

03072  
7  
Leje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA  
DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**PROYECTO ACADÉMICO  
DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**SEDE FACULTAD DE QUÍMICA**

**METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN  
*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
PRODUCTORA DE EXOPOLISACÁRIDOS**

**TESIS**  
que para obtener el grado de  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**  
presenta el  
**Biólogo José Adelfo Escalante Lozada**

**México, D. F.  
1994**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

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

El Comité Tutorial de este proyecto estuvo formado por los siguientes investigadores:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
M. en C. Ma. del Carmen Wachter-Rodarte  
M. en C. Mariano García-Garibay  
Dr. Alberto Tecante Coronel

Durante este trabajo se contó con el apoyo de beca de DGAPA.

A Martha,  
la mujer, la amiga y la compañera de mi vida,  
con todo mi amor.

A mis padres, por su apoyo y paciencia.

A Toño, Beto, Sergio y Rodri.  
Espero que este trabajo les sirva como un ejemplo a seguir en su vida.

Amelia Farrés.  
Gracias una vez más por tu apoyo, confianza y sobre todo por tu amistad  
y consejo en esos tiempos de duda y decisión en esta nueva parte de mi vida.

Agradezco de manera muy especial a Carmen Wachter-Rodarte y Mariano  
García-Garibay por todas por sus observaciones, comentarios y facilidades  
prestadas para poder realizar este trabajo en el interesante y latoso campo de las  
bacterias lácticas.

A los Drs. Miguel Angel Cevallos, Agustín López, Edgardo Escamilla y Alberto  
Tecante.

Por todas sus críticas e interesantes comentarios que le dieron la forma  
final a este trabajo. Gracias.

Lety García.  
Gracias por toda tu ayuda.

A los lácticos del laboratorio (Elsa, Jesús y Rodolfo).  
Espero que este trabajo les sea de utilidad durante su proyecto.  
...en la que se meten ...

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio.  
Por haber hecho más agradable la vida en el 312.

# ÍNDICE

	pag
<b>CAPÍTULO 1</b>	
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES	4
1. Fisiología de bacterias lácticas.	4
2. Leches fermentadas.	11
3. Yoghurt.	15
4. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	21
5. Exopolisacáridos bacterianos.	25
6. Exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.	31
7. Biosíntesis de exopolisacáridos.	35
<b>CAPÍTULO 2</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Microorganismos.	41
2. Medios de cultivo.	41
3. Preparación del inóculo.	42
4. Condiciones de fermentación.	42
5. Determinación de crecimiento.	43
6. Extracción y cuantificación del exopolisacárido.	43
7. Cuantificación de lactosa y galactosa.	44
8. Determinación de actividades enzimáticas.	45
8.1 Lisis Celular.	46
8.2 Método de detección de actividad de la enzima UDPglucosa pirofosforilasa.	46
8.3 Método de detección de la actividad de la enzima UDPgálcctosa 4-epimerasa.	48
9. Determinación de los componentes del polímero.	50

	pag
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	51
1. Extracción y cuantificación del polisacárido extracelular.	53
2. Selección de un medio de cultivo para diferenciar entre una cepa filante y no filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	52
2.1 Efecto del medio sintético Bellinker sobre la producción del exopolisacárido.	53
2.2 Efecto del medio sintético Bellinker sobre el crecimiento.	55
2.3 Producción del exopolisacárido.	57
3. Origen de la galactosa incorporada al EPS.	61
4. Determinación de la actividad de la enzimas UDP glucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa.	65
4.1 Efecto de lactosa como única fuente de carbono.	
4.1.1 Efecto sobre los niveles de actividad enzimática.	65
4.2 Efecto de glucosa como única fuente de carbono.	69
4.2.1 Efecto sobre el crecimiento y producción del exopolisacárido.	69
4.2.2 Efecto sobre las actividades enzimáticas.	71
4.3 Efecto de la p-fluorofenilalanina como probable inductor de la síntesis del exopolisacárido.	75
4.3.1 Efecto sobre el crecimiento y producción del exopolisacárido.	75
4.3.2 Efecto sobre los niveles de actividad enzimática	75
5. Determinación de los componentes del polímero.	80
<b>CAPÍTULO 4</b>	82
<b>CONCLUSIONES</b>	82
<b>PERSPECTIVAS</b>	84
<b>APÉNDICES</b>	85
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Vías metabólicas propuestas para bacterias lácticas.	9
Figura 2. Productos finales del metabolismo en bacterias lácticas.	10
Figura 3. Vías propuestas para la utilización de lactosa (lac) y galactosa (gal) en <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	24
Figura 4. Sitios de control en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos.	35
Figura 5. Semejanzas propuestas en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos.	36
Figura 6. Mecanismos de síntesis e interconversión de nucleótidos azucarados.	37
Figura 7. Ruta biosintética propuesta para un exopolisacárido formado de glucosa y galactosa en una bacteria gram negativa.	40
Figura 8. Producción de EPS en cepas de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio sintético MRS lac y medio Bellinker modificado. Cepa filante y cepa no filante.	54
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio Bellinker modificado. Cepa filante y cepa no filante.	56
Figura 10. Producción de EPS en medio Bellinker modificado en <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> . Cepa filante y cepa no filante.	58
Figura 11. Curva de producción de EPS de la cepa filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio sintético Bellinker modificado.	59
Figura 12. Curva de producción de EPS de la cepa no filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio sintético Bellinker modificado.	60
Figura 13. Consumo de lactosa y aparición de galactosa en la cepa filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio Bellinker modificado.	63
Figura 14. Consumo de lactosa y aparición de galactosa en la cepa no filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio Bellinker modificado.	64
Figura 15. Actividades enzimáticas de la cepa filante.	67
Figura 16. Actividades enzimáticas de la cepa no filante.	68
Figura 17. Efecto de la glucosa sobre la producción del EPS en <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> en medio Bellinker modificado. Cepa filante y cepa no filante.	70
Figura 18. Efecto de la glucosa como fuente de carbono sobre los niveles de actividad de la enzima UDPglucosa pirofosforilasa en la cepa filante y cepa no filante en diferentes fuentes de carbono.	72
Figura 19. Efecto de la glucosa como fuente de carbono sobre los niveles de actividad de la enzima UDPgalactosa 4-epimerasa en la cepa filante y cepa no filante en diferentes fuentes de carbono.	73
Figura 20. Rutas propuestas para la incorporación de glucosa y galactosa en la síntesis del EPS de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	74

	pag
Figura 21. Efecto de la p-fluorofenilalanina sobre la producción del EPS en <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> . Cepa filante y cepa no filante.	77
Figura 22. Efecto de la p-fluorofenilalanina sobre la actividad de la UDP glucosa pirofosforilasa en la cepa filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	78
Figura 23. Efecto de la p-fluorofenilalanina sobre la actividad de la UDPgalactosa 4-epimerasa en la cepa no filante de <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> .	79
Figura 24. Fragmento de la ruta biosintética propuesta para el polisacárido capsular de <i>E. coli</i> K-12 en donde se muestra la formación de un precursor con ramnosa.	81



## ÍNDICE DE TABLAS

	pag
Tabla 1. Nomenclatura actual para los principales microorganismos iniciadores de alimentos fermentados.	8
Tabla 2. Leches fermentadas.	12
Tabla 3. Clasificación de leches fermentadas	13
Tabla 4. Composición de exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.	32

## RESUMEN

Existen cepas de bacterias lácticas iniciadoras en la producción del yoghurt productoras de exopolisacáridos (EPS) que confieren mayor viscosidad y una disminución del fenómeno de sinéresis al producto final. A pesar de la importancia de estas bacterias existe muy poca información relacionada con la ruta biosintética del EPS en bacterias lácticas. Hasta el momento existen muy pocos reportes sobre la participación de algunas enzimas intracelulares responsables de la síntesis e interconversión de los precursores que forman el polímero. En este trabajo se determinaron los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa, enzimas responsables de la formación de UDPglucosa y UDPgalactosa respectivamente a partir de glucosa proveniente de lactosa en una cepa filante y una no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Gal- en cultivos en medio Bellinker modificado, empleando como fuentes de carbono lactosa, glucosa y en presencia de p-fluoro-fenilalanina, un probable inductor de la síntesis del EPS. Se observó en cultivos en lote de ambas cepas que estas bacterias producen un EPS compuesto por glucosa, galactosa y ramnosa. La producción del EPS es una característica asociada al crecimiento en ambas cepas observándose una mayor producción del polímero en la cepa filante respecto a la cepa no filante a pesar del mayor crecimiento de ésta última (800 y 500 µg equiv. de glucosa/ml respectivamente). La actividad de las enzimas epimerasa y pirofosforilasa durante una fermentación de 20 horas muestran diferentes perfiles para cada cepa. La enzima pirofosforilasa muestra un perfil de actividad similar al de la producción del EPS en la cepa filante en cultivos con lactosa como fuente de carbono con un máximo de actividad a las doce horas, mientras que la epimerasa muestra un gradual incremento hasta alcanzar un máximo de actividad las 12 horas también. En el caso de la cepa no filante, ambas enzimas muestran también un máximo de actividad a las 12 horas observándose una fase lag en la actividad de ambas enzimas de 4 horas. El nivel de actividad de la epimerasa es mayor respecto a la cepa filante a la hora 12. Ambas enzimas muestran una caída a partir del punto de máxima actividad en las dos cepas. La presencia de glucosa como única fuente de carbono causa una disminución en los niveles de actividad de ambas enzimas respecto a los observados con lactosa. Finalmente se observó que la p-fluoro-fenilalanina no posee un efecto inductor sobre la síntesis de EPS.

## CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.

El empleo de cepas de bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, productoras de polisacáridos exocelulares como iniciadores en la elaboración industrial del yoghurt origina un producto con mayor viscosidad y una disminución del fenómeno de sinéresis, el cual es un problema frecuentemente asociado a la producción de este alimento con el empleo de cepas comerciales. Esta característica resulta de gran interés desde el punto de vista industrial, sin embargo, uno de los principales problemas relacionados con el empleo de estas cepas a gran escala es la inestabilidad en la producción del polisacárido extracelular y la poca información sobre los aspectos fisiológicos y genéticos de la producción del polímero.

Debido a la gran importancia de estos microorganismos en la industria de alimentos lácteos, algunos grupos de trabajo en el mundo se han avocado en los últimos años a determinar los aspectos fisiológicos y genéticos relacionados con la producción del polímero en estas bacterias.

Hasta el momento se han determinado algunas de las características estructurales del polímero producido por estas bacterias como son los tipos y proporciones de los monómeros componentes y se ha propuesto la presencia de plásmidos como una explicación en torno al fenómeno de inestabilidad. La presencia de plásmidos y su relación con el fenómeno de inestabilidad en la producción de exopolisacáridos, es una característica observada en cepas iniciadoras de leches fermentadas escandinavas de *Lactococcus lactis*, hipótesis que ha sido descartada para los iniciadores del yoghurt (Gasson y Lyndon, 1985; García-Garibay, 1985; Vedamuthu y Neville, 1986; Cerning, *et al.* 1986; 1988; Cerning, 1990; Somkuti y Steimberg, 1986; Zourari, *et al.* 1992 y nuestro grupo de trabajo).

Las rutas biosintéticas de heteropolisacáridos exocelulares se han estudiado muy bien en cepas productoras de bacterias gram negativas, especialmente en *E. coli*, y algunos autores han propuesto semejanzas en algunas etapas de la biosíntesis entre bacterias gram negativas y gram positivas (Sinskey, *et al.* 1986; Whitfield, 1988). Sutherland, 1992 ha propuesto que el proceso de biosíntesis de un exopolisacárido difiere dependiendo de las características estructurales del polímero. Así, la síntesis de heteropolisacáridos, como los producidos por las bacterias lácticas iniciadoras del yoghurt (Cerning, 1990), difiere del proceso de biosíntesis de los homopolisacáridos el cual es completamente extracelular, como es el caso de la dextrana producida por algunas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

Los heteropolisacáridos son producidos a nivel de membrana celular utilizando una serie de precursores formados intracelularmente. En este proceso, los nucleótidos azucarados tienen gran importancia en el proceso de biosíntesis por su papel en la interconversión y activación de azúcares necesarios para la formación de unidades

repetitivas del polímero para su posterior traslocación y polimerización fuera de la célula (Sutherland, 1990). Sin embargo, y a pesar de proponerse semejanzas en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos entre bacterias gram negativas y gram positivas, existe muy poca información sobre estos aspectos en bacteria lácticas, encontrándose solamente algunos reportes sobre la síntesis de precursores a nivel de citoplasma:

- a) Försén y Häivä, (1981). Determinan la relación de los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa, enzimas responsables de la formación de los precursores nucleótido azucarados, UDPglucosa y UDPgalactosa respectivamente, con la cantidad de polímero producido en algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* con diferentes fuentes de carbono y establecieron que la p-fluorofenilalanina es inductor de la producción de exopolisacárido.
- b) Sjöberg y Hahn-Hägerdal, (1989). Determinan la relación de la glucosa-1-P y la actividad de la fosfoglucomutasa en etapas primarias de la biosíntesis del polímero producido por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.
- c) Petit, *et al.* (1991). Estudian la relación de algunas enzimas de la vía de Leloir con la síntesis del polisacárido producido por una cepa Gal+ de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Este último reporte es el único antecedente en bacterias iniciadoras del yoghurt en relación con algunos aspectos del proceso de biosíntesis de polisacáridos extracelulares. Sin embargo, es importante considerar que el fenotipo dominante en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* es el Gal- y que a pesar de que ambos fenotipos poseen las enzimas para metabolizar la galactosa, solamente bajo ciertas condiciones de cultivo es posible activar algunas enzimas de esta ruta en cepas Gal- (Petit, *et al.* 1991; Zourari, *et al.* 1992).

