han reportado que son capaces de sintetizar biopolímeros.	10
Tabla 3. Condiciones de reacción para la producción de polímero “ <i>in vitro</i> ”. ...	25
Tabla 4. Resumen de los valores de pH de máxima actividad obtenidos para las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B.	32
Tabla 5. Resumen de los valores de temperaturas de máxima actividad obtenidos para las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B.....	33
Tabla 6. Resultados de la actividad residual de cada extracto al ser incubados a 30 y 40 °C.....	35
Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C para diversos polímeros.....	41
Tabla 8. Propiedades reológicas para polímeros con comportamiento no newtoniano	46
Tabla 9. Coeficientes de viscosidad a 25°C.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de glucosiltransferasas de acuerdo a la estructura del producto que sintetizan.----- 11

Figura 2. Reacciones catalizadas por enzimas glucosiltransferasas.----- 11

Figura 3. Reacción de síntesis de dextrana catalizada por la dextransacarasa.----- 12

Figura 4. Mecanismo de biosíntesis de dextrana.----- 13

Figura 5. Estructura de algunas dextranas.----- 16

Figura 6. Diagrama de la metodología desarrollada en este trabajo.----- 21

Figura 7. Crecimiento de las cepas EPS A y EPS B en placas de medio APT en presencia y ausencia de sacarosa.----- 28

Figura 8. Cinética de crecimiento, pH y actividad enzimática asociada a células y extracelular de la cepa EPS A.----- 29

Figura 9. Cinética de crecimiento, pH y actividad enzimática asociada a células y extracelular de la cepa EPS B.----- 30

Figura 10. Efecto del pH en la actividad enzimática de las enzimas producidas por la cepa EPS A y EPS B.----- 32

Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de las enzimas producidas por la cepa EPS A y EPS B.----- 33

Figura 12. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de las enzimas producidas por la cepa EPS A.----- 36

Figura 13. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de las enzimas producidas por la cepa EPS B.----- 37

Figura 14. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.----- 38

Figura 15. Estructura en forma de silla del anómero α del residuo D-glucosa. 39

Figura 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero sintetizado por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B. -----	39
Figura 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero asociado a las células de la cepa EPS B.-----	40
Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , 60°C) del polímero liberado al sobrenadante por la cepa EPS A. -----	43
Figura 19. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , 60°C) del polímero asociado a las células de la cepa EPS A. -----	44
Figura 20. Comportamiento reológico de los polímeros en solución (20 mg/mL) sintetizados por las cepas EPS A y B. -----	47
Figura 21. Microscopía electrónica de barrido de la cepa EPS A después de 10 h de cultivo con y sin sacarosa (20% v/v). Imágenes x 7500 referencia $1\mu\text{m}$. -	48
Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de la cepa EPS B después de 10 h de cultivo con y sin sacarosa (20% v/v). Imágenes x 7500 referencia $1\mu\text{m}$. -	49

1. RESUMEN

Durante el presente trabajo, se estudiaron los exopolisacáridos (EPS) producidos por dos cepas de *Leuconostoc citreum* (EPS A y EPS B) aisladas del pulque. Ésta es una bebida alcohólica fermentada obtenida a partir del aguamiel extraído del maguey. La caracterización se realizó con el fin de contribuir al estudio de la diversidad metabólica de esta bebida y por ampliar el conocimiento sobre EPS del pulque con potencial para aplicaciones industriales.

Se realizó la caracterización bioquímica tanto de las enzimas asociadas a células como las enzimas liberadas al sobrenadante por las cepas EPS A y EPS B de *L. citreum*. El objetivo de esta caracterización fue establecer las condiciones óptimas de pH y temperatura así como el tiempo adecuado de fermentación para la extracción de las enzimas para lograr la mayor capacidad catalítica posible. En el caso de la cepa EPS A, la extracción de células y enzimas del medio de cultivo para la producción de polímeros se realizó a las 4 y 6 h de fermentación, respectivamente. En el caso de la cepa EPS B, la cosecha se realizó a las 6 h para ambas enzimas. Las condiciones óptimas para lograr la mayor capacidad de producción de EPS fueron 30°C, pH 5.4 y condiciones de saturación de sustrato.

Los polímeros fueron producidos “*in vitro*” y posteriormente se analizó su estructura química mediante las técnicas espectroscópicas ^1H RMN y ^{13}C RMN. Las enzimas liberadas al sobrenadante por las cepas EPS A y EPS B produjeron EPS de tipo dextrana constituidos por glucosas enlazadas por uniones glucosídicas $\alpha(1-6)$ en una cadena principal. La diferencia entre ambos, radicó en que el EPS de la cepa EPS A presentó ramificaciones $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-2)$ y el EPS producido por la cepa EPS B fue de tipo lineal. El estudio de los polímeros producidos por las enzimas asociadas a células mostró la producción de inulina además de la producción de la dextrana respectiva para cada cepa.

El análisis reológico de los EPS no mostró una relación cierta con su estructura; sin embargo, se observó que el polímero sintetizado por la enzima

liberada al sobrenadante por la cepa EPS B mostró un índice de consistencia por encima de los demás EPS.

El análisis morfológico realizado a los cultivos mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) no mostró diferencias notables al variar la concentración de sacarosa, ni tampoco reveló diferencias entre los cultivos de la cepa EPS A y EPS B.

2. INTRODUCCIÓN

Una búsqueda en la historia de la alimentación tradicional mexicana, ha revelado al maguey “pulquero” (*Agave atrovirens*, *A. salmiana* o *A. americana*), como la planta más característica del altiplano de México y a su producto principal, el pulque. Ambos forman parte de la tradición cultural nacional. Entre los productos obtenidos a partir del maguey (además del aguamiel como líquido originario del pulque) se encuentran sus fibras tiernas como alimento, tejidos y material de construcción a partir de las pencas y agujas de sus espinas. Las tierras aptas para el cultivo del maguey pulquero son de tipo semiárido.

La explotación magueyera impone una continua rotación de los plantíos para asegurar una producción de aguamiel determinada a lo largo de los años, esto implica la necesidad de grandes extensiones de tierras que en el periodo colonial se extendieron desde el noreste del Estado de México hasta el sureste de Hidalgo y el noroeste de Tlaxcala, formándose una especie de triángulo geográfico que conferían a las haciendas pulqueras más importantes. Como se mencionó anteriormente, un subproducto del maguey es el pulque. El pulque es una bebida obtenida de la fermentación del aguamiel extraída del agave o maguey pulquero, de composición variable tanto en su contenido de azúcar como de alcohol. El contenido de estos elementos está determinado por la composición del suelo, época del año, variedad del maguey explotado, características del aguamiel, características del inóculo y por último, el proceso de elaboración.

Actualmente, el pulque es un símbolo fundamental de la cultura mexicana y por ello se ha convertido en el objeto de estudio de diversos grupos de investigación que pretenden describirlo detalladamente desde el punto de vista científico, además de pretender encontrar innovaciones que contribuyan a las necesidades sociales (Ramírez, 2007).

Los microorganismos naturalmente asociados y aquellos presentes durante la fermentación del pulque han sido ampliamente estudiados desde el año de 1967. Determinándose que diversas especies de bacterias y levaduras, incluidas las bacterias ácido lácticas (BAL) homo- y heterofermentativas,

Zymomonas mobilis, *Leuconostoc mesenteroides* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son comúnmente los reportados como responsables de la fermentación del pulque (Sánchez-Marroquín, 1967).

Escalante *et al.* en el año 2004 contribuyeron a la caracterización del pulque mediante el análisis de la secuencia del DNAr 16S de las bacterias presentes en tres diferentes muestras, utilizando métodos independientes al cultivo microbiano. Por medio de este estudio se identificaron microorganismos que no habían sido previamente reportados, entre ellos: *Lactobacillus acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei*.

Debido a que los microorganismos del pulque son una población dinámica con cambios durante la fermentación, Escalante *et al.* (2008) utilizaron un enfoque polifásico para poder llevar a cabo una caracterización más completa de la diversidad microbiológica de la bebida. Los resultados revelaron que las especies *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchi*, *L. citreum* y *Lactococcus lactis* fueron las BAL más abundantes en el aguamiel. Al final del proceso de fermentación, la diversidad bacteriana predominante fue *Lactobacillus acidophilus*, *L. mesentroides*, *L. lactis subsp. lactis* y levaduras observadas por microscopía electrónica de barrido.

El pulque se caracteriza por ser una bebida viscosa. Diversos autores han atribuido esta característica a la capacidad que tienen las BAL para producir polímeros. Chellapandian *et al.* en 1998 aislaron a partir de pulque dos cepas capaces de generar polímeros con capacidad espesante en presencia de sacarosa. Las cepas fueron aisladas e identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ y *Lactobacillus platarum*. Más tarde se determinó que *L. mesenteroides* IBT-PQ posee una enzima (dextransacarasa) asociada a células que sintetiza un polímero soluble lineal de glucosa en una cadena principal de enlaces tipo $\alpha(1-6)$ y ramificaciones de tipo $\alpha(1-3)$ en una proporción 4:1 según los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN). Por otro lado, *L. plantarum* fue identificado como productor de levana. Hasta este momento la viscosidad del pulque fue únicamente atribuido a la actividad de la

dextranosa de *L. mesenteroides* (Escalante *et al.*, 2008). En lo que concierne al pulque, no se han realizado estudios para caracterizar a profundidad las fructanas presentes en los aguamieles. Se había pensado que la presencia de polímeros de fructosa como inulina y levana se debían a que son formas de reserva de carbono y energía para la planta que eran transferidos al aguamiel durante el raspado de la piña; sin embargo, existen evidencias aportadas por el grupo del Dr. Agustín López Munguía de que diversas cepas de *L. mesenteroides* también produce fructanas (Olvera *et al.*, 2008).

En el año 2008 Escalante *et al.* además de llevar a cabo el análisis de la diversidad metabólica, determinó diversos parámetros fisicoquímicos durante la fermentación con el fin de obtener una descripción más detallada de la bebida y su fermentación. Entre ellos, realizó algunos estudios para caracterizar los polímeros presentes en el pulque. Los resultados sugirieron la presencia de polímeros compuestos de fructosa (Escalante *et al.*, 2008). Posteriormente logra aislar dos cepas productoras de polímeros identificadas como *L. citreum* identificadas como cepa EPS A y EPS B que son el objeto de estudio del presente trabajo (Conca, 2008).

Se ha reportado que *L. citreum* tiene la capacidad de sintetizar inulina (Olivares-Illana *et al.*, 2002). Por otro lado, Maina *et al.* (2008) y Bounaix *et al.* (2009), reportaron que diversas cepas de *L. citreum* sintetizan dextransas lineales y ramificadas. Todos estos reportes permiten esperar que las cepas EPS A y EPS B pueden aportar información adicional a la caracterización microbiana y metabólica del pulque, además de encontrar nuevos exopolisacáridos (EPS) producidos por BAL que tengan potencial para aplicaciones industriales (Bounaix *et al.*, 2010).

3. GENERALIDADES

3.1. Pulque

El pulque es una bebida alcohólica no destilada tradicional mexicana extraída de varias especies de maguey (*Agave americana*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana* y principalmente *A. atrovirens*), Se obtiene de la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel, por acción de un consorcio de microorganismos naturalmente asociados a la planta y de otros que son adicionados con la finalidad de acelerar el proceso de fermentación (Escalante *et al.*, 2004). Esta bebida es actualmente producida en cantidades limitadas y consumida en diversas regiones del país, particularmente en los estados del centro de México. El pulque se caracteriza por ser una bebida viscosa, de color blanco y con olor herbáceo (Conca, 2008).

Los microorganismos presentes en el aguamiel transforman parte de los azúcares disponibles desarrollando la fermentación; sin embargo, el proceso es acelerado por la adición de una porción de pulque previamente producido. A medida que la fermentación transcurre se presentan cambios importantes como el incremento de etanol y formación de exopolisacáridos que le dan una consistencia viscosa. Estos dos cambios son usados como parámetros principales para determinar el momento en que debe suspenderse la fermentación de la bebida (Escalante *et al.*, 2008).

Los antiguos mexicanos además de consumir el pulque como una bebida refrescante, también lo consumían para combatir algunas enfermedades gastrointestinales e infecciones renales porque se tenía la creencia de que era una bebida con propiedades medicinales, aunque no existen reportes del posible efecto benéfico de microorganismos presentes en el pulque sobre la salud humana.

3.1.1. Microbiología del pulque

La producción de pulque se realiza bajo condiciones no asépticas, permitiendo el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos, incluyendo los naturalmente asociados al aguamiel y los que se incorporan durante todo el proceso de elaboración, lo que crea un complejo sistema constituido por

levaduras productoras de etanol e inulinasas, bacterias productoras de etanol, ácido láctico, ácido acético, CO₂, etc. y bacterias lácticas productoras o no de exopolisacáridos (EPS) entre otras (Chellapandian *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2004).

En los diferentes estudios que se han realizado sobre esta bebida, se reporta comúnmente la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Zymomonas mobilis*; se propone que son los microorganismos esenciales para la fermentación; sin embargo, también se han identificado los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. plantarum*, *L. hilgardii*), *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Diplobacter*, *Pichia*, *Pediococcus*, *Candida* (antes *Torulopsis*), *Rhodotorula*, *Mycoderma* y algunos microorganismos específicos como *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Oenococcus oeni*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei*, dependiendo de la región geográfica, tipo de agave utilizado, características iniciales del aguamiel, forma de procesamiento y técnicas empleadas para su aislamiento e identificación (Escalante *et al.*, 2004; Cervantes y Pedroza, 2007).

3.1.2. Fermentación del pulque

La diversidad de microorganismos presentes durante la elaboración del pulque, son capaces de transformar los componentes del aguamiel en otros compuestos que otorgan características fisicoquímicas y sensoriales distintivos a la bebida. Hasta el momento los estudios sobre el pulque permiten identificar que se desarrollan tres tipos de fermentación: alcohólica, ácida y viscosa. La interacción de las tres determina que se presente un incremento en los recuentos poblacionales, consumo de azúcares y proteínas, formación de etanol y algunos EPS que le dan aspecto viscoso (García-Garibay y López Munguía, 1993; Escalante *et al.*, 2008).

Fermentación alcohólica: Es el proceso mediante el cual los microorganismos transforman los azúcares a etanol y CO₂. *Zymomonas mobilis* es considerado el responsable de iniciar la fermentación alcohólica en la elaboración del pulque, utiliza condiciones anaerobias preferentemente la vía

de Enter- Doudoroff (Sprenger, 1996). En presencia de glucosa y fructosa, los productos mayoritarios de la fermentación son etanol y CO₂, pero cuando el sustrato es sacarosa, además produce sorbitol y levana (Conca, 2008). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* también es responsable de la fermentación alcohólica del pulque, es capaz de sintetizar etanol y dióxido de carbono a partir de los azúcares presentes en el agua miel mediante la vía central de degradación de Embden-Meyerhof y mediante una descarboxilación transforman el piruvato a acetaldehído, que a su vez es reducido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (Behera *et al.*, 2010).

Fermentación ácida: La fermentación ácida es llevada a cabo principalmente por BAL, que son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones, con un metabolismo estrictamente fermentativo y que producen ácido láctico como producto final mayoritario a través de la vía Embden-Meyer y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico. En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos BAL, las cuales pueden dividirse en dos grupos: 1) las fermentadoras homolácticas que degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan pentosas o gluconato, utilizan la vía glucolítica y reducen directamente casi todo el piruvato a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. Dos géneros importantes de bacterias homolácticas son *Streptococcus* y *Lactobacillus*. 2) Las fermentadoras heterolácticas, que forman a partir de hexosas, ácido láctico ácido acético, etanol y CO₂ y a partir de las pentosas producen ácido acético y ácido láctico. Los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* son representativos de este grupo (Serna y Rodríguez, 2005). La producción de ácido acético en el pulque también es atribuido a la presencia de especies de *Acetobacter*. Este microorganismo por medio de un metabolismo aeróbico, oxida el etanol hasta ácido acético, por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa.

Fermentación viscosa: La biosíntesis de dextranos y levanos no implica sistemas multienzimáticos, azúcares activados o lípidos portadores intermediarios. Su producción es enteramente extracelular e implica enzimas que catalizan la polimerización de monosacáridos (Pace, 1991).

En la sección 3.2.2. se explica a detalle la forma de acción de las enzimas glucosiltransferasas para la formación de polímeros extracelulares.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas con metabolismo homofermentativo y heterofermentativo.

Bacterias ácido lácticas	
Metabolismo homofermentativo	Metabolismo heterofermentativo
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus buchnerii</i>
<i>Streptococcus salivarium</i>	<i>Lactobacillus bifidus</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Leuconostoc dextranicum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Leuconostoc cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	<i>Weissella spp.</i>

La mayoría de las bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Bifidobacterium*. En la Tabla 2 se presentan algunos de estos microorganismos que se han aislado a partir de muestras de alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, como el pulque, pozol, pan tradicional francés, cereales fermentados y algunos otros ambientes ricos en sacarosa o que se han reportado son capaces de producir exopolisacáridos (Tieking y Gänze, 2005; Bounaix *et al.*, 2009). *L. mesenteroides* es el principal microorganismo asociado a la producción de dextranas que confieren viscosidad al pulque (Chellapandian *et al.*, 1998).

Se ha reportado que la inulina y la levana también confieren viscosidad; sin embargo, no hay reportes de microorganismos que produzcan estos polímeros en el pulque. En diversos reportes se menciona que tal vez la presencia de estos polímeros se deba a que los microorganismos producen enzimas que degradan la inulina y la levana que el propio agave sintetiza, para usarlo como fuente de energía y carbono (Encizo, 2008). Por otra parte, puede deberse a que durante el proceso del raspado de la piña del maguey, el aguamiel se enriquezca de estos polímeros.

Tabla 2. Algunas especies de bacterias que se han reportado que son capaces de sintetizar biopolímeros.

Microorganismos productores de glucanas y fructanas aislados de diferentes fuentes.		
Tipo de exopolisacárido	Microorganismo reportado	Referencia
Dextrana (Glucosa α (1-6) glucosa)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc citreum</i> E497 <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Weissella confusa</i> <i>Weissella cibaria</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Chellapandian <i>et al.</i> , 1998 Maina <i>et al.</i> , 2008 Bounaix <i>et al.</i> , 2009 Patel <i>et al.</i> , 2010
Inulina (Fructosa β (2-1) fructosa)	<i>Leuconostoc citreum</i> CW 28 <i>Lactobacillus reuteri</i>	Olivares-Illana <i>et al.</i> , 2002 Tieking y Gänzle, 2005
Levana (Fructosa β (2-6) fructosa)	<i>Zymomonas mobilis</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>	Sprenger G., 1996 Van Geel-Schutten <i>et al.</i> , 1999

3.2. Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas (GTFs) son enzimas extracelulares de alto peso molecular y han sido ampliamente estudiadas en los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Estas enzimas llevan a cabo la reacción de transglucosilación, es decir, rompen el enlace glucosídico de la sacarosa, liberan fructosa al medio de reacción y transfieren la glucosa a un aceptor. La energía necesaria para la condensación de los residuos glucosídicos es proporcionada por la hidrólisis del enlace de la sacarosa, por esta razón, la enzima no requiere de cofactores o nucleótidos activados (Kiran *et al.*, 2008). En la Figura 1 se muestran las diversas glucosiltransferasas.

Dependiendo de la molécula aceptor, será el producto formado, como en los siguientes casos: a) en presencia de aceptores eficientes como maltosa o isomaltosa sintetizan oligosacáridos, b) cuando el agua actúa como aceptor produce la hidrólisis de la sacarosa c) la sucesiva transferencia de residuos glucosilo forma un polímero de alto peso molecular llamado glucano, e) el glucano formado puede a su vez actuar como aceptor, dando origen a un polímero ramificado y d) cuando en el medio de reacción la concentración de sacarosa ha disminuido notablemente y por tanto la concentración de fructosa es alta, la enzima transfiere el residuo glucosilo a la fructosa y libera un azúcar poco común llamado leucrosa (α -D- glucopiranososa-(1-5)-D-fructosa) (Monchois *et al.*, 1998).

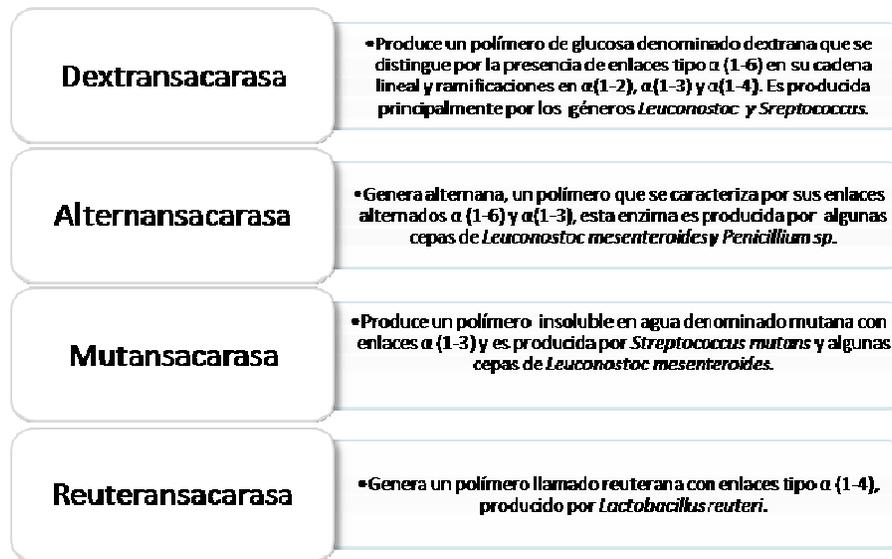


Figura 1. Clasificación de glucosiltransferasas de acuerdo a la estructura del producto que sintetizan (Naessens *et al.*, 2005; Morales, 2007).

Se ha propuesto que cuando se transfiere una unidad de fructosa a la cadena de polímero en crecimiento, ésta se libera, debido a que no es una molécula aceptora eficiente. En la Figura 2 se esquematizan las reacciones que pueden catalizar las enzimas glucosiltransferasas; sin embargo, no son catalizadas con la misma frecuencia. A excepción de la reacción inversa de la formación del complejo enzima–glucosilo para producir leucrosa, las demás reacciones son irreversibles y están principalmente en competencia con el intermediario glucosilo-enzima (Naessens *et al.*, 2005; Robyt *et al.*, 2008).

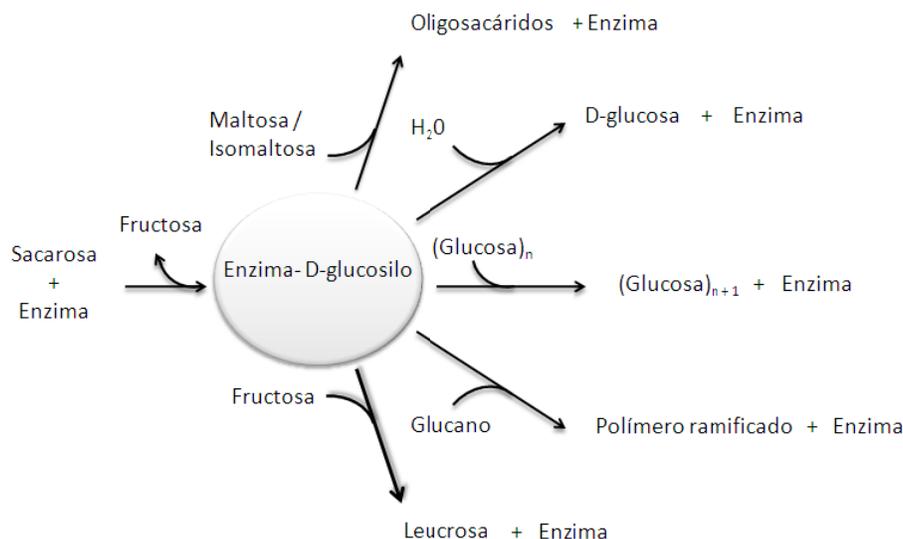


Figura 2. Reacciones catalizadas por enzimas glucosiltransferasas.

3.2.1. Dextransacararas

Las dextransacararas catalizan la reacción de transferencia de residuos glucosilo de la sacarosa hacia una molécula aceptora, como se mencionó anteriormente, esta molécula puede ser incluso el mismo polímero en crecimiento. Dado que la enzima es inducible en el género *Leuconostoc*, se requiere que la sacarosa esté presente en el medio de cultivo, mientras que para *Streptococcus*, la enzima es constitutiva. La reacción que se lleva a cabo en la síntesis del polímero está ejemplificada en la Figura 3.

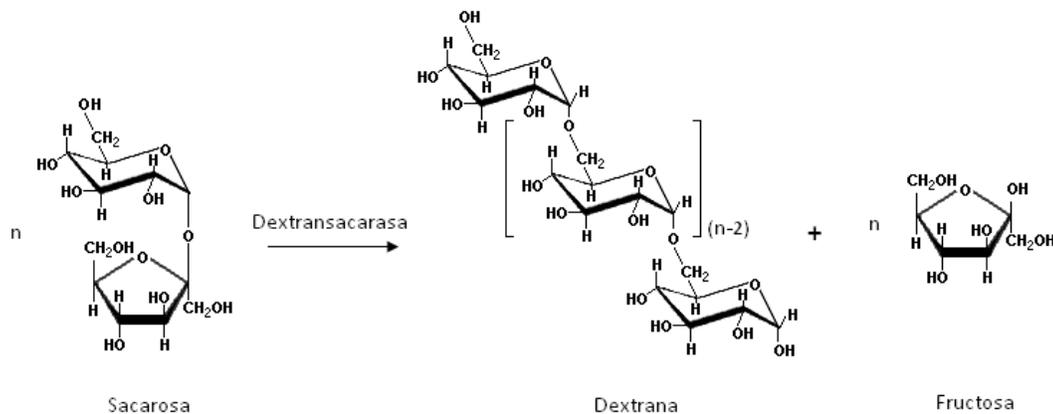


Figura 3. Reacción de síntesis de dextrana catalizada por la dextransacarasa.

3.2.2. Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de la enzima dextransacarasa para la formación de enlaces $\alpha(1-6)$ entre residuos de glucosa a partir de sacarosa ha sido estudiado para la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y *Streptococcus mutans* 6715. Es explicado por la síntesis de intermediarios glucosilo y se presenta en la Figura 4 (Quirasco, 1994; Robyt *et al.*, 2008).

Iniciación: En el sitio activo de la enzima se encuentra tres aminoácidos conservados y necesarios para la formación de los dos centros nucleofílicos, ácido aspártico 551 (Asp551), ácido aspártico 662 (Asp662) y ácido glutámico 589 (Glu589). El grupo carboxilo del Glu589 actúa como un catalizador básico, facilitando el ataque nucleofílico del Asp551 al carbono 1 de la glucosa que conforma la sacarosa y liberando D-fructosa. El grupo carboxilato del Glu589 es reducido al sustraer el protón del grupo carboxilo del Asp 662, esto facilita el ataque nucleofílico de este aminoácido al carbono 1 de la glucosa de otra

sacarosa y se libera D-fructosa. De esta forma se generan dos complejos enzima-glucosilo que actúan como centros nucleofílicos a lo largo de la reacción.

Elongación: El hidroxilo del carbono 6 de uno de los dos residuos glucosilo es orientado para atacar el carbono 1 del residuo glucosilo contiguo y formar el enlace $\alpha(1-6)$. El nucleófilo que se libera ataca a otra molécula de sacarosa formando un nuevo intermediario enzima-glucosilo. El hidroxilo del carbono 6 de este nuevo intermediario ataca al carbono 1 del residuo isomaltosilo, formando un intermediario dextranosilo-enzima. El proceso continúa de tal forma que el glucosilo y el residuo dextranosilo creciente son transferidos alternadamente entre los grupos carboxilo del Asp551 y Asp662 durante la elongación por el extremo reductor del polímero (Quirasco, 1994; Robyt *et al.*, 2008).

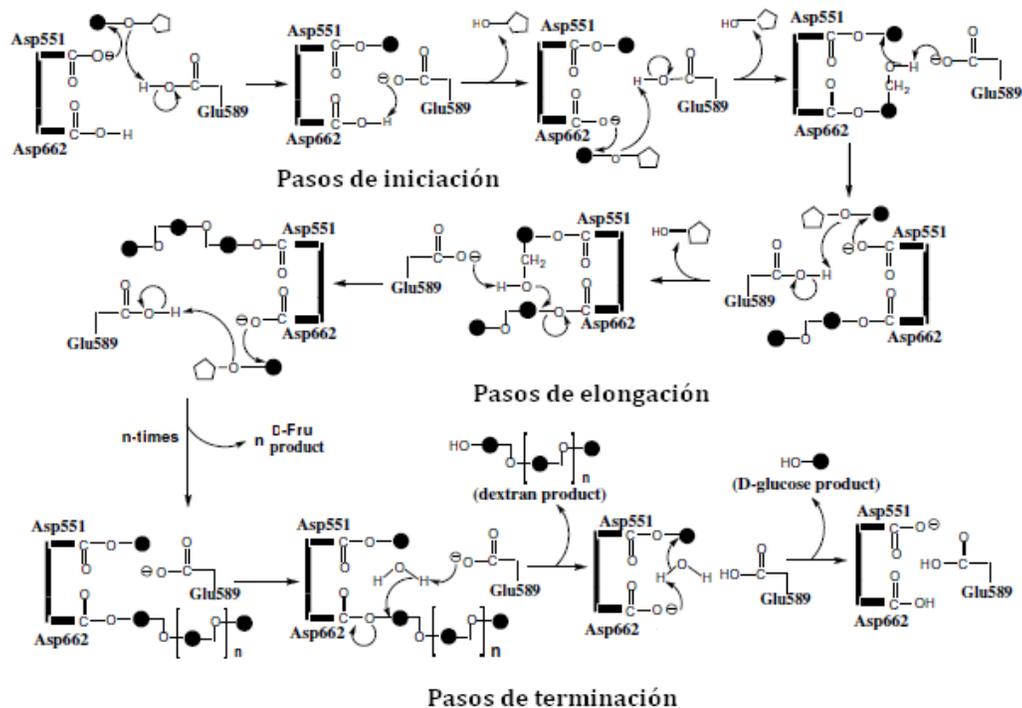


Figura 4. Mecanismo de biosíntesis de dextrana. En donde ●◻ es sacarosa y ● es glucosa Tomado de Robyt *et al.*, 2008.

Terminación: La elongación finaliza cuando el agua actúa como aceptor. Se libera D-glucosa y la cadena en crecimiento, que puede ser un oligosacárido

o una dextrana. Se ha propuesto que los aceptores débiles como es el caso de la fructosa provoca la disociación del complejo dextranosilo-enzima.

3.3. Biopolímeros microbianos

Las plantas, algas marinas, hongos y bacterias son capaces de producir exopolisacáridos extracelularmente bajo una amplia variedad de condiciones. Se sabe que no son utilizados como fuente de energía o carbono pero que desarrollan funciones específicas como:

- Proteger contra la desecación.
- Es la forma de almacenar el exceso de sustrato en una masa poco disponible para otros microorganismos.
- Actúa como barrera para impedir la unión a virus o anticuerpos a sitios específicos de la pared celular.
- Complejar o neutralizar toxinas.
- Establecer un vínculo con otras células para formar asociaciones simbióticas o patogénicas, entre otras.
- Formación de biopelículas.

Los polímeros pueden presentarse en dos formas diferentes de acuerdo al lugar donde se ubiquen con relación a la célula: 1) libre, es decir, no adherido a la célula, este tipo de polímeros son liberados al sobrenadante e imparten una consistencia viscosa al medio de cultivo, llegando incluso a solidificarlo; 2) en forma de microcápsulas adheridas a la pared de las células, las cuales tienen forma definida y algunas se pueden separar por centrifugación (Sutherland, 1990).

Los EPS tienen diversas estructuras, encontrándose homopolisacáridos y heteropolisacáridos que pueden estar formados por los principales azúcares como D-glucosa, D-galactosa o D-manosa, en la conformación piranosa o D-fructosa en configuración furanosa; sin embargo, el permanente interés en la obtención de diversos oligosacáridos y polímeros ha llevado a descubrir algunos constituidos por azúcares raros como L-fucosa y L-ramnosa incluyendo

L-hexosas o conformaciones furanosa de hexosas como glucosa y galactosa. Los heteropolímeros pueden tener un esqueleto formado hasta por 4 diferentes monosacáridos. Además de poder estar conformados por diversos azúcares, pueden estar unidos por un sólo tipo o varios tipos de enlace para crear un polímero lineal o ramificado, con longitud y peso molecular variable.

La principal característica exhibida por los EPS es su capacidad de modificar en formas particulares la reología o el comportamiento fluido de las soluciones; esta propiedad está determinada por su composición química, su carácter hidrofílico, sus agrupamientos y uniones moleculares, su peso molecular medio y su distribución.

3.3.1. Dextranas

La dextrana es uno de los homopolisacáridos microbianos más estudiados, está compuesta por unidades α -D-glucopiranosas unidas por enlaces α (1-6) con ramificaciones por enlaces α (1-2), α (1-3) o α (1-4) dependiendo de la cepa productora de la enzima. El principal microorganismo que la sintetiza es *Leuconostoc mesenteroides* por acción de la enzima dextranasa. La dextrana presenta un peso molecular entre 4 y 2000 kDa, dependiendo de las características de la enzima que la sintetiza (Conca, 2008). Sus características están determinadas por la composición de monosacáridos, el tipo de sustituyentes, el tipo de enlaces glucosídicos, el grado de ramificación y el peso molecular. A pesar de las similitudes entre sus estructuras primarias, sus propiedades físicas como soluciones o geles presentan notables diferencias.