A pesar de la importancia de las cepas productoras de EPS de esta bacteria en la industria de alimentos lácteos, no existen reportes sobre el efecto de la fuente de carbono en la producción del polisacárido, del efecto de probables inductores de la síntesis del EPS o estudios sobre el proceso de biosíntesis del polímero en cepas Gal- de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Con base en estos antecedentes se propone como hipótesis de trabajo para este proyecto que:

Existe una relación entre los niveles de actividad de la UDPglucosa pirofosforilasa y la UDPgalactosa 4-epimerasa, enzimas probablemente involucradas en la formación de los precursores UDPGlu y UDPGal respectivamente a partir de glucosa, con los niveles de producción del polisacárido extracelular formado por una cepa filante y una no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar si existe relación entre los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.9) y la UDPgalactosa 4-epimerasa (EC 5.1.3.2), con la cantidad de polisacárido producido:

- a) En ambas cepas con lactosa como fuente de carbono;
- b) En ambas cepas con glucosa como única fuente de carbono.
- c) En presencia de un probable inductor de la síntesis del EPS.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- 1) Determinación del tipo de modelo que sigue la formación del polisacárido (asociado, no asociado o parcialmente asociado al crecimiento).
- 2) Cuantificación del consumo de lactosa y aparición de galactosa en sobrenadantes de cultivos de ambas cepas para determinar la probable participación de galactosa proveniente de la hidrólisis de lactosa en la formación del polímero.
- 3) Determinación del efecto de la p-fluorofenilalanina como probable inductor en la formación del polisacárido y en los niveles de actividad de las enzimas pirofosforilasa y epimerasa.
- 4) Identificación de los componentes del polímero producido por estas cepas en cultivos empleando como fuente de carbono lactosa y glucosa.

## GENERALIDADES.

### 1. FISIOLÓGÍA DE BACTERIAS LÁCTICAS.

#### 1.1 GENERALIDADES.

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, y son empleadas principalmente en la industria alimentaria para la producción de quesos y leches fermentadas, en donde los productos de la fisiología propia de los cultivos iniciadores proporcionan el sabor, aroma y textura característicos de cada producto.

La fermentación de alimentos es un proceso que se ha realizado de manera tradicional por el crecimiento de la microbiota naturalmente asociada y la acción de una serie de microorganismos en un ambiente especial generado por el alimento. Estos microorganismos poseen actividades lipolíticas y proteolíticas muy variadas y como consecuencia del catabolismo de diversos azúcares producen ácido láctico, ácido acético, compuestos aromáticos y bióxido de carbono principalmente. Todas estas características contribuyen a la fermentación y maduración del sustrato para generar un producto final con características sensoriales particulares.

Las bacterias lácticas empleadas en la industria de alimentos lácteos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. La gran variedad de quesos y leches fermentadas hace que cualquier discusión sobre la fisiología de los cultivos iniciadores resulte compleja, ya que la leche puede ser fermentada a una gran cantidad de productos, cada uno de ellos diferente como consecuencia del control del ambiente durante su elaboración, el cual induce al microorganismo a impartir diferentes características al producto final (Marshall y Law, 1984a; Farrés, *et al.* 1991; García-Garibay, *et al.* 1993).

#### 1.2. TAXONOMÍA.

La homología en secuencias de DNA y RNA ribosomal entre bacterias se ha empleado en microbiología como criterio taxonómico. La hibridación entre segmentos de cadena sencilla de DNA de diferentes cepas proporciona una medida de la relación entre especies. Así de este modo, una especie podría consistir de cepas con secuencias de DNA con un alto grado de homología. Aunque el grado de variación tolerable para definir semejanzas entre dos microorganismos no ha sido claramente definido, la hibridación de DNA-DNA ha tenido como consecuencia la reclasificación de varias especies de bacterias lácticas reagrupando microorganismos que en algunos casos eran clasificados como especies fenotípicamente diferentes pero que poseen el mismo genotipo.

Como consecuencia de los frecuentes y recientes cambios en la nomenclatura de los microorganismos empleados como iniciadores en la elaboración de leches y otros alimentos

fermentados, en la Tabla 1 se muestran los nombres antiguos y/o sinonimias de los principales microorganismos iniciadores.

Como resultado de estos cambios, cepas fisiológicamente diferentes de importancia comercial se encuentran ahora en un solo género, resultando subespecies con las divisiones específicas originales. Aunque estos cambios no sean fácilmente aceptados por los microbiólogos de alimentos, resulta interesante desde el punto de vista de la ecología microbiológica de las bacterias lácticas el separar claramente especies que en la mayoría de los casos poseen propiedades que las ubican en un mismo nicho, aunque estas características estén asociadas a diferentes genotipos (Garvie, 1984).

### 1.3. NUTRICIÓN.

A pesar de que las bacterias lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, sus requerimientos nutricionales son complejos. Las características enzimáticas propias de estos microorganismos los hacen incapaces de sintetizar muchos aminoácidos y vitaminas. Tales requerimientos determinan su hábitat natural, de tal forma que son encontrados típicamente en leche, productos lácteos, carne y vegetales, productos que son ricas fuentes de carbono y nitrógeno.

Las bacterias lácticas comprenden un gran grupo de bacterias gram positivas agrupadas en cinco géneros principales: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El hecho de que estos microorganismos crezcan en leche indica que pueden obtener de ella todos los nutrientes esenciales tales como vitaminas y bases de ácidos nucleicos. Las vías metabólicas por las cuales estos microorganismos satisfacen a partir de la leche sus requerimientos de carbono, aminoácidos libres y azúcares fermentables han sido conocidas, pero no ha sido sino a partir de la década pasada en que los mecanismos de transporte, particularmente los de azúcares, han sido identificados y parcialmente caracterizados (Marshall y Law, 1984b; Thompson, 1988).

En las bacterias lácticas se reconocen dos tipos de metabolismo, el homofermentativo y el heterofermentativo. En el primero se genera ácido láctico como principal producto, mientras que en el heterofermentativo se producen además, otros compuestos como el ácido acético, etanol y bióxido de carbono en cantidades significativas. Así por ejemplo, se considera que las bacterias del género *Lactococcus* transforman aproximadamente un 90% de lactosa en ácido láctico utilizando la vía de las hexosas difosfato y aunque se considera que el producto final de estas bacterias es el ácido láctico (del que se deriva su nombre), también se producen en menor cantidad ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoina y CO<sub>2</sub>, dependiendo de la vía metabólica (Farrés, *et al.* 1991).

#### 1.3.1 Metabolismo de carbohidratos.

Dentro de la composición de la leche se encuentra la lactosa en un 5% como prácticamente el único carbohidrato, siendo el sustrato del que se obtiene ácido láctico. La lactosa que se encuentra en el medio pasa al interior de la célula por dos diferentes vías: a

través del sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP-PTS), o bien, por medio de permeasas que requieren de ATP. Una diferencia entre ambas vías es que la primera fosforila la lactosa al entrar en la célula, mientras que esto no ocurre con las permeasas.

Existen dos enzimas intracelulares importantes que hidrolizan la lactosa en glucosa y galactosa, la  $\beta$ -D-fosfogalactosido galactosidasa ( $\beta$ -D-gal), que a partir de lactosa-P, produce glucosa y galactosa-6-P, y la  $\beta$ -D-galactosido galactohidrolasa ( $\beta$ -gal), que a partir de lactosa produce glucosa y galactosa no fosforiladas.

La galactosa-6-P se metaboliza a triosa fosfato, directamente por la vía de la Tagatosa fosfato, y la glucosa a su vez se fosforila en el carbono 6 por la enzima hexocinasa, y se metaboliza por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

En la cepa de *Lactococcus lactis* 7962, la galactosa se fosforila para producir galactosa-1-P, por acción de la enzima galactocinasa, y este azúcar puede entrar a la vía de Leloir en donde se convierte en glucosa-1-P, y posteriormente en glucosa-6-P, para entrar a la vía de EMP.

Por otra parte, la enzima piruvato cinasa cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato, para después producir lactato. Todos los intermediarios fosforilados antes del ácido 1,3-difosfoglicérico son activadores de la piruvato cinasa, pero el ácido 2-fosfoglicérico, que es el precursor del PEP, no la activa controlando la concentración intracelular de PEP.

Al mismo tiempo, la lactato deshidrogenasa controla el metabolismo de carbohidratos, puesto que se activa por la fructosa 1,6-difosfato y por la tagatosa 1,6-difosfato, promoviendo la transformación de piruvato a lactato y limitando su conversión hacia otros productos.

El metabolismo de la galactosa puede realizarse por dos vías diferentes, por la vía de la tagatosa-6-P, o por la vía de Leloir. Dependiendo del mecanismo por el cual la lactosa se introduce a la célula, la galactosa obtenida de la hidrólisis estará o no fosforilada. Si se obtiene galactosa-6-P, el metabolismo se realizará por la vía de la Tagatosa, y si no se encuentra fosforilada, entra a la vía de Leloir.

El citrato empleado como fuente de carbono produce piruvato, y el exceso se transforma en acetoina o material lipídico celular. El cambio de piruvato a lactato genera NAD a partir de NADH.

Las bacterias lácticas que son homofermentativas producen principalmente ácido láctico por medio de las vías de la Tagatosa, de EMP y de Leloir. Sin embargo, en las heterofermentativas como *Leuconostoc mesenteroides*, producen lactato, etanol y CO<sub>2</sub> como subproductos, a través de la descarboxilación del fosfogluconato, en la vía del



cetodesoxigluconato de Entner-Doudoroff (ED), y a partir de la xilulosa-5-P por la enzima fosfocetolasa, transformándola a gliceraldehído-P.

Independientemente de la vía metabólica de carbohidratos en bacterias lácticas, algunos productos importantes que se generan son el ácido pirúvico, la acetilCoA, y el acetil fosfato los cuales son intermediarios clave en la generación de productos de interés en la industria de alimentos lácteos.

De esta manera a partir de la descarboxilación del piruvato y junto con la tiamina pirofosfato (TPP), se forma el acetaldehído-TPP, el cual junto con el piruvato y por acción de la acetolactato sintetasa, forma el acetolactato, el cual a su vez por efecto de la acetolactato descarboxilasa genera acetoina (acetil metil carbinol). Por otra parte, el acetaldehído-TPP puede formar acetilCoA y CO<sub>2</sub>. A partir de acetaldehído, y junto con acetilCoA, se forma el diacetilo, y a partir de éste y junto con una deshidrogenación del NADH, se puede producir acetoina, la cual por acción de la acetoin reductasa se transforma en el compuesto 2,3-butanodiol (2,3-butilenglicol). Así mismo, el acetaldehído puede transformarse en etanol, por efecto de la alcohol deshidrogenasa. En la Figura 1 se muestran las rutas metabólicas homofermentativas y heterofermentativas propuestas para bacterias lácticas; en la Figura 2 se muestran los diferentes productos metabólicos finales (Marshall y Law, 1984b; 1986; Farrés, *et al.* 1991; Ono *et al.* 1993).

### **1.3.2 Proteínas, papel de los aminoácidos y péptidos en la nutrición.**

Todas las bacterias lácticas requieren o son estimuladas para su crecimiento por aminoácidos, y sin embargo, la cantidad de estas moléculas en forma libre en la leche no son suficientes para permitir el crecimiento útil para la producción de ácido, por lo que estas bacterias han resuelto este problema nutricional usando una compleja combinación de proteasas, peptidasas y sistemas de transporte en contra de un gradiente de concentración para utilizar los aminoácidos de la proteína de la leche.

Se ha observado por ejemplo, en el caso de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* que no solamente posee requerimientos de algunos aminoácidos esenciales, sino que su crecimiento es estimulado por aminoácidos no esenciales tales como la valina, metionina, leucina y triptofano, para producir más ácido que en la leche (Oberman, 1985; Tsakalidou y Delezios, 1993).