3.3.1.1. Estructura de diversas dextranas

En 1954 el grupo de Jeanes determinó la estructura aproximada de las dextranas sintetizadas por diversas cepas de *L. mesenteroides*. Se encontró que tenían una alta proporción de enlaces α (1-6) y enlaces α (1-2), α (1-3) y α (1-4) en proporciones variables dependiendo de la cepa. Algunas cepas producían dextranas insolubles en agua y otras formaban más de un tipo de dextrana.

La dextrana producida por la cepa de *L. mesenteroides* B-512F y la fracción menos soluble producida por *L. mesenteroides* B-1355 contiene más

del 95% de enlaces $\alpha(1-6)$ y menos del 5% de enlaces $\alpha(1-3)$ en las ramificaciones. La longitud de estas ha causado gran controversia; sin embargo, considerando el mecanismo de reacción de la dextransacarasa se concluye que puede tener una longitud variable.

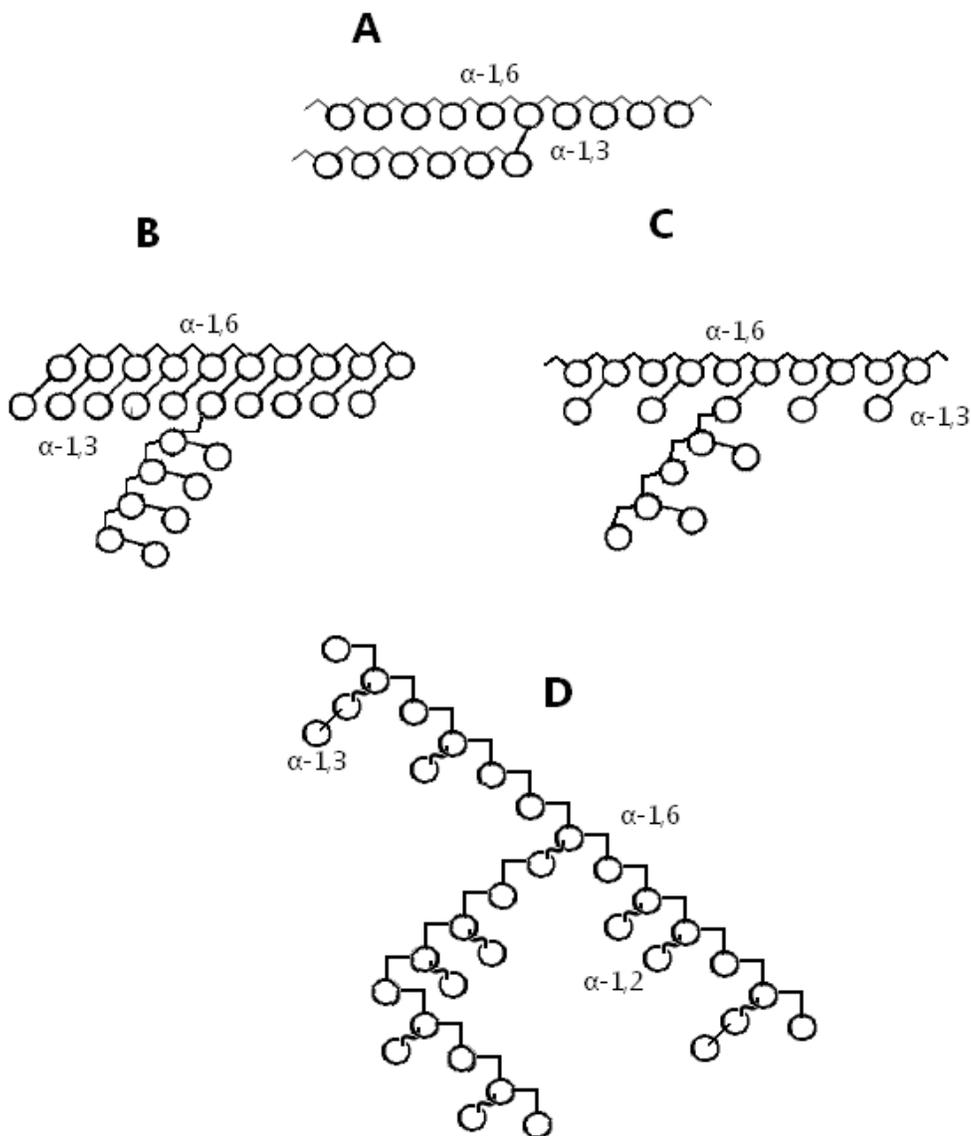


Figura 5. Estructura de algunas dextranas.

A) Dextrana de *L. mesenteroides* B-512F. B) Dextrana en forma de peine producida por *L. mesenteroides* B-742. C) Dextrana soluble en forma de peine alternado producida por *S. mutans* 6715. D) Estructura propuesta para la fracción soluble de la dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. Donde \wedge enlace $\alpha(1-6)$, — enlace $\alpha(1-3)$, ↘ enlace $\alpha(1-2)$.

La cepa *L. mesenteroides* B-742 sintetiza una estructura soluble que se caracteriza por tener una cadena principal con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones de una unidad de longitud en enlace $\alpha(1-3)$ en cada residuo glucosilo, esta estructura es conocida como “de peine” y es la que presenta mayor grado de ramificación, siendo absolutamente resistente a la hidrólisis por endodextranasas. La cepa *L. mesenteroides* B-742 produce otra dextrana soluble que contiene enlaces $\alpha(1-6)$ en un 87% y un 13% de enlaces $\alpha(1-4)$. *Streptococcus mutans* 6715 sintetiza una dextrana soluble que tiene un alto grado de ramificación, presenta una estructura similar a la “de peine”, pero las ramificaciones son alternadas de forma regular en cada residuo de glucosa, dando lugar a una estructura conocida como “peine alternado”.

La cepa *L. mesenteroides* B-1299 sintetiza dos tipos de polímeros: el soluble y el poco soluble, la estructura propuesta para ambas, es una cadena principal constituida por enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones $\alpha(1-2)$ a lo largo de la cadena, de una unidad de glucosa. La mayoría de los enlaces $\alpha(1-3)$ presentes en ambas dextranas están en porciones lineales, específicamente en los extremos no reductores de las cadenas. La dextrana de la fracción poco soluble presenta mayor proporción de enlaces $\alpha(1-3)$ en posiciones terminales (Naessens *et al.*, 2005; Quirasco, 2007). Los diferentes tipos de dextranas descritas anteriormente se presentan en la Figura 5.

3.3.2. Aplicaciones

Los polisacáridos han encontrado aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria, agronómica y en diversas industrias químicas por su capacidad de actuar como estabilizantes, emulsificantes, espesantes y agentes ligadores de agua. En la industria de alimentos, los polisacáridos son clasificados como aditivos y por ello su uso no es tan deseado. Los polisacáridos producidos por aquellas bacterias que son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) puede permitir el desarrollo de una nueva generación de polisacáridos de grado alimenticio (Shuterland, 1994).

El hecho de que las dextranas sean altamente solubles da lugar a sus múltiples aplicaciones, por ejemplo: actúan como estabilizante en helados, agentes crioprotectores, estabilizantes de cosméticos, como encapsuladoras

de células y en la liberación de medicamentos, permiten expandir el volumen sanguíneo, estabilizan agregados de suelo, participan en la recuperación secundaria de petróleo y permiten formar un tamiz molecular para el asilamiento y purificación de productos biológicos, entre otras aplicaciones (Olivares, 1998; Patel *et al.*, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha incrementado la popularidad del consumo de productos alimenticios naturales y con el aumento en la demanda, las industrias están en búsqueda de sustancias que logren esta característica. Los biopolímeros son sustancias que confieren textura a los alimentos, algunos son sintetizados por microorganismos. Algunas BAL son capaces de sintetizar EPS que pueden tener un importante impacto en el desarrollo de nuevos alimentos, logrando un producto final de igual o mejor estabilidad y textura que los productos actuales, además de ser seguros, naturales y saludables por el hecho de que este grupo de bacterias son consideradas por la FDA (Food and Drug Administration, USA) como “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS). Estudios realizados anteriormente sobre la presencia de BAL productoras de biopolímeros en pulque han mostrado que la presencia de dextranas en esta bebida se debe únicamente a *L. mesenteroides*, a pesar de que se encuentran presentes diversas bacterias capaces de producir polímeros de glucosa; sin embargo, no se ha reportado que microorganismo podría ser el responsable de la presencia de inulina o levana. En nuestro grupo de trabajo se realizó el aislamiento de dos cepas productoras de EPS, a partir de muestras de aguamiel y pulque, identificadas como *L. citreum* (denominadas EPS A y EPS B). También se encontró que la cepa EPS A tiene asociada a pared celular una enzima capaz de producir un polímero, mientras que la cepa EPS B libera la enzima al medio de cultivo (Conca, 2008). Se ha reportado que varias especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* pueden sintetizar los dos tipos de enzimas. Basados en estos reportes, se intentó extraer nuevamente los dos tipos de enzimas de las cepas EPS A y EPS B, obteniéndose resultados positivos. Estos antecedentes permitieron realizar un trabajo enfocado a la identificación y caracterización de polímeros sintetizados por *L. citreum*, con el propósito de contribuir al estudio de la diversidad metabólica de esta bebida.

5. HIPÓTESIS

Los EPS producidos por las cepas de *L. citreum* EPS A y EPS B tendrán propiedades estructurales y fisicoquímicas diferentes a los previamente reportados para el pulque.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Producir y caracterizar los polímeros sintetizados por las cepas de *Leuconostoc citreum* (EPS A Y EPS B) aisladas a partir de muestras de aguamiel y pulque.

6.2. Objetivos particulares

- Caracterizar las enzimas involucradas para optimizar las condiciones de producción de los polisacáridos.
- Producción de polisacáridos “*in vitro*”.
- Determinar la estructura química de los polisacáridos mediante técnicas de RMN.
- Analizar el comportamiento reológico de los polímeros.
- Estudiar la posible relación estructural del exopolisacárido con la célula mediante microscopía electrónica de barrido.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Diagrama de la metodología

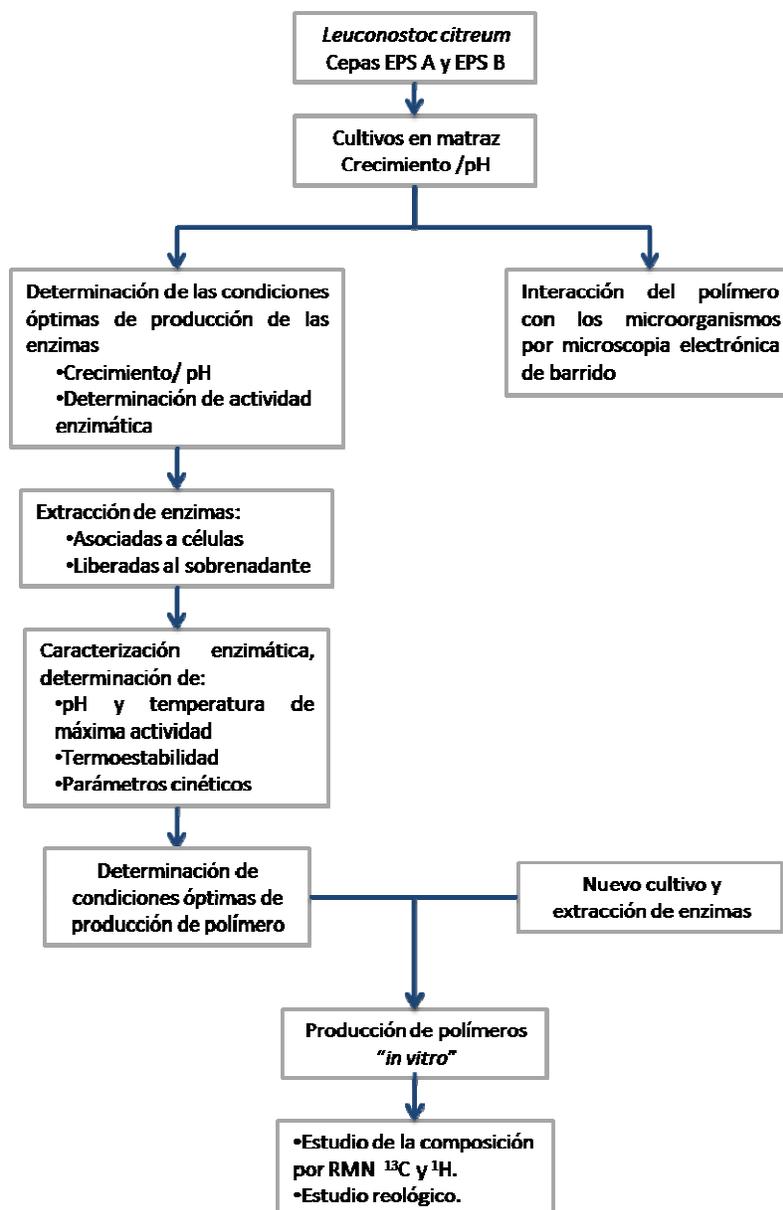


Figura 6. Diagrama de la metodología desarrollada en este trabajo.

7.2. Cepas

Las cepas de *Leuconostoc citreum* EPS A y EPS B fueron aisladas por Conca en el 2008 a partir de muestras de aguamiel y pulque obtenidas en la localidad de Huitzilac, Morelos, México, preservados en glicerol al 25% (v/v) y almacenadas a -70°C .

7.3. Producción de enzimas

7.3.1. Condiciones de cultivo

Las cepas EPS A y EPS B, se recuperaron de los cultivos en glicerol almacenados a -70°C , al sembrar una asada en placas de medio APT (*DIFCO*) + 20% de sacarosa, incubándose a temperatura ambiente durante 12 h en el caso de la cepa EPS B y durante 24 h en el de la cepa EPS A. A partir de estas cajas se realizó un precultivo en 50 mL de caldo APT + 20% de sacarosa en una incubadora (*New Brunswick Scientific G24*) a 30°C /150 rpm durante 14 h para la cepa EPS A y durante 8 h para la cepa B. Los precultivos fueron centrifugados a $8,944 \times g$ /5 min en una centrifuga (*Sorvall Legend MaCH 1.6R*). La pastilla de células, se resuspendió en 5 mL de caldo APT + 20% de sacarosa en condiciones asépticas y se determinó la densidad óptica a 600nm ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$) utilizando un espectrofotómetro (*Beckman DU -70*). El concentrado celular se utilizó como inóculo ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.2$), para el desarrollo de un cultivo en un matraz de capacidad de 2.8 L con un volumen de trabajo de 560 mL de medio APT+ 20% de sacarosa, incubado a 30°C / 200 rpm durante 8 h para la cepa EPS A y durante 6 h para la cepa EPS B. Al final de la fermentación se ajustó el pH a 5.4 con hidróxido de potasio 2N y se centrifugó a $14,970 \times g$ / 5 min a 4°C .

Durante el cultivo se realizó el seguimiento de los siguientes parámetros para definir y estandarizar las condiciones óptimas para la producción y extracción de las enzimas.

- Crecimiento celular: Se midió $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$, cada hora, durante 12 h.
- pH de la fermentación: Se midió el pH de la fermentación en un potenciómetro *HANNA pH 209* previamente calibrado a $\text{pH} \sim 4$ y ~ 7 .

7.3.2. Actividad enzimática

La actividad enzimática se midió tanto en células como en sobrenadante cuantificando los azúcares reductores liberados por la técnica de DNS (Summer, 1934) durante el desarrollo de la reacción enzimática. Ésta se llevó a cabo en un volumen total de 600 μL en presencia de 10% (v/v) de sacarosa y

buffer de acetatos 100 mM pH 5.4 a 30°C/ 500 rpm en un equipo *Eppendorf Thermomixer*®. Una unidad de actividad dextransacarasa (U) está definida como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de fructosa por minuto a pH 5.4, 30 °C y 10 % de sacarosa.

7.3.3. Recuperación de las enzimas

Se obtuvieron los extractos crudos de enzimas siguiendo el protocolo reportado por Quirasco (1997). A partir del sobrenadante del cultivo, se precipitó la enzima adherida al polímero con un volumen de polietilenglicol (PEG) 5000 al 50%. La mezcla fue centrifugada a 14,970 x *g*/ 5 min a 4°C. En este caso el sobrenadante se desechó, mientras que el precipitado fue lavado con buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4 para recuperar células que no se lograron separar por centrifugación. Después el precipitado fue disuelto en un volumen mínimo de buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4 y conservado a 4 °C.

Las células separadas por centrifugación y las obtenidas por el lavado del precipitado anterior, se mezclaron, se lavaron 3 veces con buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4 y se resuspendieron en un volumen mínimo del mismo buffer, manteniéndose a 4°C.

7.4. Caracterización bioquímica de las enzimas

7.4.1. Efecto de la temperatura, pH y termoestabilidad de las enzimas

Para determinar el efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas, se llevaron a cabo ensayos a diferentes temperaturas. El intervalo de temperatura utilizado fue de 20°C a 55°C en buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4.