**Tabla 1. Nomenclatura actual para los principales microorganismos iniciadores de alimentos lácteos fermentados.**

Nombres comunes y/o aceptados.	Nombres antiguos y sinónimos no válidos
<b>BACTERIAS</b>	
<b>Lactococcus</b>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus</i> del grupo N <i>S. lactis</i> <i>S. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetyllactis</i> <i>S. diacetyllactis</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<b>Lactobacillus</b>	
<i>L. acidophilus</i>	
<i>L. brevis</i>	
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>delbruekii</i>	<i>L. delbruekii</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. leichmannii</i>
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>L. jugurt</i>
<i>L. kefir</i>	<i>L. caucasicus</i>
<b>Streptococcus</b>	
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<b>Leuconostoc</b>	
<i>L. lactis</i>	<i>L. citrovorum</i> , <i>S. kefir</i>
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. cremoris</i> , <i>L. citrovorum</i>
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<b>Bifidobacterium</b>	
<i>B. bifidum</i>	<i>Lactobacillus bifidus</i>
<b>Propionibacterium</b>	
<i>P. freudenreichi</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>P. shermanii</i>
<i>P. freudenreichi</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<b>LEVADURAS</b>	
<b>Kluyveromyces</b>	
<i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Saccharomyces lactis</i>
<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> <i>Saccharomyces marxianus</i>
<i>K. bulgaricus</i>	<i>S. fragilis</i> , <i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
<b>Candida</b>	
<i>C. kefir</i>	<i>S. kefir</i> , <i>Torulopsis kefir</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. macedoniensis</i> .

Tomado de García-Garibay, et al. 1993.

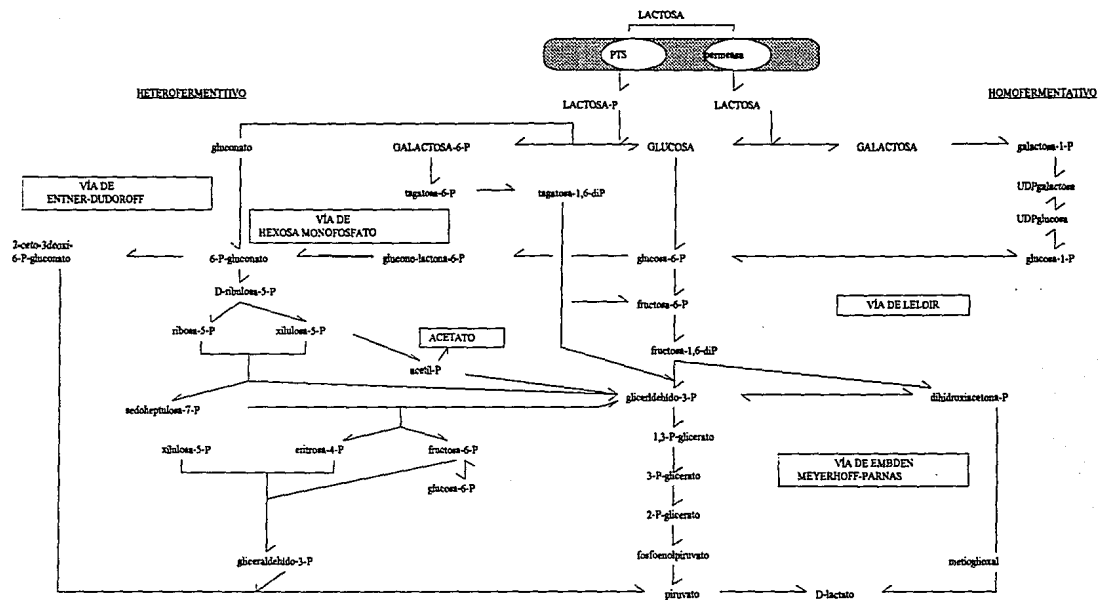
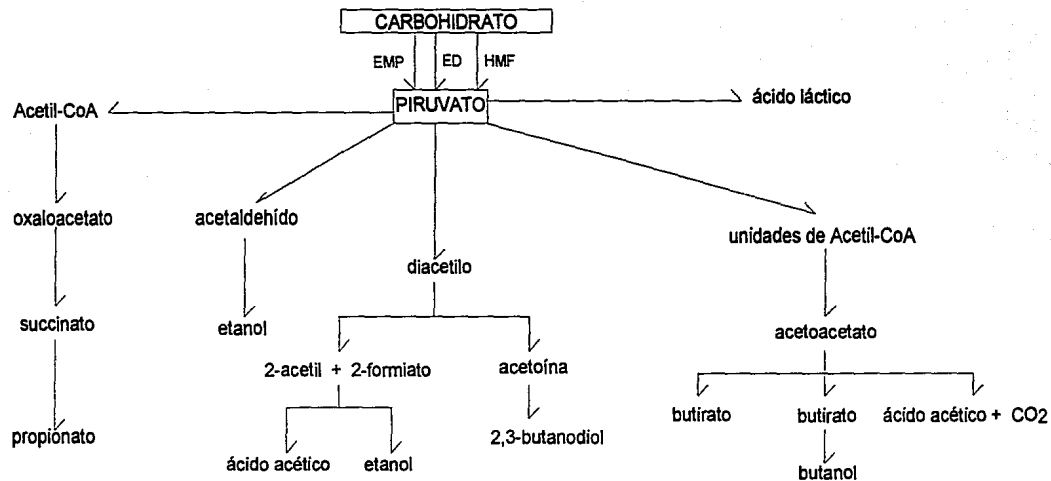


Figura 1. Vías metabólicas propuestas para bacterias lácticas. Tomado de Doelle, 1981; Marshall, 1986 ; William, 1989; Zourari; *et al.* 1992.



**Figura 2. Productos finales del metabolismo en bacterias lácticas.**

**EMP, Vía de Embden-Meyerhof-Parnas; HMF, Vía de Hexosa-Monofosfato; ED, Vía de Entner-Dudoroff.**

**Tomado de Doelle, 1981, Friend y Shahami, 1985; William, 1986.**

## 2. LECHES FERMENTADAS.

### 2.1. GENERALIDADES.

De acuerdo a la IDF (International Dairy Federation) (1969), las leches fermentadas son: "productos preparados a partir de leche entera, parcial o completamente descremada, leche concentrada o leche sustituida parcial o completamente, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos" (Oberman, 1985).

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos es una práctica muy antigua, la cual seguramente se originó sin intención durante el almacenamiento del alimento líquido. Los métodos tradicionales aplicados en la producción de leches fermentadas dependen de las condiciones climáticas y de las circunstancias regionales. También están influenciados por la transmisión de los criterios de elaboración de generación en generación. Los nombres populares de las leches fermentadas tradicionales originales se muestran en la Tabla 2. Originalmente, las leches fermentadas se prepararon a partir de leche de vaca, borrega, cabra, camella y yegua. La fermentación se realizaba originalmente en bolsas de tela o cuero o bien en recipientes de madera o arcilla. La propagación de la microbiota original se iniciaba con una pequeña cantidad de leche previamente coagulada para inocular leche fresca. Además la leche se acidificaba por la adición de una pequeña parte del estómago de ternera u ovejas o con una porción seca de leche ácida.

En todos los países donde las leches fermentadas se producen actualmente, la microbiota original actúa como una mezcla en la mayoría de los casos, con una composición indefinida o parcialmente definida. De tal modo que los reportes de muchas investigaciones de leches fermentadas "originales" muestran la presencia de varias especies de bacterias lácticas, levaduras y mohos. Durante estas fermentaciones se acumulan metabolitos como el ácido láctico, el etanol y muchos otros que conservan la leche y le imparten sus características organolépticas distintivas.

Existe una muy amplia variedad de leches fermentadas, probablemente algunos cientos, en las que interviene un gran número de especies de bacterias lácticas y algunas levaduras. En algunos países el consumo de estos productos es superior al de la leche fresca, y se utilizan leches de diferentes especies. En ocasiones es difícil definir algunos de estos productos debido a su gran número y a que se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materia prima; este puede ser el caso del buttermilk, o en México el "jocoque". A pesar de lo complicado que resultaría elaborar una clasificación de los principales tipos de leches fermentadas, debido a que sus características pueden variar de un fabricante a otro, o bien el tipo de microorganismos iniciadores puede variar de acuerdo a la región, el procedimiento de inoculación y aún de las condiciones climáticas existe una clasificación propuesta por Marshall (1986), en la cual se toma como criterio el tipo de microbiota dominante en diversos productos (Tabla 3). Esta clasificación se refiere en revisiones recientes (Friend y Shahami, 1985; Oberman, 1985; Marshall y Law, 1986; Kroger, 1989; García-Garibay, *et al.* 1993).

Tabla 2. Leches fermentadas

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

Tabla 2. Leches fermentadas (Continuación)

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

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

**Tabla 3. Clasificación de leches fermentadas.**

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

Tomado de Marshall y Law, 1986 y García Garibay, *et al.* 1993.

El yoghurt y otros alimentos lácteos fermentados se han consumido de manera popular por mucho tiempo principalmente en los países mediterráneos (Los Balcanes y el Norte de África), en los países del Centro y Sudoeste de Asia (Mongolia, Turquía, Irak, Irán y Siria), y en Europa Central. En muchos de estos países el yoghurt aún se procesa de manera tradicional. Sin embargo, a partir del término de la segunda guerra mundial, el consumo del yoghurt no sólo se ha incrementado de manera notable en Europa y en Estados Unidos, sino que también es producido a escala industrial. Actualmente, existen muchos tipos nuevos de leches fermentadas preparadas con la adición de frutas o saborizantes, enriquecidas con vitaminas o con microorganismos seleccionados tales como *Lactobacillus acidophilus* y algunas especies de *Bifidobacterium*.

En México se elaboran industrialmente el yoghurt, que es con mucho, la leche fermentada más importante, el yakult, el jocoque (que es equivalente al buttermilk elaborado en Estados Unidos), y en menor producción el labne o jocoque árabe. Existe también en muchos hogares la costumbre de elaborar leches fermentadas a nivel casero, principalmente el yoghurt, el labne y sobre todo un producto denominado "búlgaros" (Zourari, *et al.* 1992; García-Garibay, *et al.* 1993; Wachter-Rodarte, *et al.* 1993).



### 3. YOGHURT.

#### 3.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El origen del yoghurt no es muy claro. De acuerdo a algunas fuentes, este alimento se originó en Asia cuando los antiguos turcos vivían como nómadas. Pero de acuerdo a otros autores, el yoghurt tuvo su origen en los Balcanes, en donde los antiguos habitantes de Tracia fabricaban una leche ácida denominada prokish, la cual posteriormente se convirtió en el yoghurt. Los eslavos adoptaron el procedimiento de la preparación del yoghurt y con el paso del tiempo, éste se volvió de consumo popular (Oberman, 1985).

De acuerdo a Koroleva y Kondratenko, 1978 (Oberman, 1985), probablemente el koumiss precedió a la preparación del yoghurt. Los grupos nómadas, quienes en el siglo V vivieron a lo largo del Danubio y alrededor del Mar Negro, introdujeron el procedimiento para la elaboración del yoghurt a partir de la elaboración del koumiss, empleando leche de oveja en lugar de leche de yegua.

El yoghurt original se prepara en Bulgaria de manera tradicional a partir de leche de vaca o de cabra hervida inoculada al agregar una porción de leche acidificada. Para mantener la temperatura constante (40 - 45°C), el recipiente se envuelve en pieles y se coloca en una estufa de 8 a 10 horas hasta obtener un gel suave, relativamente viscoso, con consistencia firme y cohesiva y con muy poca pérdida de suero.

Existen datos controvertidos respecto a la microbiota original del yoghurt. La presencia de varios grupos fisiológicos de microorganismos se reportó en los primeros trabajos sobre el producto original. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* se consideraron como microorganismos dominantes, mientras que levaduras capaces de crecer en leche y ampliamente distribuidas tales como *Candida mycoderma*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* se consideraron como microbiota contaminante. Algunas otras bacterias tales como *Leuconostoc*, y una variedad productora de exopolisacáridos de *Lactococcus lactis* se consideraron como microbiota adicional. En los yoghurts originales de Bulgaria y de la ex-Yugoslavia se reportó también *Geotricum candidum* (Oberman, 1986).

Rašić y Kurman en 1978 (Oberman, 1985), resumen los descubrimientos concernientes a la microbiota original del yoghurt en tres grupos:

- a) Microbiota original del yoghurt constituida por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*.
- b) Microbiota no esencial representada por otras bacterias lácticas algunas de ellas heterofermentativas, considerándose que algunas de ellas pueden suplementar la microbiota original: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium shermanii*, y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

- c) Microbiota contaminante: mohos, levaduras, coliformes y cualquier otro microorganismo indeseable (Oberman, 1985).

En Francia, actualmente el término yoghurt se aplica para designar al producto resultante de la fermentación de la leche empleando exclusivamente dos especies de bacterias ácido lácticas termófilas, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* en un proporción de 1:1, los cuales deben estar presentes en el producto final alrededor de  $1 \times 10^7$  UFC·g<sup>-1</sup>. Estas dos condiciones se especifican en la legislación existente en la mayoría de los países productores de yoghurt (Zourari, *et al.* 1992).