El efecto de pH en la enzima se determinó midiendo actividad bajo las condiciones mencionadas anteriormente, variando el pH en amortiguador de acetatos en un rango de 4 a 5.4 y el amortiguador de fosfatos en un rango de pH de 6 a 8.

La termoestabilidad fue determinada incubando los extractos crudos de enzima a 30 y 40 °C, en una incubadora (*Thermolyne DB16525 Dry Bath*

Incubator). Se midió la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación en una mezcla de reacción final con 10% de sacarosa y buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4 a 30 °C.

7.4.2. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar las constantes cinéticas se llevaron a cabo reacciones enzimáticas a 30 °C con diferentes concentraciones de sustrato (0 a 300 mM), en buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4, ajustado a 0.5 U/mL. Las velocidades iniciales de reacción, se midieron por la liberación de azúcares reductores.

7.4.3. Electroforesis de proteínas

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la separación de proteínas (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó en un gel constituido de una fracción concentradora al 4% y una fracción separadora al 8%. Se utilizó una cámara de electroforesis (*Mighty small II*) para geles de 1 mm de espesor. Las muestras analizadas se mezclaron con un volumen de amortiguador de carga 2X, el cual contenía Tris-HCl 0.125 M pH 6.8 SDS 4%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.05%. La migración de proteínas se realizó a amperaje constante de 30 a 40 mA. Las muestras se cargaron por duplicado para poder dividir el gel y aplicar a cada segmento uno de los dos tratamientos siguientes:

- a) **Tinción con azul de Coomassie.** El gel se mantuvo durante 10 min, en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (50% v/v) y azul de Coomassie (0.125% v/v). Después se realizó un lavado de 10 min, con la solución I: ácido acético (10% v/v) y metanol (50% v/v) y finalmente con la solución II: ácido acético (7%) y metanol (5%), para remover el exceso de colorante.

- b) **Zimograma de actividad teñido con reactivo de Schiff.** Después de la electroforesis, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de acetatos 0.1 mM pH 5.4 y Tween 80 (1% v/v) para reconstituir la forma nativa de las enzimas. En seguida se incubó en buffer de acetatos 0.1 mM pH 5.4, a

una concentración final del 10% (v/v) de sacarosa durante toda la noche a 30 °C. La actividad fue detectada por la aparición de bandas blancas correspondientes al polímero sintetizado por la enzima. Para lograr fijar el polímero al gel, se mantuvo 30 min en etanol al 100% y posteriormente la oxidación de los grupos hidroxilo se llevó a cabo incubando una hora con una solución de ácido periódico al 0.7% (v/v) y ácido acético al 5% (v/v). Después se realizaron tres lavados de 20 min cada uno con una solución de metabisulfito de sodio 0.2% (p/v) y ácido acético 5% (v/v). Finalmente, el gel con el polímero fijado, se puso en contacto con el reactivo de Schiff hasta la aparición de color. El exceso de colorante se eliminó lavando con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% (p/v) y ácido acético 5% (v/v).

7.5. Producción de polímeros “*in vitro*”

Los polímeros fueron producidos “*in vitro*” con la enzima presente en los extractos crudos y células obtenidas como se describe anteriormente. La producción de los EPS se realizó ajustando las condiciones de reacción como indica la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la producción de polímero “*in vitro*”.

Condición	Parámetro
Concentración de la enzima	1 U/mL
Concentración de sacarosa	120 g/L
Buffer de Acetatos 0.1 mM pH 5.4	Ajustar a 600 µL

Las mezclas de reacción fueron incubadas en una incubadora (*New Brunswick Scientific G24*) a 30 °C/100 rpm por 12- 14 h. Los polisacáridos producidos a partir de células fueron centrifugados a 7860 x *g* /5 min, para separar las células del polisacárido. Los EPS producidos fueron precipitados por la adición de 1 volumen de etanol absoluto y centrifugado a 2236 x *g* /10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se disolvió por completo en un volumen mínimo de Agua MQ. Cada EPS disuelto fue transferido a una bolsa de diálisis (*m.w. cut off 12 400, wet cellulose SIGMA-ALDRICH*) y se dializó contra

2 L de agua con agitación a temperatura ambiente, realizando cambios de agua cada media hora durante 2 horas, una vez durante 12 horas y un último cambio de media hora.

Los polímeros producidos fueron liofilizados en un equipo *LABCONCO* (*FreeZone 4.5*) en frascos de capacidad de 600 mL y 250mL con un volumen de trabajo suficiente para formar una capa medianamente gruesa de polímero congelado sobre las paredes del frasco.

7.6. Caracterización de los polímeros producidos

7.6.1. Análisis por resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C

La composición del polímero se estudio por RMN ^{13}C y ^1H . Las muestras fueron disueltas en la mínima cantidad de D_2O . Los experimentos se obtuvieron en un equipo Mercury Varian, operado a una a frecuencia de 100 MHz para el análisis de ^{13}C y a una frecuencia de 400 MHz para ^1H . Se utilizó como compuesto de referencia de desplazamiento TSP (sal de sodio del ácido 3-(trimetilsilil)- propiónico- D_4). Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Resonancia Magnética Nuclear de la UAM Xochimilco.

7.6.2. Análisis reológico

El análisis reológico se llevó a cabo disolviendo 0.1 g de polímero liofilizado en 5 mL de agua destilada hasta tener una consistencia homogénea. Se sometió al mismo tratamiento las dextranas comerciales producidas por *Leuconostoc mesenteroides* B-512 de 69 000 mol wt y 500 000 mol wt (*Sigma Aldrich*). El estudio se realizó en un reómetro AR 1000 (TA Instruments), con una configuración de cono y plato de acero inoxidable (60 mm de diámetro y 1°). Se determinó a cada muestra, el índice de consistencia, K (Pa s^n) y el índice de flujo, n (-) siguiendo la ley de la potencia ($\tau = K\dot{\gamma}^n$).

7.6.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis de la morfología de los cultivos, se realizaron fermentaciones de las dos cepas en medio APT, en presencia y ausencia de sacarosa (20% v/v) a 30°C / 200 rpm. Se tomaron 5 mL de muestra de cada cultivo a la hora 10 de crecimiento y se adicionaron 5 mL de solución fijadora

(preparación, ver Anexo II). Las muestras fijadas fueron deshidratadas 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). Se cubrieron con partículas de oro en un equipo "ion sputter" JFC-110 (JEOL) y finalmente fueron observadas 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.

7.7. Análisis de datos

Todos los resultados en este trabajo, fueron obtenidos a partir de dos preparaciones independientes y se muestra el promedio de ambos. En el caso de los análisis por RMN y MEB, las determinaciones se realizaron individualmente.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Morfología de las cepas EPS A y EPS B



Figura 7. Crecimiento de las cepas EPS A y EPS B en placas de medio APT en presencia y ausencia de sacarosa (20% v/v), D.O. $_{600nm}$ inicial: 1, $V_{inóculo}$: 1 mL, temperatura: 30°C.

Las cepas EPS A y EPS B fueron crecidas en placas de medio APT con y sin sacarosa (20% v/v) a partir de un inóculo con $D.O._{600nm} = 1$ y se incubaron durante 12 h. Las imágenes del crecimiento se presentan en la Figura 7. Se observó que en ausencia de sacarosa las cepas producen colonias de apariencia blanquecina y compacta. En presencia de sacarosa, muestran un crecimiento extendido sobre la placa, no forman colonias definidas, el aspecto del crecimiento es mucoide para ambas cepas. La cepa EPS B forma a la vista una capa de polímero de mayor firmeza y grosor que la cepa EPS A. A partir de estas observaciones se propone que el control de la síntesis de enzimas a nivel genético es de tipo inductivo, porque las cepas solo producen el polímero en presencia de sacarosa. Una vez que la enzima es sintetizada utiliza la sacarosa presente en el medio como sustrato, la hidroliza y polimeriza los monosacáridos, para producir polímeros que aumentan la viscosidad del caldo de cultivo, esto dificulta el proceso de recuperación, estimación de la actividad enzimática y purificación de las enzimas.

8.2. Producción de las enzimas

8.2.1. Condiciones de cultivo

Como se mencionó en los objetivos, unos de los aspectos primordiales en que se centra este trabajo, es la caracterización de las enzimas que producen las cepas EPS A y EPS B de *L. citreum* aisladas del pulque. Estudios

realizados anteriormente sugieren que las enzimas extraídas en fase estacionaria tardía del crecimiento celular, resultan en bajos rendimientos de producción de polímero (Veljkovic y Lazic, 1988).

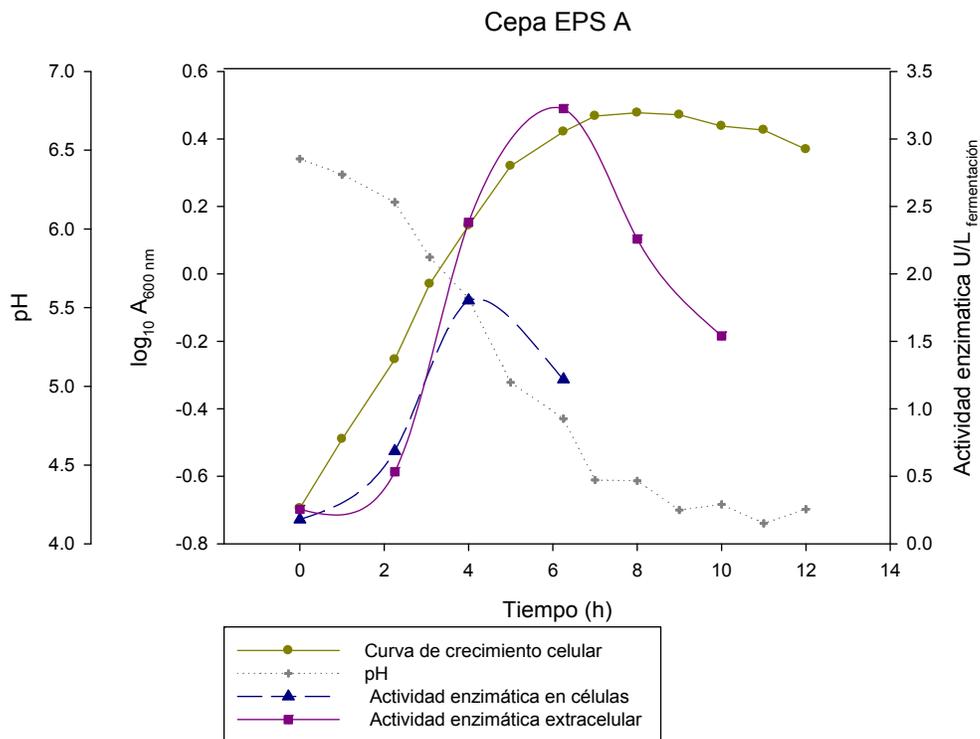


Figura 8. Cinética de crecimiento, pH y actividad enzimática asociada a células y extracelular de la cepa EPS A. Las reacciones para medir actividad enzimática en cada punto, tuvieron una duración de 15 min.

Con el objetivo de conocer las condiciones idóneas para obtener la mayor actividad de cada una de las enzimas que producen los microorganismos, se llevaron a cabo cinéticas de fermentación en cultivos de 560 mL con medio APT en matraz de 2.8 L, a 30°C y 200 rpm. Se monitoreó el crecimiento celular y pH de los cultivos cada hora. También se monitoreó la actividad enzimática extracelular y asociada a células cada dos h durante 12 horas.

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. Se observa que ambas cepas presentan curvas típicas de crecimiento. A partir de los datos en fase exponencial se obtuvieron las velocidades de crecimiento (μ) de 0.4494 h^{-1} y 0.5510 h^{-1} para las cepas EPS A y EPS B respectivamente. Estos valores son

muy similares a los reportados para el crecimiento de BAL (Lee, 2006). Debido a la producción de ácidos por el metabolismo heterofermentativo de *L. citreum*, en ambos cultivos, el pH disminuye de 6.4 a 4.2 aproximadamente.

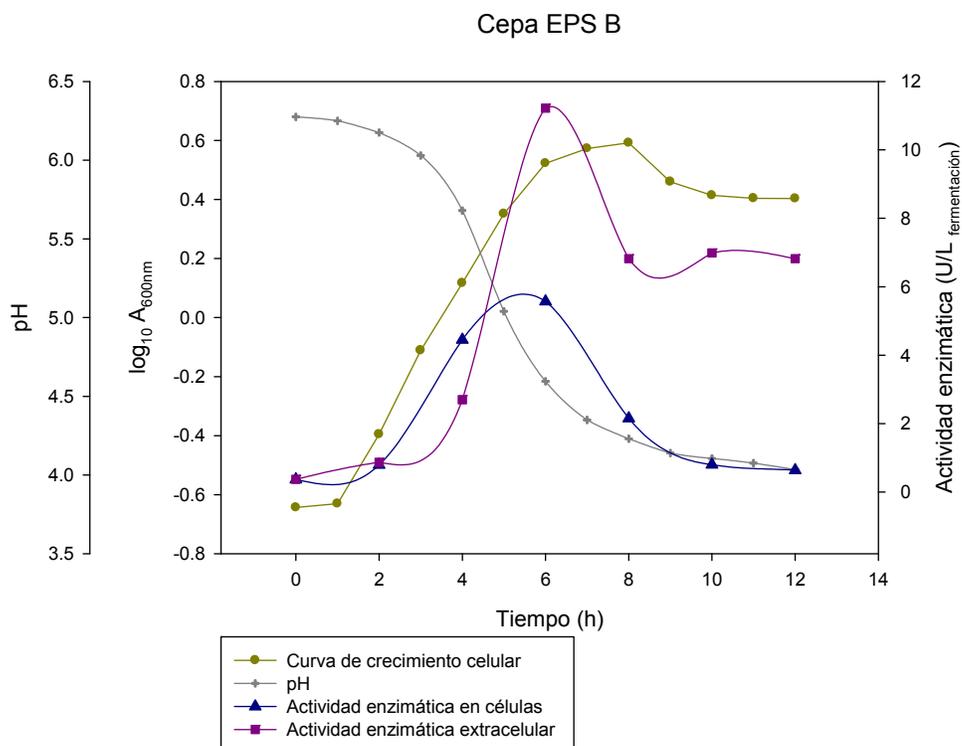


Figura 9. Cinética de crecimiento, pH y actividad enzimática asociada a células y extracelular de la cepa EPS B. Las reacciones para medir actividad enzimática en cada punto, tuvieron una duración de 15 min.

En el caso de la cepa EPS A el estudio de la actividad enzimática nos permitió conocer que la enzima asociada a células presenta la máxima actividad a las 4 h de fermentación en un pH de 5.5, mientras que la enzima excretada al medio de cultivo muestra su máxima producción a las 6 h cuando el pH se encontraba en 4.8. Los resultados obtenidos para la cepa EPS B muestran que tanto la enzima asociada a células como la excretada al medio de cultivo logran su máxima actividad en la hora 6 de fermentación, a un pH de 5.

En ambas cepas la síntesis de las enzimas está relacionada al crecimiento celular hasta la fase exponencial, después de la cual la actividad cae. La producción de la enzima asociada a células de la cepa EPS A está vinculada al crecimiento hasta la mitad de la fase exponencial, para

posteriormente disminuir. La reducción de actividad en ambas cepas se relaciona con la acidificación del medio de cultivo. Este comportamiento ya ha sido observado en la producción de enzimas por bacterias lácticas productoras de polímero, tal es el caso de la inulosacarasa de *L. citreum* (Olivares-Illana *et al.*, 2002) y la dextransacarasa de *L. mesenteroides* (López y Monsan, 1980).

La extracción de células y enzimas del medio de cultivo para la producción de polímeros en el caso de la cepa EPS A se realizó a las 4 y 6 horas de fermentación respectivamente. En el caso de la cepa EPS B, la cosecha se realizó a las 6 h para ambas enzimas. Una vez que los cultivos cumplían el tiempo de fermentación adecuado, el pH se ajustaba a 5.4, para iniciar el proceso de obtención de los extractos enzimáticos que posteriormente fueron caracterizados.

8.2.2. Caracterización bioquímica de las enzimas

8.2.2.1. Perfil de pH

Una vez establecidas las condiciones de producción de las enzimas, se investigaron los parámetros óptimos de reacción.

En la Tabla 4 y Figura 10 se muestran los valores de máxima actividad de las enzimas y el perfil de pH respectivamente. La enzima asociada a células de la cepa EPS A tiene un pH óptimo de 5.4, mientras que la enzima liberada al sobrenadante presenta una mayor actividad en el intervalo de 5 a 6. Las enzimas sintetizadas por la cepa EPS B, muestran un valor óptimo de 6.5 para la enzima asociada a células y de 4.5 a 5.4 para la enzima extracelular. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado para algunas glucosiltransferasas (Vasileva *et al.*, 2010), con valores reportados desde 4.8 hasta 6.2.

Tabla 4. Resumen de los valores de pH de máxima actividad obtenidos para las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B.

pH de máxima actividad de las enzimas producidas			
EPS A		EPS B	
Asociada a células	Extracelular	Asociada a células	Extracelular
5.4	5 - 6	6.5	4.6 - 5.4

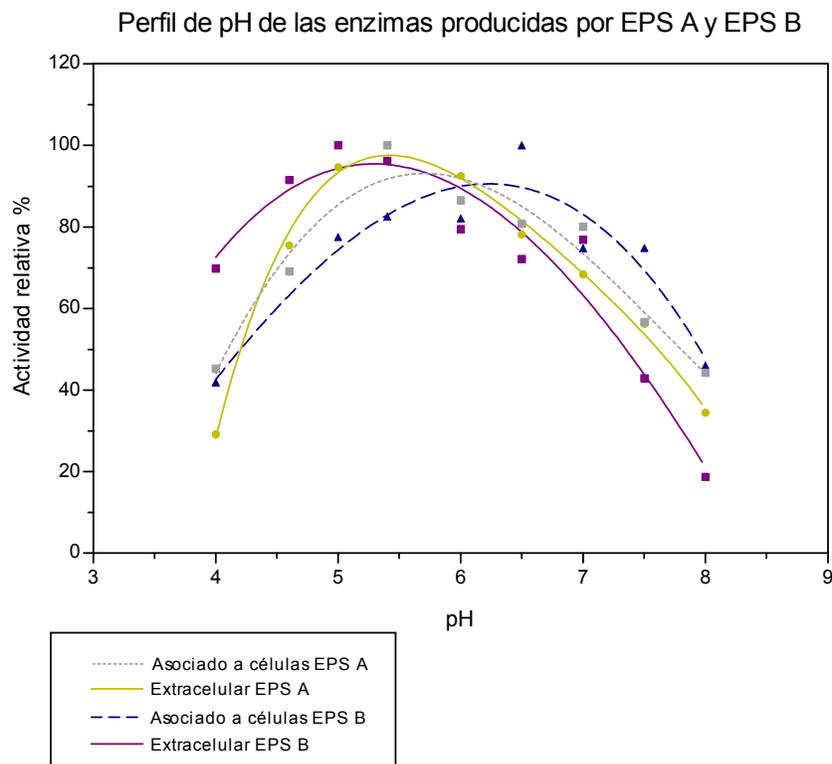


Figura 10. Efecto del pH en la actividad enzimática de las enzimas producidas por la cepa EPS A y EPS B. La cantidad de enzima se ajustó a 0.5 U/mL.

Los sitios activos de las enzimas pueden tener numerosos grupos ionizables que deben poseer una carga determinada para mantener la conformación adecuada, unir los sustratos y/o catalizar la reacción. La disminución de la actividad que presentan las enzimas por debajo y por encima del rango de pH óptimo podría deberse a que al aceptar o donar protones, la carga eléctrica se verá modificada, al igual que la estructura de los aminoácidos que a su vez, producen la desnaturalización total o parcial de la enzima, apreciándose como una baja de la actividad enzimática.

8.2.2.2. Perfil de temperatura

Con el objetivo de determinar la temperatura óptima de las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B, se realizaron las mediciones de actividad enzimática en un intervalo de 20 a 55°C, en la Tabla 5 y Figura 11 se muestran los resultados. Se observa que la enzima extracelular de la cepa EPS A mantuvo su máxima actividad entre los 25 y 40°C, mientras que la enzima asociada a células es más activa a los 40°C. En el caso de la cepa EPS B, la

enzima asociada a células presentó máxima actividad en un intervalo de 40 a 45°C, mientras que la enzima que liberada al sobrenadante es más activa a los 40°C.

Tabla 5. Resumen de los valores de temperaturas de máxima actividad obtenidos para las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B.

Temperatura de máxima actividad de las enzimas producidas			
EPS A		EPS B	
Asociada a células	Extracelular	Asociada a células	Extracelular
40 °C	25-40 °C	40-45 °C	40 °C

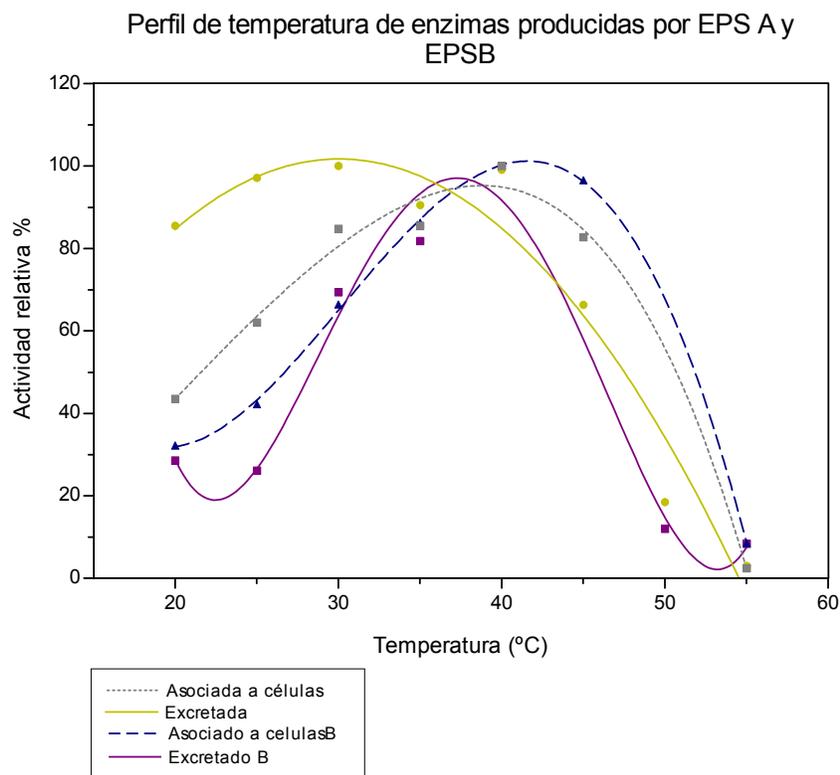


Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de las enzimas producidas por la cepa EPS A y EPS B. La cantidad de enzima se ajustó a 0.5 U/mL.

Los valores de máxima actividad de enzimas glucosiltransferasas van de 25 a 35°C para enzimas purificadas (Dols *et al.*, 1997; Chellapandian *et al.*, 1998; Naessens *et al.*, 2005; Kiran y Goyal, 2009) y algunas enzimas que se encuentran embebidas en dextrana presentan valores hasta de 40°C. En

general las temperaturas óptimas obtenidas son altas, lo que puede deberse a que las enzimas y células están protegidas de una desnaturalización parcial por estar atrapadas en una baja concentración de polímero.

Estos perfiles pueden explicarse a partir de la estructura química de las enzimas. Las enzimas son catalizadores muy sensibles al calor. A bajas temperaturas la estructura tiene menor flexibilidad conformacional para la catálisis, pero un aumento en el nivel térmico se traduce en un incremento de la energía vibracional que puede provocar la ruptura de puentes de hidrogeno y la destrucción de interacciones apolares. Esto conlleva a la desnaturalización de la enzima. En cualquiera de los dos casos, se ve modificada la actividad enzimática.

8.2.2.3. Estabilidad a la temperatura

La temperatura óptima de una enzima, es aquella en la cual presenta una actividad constante a lo largo de un periodo de tiempo por lo menos tan largo como el periodo de ensayo. Para poder definir la temperatura óptima, se evaluó la estabilidad térmica, a fin de relacionar estos resultados con los obtenidos anteriormente. Se ajustó a 3.5 U/mL el extracto enzimático asociado a células y 2 U/mL los extractos de enzimas extracelulares. Se evaluó la actividad residual a 30 y 40 °C, tomando muestras durante 12 y 4 h respectivamente. Posteriormente se midió actividad enzimática a 30°C como se describe en la metodología.

En general, las enzimas resultaron ser más estables a 30°C que a 40°C, como se observa en la Tabla 6. Después de 40 min de incubación a 40 °C, todas las enzimas a excepción de la enzima extracelular de la cepa EPS B pierden más del 85% de su actividad. En cambio, cuando las enzimas de la cepa EPS B y la enzima asociada a células de la cepa EPS A fueron incubadas a 30°C durante 12 h, conservaron más del 85% de su actividad.

Con los resultados obtenidos solo fue posible determinar el tiempo de vida media de la enzima extracelular de la cepa EPS A, el cual resultó ser de 15.97 h.

Tabla 6. Resultados de la actividad residual de cada extracto al ser incubados a 30 y 40 °C.

Actividad residual porcentual			
Células		Sobrenadante	
EPS A	EPS B	EPS A	EPS B
Resultados después de 40 min a 40 °C			
10.74	4.22	12.61	44.43
Resultados después de 12 horas a 30 °C			
90.33	93.36	55.61	83.51

Los datos obtenidos de la evaluación del efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas mostró en general, que su capacidad catalítica es máxima a 40°C. Esto puede deberse a que la moléculas reactivas adquieren más rápidamente la energía necesaria (energía de activación) para que la reacción se lleve a cabo. La prueba de estabilidad a esta temperatura mostró que la enzima dura activa un tiempo muy corto, lo que se traduce en malos rendimientos. La temperatura óptima de las enzimas se determina estableciendo un compromiso entre los efectos de la temperatura y la estabilidad sobre la actividad de la enzima, de esta forma se concluye que la temperatura óptima para las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B es 30°C.

8.2.2.4. Determinación de parámetros cinéticos

Se realizaron una serie de ensayos para la determinación de las constantes cinéticas de las enzimas producidas por las cepas EPS A y EPS B. En las Figuras 12 y 13 se muestra que todas las enzimas producidas presentan un comportamiento cinético de tipo Michelis-Menten, es decir, la velocidad de la reacción aumenta linealmente con el aumento de la concentración del sustrato ([S]), hasta un punto en que la enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima (V_{max}), que no sobrepasará independientemente de la [S].

Los resultados de K_m aparente muestran para ambas cepas, que las enzimas liberadas al sobrenadante presentan mayor afinidad por la sacarosa que las enzimas que se encuentran asociadas a las células.

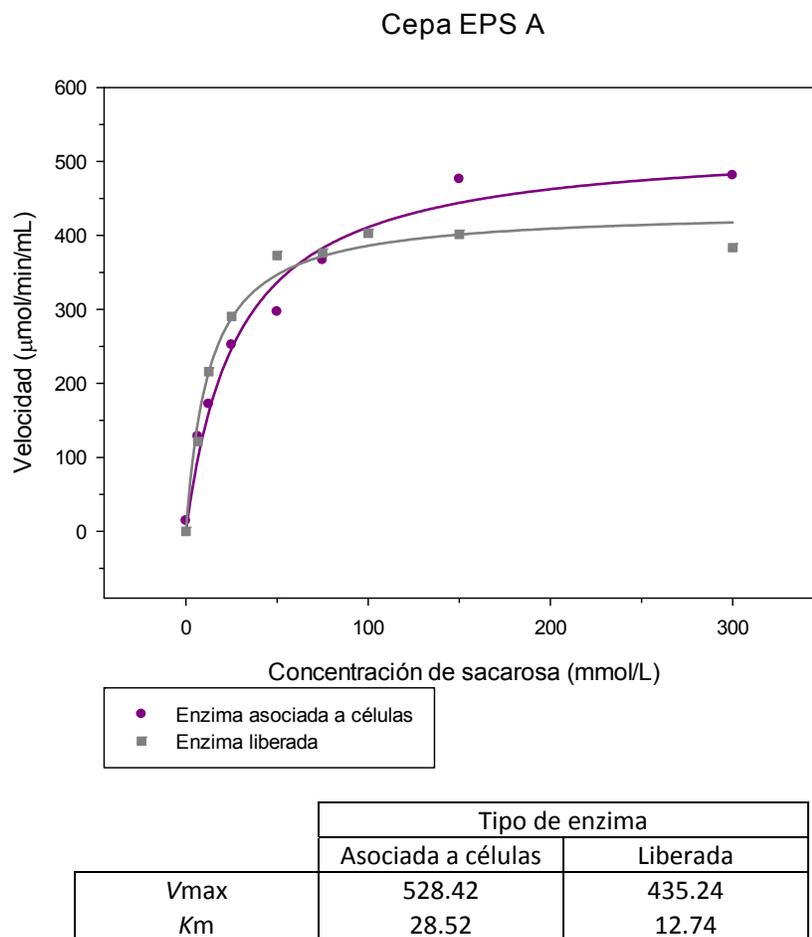


Figura 12. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de las enzimas producidas por la cepa EPS A. La cantidad de enzima se ajustó a 0.5 U/mL. Las reacciones para medir actividad enzimática tuvieron una duración de 15 min.

Es probable que esta diferencia se deba a que la enzima que está asociada a células se vea afectada por problemas de difusión. También podemos observar que ninguna de las enzimas es inhibida por altas concentraciones (hasta 300 mM) de sustrato, ya que al aumentar [S] no decae la actividad.

El comportamiento presentado por las enzimas asociadas a células es muy similar al reportado por Chellapandian *et al.* (1998), quienes caracterizaron a la enzima asociada a células de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ, obteniendo K_m aparente de 26 mM.

Por otro lado Naessens *et al.* (2005), reportaron que la dextransacarasa extracelular producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F tiene una K_m

aparente de ~12 a 16 mM, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para las enzimas liberadas al sobrenadante.

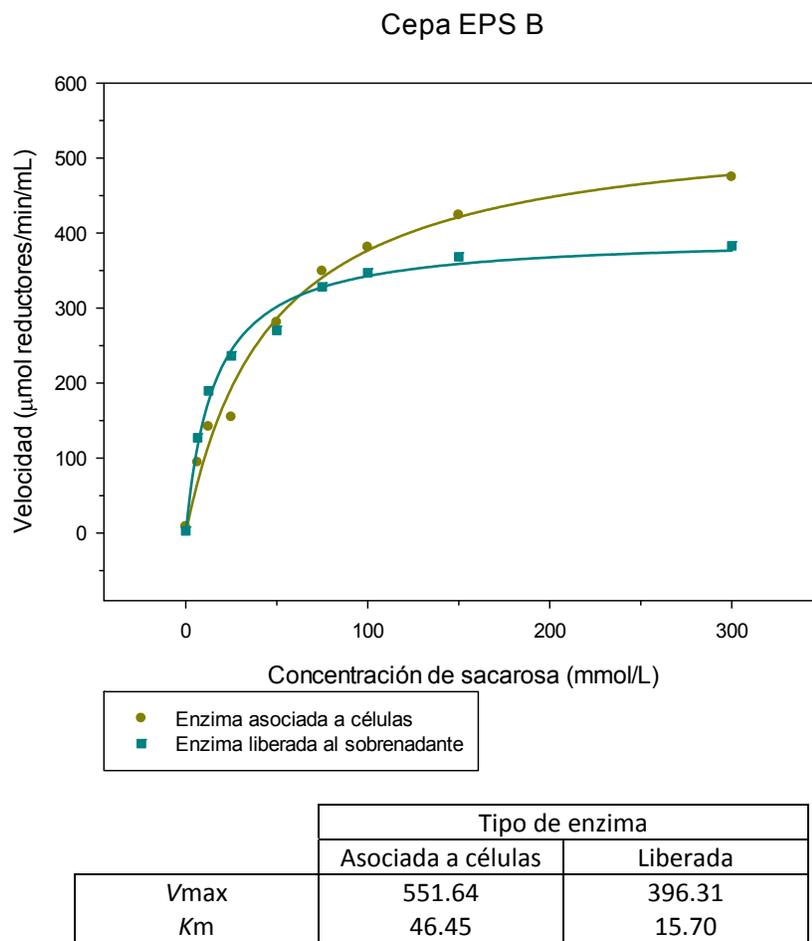


Figura 13. Efecto de la concentración de sacarosa en la velocidad de reacción de las enzimas producidas por la cepa EPS B. La cantidad de enzima se ajustó a 0.5 U/mL. Las reacciones para medir actividad enzimática tuvieron una duración de 15 min y se monitoreo cada 3 min.

8.2.2.5. Electroforesis de proteínas

Los extractos crudos de enzimas fueron analizados por electroforesis en gel SDS-PAGE. Los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos en el ensayo de actividad “*in situ*” (zimograma). Como se muestra en la Figura 14, el patrón electroforético de los extractos celulares presenta varias bandas (carriles 2 y 3). En base a los resultados del zimograma, se deduce que las bandas correspondientes a un peso molecular mayor a 200 kDa y 150 kDa para la cepa EPS A y EPS B respectivamente, son las responsables de la producción de polímero. En los carriles 4, 5, 8 y 9 se observa una sola banda

perteneciente a las enzimas extracelulares de las cepas EPS A y B, con pesos moleculares de 200 kDa y 150 kDa respectivamente.