El yoghurt se elabora con leche clarificada, casi siempre de vaca, la cual puede ser entera o descremada, pero libre de antibióticos. En algunos países se elabora a partir de leches de otras especies como cabra, yegua, búfala, etc. (García-Garibay, *et al.* 1993), y aunque la proporción de microorganismos iniciadores debe ser 1:1 para asegurar un producto con un óptimo de sabor y textura, se recomiendan como proporciones favorables de *Streptococcus* : *Lactobacillus* de 1:5, 2:1, 1:2 (Oberman, 1985).

De esta fermentación debe de resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico. Existen algunos tipos de yoghurt, entre los que se encuentran actualmente el tipo firme, batido y líquido, aunque se pueden mencionar algunos otros como el congelado, deshidratado, etc., cada uno de ellos en forma natural o adicionado con sabores o con fruta. El yoghurt líquido ha encontrado en México una gran aceptación en los últimos años, sin embargo, esto no ha sido así en todo el mundo; por ejemplo, en Gran Bretaña su introducción al mercado fue un fracaso.

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

### **3.2. ACTIVIDADES METABÓLICAS DE IMPORTANCIA EN LA TECNOLOGÍA DEL YOGHURT.**

El papel de los estreptococos y los lactobacilos en el proceso de elaboración del yoghurt se puede resumir como sigue: acidificación de la leche, síntesis de compuestos aromáticos y desarrollo de la textura y viscosidad. Este último aspecto es de gran importancia en los yoghurts agitado y líquido, por lo que para la producción industrial del yoghurt, la selección de las cepas de interés debe de estar sujeta a estos criterios.

El papel principal de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* en el proceso de elaboración de yoghurt es la acidificación de la leche como consecuencia de la producción de grandes cantidades de ácido láctico a partir de lactosa. El ácido láctico baja el pH de la leche y ocasiona una solubilización progresiva del fosfato de calcio micelar. Esto causa la desmineralización de las micelas de caseína y su desestabilización, la cual ocasiona una total precipitación de esta proteína en un rango de pH de 4.6 - 4.7. Además, el ácido láctico es el responsable del sabor ácido del yoghurt (Zourari, et al. 1992).

*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* es un bacilo homofermentativo gram positivo, largo, no móvil, el cual produce ácido D(-) láctico. Es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no maltosa ni sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45° C, pero normalmente tiene su óptimo entre 40-43° C; no crece a temperaturas menores de 15° C. Crece a valores de pH inferiores a 5.0, presentando metabolismo fermentativo aún en presencia de aire. En tanto que *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* es una bacteria gram positiva, esférica, la cual se observa en pares o cadenas; es homofermentativo y produce ácido L-(+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40-45° C, aunque puede crecer hasta 50° , pero no a menos de 20° C.

Ambas bacterias transforman la lactosa de la leche en ácido láctico, con la formación de pequeñas cantidades de otros metabolitos. El ácido láctico es responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característicos del yoghurt. Esta acidez también inhibe el crecimiento de otras bacterias como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*. *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* produce además peróxido de hidrógeno, bulgaricano y otro biocida de naturaleza proteínica, los cuales también inhiben el crecimiento de algunos microorganismos indeseables. La formación de ácido láctico en estas bacterias es por medio de la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas, con un paso terminal de piruvato a lactato, aunque cada especie produce un enantiómero diferente; la proporción del isómero L en el yoghurt es de 55 a 60% del ácido láctico total, y sólo este enantiómero es asimilable por los mamíferos, aunque no hay ninguna evidencia de que el enantiómero D resulte tóxico al hombre (García-Garibay, et al. 1993).

La producción de ácido láctico también puede ocurrir durante el almacenamiento del yoghurt a baja temperatura, lo que puede ocasionar una excesiva acidificación que afecta las características sensoriales del producto. Esta característica depende del tipo de cepas empleadas, especialmente del *Lactobacillus* (Zourari, et al. 1992).

El crecimiento inicial rápido de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* genera la acumulación de cantidades moderadas de ácido láctico, acético, acetaldehído, diacetilo y ácido fórmico. La disponibilidad de formiato y los cambios generados en el potencial rédox del medio, estimulan el crecimiento de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

*S. salivarius* subsp. *thermophilus* hidroliza la lactosa por medio de la  $\beta$ -galactosidasa, metabolizando únicamente el residuo de glucosa y excretando la galactosa al medio, mientras que la hidrólisis de lactosa por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* es por medio de la  $\beta$ -galactosidasa mas que por la  $\beta$ -fosfogalactosidasa, aunque ambas enzimas se encuentran presentes. El residuo de galactosa puede ser fosforilado por medio de la galactocinasa y así metabolizada por la vía de Leloir, aunque este sistema opera solamente si la galactosa es el único azúcar en el medio.

El acetaldehído es el principal componente responsable del aroma en el yoghurt. Es producido ya sea como un subproducto de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (principal ruta de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*), o bien a partir de treonina (ruta empleada por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*). Ambas bacterias carecen de la enzima alcohol deshidrogenasa, lo que las hace incapaces de transformar acetaldehído a etanol. Otros metabolitos que también contribuyen al sabor del yoghurt son el diacetilo y la acetoína, pero estos compuestos tienden a desaparecer con rapidez. La concentración de acetaldehído en el yoghurt es de 23 a 55 ppm, considerándose como concentración óptima de 23 a 41 ppm, lo cual incrementa el sabor del producto. El diacetilo raras veces excede 0.5 ppm.

Los requerimientos de aminoácidos son satisfechos por las propias bacterias hidrolizando las proteínas de la leche. *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* posee un sistema de proteasas y peptidasas extracelulares, activas dentro de un amplio rango de temperatura y pH, mientras que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* posee una proteasa externa, probablemente unida a su pared celular (García-Garibay, *et al*, 1993). La liberación de aminoácidos de las proteína de la leche no sólo satisface los requerimientos de ambas bacterias, sino que el contenido de aminoácidos en el producto final es alto, encontrándose grandes cantidades de ácido glutámico y prolina (Oberman, 1985; Tsakalidou y Delezios, 1993).

Ambas especies bacterianas se estimulan mutuamente en una relación protocooperativa: mientras la primera hidroliza activamente las proteínas, la otra le corresponde produciendo ácido fórmico y bióxido de carbono, los cuales son estimulantes para *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus*; el formiato es un precursor de las purinas por lo cual estimula la síntesis de RNA. Este efecto sinérgico resulta en un incremento en el crecimiento y en la producción de ácido láctico y de acetaldehído. También se ha sugerido que la glicina producida por el bacilo, como un subproducto de la conversión de treonina a acetaldehído, estimula a la otra bacteria. Durante las primeras etapas de la fermentación, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* crece rápidamente causando una disminución de oxígeno disuelto, lo cual favorece el crecimiento del bacilo.

Las condiciones de crecimiento tales como temperatura y pH son factores determinantes durante la fermentación. Se reporta que temperaturas superiores de 40-45° C favorecen el bacilo, mientras que temperaturas de 31° C permiten que el estreptococo domine, no obstante, independientemente de la temperatura de cultivo el estreptococo

siempre alcanza un crecimiento mayor que el lactobacilo. Ambas especies son resistentes al ácido, pero *S. salivarius* subsp. *thermophilus* crece mejor a valores de pH más altos, es decir al principio de la fermentación. Cuando el pH cae abajo de 5.5, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* es más activo que el estreptococo y a un pH inferior de 4.2, la fermentación es totalmente dominada por el *Lactobacillus*. Hacia el final de la fermentación, la proporción de *Lactobacillus* a *Streptococcus* varía de 1:1 a 1:8, pero esta puede cambiar e incrementarse mucho la proporción de *Lactobacillus* sobre *Streptococcus* si el producto se almacena a temperaturas relativamente altas (10° C). En un estudio realizado con yoghurts mexicanos, la relación de *Lactobacillus* a *Streptococcus* varía entre 1:0.3 y 1:3 (García-Garibay, et al. 1993).

### 3.3. ESTRATEGIAS EMPLEADAS PARA GARANTIZAR LA CONSISTENCIA Y TEXTURA DEL YOGHURT.

En la industria de alimentos lácteos existe una serie de problemas para la producción de yoghurt de una buena y constante calidad. Uno de los aspectos más importantes es la selección de las cepas a emplear. Las parejas de cepas seleccionadas o accesibles a las diversas empresas no siempre proporcionan los niveles exigidos por las normas correspondientes en cuanto a textura y viscosidad del producto principalmente, por lo que los productores de yoghurt han tratado de mejorar estas características manipulando uno o varios de los siguientes factores: composición de la mezcla de iniciadores, rotación de cultivos, incremento de sólidos totales de la leche al inicio de la fermentación y la adición de espesantes de origen animal o vegetal (Cerning, 1990).

El propósito de la modificación de la leche es el de mejorar la firmeza del producto y darle al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante el manejo normal del yoghurt. La adición de estabilizantes le confiere mayor fuerza a la estructura del gel haciéndolo menos vulnerable a los factores mecánicos que pueden ocasionar la ruptura del coágulo y la consecuente sinéresis. Los estabilizantes también mejoran el cuerpo, la textura, la sensación táctil en la boca y la apariencia del yoghurt. Los aditivos se utilizan también en la elaboración del yoghurt líquido con la finalidad de evitar la separación de una fracción coagulada de las proteínas de la leche junto con partículas suspendidas de frutas, las cuales pueden aparecer en el fondo del envase, o bien formar una nata en la superficie al cabo de unos días de almacenamiento del producto. Los estabilizantes a usar deben de ser cuidadosamente elegidos para obtener las propiedades deseadas, ya que diferentes estabilizantes tienen diferentes características. Una mezcla adecuada de estabilizantes puede dar mejores resultados que uno solo de ellos. Algunos comúnmente utilizados son: carragenina, grenetina, almidón, goma guar, goma de algarrobo, alginatos, pectina, etc. El uso de estos aditivos en concentraciones superiores al 0.3% pueden tener efectos adversos en el sabor, sin embargo y a pesar de los beneficios sobre la consistencia del producto, su uso no está permitido por legislación en países como Francia, Holanda y México.

El uso de estabilizantes es una práctica muy común en algunos países; sin embargo, el yoghurt puede ser elaborado evitando el uso de aditivos sin detrimento de su calidad. Una alternativa interesante al uso de estabilizantes es la utilización de cepas iniciadoras de yoghurt productoras de exopolisacáridos (EPS). Existen cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y de *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* con esta característica y su uso permite la elaboración de yoghurt tipo batido con adecuadas características de viscosidad, textura y sin problema de sinéresis, inclusive utilizando leche a su concentración normal como materia prima. Esto representa una gran ventaja económica, ya que permite el ahorro de leche y de estabilizantes. En los países escandinavos algunas cepas productoras de EPS son empleadas en la elaboración de varios tipos de leches fermentadas como es el caso del villia.

Por otro lado, la creciente demanda de los consumidores en algunos países por productos "más naturales" ha estimulado la investigación en cuanto a la posibilidad de emplear cepas productoras de EPS como iniciadores del yoghurt, tarea a la cual se han avocado varios grupos de investigación en el mundo. Sin embargo, uno de los inconvenientes de emplear cepas productoras de EPS es la inestabilidad de la característica y la poca información relacionada con los aspectos genéticos y bioquímicos de las cepas productoras (Friend y Shahami, 1985; Cerning, 1990; García-Garibay, *et al.* 1993).

#### 4. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

##### 4.1. TAXONOMÍA.

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* es el nuevo nombre propuesto para designar a *Streptococcus thermophilus* que fue originalmente descrito por Orla Jensen en 1919 (Zourari, *et al.* 1992), y cuyas características lo ubican aparte de los estreptococos y en especial de los estreptococos lácticos, designados actualmente dentro del género *Lactococcus*. Este microorganismo se aísla exclusivamente de ambientes lácteos y fermenta unos cuantos carbohidratos, entre ellos lactosa, sacarosa, glucosa y algunas veces galactosa. Se caracteriza por su termorresistencia y su alto crecimiento a temperaturas que pueden alcanzar hasta 50-52° C. No se ha encontrado ningún antígeno grupo específico a este microorganismo.

Estudios de homología DNA-DNA han reunido una serie de información que podría cuestionar su clasificación actual. El contenido de guanina - citosina (% mol G + C) en el DNA se encuentra en un rango de 37.2 - 40.3% de acuerdo a Farrow y Collins, 1984 (Zourari, *et al.* 1992). Estos autores obtuvieron entre un 61 - 78% de homología entre el DNA de varias cepas de *S. thermophilus* y una sonda de DNA de *Streptococcus salivarius* (la homología entre el DNA de cepas de *S. salivarius* y una sonda de DNA de *S. thermophilus* se encuentra entre 67-91%). Ellos confirmaron la gran homología en el DNA (70-100%) observada en un estudio anterior para dos cepas de cada especie. Con base en estos resultados estos autores propusieron que *S. thermophilus* debería ser reclasificado como una subespecie de *S. salivarius* a pesar de las grandes diferencias fenotípicas entre estas dos bacterias. De hecho, la enzima lactato deshidrogenasa de las especies tipo de ambos estreptococos poseen diferentes propiedades, así como también es diferente la termorresistencia de su aldolasa fructosa difosfato.