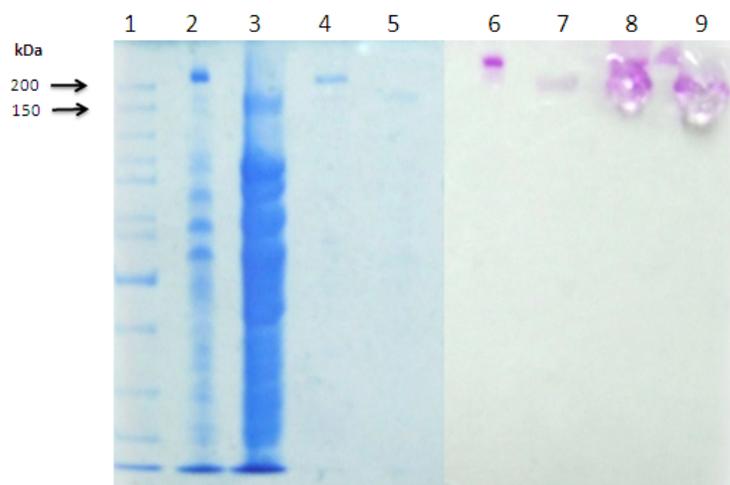


Figura 14. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se comparan los resultados obtenidos del gel teñido con azul de Coomassie y el zimograma de actividad. 1) Marcador de peso molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder 200kDa, 2 y 6) células de EPS A, 3 y 7) células de EPS B, 4 y 8) enzima extracelular de EPS A, 5 y 9) enzima extracelular de EPS B.

Se ha reportado que la enzima asociada a células de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ tiene un peso molecular de 166 kDa (Chellapandian *et al.*, 1998). La enzima extracelular producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F tiene un peso de 170 kDa (Naessens *et al.*, 2005). Teniendo estos antecedentes podemos concluir que los resultados experimentales en este trabajo se encuentran cercanos a los valores obtenidos anteriormente.

8.3. Caracterización del polímero

8.3.1. Análisis de la estructura química por RMN ^{13}C y ^1H

La determinación estructural de polisacáridos implica normalmente un análisis por métodos estándar de RMN, combinado con métodos químicos y técnicas de espectrometría de masas; sin embargo, se ha reportado que hay varias maneras de llevar a cabo el análisis de la estructura primaria de los polisacáridos utilizando únicamente espectroscopia de RMN (Duus *et al.*, 2000). En este trabajo los resultados obtenidos del análisis estructural de los EPS por las técnicas espectroscópicas RMN ^{13}C y RMN ^1H fueron comparados con datos reportados en la literatura (Pretsch *et al.*, 2009).

En la Figura 15, se muestra la estructura numerada del anómero α de la D-glucosa que se usó como marco de referencia para el análisis de los resultados.

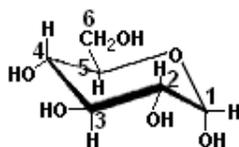


Figura 15. Estructura en forma de silla del anómero α del residuo D-glucosa.

En las Figuras 16 y 17 se presentan los espectros de RMN ^1H para el EPS producido por la enzima liberada al sobrenadante y el EPS asociado a células de la cepa EPS B respectivamente.

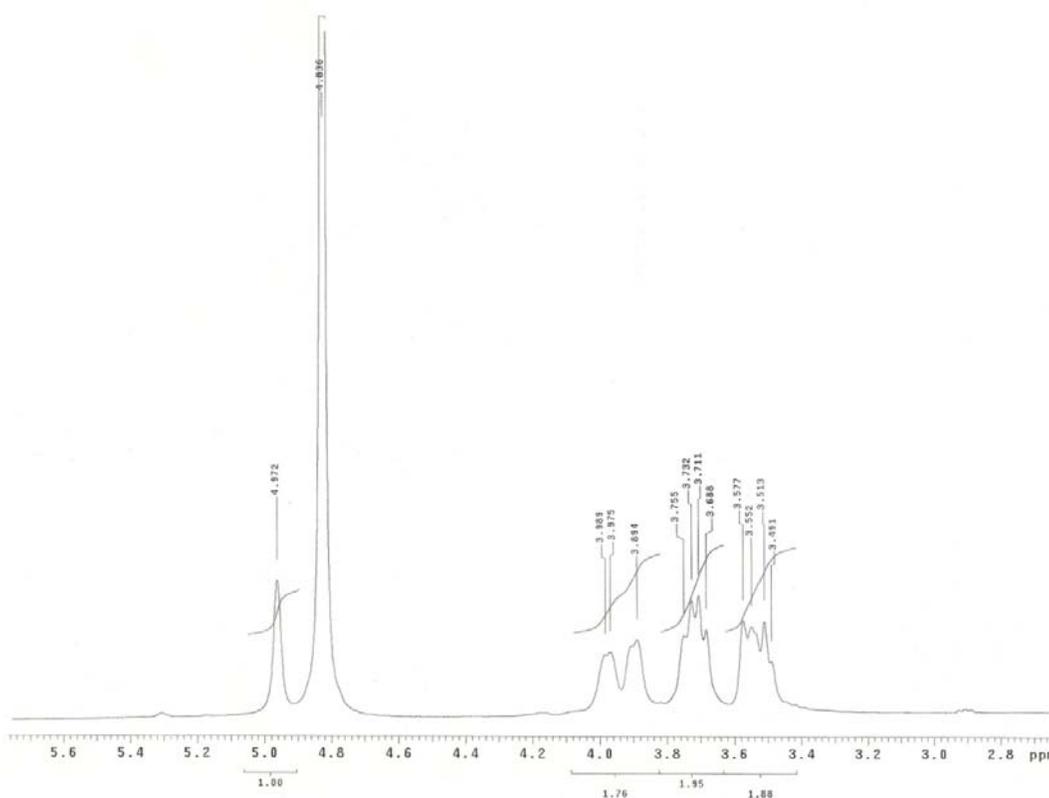


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero sintetizado por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B.

El patrón de señales es similar al reportado para una dextrana lineal con enlaces $\alpha(1-6)$ y algunas ramificaciones en $\alpha(1-3)$ (Maina *et al.*, 2008). Las señales en la región de 3.4 a 4 ppm corresponden a los hidrógenos de los carbonos C2, C3, C4, C5 y los protones correspondientes al C6 de la glucosa.

La señal intensa en 4.8 corresponde al agua que se utilizó para disolver las muestras. Las señales en 4.9 y 5.3 ppm corresponden a los protones anoméricos de los enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$ respectivamente. El patrón de intensidades para los protones anoméricos es similar al reportado por Bounaix *et al.*, 2009, para la dextrana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F, en la cual determina que tiene un 95% de enlaces $\alpha(1-6)$ y 5% de enlaces $\alpha(1-3)$. Por lo que se puede concluir que las enzimas de la cepa EPS B sintetizan un polímero con características semejantes.

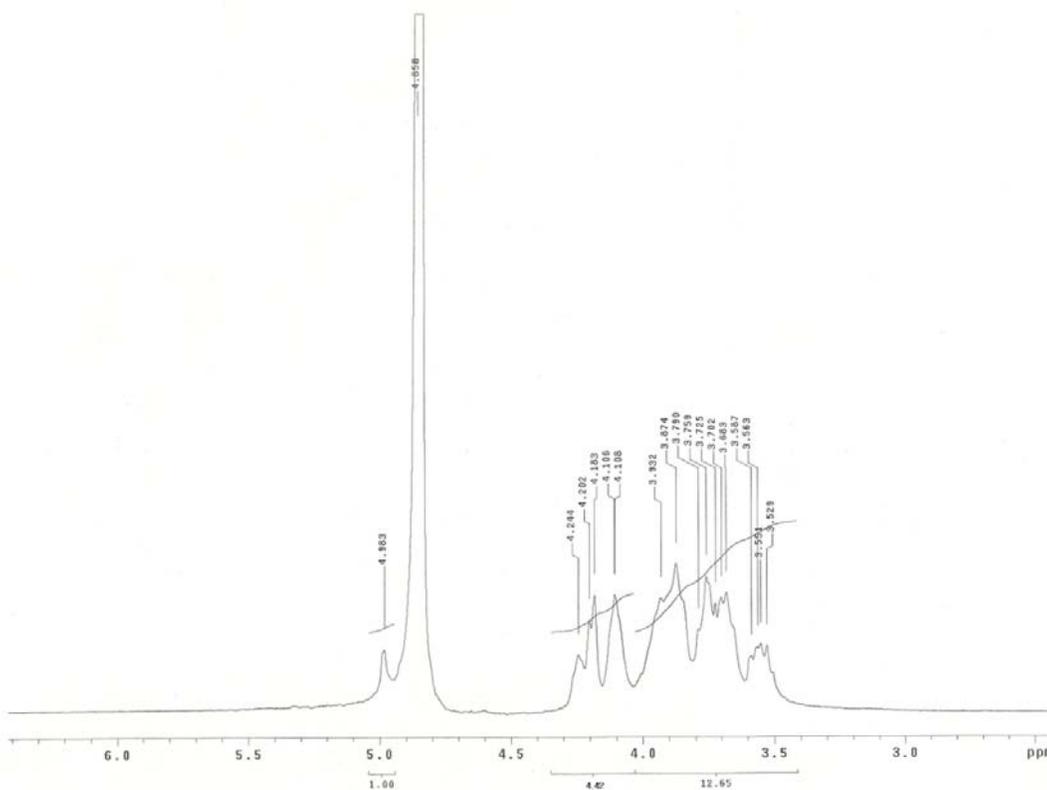


Figura 17. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero asociado a las células de la cepa EPS B.

En el espectro de RMN ^{13}C para el EPS producido por la enzima liberada al sobrenadante se obtuvieron 6 señales, que corresponden a los 6 carbonos de la glucosa. Los desplazamientos químicos se presentan en la columna Bs de la Tabla 7. Se puede observar que son similares a los desplazamientos reportados para la dextrana lineal producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Con base en los resultados publicados por Maina *et al.*, 2008, los desplazamientos químicos en 73.43, 71.42, 70.20, 69.53 y 65.52 ppm corresponden a los carbonos C3, C2, C5, C4 y C6 respectivamente.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN ¹³C para diversos polímeros. a, Dextrana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F. b, Dextrana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-1299. c, Alternana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Bs, polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B. Bc, polímero producido por la enzima asociada a las células de la cepa EPS B. As, polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS A. Ac, polímero producido por la enzima asociada a las células de la cepa EPS A. (Uzochukwu *et al.*, 2002; Bounaix *et al.*, 2009).

Dextrana lineal con enlaces α(1-6) ^a	Dextrana con enlaces α(1-6) y α(1-2) ^b	Dextrana con enlaces alternados α(1-6) y α(1-3) ^c	Inulina ^d	Bs	Bc	As	Ac
			103.6		103.67		102.57
							102.33
							102.09
		100.55					100.75
							100.39
		99.02					98.93
98.53	98.71	98.93				98.29	~98
	97.24			97.71	97.72	96.91	
	96.36					96.03	
		81.6	81.8		81.09		81.33
					80.36		
			77.5				~78
	76.47				76.72	76.22	
					76.23		75.99
							75.51
							75.38
74.23	74.3	74.36			74.29	73.97	74.17
	73.86			73.43	73.44		
	72.77						72.83
72.23	72.34	72.62					72.1
	71.17			71.42	71.5		
71.01		71.16				71.96	
						70.71	
70.35	70.41	70.62		70.2	70.16	70.08	
				69.53	69.56		69.31
							68.46
66.35	66.61	66.13		65.53	65.55	66.32	
					63.49		63.24
			62.7		62.49		
	61.38	61.35	61.4		62.27	61.05	
					60.45		
					59.97		

Los resultados de este trabajo muestran una diferencia de 0.8 ppm. Se ha reportado que los carbonos anoméricos β , se ubican en 102 ppm mientras que los α se encuentran alrededor de 97-98 ppm. Por esta razón se concluye que el tipo de enlace de este polímero es de tipo $\alpha(1-6)$.

El espectro de ^{13}C para el EPS producido por la enzima asociada a células muestra un mayor número de señales comparado con el espectro de ^{13}C para la dextrana producida por la enzima liberada al sobrenadante, esto sugiere la presencia de una mezcla de polímeros. Los datos se presentan en la columna Bc de la Tabla 7.

Las señales en 97.72, 73.44, 71.50, 70.16, 69.56 y 65.55 ppm pueden ser asignadas a una dextrana lineal de características similares a la producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Se ha reportado que *L. citreum* tiene la capacidad de sintetizar inulina por acción de una enzima que se encuentra asociada a células (Olivares-Illana *et al.*, 2002). Basados en este antecedente relacionamos las señales en 103.67, 81.09 y 60.45 ppm con la presencia de inulina (polímero de residuos D-fructosil en enlace $\beta(2-1)$) en la mezcla de polímeros producidos por la enzima asociada a células por la cepa EPS B.

La cepa EPS B libera una enzima dextransacarasa al sobrenadante que sintetiza una dextrana lineal con enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$; sin embargo, posee dos enzimas asociadas a células: 1) una dextransacarasa que sintetiza una dextrana lineal con enlaces $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-3)$ y; 2) una inulosacarasa que sintetiza inulina.

En las Figuras 18 y 19 se presentan los espectros de RMN ^1H para el EPS producido por la enzima liberada al sobrenadante y para el EPS producido por la enzima asociada a células de la cepa EPS A respectivamente.

En los espectros se observan cuatro señales en la región anomérica con un patrón similar al reportado para una dextrana con una cadena principal de glucosas enlazadas en $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en $\alpha(1-2)$ (Maina *et al.*, 2008; Bounaix *et al.*, 2009). La señal en 5.31 corresponde al protón anomérico del carbono en enlace $\alpha(1-3)$. Las señales en ~ 5.16 y 5.10 corresponden a los protones del C1 de un residuo D-glucopiranosil y del C2 de otro residuo D-

glucopiranosil en enlace $\alpha(1-2)$. La señal en 4.97 ppm corresponde al protón anomérico del C1 en enlace $\alpha(1-6)$.

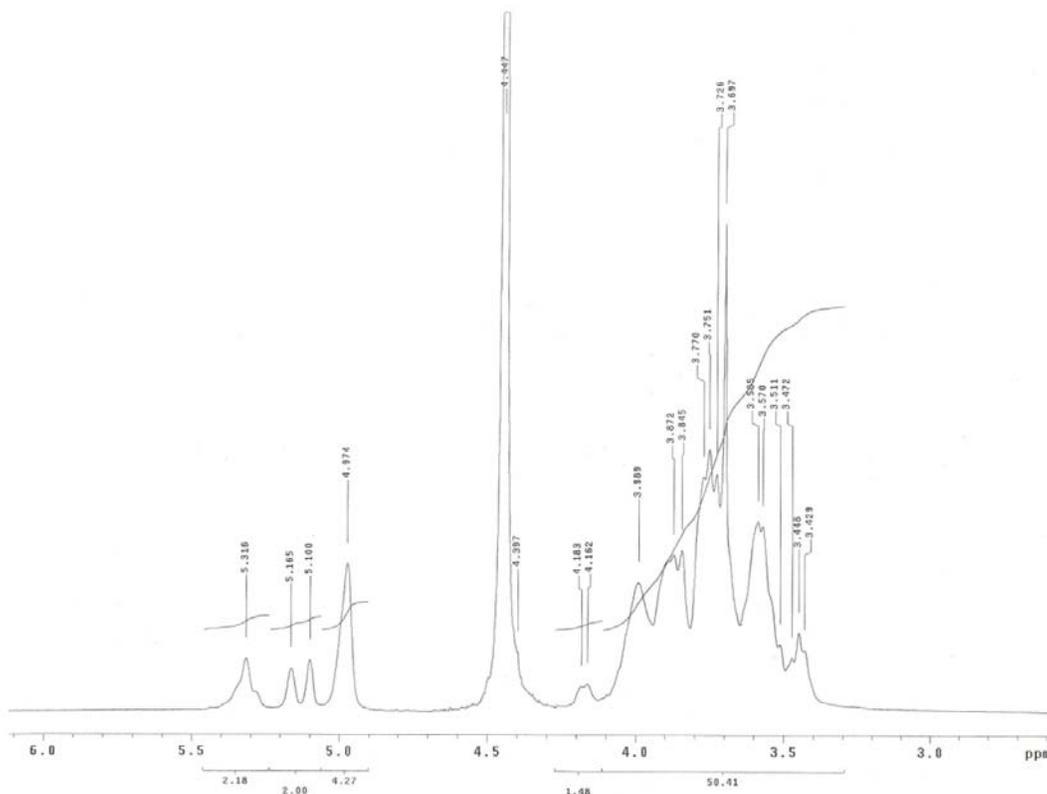


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , 60°C) del polímero liberado al sobrenadante por la cepa EPS A.

La intensidad de la señal ubicada en 5.3 es mucho mayor que la observada en los espectros de los polímeros producidos por la cepa EPS B. Esto nos permite inferir que el polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS A tiene muchas más sustituciones en la posición 3 que los producidos por la cepa EPS B.

En la columna As de la Tabla 7 se presentan los desplazamientos químicos obtenidos en el análisis de RMN ^{13}C para el EPS producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS A. Estos resultados son muy similares a los desplazamientos químicos reportados para la dextrana con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en $\alpha(1-2)$ producida por *L. citreum* (Maina *et al.*, 2008; Bounaix *et al.*, 2009) y por *L. mesenteroides* NRRL B-1299 (Seymour *et al.*, 1979). De acuerdo a los desplazamientos químicos reportados por Maina *et al.* (2008), se asignaron las señales en 98.29, 96.91 y 96.03 ppm a los

carbonos anoméricos en enlace $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-2)$. La señal del carbono en posición 2 del residuo D-glucopiranosil en enlace $\alpha(1-2)$, se encuentra en 76.22 ppm.

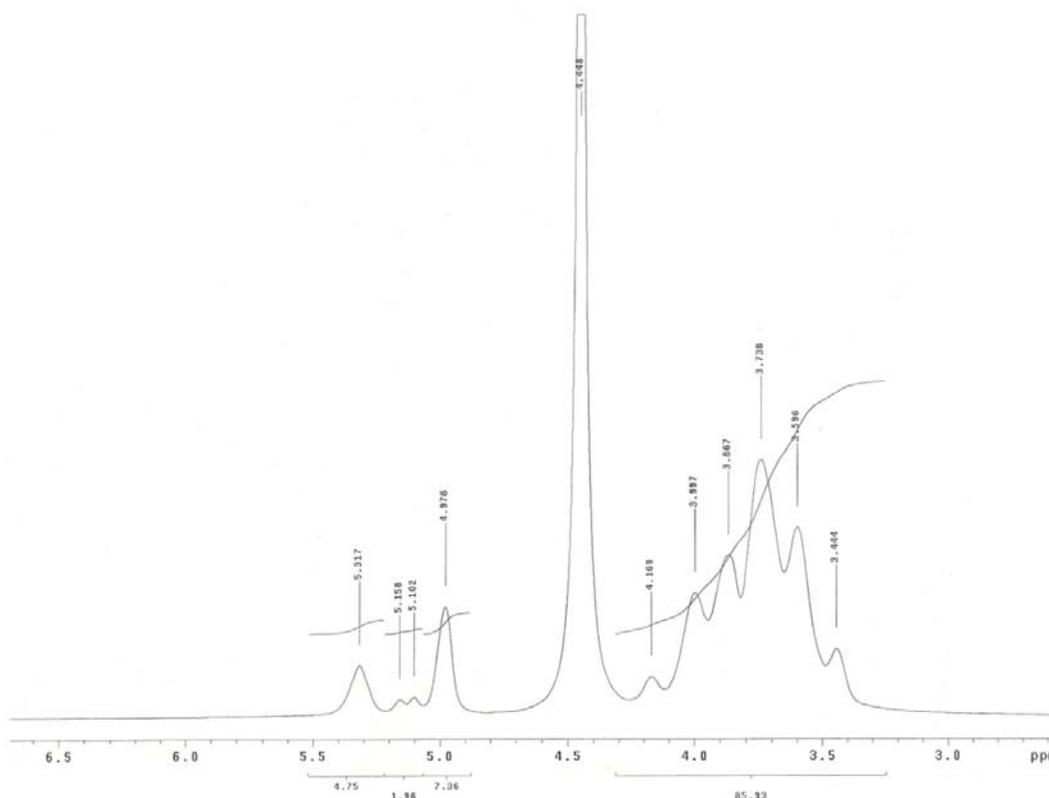


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_2O , 60°C) del polímero asociado a las células de la cepa EPS A.

Los datos obtenidos en el espectro de RMN ^{13}C para el EPS asociado a células de la cepa EPS A se muestran en la columna As de la tabla 7. El número de señales observadas en este espectro comparado con el espectro del polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante, proponen la presencia de una mezcla de polímeros. Algunas de las señales coinciden con las reportadas para la dextrana con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificaciones en $\alpha(1-2)$ por producida por *L. mesenteroides* NRRL B-1299. De acuerdo a los datos reportados por Maina *et al.* (2008) y Bounaix *et al.* (2009), las señales con desplazamiento químico de 100.39, 98.93, ~ 98 ppm son asignadas a los carbonos anoméricos en enlace $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-2)$. La señal del carbón en la posición 2 del enlace $\alpha(1-2)$ se encuentra en ~ 78 ppm. Según los resultados reportados por Olivares-Illana *et al.* (2002), para la inulina producida por *L.*

citreum CW28, las señales encontradas en 102, 81.33 y 63.24 ppm son características de este tipo de polímeros, lo que confirma la suposición de tener una mezcla de polímeros.

El análisis espectroscópico de ^1H y ^{13}C para los polímeros de la cepa EPS A, proponen que el microorganismo libera una enzima dextransacarasa al sobrenadante que sintetiza una dextrana con una cadena principal de residuos D-glucopiranosil unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ y ramificada por enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-2)$. Pero los resultados del polímero producido a partir de la enzima asociada a células, muestran una mezcla de la dextrana descrita anteriormente e inulina.

Es muy probable que ambas cepas de *L. citreum* produzcan los dos tipos de polímeros, puesto que se ha reportado que este microorganismo posee enzimas para sintetizar tanto polímeros de glucosa como de fructosa (Olivares-Illana *et al.*, 2002; Maina *et al.*, 2008; Bounaix *et al.*, 2009). El hecho de tener una mezcla de polímeros en las muestras Ac y Bc, sugiere que en el extracto celular se encuentra también una mezcla de enzimas, dextransacarasa e inulosacarasa. Por esta razón la caracterización enzimática realizada a estos extractos es una mezcla de ambas enzimas.

De acuerdo a estos resultados, era de esperarse poder ver dos bandas en el ensayo de actividad "*in situ*" para los extractos celulares; sin embargo, en estudios reportados del análisis de mezclas de enzimas, se ha observado que la inulosacarasa se encuentra en muy bajas concentraciones. Esto puede explicar la presencia de una sola banda. Por otro lado, se puede pensar que las enzimas tienen el mismo peso molecular y no se definen durante la electroforesis.

El único polisacárido asociado hasta el momento a la viscosidad del pulque es la dextrana producida por *L. mesenteroides*. Se había pensado que la presencia de polímeros de tipo fructanas en pulque, se debía a que al raspar la piña del maguey para extraer el aguamiel, se arrastraban residuos de inulina o levana pertenecientes a la planta. Recordando que las cepas EPS A Y EPS B fueron aisladas de muestras de agua miel y pulque y de acuerdo a los resultados obtenidos por RMN, podemos concluir que *L. citreum* contribuye a la

producción de dextrana durante la fermentación del pulque, pero además es productor de inulina.

8.3.2. Análisis reológico

Se realizó el análisis reológico de los polímeros sintetizados “*in vitro*”, con excepción del polímero sintetizado por la enzima asociada a células de la cepa EPS B, por la escasa producción. Así mismo, se obtuvieron los reogramas para dos dextranas comerciales sintetizadas por *L. mesenteroides* B-512F de peso molecular 69 y 500 kDa, con la finalidad de comparar con los polímeros sintetizados “*in vitro*”.

Las características reológicas para los polímeros en solución se presentan en la Tabla 8. Se determinó el comportamiento de cada uno de los polímeros con base en el índice de flujo (n) e índice de consistencia (K), utilizando la ley de la potencia.

Tabla 8. Propiedades reológicas para polímeros con comportamiento no newtoniano.

Polímero*	K (mPa*s ⁿ)	n (-)
Ac	4.05	0.91
Bs	13.66	0.92
As	-	1
D69	-	1
D500	-	1

*solución de polímero a 20mg/mL.

Como puede observarse en la Figura 20, el polímero producido por la enzima asociada a células de la cepa EPS A (Ac) y el polímero producido por la enzima liberada por la cepa EPS B (Bs) presentan un comportamiento no newtoniano, de tipo pseudoplástico ($n < 1$), es decir, estos fluidos disminuyen su viscosidad conforme aumenta la velocidad de deformación (ver Bs y Ac). De acuerdo al índice de consistencia (K), Bs produce soluciones más espesas que Ac.

El polímero liberado al sobrenadante por la cepa EPS A (As) así como las dextranas comerciales de peso molecular de 500kDa y 69kDa (D500 y D69 respectivamente) presentaron un comportamiento de tipo newtoniano ($n=1$). Como se observa en la Figura 20, estos fluidos no cambian su viscosidad conforme se aumenta la velocidad de deformación. Por tanto la viscosidad

determinada a 25°C para estos polímeros se presenta en la Tabla 9. El polímero As presenta una viscosidad similar a la dextrana de alto peso molecular.

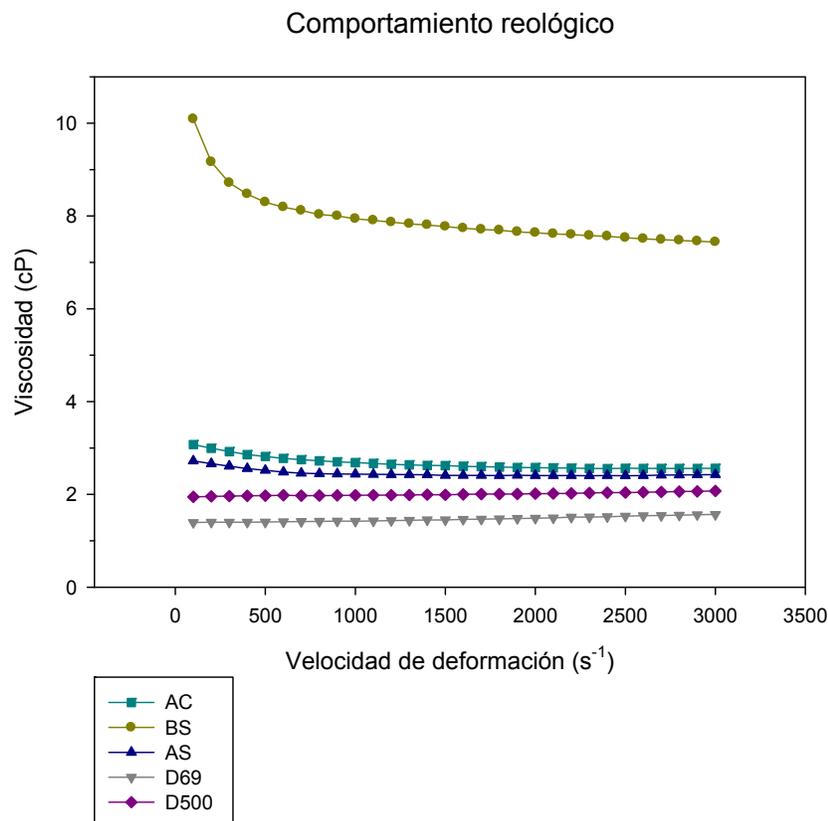


Figura 20. Comportamiento reológico de los polímeros en solución (20 mg/mL) sintetizados por las cepas EPS A y B. AS) Polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS A. BS) Polímero producido por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B. AC) Polímero producido por la enzima asociada a las células de la cepa EPS A. D69) Dextrana comercial sintetizada por *L. mesenteroides* B-512F de peso molecular 69 kDa. D500) Dextrana comercial sintetizada por *L. mesenteroides* B-512F de peso molecular 500 kDa.

Tabla 9. Coeficientes de viscosidad a 25°C.

Polímero	Viscosidad (cP)
As	2.39
D500	2.06
D69	1.57

A partir de los análisis de RMN se dedujo que Bs es una dextrana lineal que presenta un comportamiento no newtoniano; sin embargo, las dextranas comerciales son lineales y tienen un comportamiento de tipo newtoniano. Por

otra parte, el polímero As es de tipo ramificado y tuvo un comportamiento similar a las dextranas lineales comerciales analizadas en este trabajo. Los análisis de RMN ^{13}C mostraron que Ac es una mezcla de inulina con una dextrana ramificada. La mezcla se comporta como un fluido pseudoplástico. Con estos resultados no se puede establecer una relación entre la estructura de los polímeros y su comportamiento reológico.

El cambio de comportamiento reológico del aguamiel a pulque, es de tipo newtoniano a no newtoniano. Esto puede deberse al aumento de la concentración de EPS de tipo no newtoniano sintetizado por las bacterias ácido lácticas durante la fermentación. (Tecante y López-Munguía, 1986; Majumder y Goyal, 2009).

8.3.3. Análisis por MEB de los cultivos de las cepas EPS A y EPS B.

Al crecer las cepas en placas de medio APT + 20% de sacarosa se observó la producción de polímero, a diferencia del crecimiento en ausencia de sacarosa. Con la finalidad de establecer la morfología del crecimiento y la relación que existe entre las células y el polímero producido por cada cepa, se realizó el análisis por MEB de cada cultivo. En las Figuras 21 y 22 se presentan las imágenes obtenidas para la cepa EPS A y EPS B respectivamente. Como era de esperarse se observan conjuntos de bacterias con morfología coco, asociados en parejas (diplococos).

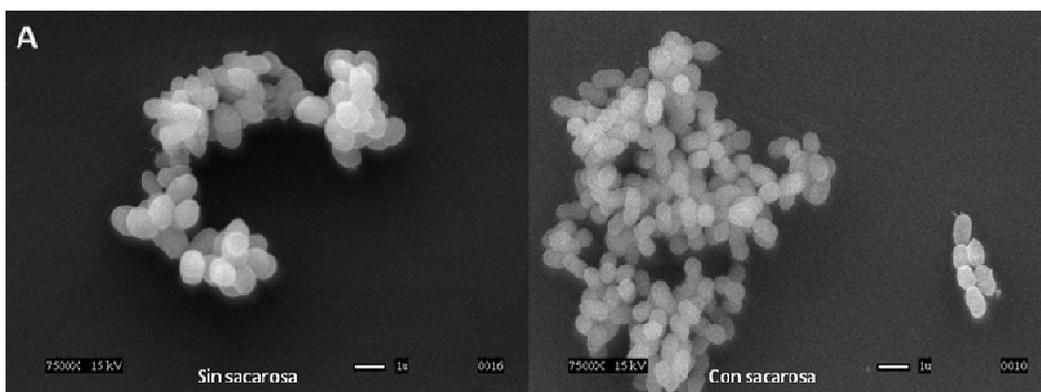


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido de la cepa EPS A después de 10 h de cultivo con y sin sacarosa (20% v/v). Imágenes x 7500 referencia 1 μm .

Se pensó que el promover la producción de polímero con sacarosa, resultaría en un cultivo mucho más compacto; sin embargo, los resultados

muestran que los conglomerados formados tienen las mismas características. El polímero puede ser sintetizado en diversos ambientes con numerosos objetivos. Entre ellos, crear consorcios con otros microorganismos con el propósito de hacer más eficiente el metabolismo o contrarrestar la concentración de sacarosa en el medio para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

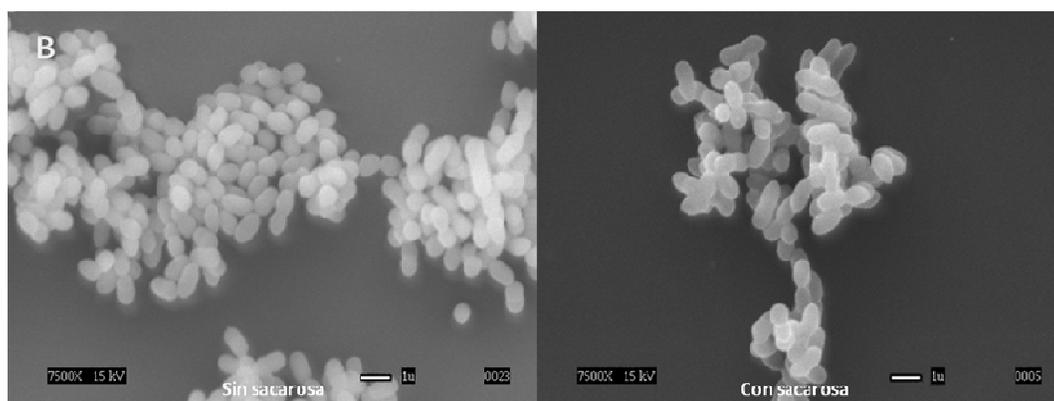


Figura 22. Microscopía electrónica de barrido de la cepa EPS B después de 10 h de cultivo con y sin sacarosa (20% v/v). Imágenes x 7500 referencia 1µm.

La resolución de las imágenes dificulta la observación del polímero. La minúscula diferencia en el tamaño celular de los cultivos con y sin sacarosa, nos permite pensar que el polímero que producen ambas cepas forma una especie de matriz que las recubre dándoles una apariencia “aterciopelada” y ligeramente más voluminosa. En algunas zonas se pueden observar pequeños filamentos que probablemente también sea polímero. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis de RMN, donde se dedujo que cada cepa producía dos polímeros, dextrana e inulina. A pesar de las diferencias encontradas en la estructura química y comportamiento reológico de los polímeros producidos por las cepas EPS y EPS B, los cultivos presentan similitudes morfológicamente.