En adición a estos resultados, Garvie y Farrow en 1981 (Zourari, *et al.* 1992), ubicaron estas cepas estreptococales en el mismo grupo, basados en la homología entre su DNA y RNA ribosomal y el RNA ribosomal de la cepa tipo de *Streptococcus bovis* (esta cepa actualmente es ubicada como subespecie de *Streptococcus equinus*), pero en diferentes clusters. Pese a los trabajos de hibridación molecular DNA-DNA entre diversas cepas de *S. thermophilus* y *S. salivarius* solamente se han obtenido una homología del 60% en condiciones laxas y un 30% bajo condiciones de hibridación estrictas. Basado en datos recientes de hibridación, las diferencias fenotípicas y la presencia en ambientes completamente diferentes (boca/leche) sugieren el mantener a *S. thermophilus* y *S. salivarius* como dos especies separadas. Resulta obvio que la ubicación taxonómica de *S. thermophilus* requiere de futuras discusiones y que son necesarios más datos antes de tomar una decisión definitiva (Zourari, *et al.* 1992).

Colmin, *et al.* 1991 (Zourari, *et al.* 1992), desarrollaron una sonda de DNA la cual específicamente hibridiza con 25 cepas de subespecies de *S. thermophilus* y con 2

subespecies de *S. salivarius*. Este trabajo de hibridación cruzada sugiere que ambas especies muestran secuencias de DNA comunes, pero se necesitan más datos para apoyar una posible relación cercana entre estos dos estreptococos (Zourari, *et al.* 1992).

## 4. 2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

### 4.2.1 Transporte de lactosa y galactosa.

El mecanismo de transporte de lactosa en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* difiere de todos los lactococos, los cuales poseen un sistema específico de transporte de lactosa, el sistema de fosfoenolpiruvato (PEP)-dependiente de un sistema de fosfotransferasa (PTS). En este sistema, la lactosa-6-fosfato formada durante el transporte se hidroliza por una fosfo- $\beta$ -galactosidasa para rendir glucosa y galactosa 6-fosfato, los cuales se metabolizan a ácido láctico (Farrés, *et al.* 1991; Zourari, *et al.* 1992).

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* no posee el sistema de PTS, pero posee un sistema de transporte de lactosa que incluye una permeasa protón dependiente a nivel de membrana y una  $\beta$ -galactosidasa intracelular.

El gen de la lactosa permeasa de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (lacS) se ha clonado y expresado en *Escherichia coli*. La comparación de las secuencias de aminoácidos muestran que el sistema proteínico de transporte de lactosa de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (LacS) difiere de la lactosa permeasa de *E. coli* (LacY). Sin embargo, tiene homología en su región amino terminal con el acarreador MELB de *E. coli* (similitud de 23%), mientras que en su región carboxilo terminal tiene homología con la enzima III (E III) de tres sistemas de PEP-PTS diferentes (similitud de 34-41%) (Zourari, *et al.* 1992).

La galactosa se relaciona directamente con el transporte de lactosa. De hecho, la presencia de una gran cantidad de galactosa en el medio de cultivo inhibe el transporte de lactosa. Estudios bioquímicos han mostrado que la galactosa posee una gran afinidad por la lactosa permeasa y actúa como un inhibidor competitivo del sistema de transporte de lactosa, pero datos más recientes han sugerido otra explicación. En vesículas membranales de *E. coli*, el sistema LacS no sólo cataliza una fuerza protón motriz asociada al transporte de lactosa, sino que también un intercambio de  $\beta$ -galactósidos. Esto significa que la reacción de transporte de lactosa funciona como un sistema antiporte lactosa-galactosa independiente de la fuerza protón motriz (Zourari, *et al.* 1992).

El transporte de galactosa requiere de una fuente exógena de energía e involucra un sistema de galactosa permeasa. El transporte de glucosa y galactosa es muy lento en comparación al transporte de lactosa. El uso preferencial de lactosa se podría deber a limitaciones en el sistema de transporte de monosacáridos (Zourari, *et al.* 1992).



La Figura 3 muestra las rutas metabólicas propuestas para el transporte de lactosa y galactosa y su uso por *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. La  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) intracelular hidroliza la lactosa a glucosa y galactosa. Se ha observado que la glucosa reprime la síntesis de esta enzima. La  $\beta$ -gal estreptococal se ha purificado y caracterizado. Los genes que codifican la  $\beta$ -gal se han clonado y expresado en *E. coli* y en *Saccharomyces cerevisiae*. La  $\beta$ -gal de *S. thermophilus* es una proteína de alrededor 105 kDa. Se propone a esta enzima como un marcador potencial muy útil en la construcción de vectores de clonación a emplear en procesos de producción de alimentos, y por otro lado, su gran termoestabilidad comparada con la obtenida a partir de levaduras hace pensar en su producción a gran escala (Zourari, *et al.* 1992).

#### 4.2.2 Metabolismo de lactosa, glucosa y galactosa.

La glucosa proveniente de la hidrólisis de lactosa se incorpora directamente a la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* posee dos enzimas fructosa-1,6-difosfato-independientes (FDP-independiente) de la lactato deshidrogenasa (LDH) que reducen el piruvato a ácido láctico. El residuo de galactosa es excretado al medio extracelular por la mayoría de las cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, las cuales son incapaces de metabolizarla (fenotipo Gal<sup>-</sup>). Sin embargo, se han aislado cepas Gal<sup>+</sup>, en las cuales la galactosa se metaboliza por la vía de Leloir, la cual incluye las enzimas galactocinasa, uridil-galactosa-1-fosfato transferasa y la uridil-5-difosfo-glucosa-4-epimerasa. Estas dos últimas enzimas son constitutivas y están presentes tanto en cepas Gal<sup>-</sup> como en Gal<sup>+</sup>. La diferencia entre estos dos fenotipos parece estar en la actividad de la galactocinasa y/o actividad de la galactosa permeasa. Ambas enzimas se inducen por galactosa y se reprimen por lactosa. La secuencia de nucleótidos de los genes que codifican estas enzimas presenta cierta homología con los genes análogos de otras bacterias y levaduras. Es posible obtener cepas Gal<sup>+</sup> a partir de cepas Gal<sup>-</sup> de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* por medio de cultivos en quimostato con limitación de lactosa (O'leary y Woychik, 1976; Terence y Crow, 1984; Benayeta, *et al.* 1990; Zourari, *et al.* 1992).

El uso de cepas Gal<sup>+</sup> es de especial interés en la producción de quesos Mozzarella, Cheddar y Emmental pues se puede evitar una serie de problemas como resultado de la degradación de galactosa acumulada en estos quesos durante el proceso de fermentación. Entre ellos están la producción de bióxido de carbono al fermentar la galactosa por vía heterofermentativa lo que favorece la proliferación de microbiota no deseada que genera defectos en el sabor y textura final del producto (Oberg y Broadbent, 1993; Zourari, *et al.* 1992).

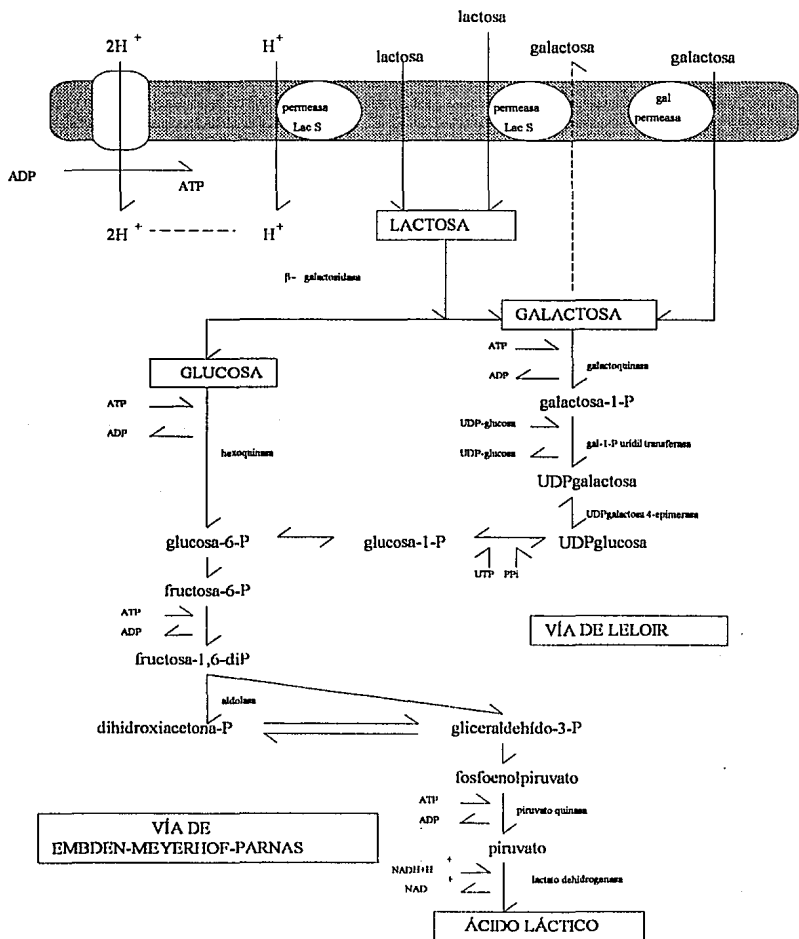


Figura 3. Vías propuestas para la utilización de lactosa (lac) y galactosa (gal) en *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Tomado de Zourari, et al. 1992.

## 5. EXOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS.

### 5.1. DEFINICIÓN.

La superficie celular de muchos microorganismos es rica en moléculas que contienen o están asociadas a carbohidratos. Algunas de estas moléculas son únicas en su tipo y están confinadas a ciertos grupos de microorganismos tales como los mananos en levaduras, los ácidos teicoicos y teiurónicos, lipopolisacáridos y peptidoglucanos en bacterias. Sin embargo, en adición a estos componentes de la pared celular, se encuentran polisacáridos que pueden estar o no asociados con otras macromoléculas de la superficie celular. Estas moléculas son los exopolisacáridos, los cuales son polisacáridos extracelulares con una gran diversidad en composición y estructura, aunque en algunos casos pueden presentar una gran similitud química con componentes de la pared celular.

Los exopolisacáridos (EPS) son producidos principalmente en procariontes, tanto en especies de vida libre como en especies parásitas, sin embargo, se encuentran también en cianobacterias y aunque son poco comunes, en levaduras y hongos filamentosos (Sutherland, 1990).

La definición de exopolisacárido resulta difícil de elaborar para no confundir con este término a todos aquellos componentes que forman parte de la pared celular y que quedan ubicados bajo la definición de glucocálix, el cual se refiere a una gran cantidad de compuestos que forman parte de la estructura celular y que no son distinguibles como una entidad estructural bajo el microscopio (Sutherland, 1990).

El término de exopolisacáridos fue propuesto por Sutherland en 1972 (Cerning, 1990), y es empleado para designar a aquellas formas de polisacáridos producidos por bacterias que se encuentran en el exterior de la célula y que pueden o no formar parte de la estructura celular, de tal manera que en ausencia de estos polímeros la superficie celular no se altera. Esta característica los hace reconocibles *per se* al microscopio (Sutherland, 1990).

Los exopolisacáridos bacterianos se pueden encontrar en dos formas básicas: como una cápsula (polisacáridos capsulares, PCS), asociada a la pared celular de manera covalente, o bien como una forma que no está asociada fuertemente a la pared celular y que se libera al medio dando un aspecto viscoso en un medio líquido. A ésta última forma se le denomina como polisacáridos filantes o mucoides.

La distinción entre los dos tipos de exopolisacáridos era frecuentemente definida en términos operativos por el grado de asociación con la célula después de una centrifugación. Sin embargo, la diferenciación real entre estas dos formas es muy difícil, sobre todo porque en algunos casos células productoras de una gran cantidad de polisacáridos capsulares pueden "liberar" algo del material de la periferia al medio, dando la apariencia de ser un tipo mucóide. Por otro lado se ha observado que algunas cepas de *Klebsiella* poseen la

capacidad de producir exopolisacáridos de tipo capsular o mucoide en algunas ocasiones químicamente indistinguibles y por el contrario se ha observado que una variedad de *Alcaligenes faecalis* puede producir exopolisacáridos químicamente diferentes (Whitfield, 1988).

Por otro lado, algunas especies del género *Leuconostoc* son microorganismos encapsulados y sin embargo, se ha observado que la cápsula está constituida por glucosa y galactosa en proporciones variables. En cultivos de esta bacteria en sacarosa se puede encontrar dextrana fuertemente asociada a la célula o bien material capsular libre de dextrana (Quirasco, 1994).