9. CONCLUSIONES

Los EPS producidos por las cepas de *L. citreum* EPS A y EPS B mostraron propiedades estructurales y fisicoquímicas diferentes a los previamente reportados para el pulque.

La extracción de células y enzimas del medio de cultivo para la producción de polímeros en el caso de la cepa EPS A se realizó a las 4 y 6 h de fermentación respectivamente. En el caso de la cepa EPS B, la cosecha se realizó a las 6 h para ambas enzimas. Estos tiempos garantizan la extracción de enzimas que aún no se encuentran desnaturalizadas, además de asegurar que aún no hay producción de enzimas de tipo proteolítico que afecten el producto.

La caracterización bioquímica de las enzimas en términos de V_{max} y K_m aparente mostraron que las enzimas no son inhibidas por altas concentraciones de sacarosa y que tanto las enzimas liberadas como asociada a células presentan una afinidad similar para ambas cepas. Las condiciones óptimas en las que se llevó a cabo la producción de polímero fueron 30°C, pH 5.4 y condiciones de saturación de sustrato.

El análisis de la composición química de los EPS producidos por las enzimas asociadas a células para ambas cepas mostró que poseen dos enzimas activas en presencia de sacarosa, una dextransacarasa y una inulosacarasa. El análisis reológico de los EPS demostró que el polímero sintetizado por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B posee un índice de consistencia muy por encima de los demás EPS. Esto indica que esta cepa puede colaborar de manera considerable al comportamiento reológico del pulque.

Hasta el momento solo se había reportado que *L. mesenteroides* era el responsable de la producción de polímeros en el pulque; sin embargo, los resultados de este trabajo nos permite concluir que las cepas EPS A y EPS B de *L. citreum* también son responsables de esta característica, ya que sintetizan dextranas de tipo lineal y ramificado además de inulina.

Otra conclusión obtenida en este trabajo del análisis por MEB es que los EPS por estas bacterias no parecen tener influencia en la asociación bacteriana.

10. PERSPECTIVAS

- Medir actividad enzimática en extractos enzimáticos obtenidos de cultivos en ausencia de sacarosa para verificar que el control de la síntesis de enzimas es inductivo.
- Realizar el análisis “*in situ*” de las enzimas asociadas a células, utilizando como sustrato D-rafinosa para corroborar la presencia de fructosiltrasferasas.
- Realizar el tratamiento enzimático de los polímeros con dextranasas y/o inulinasas así como el análisis de los productos de reacción para confirmar la producción de polímeros de tipo glucana y fructana por las cepas EPS A y EPS B de *L. citreum*.
- Identificar los genes que codifican las enzimas que producen las cepas EPS A y EPS B tanto de tipo glucosil como fructosiltrasferasas.
- Realizar el análisis reológico de los polímeros con un procedimiento oscilatorio que permita relacionar la estructura con su comportamiento.

11. BIBLIOGRAFÍA

Behera S, Chandra M R, Mohanty C, Chandra R R. 2010. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *Appl Energ* **87**: 2352-2355.

Bounaix M-S, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Simeón M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C. 2009. Biodiversity of exopolisaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* **57**: 10889-10897.

Bounaix, M-S, Gabriel V, Robert H, Morel S, Remaud-Simeón M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C. 2010. Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *Int J Food Microbiol* **144**:1-9.

Cervantes-Contreras M, Pedroza-Rodríguez A M. 2007. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* **5**:101-212.

Chellapandian M, Larios C, Sánchez-González M and López-Munguía A. 1998. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *J Ind Microbiol Biot* **21**: 51-56.

Conca M. 2008. Aislamiento e Identificación de Cepas de Bacterias Lácticas Productoras de Nuevos Polisacáridos Extracelulares del Pulque. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM Pp. 38-70.

Dols M, Remaud-Simeon M, Willemot R-M, Vignon M, F Monsan P. 1997. Characterization of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl Biochem and Biotechnol* **62**: 47-59.

Duus J Ø, Gotfredsen C H, Bock K. 2000. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chem Rev* **100**:4589-4614.

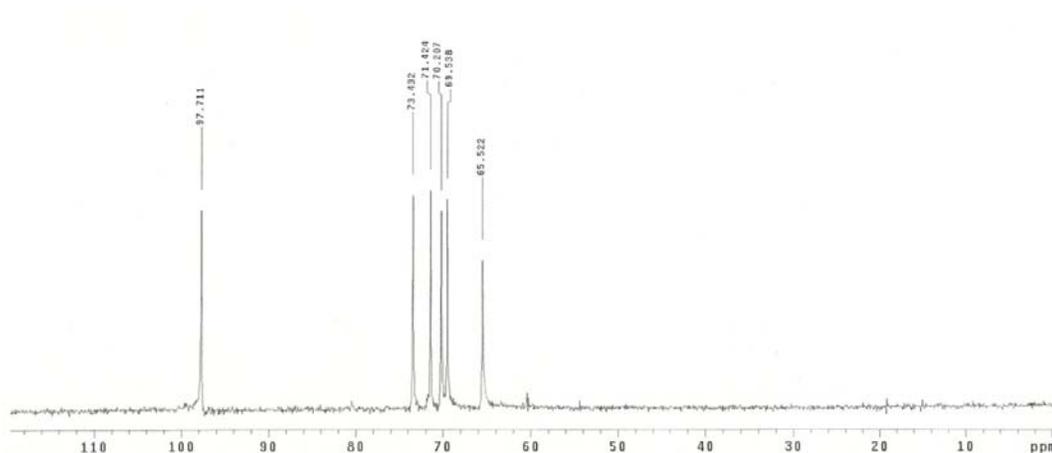
- Escalante A, Flores M E, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* **235**: 273–279.
- Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, González F, Córdova M, López-Munguía A, Gosset G, Bolívar F. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of *pulque*, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* **124**: 126-134.
- Encizo A. 2008. Selección y caracterización de mutantes de la inulosacarasa de *L. citreum*, para la producción de fructooligosacáridos. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Pp. 7-17, 30-35.
- García-Garibay M, López Munguía A. 1993. Bebidas alcohólicas no destiladas. En: *Biología Alimentaria* (García-Garibay M, Quintero-Ramírez R, López-Munguía A, eds), Pp. 263–311, Limusa, México, DF.
- Geel-Shutten G H Van, Faber E J, Smit E, Bonting K, Smith M R, Ten Brink B, Kamerling J P, Vliegthart J F G and Dijkhuizen L. 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strain. *Appl Environ Microbiol* **5**: 3008-3014.
- Kim D and Robyt J F. 1994. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microbi Technol* **16**: 1010-1015.
- Kiran P R and Goyal A. 2008. Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using static approach. *Bioresource Technol* **99**: 7108-7114.
- Kiran P R and Goyal A. 2009. Optimization of condition of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 for production of a dextransucrase and its assay. *J Food Biochem* **33**: 218-231.
- Kiran P R, Goswami P, Taleb K A, Goyal A. 2009. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydr Polym* **76**: 30-35.

- Laemmli U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee Y K. 2006. Bioprocess Technology. En: *Microbial Biotechnology Principles and Applications* (Lee Y K ed), pp: 32, Word Scientific, 2da Edición, Singapore.
- López A, Monsan P. 1980. Dextran synthesis by immobilized dextran sucrase. *Biochemie* **62**:323-9.
- Maina N H, Tenkanen M, Maaheimo H, Juvonen R and Virkki L. 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confuse*. *Carbohydr Res* **343**:1446–1455.
- Majumder A, Goyal A. 2008. Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Food Res Int* **42**: 525-528.
- Monchois V, Willemot R-M, Monsan P. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 131-151.
- Morales A S. 2007. Estudio de una fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B15F: Clonación, producción y análisis de la estructura-función. Tesis de doctorado, Instituto de Biotecnología, UNAM Pp: 40-70.
- Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandame J E. 2005. Review *Leuconostoc* dextran sucrase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Technol Biot* **80**: 845-860.
- Núñez M, Méndez M G, Solorza J. Introducción a la Reología. Instituto Politécnico Nacional, 1a edición. México, 2001. pp:8-14, 23-45, 49-57.
- Olivares V. 1998. Caracterización de glicosiltransferasas de 15 diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de pozol. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM Pp: 5-19,32-50.
- Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgue S and López Munguía A. 2002. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from *Pozol*, a novel fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microbiol Biot* **28**: 112-117.

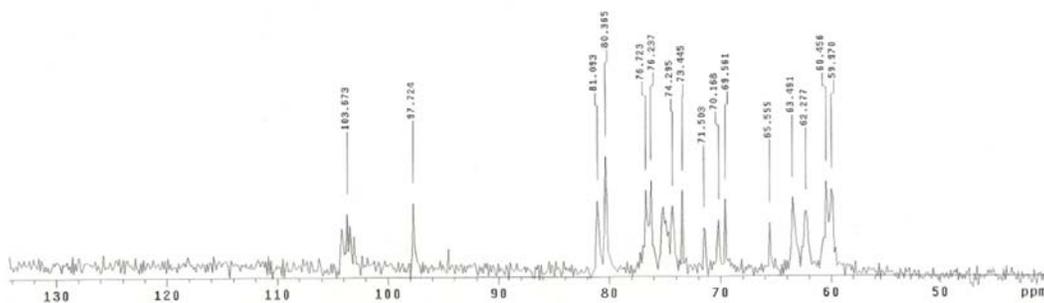
- Olvera C, Castillo E, López-Munguía A. 2008. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. En: Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología, UNAM. Pp: 327-345.
- Pace G W. 1991. Polímeros microbianos. En: Biotecnología Básica (Bu'Lock J, Kristiansen B, eds), pp: 449, 453, 454, Acribia S A, 1a edición, España.
- Patel S, Kasoju N, Bora U, Goyal A. 2010. Structural analysis and biomedical applications of dextrana produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. *Bioresource Technol* **101**: 6852-6855.
- Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. 2009. Structure determination of organic compounds, Springer, 4ta edición, Alemania. Pp: 148-150, 235-237.
- Quirasco M, 1997. Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosiltransferasa. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM Pp:2-40.
- Ramírez R. R.. 2007. La representación popular del maguey y el pulque en las artes *Cuicuilco*. Escuela Nacional de Antropología e Historia México **14**: 115-149.
- Robyt J F, Kimble B K and Walseth T F. 1974. The mechanism of dextransucrase action. *Archiv Biochem Biophys* **165**: 634-640.
- Robyt J F, Seung-Heon Y, Mukerjea R. 2008. Dextransucrases and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydr Res* **343**: 3039-3048.
- Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán C G. 2005. Interview Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **88**: 843-856.
- Sánchez-Marroquín A. 1967. Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. *Rev Lat Microbiol Parasit* **9**: 87-90.

- Sánchez-Marroquín A, Larios C and y Vierna L.1967. Estudios sobre la microbiología del pulque XIX. Elaboración de la bebida mediante cultivos puros. Rev Lat Microbiol Parasit **9**: 83–85.
- Seymour F R, Knapp R D, Bishop S H, Jeanes A. 1979. High temperature enhancement of ^{13}C -N.M.R. chemical-shifts of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis. Carbohyd Res **68**: 123–140.
- Shimamura A, K Tsuboi, N.T. Nagase, M. Ito, H. Tsumori and H. Mukasa. 1987. Structural determination of D- fructans from *Streptococcus mutans*, serotype d, c, e, and f strains, by ^{13}C -NMR spectroscopy. Carbohyd Res **165**: 150–154.
- Sprenger G. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol Lett **145**: 301-307.
- Sutherland I W 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. Biotechnol Adv **12**: 393-448.
- Tecante A, López-Munguía A. 1986. Rheological characterization of dextran-enzymatic synthesis media. J Appl Polym Sci **31**: 2337-2350.
- Tieking M, Gänzle M G. 2004. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. Trends in Food Sci Tech **16**: 79-84.
- Uzochukwu S, Balogh E, Loeffler R T, Ngoddy P O. 2002. Structural analysis by ^{13}C - nuclear magnetic resonance spectroscopy of glucan extracted from natural palm wine. Food Chem **76**: 287-291.
- Vasileva T, Bivolarski V, Ivanova I and Iliev I. 2010. Some aspects of carbohydrate metabolism and production of glycosyltransferases from mutant strain *Leuconostoc mesenteroides* M2860. Biotechnol Biotechnol Eq **24**: 571-575.
- Veljkovic V B and Lazic M L. 1988. Studies on dextran fermentation broth rheology. Enzyme Microb Technol **10**: 686-688.

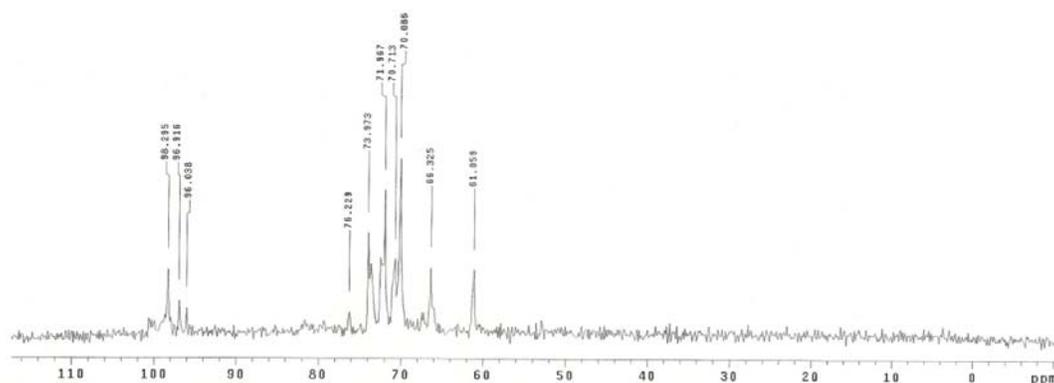
APÉNDICES

APÉNDICE I. Espectros de RMN ^{13}C de los polímeros producidos por las cepas EPS A y EPS B.

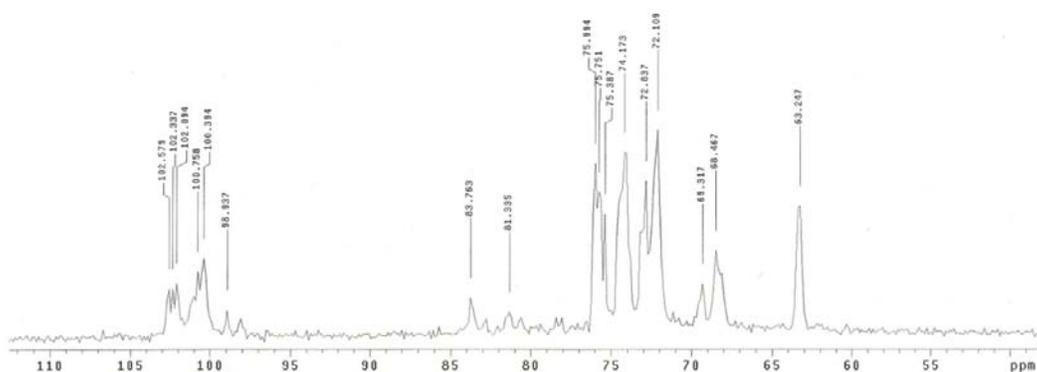
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero sintetizado por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS B.



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , temperatura ambiente) del polímero sintetizado por la enzima asociada a células de la cepa EPS B.



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , 60°C) del polímero sintetizado por la enzima liberada al sobrenadante por la cepa EPS A.



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , 60°C) del polímero sintetizado por la enzima asociada a células de la cepa EPS A.

APÉNDICE II. Medios de cultivo, soluciones, técnica DNS.

Preparación de sacarosa al 60%

La sacarosa adicionada a los medios de cultivo se esterilizó en sistemas de filtración Millipore Stericup Φ 0.22 μm .

Buffer de acetatos 0.1M pH 5.4. Sol. A 4.4 mL. Sol B 20.6 mL. Llevar a 100 mL con H_2O .

Solución A: Ácido glacial 11.55 mL/L.

Solución B: Acetato de potasio 19.6 g/L.

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
Fosfato dipotásico	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.

Caldo/ Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe):**Composición (g / litro):**

Peptona de proteosa No.3	10.0
Extracto de Res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Fosfato dipotásico	2.0
Sulfato de magnesio	0.05

pH final 6.5±0.2.

Disolvente: H₂O

Medio natural muy rico que contiene polisorbato, acetato, magnesio y manganeso que actúan como factores de crecimiento para muchos lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas.

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 100 mL 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:

Preparación de la curva de calibración:

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 min en ebullición, enfriar 5 minutos en hielo.

3. Agregar 0.5 mL de agua destilada y leer absorbancia a 540 nm.

Se realiza una curva estándar cada vez que se realizan determinaciones de muestras.

Solución fijadora para MEB

Para preparar 50 mL de solución fijadora, se mezclan 36.96 mL de fosfato de sodio dibásico 100 mM y 10.12 mL de fosfato de sodio monobásico 100 mM, se ajusta el pH a 7.4 y finalmente se agregan 6 mL de glutaraldehído al 50%.