## 5.2. COMPOSICIÓN.

Los polisacáridos son polímeros de residuos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos que se forman por la eliminación de una molécula de agua entre el hidroxilo del grupo hemiacetal de dos residuos adyacentes. Estas moléculas pueden estar formadas por uno solo o varios tipos de monosacáridos denominándose como homopolisacáridos y heteropolisacáridos respectivamente, existiendo formas lineales y ramificadas. La diversidad estructural de estas moléculas se deriva del amplio rango de componentes que pueden formar parte de su estructura y se incrementa por el tipo de moléculas sustituyentes o por el tipo de enlaces que los forman (Pazur, 1986).

Los carbohidratos encontrados en los exopolisacáridos bacterianos son extremadamente diversos, encontrándose principalmente D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en su forma piranosa; también se encuentran de manera frecuente 6-desoxihexosas, L-fucosa y L-ramnosa. En adición a estos carbohidratos comunes, algunos polisacáridos pueden contener uno o más azúcares raros como las L-hexosas o formas furanosas de las hexosas glucosa y galactosa. Además se han encontrado diversos N-acetilaminoazúcares, siendo los más comunes el N-acetil-D-glucosamina y el N-acetil-D-galactosamina y eventualmente N-acetil-D-manosamina. Mientras más diversificadas sean las fuentes de exopolisacáridos microbianos, más tipos nuevos de monosacáridos serán descubiertos.

Muchos de los exopolisacáridos existentes son de naturaleza polianiónica, como resultado de la presencia en muchos de ellos de ácidos urónicos, siendo el más común el ácido D-glucurónico y menos común el ácido D-galacturónico y D-manurónico. A pesar de que muchos polisacáridos poseen un solo tipo de ácido urónico, en polisacáridos como el alginato se encuentran presentes el ácido D-manurónico junto con el ácido L-gulurónico (Sutherland, 1990).

### 5.2.1 Sustituyentes orgánicos.

Junto con los residuos de carbohidratos en los polisacáridos microbianos se encuentran varios sustituyentes de tipo éster y piruvato cetálicos, los cuales están

ampliamente distribuidos entre los polisacáridos bacterianos. Este tipo de sustituyentes pueden o no determinar la carga del polisacárido. Así, el acetato, un sustituyente de tipo éster, no contribuye a la carga total del polisacárido mientras que los grupos piruvato cetálicos contribuyen al carácter aniónico del polímero.

El piruvato se encuentra normalmente presente en proporciones estequiométricas con los residuos de monosacáridos en los exopolisacáridos y usualmente se encuentran unidos a hexosas, aunque ocasionalmente se encuentran unidos a ácidos urónicos.

De los sustituyentes de tipo éster más comunes se encuentra el acetato, aunque también se han encontrado grupos propionilo y residuos éster-gliceril formando parte de algunos polisacáridos. En estos casos, la presencia de estos compuestos contribuye a la naturaleza lipofílica de una parte del polímero.

El contenido de grupos tipo acil de algunos polisacáridos puede ser relativamente alto y pueden incrementar el carácter lipofílico de la molécula alterando la capacidad de interaccionar con otros polisacáridos y con algunos cationes. En muchos polisacáridos los grupos acil se encuentran en una relación estequiométrica a los residuos de monosacáridos existentes aunque no siempre es el caso.

Por otro lado, se ha reportado la presencia de algunos aminoácidos en exopolisacáridos. La serina ha sido reportada en el polisacárido producido por *E. coli* K40, mientras que el ácido L-glutámico se ha encontrado en *K. aerogenes* tipo 82 (Sutherland, 1990).

### 5.2.2 Sustituyentes inorgánicos.

Se había observado que en polisacáridos de eucariontes el sulfato era un sustituyente inorgánico presente en estos polímeros de manera más o menos común, sin embargo, ahora parece ser que también se encuentra en algunos polisacáridos de procariontes, como es el caso del polímero producido por la cianobacteria del género *Phormidium*.

El fosfato se ha identificado en polisacáridos bacterianos de importancia inmunológica y aunque está ausente en el polisacárido de bacterias gram negativas, ha sido encontrado en polímeros de *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *E. coli*, y aunque el componente inorgánico forma parte de la estructura del polímero, todos los polisacáridos polianiónicos se obtienen en forma de sal. Esto puede representar una mezcla de cationes en la que algunos de ellos pueden estar firmemente unidos al polímero. Así por ejemplo, algunos alginatos unen cationes divalentes tales como el calcio, el bario y el estroncio de manera muy fuerte, mientras que en el polímero denominado XM6 de una cepa de *Enterobacter*, se favorece la unión de cationes como el sodio y el calcio.

### **5.2.3 Homopolisacáridos.**

Muchos exopolisacáridos bacterianos, incluyendo algunos de ellos con potencial importancia industrial son homopolímeros, entre los que se encuentran la celulosa bacteriana, el curdlano, el escleroglucano, las dextranas, el elsinano y el pululano que a pesar de tener estructuras y propiedades significativamente diferentes, poseen como único componente a la D-glucosa con enlaces de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (Sutherland, 1990).

### **5.2.4 Heteropolisacáridos.**

La gran mayoría de los exopolisacáridos microbianos son probablemente heteropolisacáridos los cuales están formados por dos o más tipos de residuo de monosacárido. El número posible de estructuras y de propiedades resultantes es muy grande debido a la gran cantidad posible de enlaces y configuraciones. Cada hexosa puede tener un enlace  $\alpha$  o  $\beta$ , en su forma piranosa o furanosa y tener enlaces en las posiciones 2, 3, 4 ó 6.

A pesar de la gran diversidad posible de heteropolisacáridos descubiertos, la gran mayoría esta formada solamente por dos o tres azúcares y varios substituyentes de tipo acil (Sutherland, 1990).

## **5.3. ESTRUCTURA DE EXOPOLISACÁRIDOS.**

Los homopolisacáridos y los heteropolisacáridos están compuestos por unidades repetitivas de residuos de monosacáridos. Los homopolisacáridos generalmente son glucanos neutros, mientras que los heteropolisacáridos son en su gran mayoría de naturaleza polianiónica.

Actualmente se reconocen tres tipos de estructuras principales en homopolisacáridos. Algunos de ellos son moléculas formadas por un solo tipo de enlace, mientras que algunos otros son de naturaleza polianiónica por poseer algunos grupos acil, y finalmente el tipo de estructura ramificada se encuentra representado por las dextranas.

Los heteropolisacáridos están compuestos en su mayoría por unidades repetitivas de residuos de monosacáridos que varían en tamaño desde disacáridos hasta octasacáridos. Poseen generalmente ácidos urónicos siendo el más común el ácido D-glucurónico. Los heteropolisacáridos generalmente poseen pequeñas cadenas laterales, las cuales varían de uno a cuatro residuos de longitud y aunque raramente estas cadenas laterales se ramifican, es posible encontrar exopolisacáridos que poseen diferentes tipos de cadenas laterales usualmente formadas por un solo monosacárido, mientras que los alginatos bacterianos poseen una excepcional heterogeneidad de estructuras irregulares (Cerning, 1990; Sutherland, 1990).

## 5.4. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS.

Las bacterias que son capaces de producir polisacáridos exocelulares se han encontrado en una gran variedad de nichos ecológicos y aparentemente el papel preciso que juegan los exopolisacáridos en la naturaleza depende del hábitat en el que se encuentren. Se ha sugerido que la capacidad de producir exopolisacáridos es una respuesta directa a una presión del ambiente.

La mayoría de las explicaciones sugieren que la principal función de los exopolisacáridos es protectora, proponiéndose para microorganismos de vida libre una acción protectora contra la desecación y depredación de protozoarios. Por otro lado, la presencia de una matriz extracelular puede tener una acción protectora contra antibióticos (Bouinois y Jann, 1989).

En una gran variedad de ambientes la capacidad de sobrevivencia de un microorganismo depende de su habilidad de adherirse a una superficie. La presencia de exopolisacáridos en biopelículas adherentes a superficies inertes o biológicas puede representar la capacidad de estabilización y persistencia de la colonia.

La producción de polisacáridos exocelulares de tipo capsular se presenta en una gran cantidad de bacterias patógenas. La cápsula parecen ser de particular importancia para evadir la fagocitosis y una respuesta inmune debido probablemente a la composición química de la cápsula. En especies de *Rhizobium* parece ser que la relación simbiótica con leguminosas depende de las características del polímero y su capacidad de interaccionar con las lectinas secretadas por las plantas (Whitfield, 1988).

Parece ser que los polisacáridos exocelulares no funcionan como fuente de energía bajo circunstancias extremas de un microorganismo, ya que las bacterias formadoras usualmente no son capaces de catabolizar el polímero que sintetizan. Se ha observado la degradación del exopolisacárido producido por *Streptococcus pyogenes*, aunque no hay evidencia clara de que el microorganismo utilice la cápsula degradada (Cerning, 1990).

Se ha propuesto también que los exopolisacáridos juegan un papel muy importante en la susceptibilidad de ciertos tipos bacterianos contra el ataque de bacteriofagos. Los fagos activos sobre cepas productoras de exopolisacáridos son generalmente exopolisacárido-específicos, mientras que cepas no encapsuladas o no formadoras de exopolisacáridos son resistentes a fagos. Se ha propuesto que los fagos reconocen y se unen a los exopolisacáridos al desplazar la cola a través de las capas de glucano del polímero proporcionando una abertura para la cabeza vía acción de una endoglucosidasa. La inyección del ácido nucleico ocurre por la interacción de otro receptor de la pared celular del hospedero. Este modelo supone por lo menos la presencia de dos receptores en la infección, una reacción entre la cola y el exopolisacárido y un reconocimiento asociado con la pared o membrana celular (Cerning, 1990).

La presencia de exopolisacáridos en algunas cepas bacterianas aparentemente no es necesaria para la viabilidad de la célula *in vitro*. Los exopolisacáridos capsulares o filantes pueden removerse por acción enzimática o por métodos físicos sin efectos adversos para la célula (Cerning, 1990).



## 6. EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS.

### 6.1. GENERALIDADES.

Existen tres grupos principales de exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas. Las dextranas producidas por *Leuconostoc mesenteroides*, un grupo formado por los mutanos ( $\alpha$ -glucanos) y los levanos (fructanos), producidos por varias especies de *Streptococcus*, y un gran y heterogéneo grupo de heteropolisacáridos producidos por las bacterias lácticas mesófilas y termófilas. De todos ellos probablemente ninguno ha sido tan bien estudiado como las dextranas. Los mutanos han sido de gran interés por su importancia clínica, mientras que el interés en los exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas mesófilas y termófilas se debe a su importancia sobre el comportamiento reológico y la textura de las leches fermentadas (Cerning, 1990).

### 6.2. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA.

#### 6.2.1 Homopolisacáridos.

Las dextranas y los mutanos son  $\alpha$ -glucanos compuestos por residuos  $\alpha$ -D-glucopiranosil. Las principales bacterias productoras de dextrana son *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum*, mientras que los mutanos son producidos por *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*.

Aunque cada tipo bacteriano posee un solo tipo de D-glucano, una característica común a todas las dextranas es la preponderancia de enlaces  $\alpha$ -1,6, con ramificaciones en las posiciones 2, 3 ó 4. Los mutanos poseen una fracción soluble rica en enlaces  $\alpha$ -1,6 y una gran proporción de residuos formando una fracción insoluble formada por enlaces  $\alpha$ -1,3. Las diferencias en solubilidad se deben principalmente a la proporción y tipo de enlace. (Cerning, 1990).

#### 6.2.2 Heteropolisacáridos.

Los exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas mesófilas y termófilas han sido mucho menos estudiados en comparación con los homopolisacáridos producidos por otras bacterias lácticas. La característica común de todas estas bacterias productoras de exopolisacáridos es la baja producción del polímero y la naturaleza inestable de la característica (McKay, 1986; Somkuty y Steimberg, 1986; Cerning, *et al.* 1992).

El polímero producido por *Lactobacillus helveticus* está compuesto por galactosa y glucosa en proporción de 1:2. El polímero tiene un peso molecular alto y se ha asociado a una actividad antitumoral, en tanto que el polímero producido por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* está compuesto por diferentes azúcares predominando glucosa y galactosa, aunque se propone que las diferencias en composición dependen del tipo de análisis

empleado (Tabla 4). Se han propuesto diferentes tipos de enlaces para este polisacárido entre los que se proponen  $\alpha$ -1,6;  $\beta$ -1,3 con posibles ramificaciones 1-3,6.

Cerning, *et al.* en 1986 mostraron que el polisacárido producido por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* es un polímero soluble en agua compuesto por galactosa:glucosa:ramnosa (4:1:1) con un peso molecular de alrededor de 500 000 Da.

El polisacárido producido por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en cultivos en leche descremada está compuesto esencialmente por galactosa y glucosa con pequeñas cantidades de xilosa, arabinosa, ramnosa y manosa. La cromatografía por filtración en gel de sefarosa CL 4B mostró dos fracciones, la primera con un peso molecular parecido al de la dextrana azul ( $2 \times 10^6$  Da) y la segunda de 35 000 Da fué resistente a hidrólisis ácida. Ambas fracciones poseen el mismo tipo de monómeros, sin embargo la composición del exopolisacárido producido por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* varía de acuerdo a las condiciones de hidrólisis empleadas por cada autor (Tabla 4) (Cerning, 1990).

El polisacárido que forma los granos de kefir tomados de un cultivo de *L. hilgadii* fue identificado como dextranas con enlaces 1,3 en la cadena principal. Los polisacáridos producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* son complejos formados por proteína-hexosa, metilpentosas y ácido siálico. Mientras que el polímero producido por bacterias del género *Pediococcus* es un  $\beta$ -glucano de alto peso molecular (mas de  $2 \times 10^6$  Da) con enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,2 (Cerning, 1990).

**Tabla 4. Composición de exopolisacáridos producidos por bacterias lácticas.**

Microorganismo	Monómeros									
	Gal	Gluc	Fru	Ram	Man	Xil	Ara	Agal	Ancu	
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	+	+	-	tr	+	tr	tr	-	-	
	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	+	+	-	-	-	+	-	-	+	
	+	+	-	tr	tr	-	tr	-	-	
<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

Gal, galactosa; Glu, glucosa; Fru, fructosa; Ram, ramnosa; Man, manosa; Ara, arabinosa; Agal, ácido galacturónico; Ancu, ácido neurámico, "+", presente; "-", no presente; tr, trazas; espacio en blanco, no se reporta. Tomado de Cerning, 1990.

### 6.3. FUNCIÓN Y USO.

#### 6.3.1 Placa dentobacteriana.

Los mutanos y los fructanos sintetizados por *S. mutans* y *S. salivarius* (los mutanos en particular) son considerados de importancia clínica en la formación de la placa dentobacteriana y favorecen la patogenicidad en las caries dentales por su carácter insoluble en agua y capacidad de promover la adherencia cuando son sintetizados *de novo* en varias superficies sólidas. Se han propuesto varios mecanismos de colonización bacteriana tales como la precipitación ácida, la precipitación enzimática de glicoproteínas salivales o algunas teorías sobre colonización y adherencia que explican cómo el mutano es capaz de unirse a la cubierta de esmalte de los dientes. Debido a que la enzima glicosiltransferasa se encuentra en la red del mutano, la síntesis continúa agrupando a más bacterias de la misma o de diferentes especies formando la capa amarillenta sobre los dientes conocida como placa dentobacteriana (Cerning, 1990).

#### 6.3.2 Endocarditis.

El aislamiento de un gran número de cepas estreptococales a partir de pacientes con endocarditis subcutánea ha mostrado que *S. sanguis* (16.4%), *S. bovis* (15.1%) y *S. mutans* (14.2%) son los microorganismos más abundantes. De 54 cepas aisladas de *S. mutans* se identificó el mismo serotipo encontrado para las cepas de *S. mutans* de la placa dentobacteriana.

El evento inicial de la patogenicidad de la endocarditis bacteriana es la unión del microorganismo a las válvulas aórticas dañadas produciendo un trombo de fibrina. La unión de los glucanos a las células parece promover el establecimiento de *S. mutans* y otras cepas estreptococales productoras de glucanos. La adherencia a las válvulas dañadas es aproximadamente cinco veces más grande que la adherencia a las válvulas sanas. Esto puede explicar la prevalescencia de *Streptococcus* productores de glucanos, incluyendo a *S. mutans*, como los agentes causantes de la endocarditis subcutánea (Macrina, *et al.* 1980; Cerning, 1990).

#### 6.3.3 Usos de la dextrana.

Los usos potenciales de la dextrana incluyen la recuperación secundaria del petróleo durante la perforación, estabilización de agregados de suelos, cubiertas protectoras para semillas, floculantes en productos de papel, en los procesos de laminación de metales, en suturas quirúrgicas y en alimentos estabilizando e impartiendo viscosidad a jarabes.

Las dextranas de bajo peso molecular tienen su principal aplicación en la industria farmacéutica, donde las fracciones de varios pesos moleculares se usan como expansores del plasma y para mejorar el flujo sanguíneo. Los productos originales propuestos para esta

función tienen un peso molecular de 150 000 Da, pero debido a su capacidad antigénica poseen efectos secundarios. Posteriormente fueron utilizadas dextranas de 70 000 Da como expansores del plasma y una dextrana de 40 000 Da para mejorar el flujo sanguíneo. Las dextranas de uso clínico son producidas por la cepa NRRL8512 de *Leuconostoc mesenteroides*.

Otro tipo de aplicaciones de las dextranas es su empleo en la manufactura de tamices moleculares, los cuales son preparados a partir de dextranas con enlaces entrecruzados con epíclorhidrina en presencia de hidróxido de sodio. El grado de enlace cruzado en estos geles hidrofílicos determina el tamaño de poro y el límite de exclusión molecular (Cerning, 1990; Quirasco, 1994)

#### **6.3.4 Función de los polisacáridos exocelulares producidos por bacterias mesófilas y termófilas.**

Los exopolisacáridos producidos por los iniciadores del yoghurt pueden ser una alternativa para mejorar la textura y viscosidad del producto final. El uso de cepas productoras de exopolisacáridos incrementa la viscosidad del yoghurt y evita el fenómeno de sinéresis (Wacher-Rodarte, *et al.* 1993). En los países escandinavos los iniciadores mesófilos con esta característica son utilizados para la manufactura de diferentes tipos de leches fermentadas.

La demanda de consumidores por productos "más naturales" aunada a la legislación sobre la manufactura de algunas leches fermentadas, en especial del yoghurt ha hecho que varios grupos en el mundo se estén dedicando a la investigación sobre el empleo de cepas productoras de exopolisacáridos en la manufactura del yoghurt (Cerning, 1990; Cerning, *et al.* 1992; Zourari, *et al.* 1992).

## 7. BIOSÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS.

### 7.1. GENERALIDADES.

Los polisacáridos exocelulares se sintetizan en diferentes etapas del crecimiento y bajo varias condiciones fisiológicas que dependen de cada microorganismo. Los procesos de síntesis pueden dividirse en dos principales categorías basadas esencialmente en el sitio de síntesis y la naturaleza de los precursores.

Los homopolisacáridos tales como las dextranas y los levanos producidos por *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans* se sintetizan fuera de la célula y en presencia de una molécula donadora, la sacarosa, y de un aceptor.

La síntesis de heteropolisacáridos difiere de la de los homopolisacáridos en que son producidos a nivel de la membrana celular utilizando una serie de precursores formados intracelularmente. Los nucleótidos azucarados juegan un papel esencial en la síntesis debido a su papel en la interconversión y en la activación de azúcares necesarios para la polimerización de monosacáridos (Sinskey, *et al.* 1985; Cerning, 1990; Sutherland, 1990).

### 7.2. BIOSÍNTESIS DE HETEROPOLISACÁRIDOS.

La formación de heteropolisacáridos involucra una gran cantidad de enzimas que no forman únicamente parte de la síntesis de exopolisacáridos. Se han propuesto cuatro probables sitios de control en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos, dividiéndose las enzimas involucradas en cuatro grupos, uno correspondiente a cada sitio de control (Figura 4).

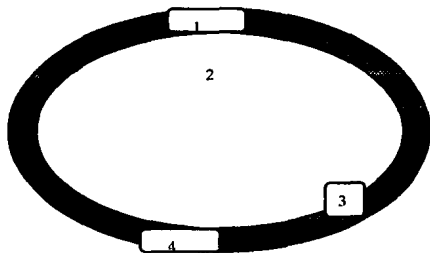


Figura 4. Probables sitios de control en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos. Tomado de Sutherland, 1992.

- Grupo 1: Enzimas y proteínas involucradas en los procesos de transporte y enzimas del metabolismo inicial de carbohidratos, p.e.: permeasas de carbohidratos, hexocinasa.
- Grupo 2: Enzimas responsables de la síntesis e interconversión de nucleótidos azucarados, p.e.: UDPglucosa pirofosforilasa, UDPglucosa deshidrogenasa.
- Grupo 3: Transferasas responsables de la formación de unidades repetitivas de monosacáridos asociados a lípidos.
- Grupo 4: Traslocasas y polimerasas responsables del ensamblamiento del polímero (Sutherland, 1990).

El mecanismo general propuesto para la biosíntesis de exopolisacáridos comparte características comunes entre bacterias gram positivas y gram negativas (Figura 5), y aunque en bacterias lácticas no existen estudios directos sobre la biosíntesis de heteropolisacáridos se puede asumir que la síntesis ocurre a nivel de la membrana citoplasmática via formación y uso de nucleótidos unidos a azúcares (Cerning, 1990; Sutherland, 1990).

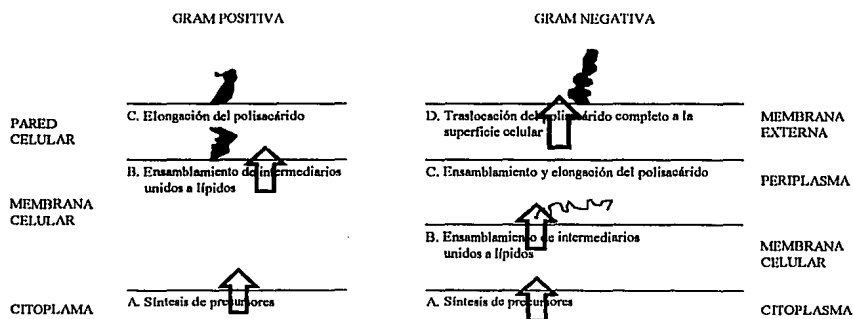


Figura 5. Semejanzas propuestas en el proceso de biosíntesis de exopolisacáridos entre bacterias gram negativas y gram positivas. Tomado de Whitfield, 1988.

### 7.2.1 Formación de precursores.

La síntesis de exopolisacáridos involucra la participación de precursores activados: formas de monosacáridos ricos en energía que principalmente son azúcares unidos a nucleósidos difosfato. Estas moléculas están involucradas en el procesos de síntesis de todos los exopolisacáridos localizados fuera de la pared celular, en la síntesis de oligosacáridos derivados de membrana encontrados en el periplasma de bacterias gram negativas y

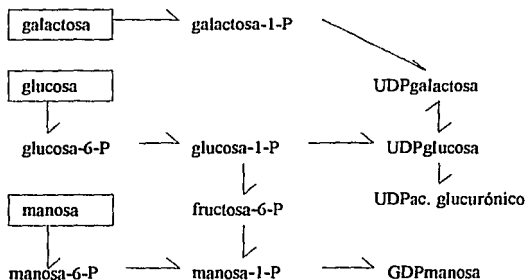
participan también en la síntesis de productos de almacenamiento tales como el glucógeno (Sutherland, 1990).

La manera en que los carbohidratos y los nucleótidos se canalizan hacia la producción de las moléculas precursoras se conoce poco pero representa un aspecto que depende críticamente de las condiciones ambientales y fisiológicas a las que se encuentra sometido el microorganismo en un cultivo.

Los azúcares unidos a nucleótidos poseen varias funciones: son monosacáridos intermediarios activados (capaces de liberar  $31.8 \text{ kJ mol}^{-1}$  durante la hidrólisis, comparado con los  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  de un azúcar fosfato), suministrando la energía necesaria para el ensamblamiento de secuencias de oligosacáridos en las moléculas acarreadoras apropiadas.

Estas moléculas proporcionan también los medios de interconversión de diferentes monosacáridos. Este proceso se puede llevar a cabo por varios mecanismos tales como la epimerización, oxidación, descarboxilación, reducción y rearrreglo (Figura 6).

La presencia de un monosacárido en un polisacárido exocelular implica que se requiere de un nucleótido azucarado para proporcionar una forma activada para su posterior transferencia al polímero. La pérdida en la capacidad para sintetizar un nucleótido azucarado usualmente tiene como consecuencia la pérdida en la producción del polímero (Markovitz *et al.* 1967a; Markovitz *et al.* 1967b; Sutherland, 1990).



**Figura 6. Mecanismos de síntesis e interconversión de nucleótidos azucarados. Tomado de Sutherland, 1992.**

La capacidad de interconversión entre azúcares para la formación de diferentes precursores puede explicar la presencia de varias unidades de monosacáridos en un polímero producido por un microorganismo crecido en un medio con un solo tipo de carbohidrato como fuente de carbono (Sinskey, *et al.* 1985; Sutherland, 1990).

### 7.2.2 Intermediarios lipídicos.

Los aceptores lipídicos son moléculas en las cuales se ensamblan las unidades repetitivas que forman los polisacáridos exocelulares. El descubrimiento de la participación de los lipídicos isoprenoides en la formación de lipopolisacáridos y peptidoglucanos indica que estos compuestos pueden estar involucrados en la síntesis de exopolisacáridos. Algunos estudios con mutantes de *Klebsiella aerogenes* han permitido observar la adición secuencial de D-glucosa-1-P y dos moles de D-galactosa a partir de UDPglucosa y UDPgalactosa respectivamente para formar un complejo oligosacárido-lípido soluble. Este lípido se aisló y se identificó como un lípido isoprenil fosfato C<sub>55</sub> (bactoprenil fosfato, undecaprenil fosfato). Este compuesto es el mismo tipo de aceptor involucrado en la síntesis de peptidoglucanos y en las cadenas laterales de lipopolisacáridos. La cantidad de este compuesto en bacterias corresponde aproximadamente a un 0.02% del peso seco de la célula (Sutherland, 1990).

El papel preciso que tienen los lipídicos isoprenoides en la síntesis de polisacáridos exocelulares se conoce poco, pero se propone que facilita la formación y arreglo de las unidades repetitivas del polisacárido, la solubilización de oligosacáridos hidrofílicos en un dominio hidrofóbico (membrana celular), el transporte a través de la membrana, la regulación en etapas finales en la síntesis del polisacárido con base en la disponibilidad de lipídicos, o alguna combinación de estos eventos (Cerning, 1990).

Existen evidencias indirectas de que la disponibilidad de los acarreadores lipídicos isoprenoides es uno de los factores más importantes que afectan la producción de exopolisacáridos. Se ha postulado que la reducción en la producción de polisacáridos exocelulares disminuye bajo condiciones de cultivo en las cuales se estimula la producción de lipopolisacáridos o ácidos teicoicos debido a la competencia por acarreadores isoprenoides fosfato. Bajo condiciones en las cuales existe una baja afinidad hacia la formación de polímeros asociados a la pared celular se observa una mayor disponibilidad de los isoprenoides fosfato para la síntesis de polisacáridos (Sutherland, 1990).

### 7.2.3 Procesos de polimerización.

Con base en experimentos con nucleótidos azucarados y sustituyentes tipo acil marcados radioactivamente se ha observado que los monosacáridos y los sustituyentes se transfieren secuencialmente a los acarreadores lipídicos isoprenoides hasta formar una unidad repetitiva característica.

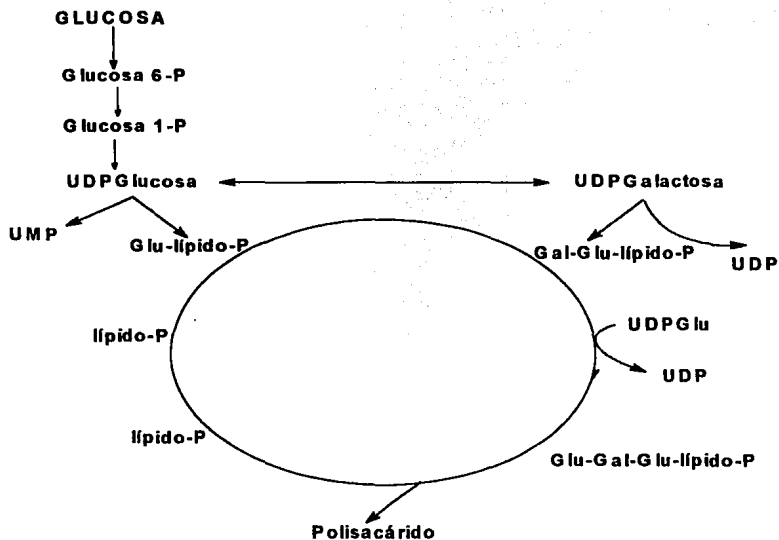


Después del ensamblamiento de las unidades repetitivas en el lípido isoprenoide ocurre la polimerización para rendir el polisacárido final. Este proceso ocurre por la transferencia de unidades repetitivas en el extremo no reductor de un complejo unidad repetitiva lípido-isoprenoide para formar un fragmento mayor en crecimiento. Este proceso continúa hasta que la macromolécula se ha formado.

La manera en que la masa molecular del polisacárido se define aún no se determina. La masa molecular del polímero probablemente depende tanto de la cepa como de las condiciones fisiológicas del microorganismo durante el cultivo.

Existen muy pocos estudios sobre los pasos finales de la síntesis del polímero, pero se propone que el sitio de ensamblamiento y polimerización de las unidades repetitivas ocurre a nivel de la membrana. Conforme la cadena del polisacárido se alarga, la estructura intermediaria incrementa su hidrofobicidad. El polisacárido puede liberarse entonces del lípido, trasladado a través de la membrana y excretado al medio extracelular. Alternativamente, los polisacáridos capsulares pueden unirse a algún componente específico de la superficie celular. Es probable que una fuerza protón motriz o el rompimiento de enlaces fosfatos ricos en energía suministren la energía necesaria para trasladar el polímero, pero los mecanismos reales por los cuales este fenómeno ocurre aún no se han determinado (Sutherland, 1990).

En la Figura 7, se muestra una ruta biosintética propuesta para un exopolisacárido compuesto por glucosa y galactosa a partir de cultivos de *E. coli* con glucosa como única fuente de carbono, basado en el proceso biosintético descrito en el texto.



**Figura 37. Ruta biosintética propuesta para un exopolisacárido formado de glucosa y galactosa en una bacteria gram negativa (Tomado de Sinskey, *et al.* 1985).**

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Microorganismos.

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*:

- a) Cepa NCFB 859. Proveniente de la colección NCFB (National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra). Esta cepa posee el fenotipo Gal-, mucoide o filante, y es una bacteria de forma esférica que crece formando cadenas de longitud variable. Este microorganismo fue recuperado a partir de un liofilizado de la colección en un tubo con leche descremada al 11% (Skim milk -DIFCO) e incubada durante toda una noche a 37°C.
- b) Cepa ST 233. Proveniente de la colección INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia). Esta cepa posee el fenotipo Gal-, no filante, y es una bacteria de forma esférica que crece en pares. Este microorganismo forma parte de las cepas del grupo de trabajo. Esta bacteria fue recuperada al transferir una muestra conservada en una perla de vidrio perforada y mantenida en glicerol a -20° C a un tubo con leche descremada 11% e incubada a 37° C toda una noche.

Estas cepas se mantuvieron por congelación en perlas de vidrio perforadas con glicerol (TECHNICAL SERVICE CONSULTANTS, LTD), a -20° C.

La identidad de los microorganismos empleados se verificó mediante el uso de "kits" de identificación bioquímica del sistema API 50 CH de bioMÉRIEUX. Las condiciones para desarrollar esta prueba se describen en el Apéndice I.

### 2. Medios de cultivo.

Las bacterias lácticas se definen desde el punto de vista nutricional como microorganismos "fastidiosos" (William, 1989), por los complejos requerimientos para poder crecer en un medio sintético (considerando que su ambiente normal de crecimiento es un medio sumamente complejo como lo es la leche). En este trabajo se utilizó inicialmente el medio sintético MRS-lac (Medio sintético de Man-Rogosa-Sharpe -DIFCO), adicionado con lactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. Este medio se substituyó posteriormente por el medio sintético Bellinker modificado (este trabajo):

- a) El medio sintético MRS-lac es un medio preparado de acuerdo a la fórmula de de Man-Rogosa y Sharpe con ligeras modificaciones (DIFCO, 1985). Este medio adicionado con lactosa ha mostrado que favorece el crecimiento exuberante de los

microorganismos empleados en este trabajo.

- b) El medio sintético Bellinker se obtiene por una modificación del medio Ellinker original (DIFCO, 1985), por la adición de extracto de carne. En este trabajo se modificó el medio Bellinker reportado por Mercenier, *et al.* (1988), en el cual se eliminó la gelatina nutritiva, la glucosa, la sacarosa y algunas sales por lactosa como única fuente de carbono.

En los cultivos en medio sólido se agregó al medio sintético en uso agar bacteriológico (DIFCO), en una proporción de 15 g/l.

Los medios se esterizaron en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121° C) por 15 minutos.

La composición de los medios empleados en este trabajo se muestran en el siguiente cuadro:

Medio sintético MRS-lactosa		Medio sintético Bellinker modificado	
Ingrediente	Conc. (g/l)	Ingrediente	Conc. (g/l)
Proteosa peptona No. 3	10	Triptona	20
Extracto de carne	10	Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5	Extracto de levadura	5
Lactosa	20	Lactosa	20
Tween 80	1	Acetato de sodio	1.5
Citrato de amonio	2		
Acetato de sodio	5		
Sulfato de magnesio	0.1		
Sulfato de manganeso	0.05		
Fosfato de potasio dibásico	2		

### 3. Preparación del inóculo.

Una vez recuperadas ambas cepas a partir de un liofilizado y de una perla de vidrio en glicerol en un tubo con leche descremada al 11% e incubadas a 37° C se realizó un precultivo de toda la noche en 50 ml de medio sintético Bellinker modificado en un matraz Erlenmeyer previo a cada experimento inoculando con 1% (v/v) del tubo en leche en que fue recuperada cada cepa.

### 4. Condiciones de fermentación.

Para cada experimento se realizaron cultivos en lote por duplicado con matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ó 100 ml de medio sintético. Cada matraz se inoculó con 1% (v/v) del precultivo. La temperatura de incubación fue de 37° C en una estufa.

## 5. Determinación de crecimiento.

Para determinar el crecimiento se realizaron cuentas en placa por duplicado con las diluciones adecuadas de muestras a diferentes tiempos de cultivo en medio sintético Bellinker modificado.

## 6. Extracción y cuantificación del exopolisacárido.

### Antecedentes experimentales:

En los primeros estudios realizados en cultivos de estos microorganismos no fue posible: (1) cuantificar el polisacárido a partir de extracciones de cultivos en leche o medio sintético MRS-lac por precipitación del sobrenadante con etanol absoluto en diferentes condiciones y concentraciones, ni cuantificando por métodos colorimétricos azúcares totales y reductores; y (2) no se logró observar el polisacárido a partir de sobrenadantes de cultivos en medio sintético MRS-lac cuando se analizó por cromatografía en capa fina y por HPLC.

Con base en estos antecedentes se propuso que el polisacárido producido por este microorganismo se encuentra asociado a la célula, de tal modo que durante el proceso inicial de extracción del polímero, éste sedimenta con el paquete celular, por lo que el método que se decidió emplear para la extracción de este polisacárido se basa en el tratamiento del paquete celular. Esta estrategia es una modificación de la metodología propuesta por Cerning, *et al.* (1986) y un método similar basado también en el tratamiento del paquete celular es empleado por Filali, *et al.* (1993) para cepas de *Spirulina platensis* en donde tampoco fue posible extraer el EPS de esta alga por los métodos comunes.

En el siguiente cuadro se describe la metodología desarrollada:

CONDICIÓN	VOLUMEN	OBSERVACIONES
Cultivo en medio sintético		37 ° C
Centrifugación		10 000 rpm / 30 min / 4° C
Decantar sobrenadante		
Lavar con solución salina 0.9%	5 ml	
Centrifugar		3 000 rpm / 5 min / temp ambiente
Decantar sobrenadante		
Romper células con TCA 5%	1 ml	vórtex máxima velocidad 1 min
Transferir a tubo Eppendorf		
Lavar con buffer de reacción	1 ml	dos veces
Resuspender en buffer de reacción	1 ml	
Agregar pronasa 20 mg / ml	125 µl	
Incubar en baño seco (thermoblock)		40° C / 20 horas
Dializar contra agua destilada	llevar a 5 ml con H <sub>2</sub> O	bolsa de diálisis con tamaño de poro de 12 000 a 14 000 Da, 4° C / 24 horas
Cuantificar azúcares totales		método de fenol- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

La composición de los buffers de reacción empleados en este trabajo se describen en el Apéndice II. La descripción de la técnica de azúcares totales por el método de fenol- $H_2SO_4$  se muestra en el Apéndice III.

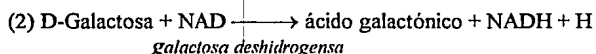
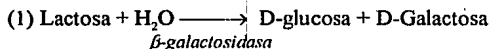
## 7. Cuantificación de lactosa y galactosa.

Para determinar la cantidad de lactosa consumida durante un cultivo y si una proporción del residuo de galactosa es consumido para su probable uso en la formación de precursores para la síntesis del exopolisacárido producido por estas bacterias, se determinaron estos azúcares en muestras de sobrenadantes de cultivos en medio Bellinker modificado libre de células a diferentes tiempos durante una fermentación de 20 horas.

Para este ensayo se utilizó el "kit" comercial de Boehringer (No. cat. 176 303) que contiene las siguientes soluciones:

- S1. Buffer de citratos, pH 6.6; NAD, 35 mg; sulfato de magnesio y estabilizante (no se especifican características).
- S2. 1.7 ml de suspensión de beta-galactosidasa, 100 U.
- S3. Buffer de fosfato de potasio dibásico, pH 8.6 y estabilizadores (no se especifican características).
- S4. 1.7 ml de suspensión de galactosa deshidrogenasa, 15 U.

**PRINCIPIO.** La lactosa se hidroliza a D-glucosa y D-galactosa por la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) (1). La D-galactosa se oxida por el NAD a ácido galactónico en presencia de la enzima  $\beta$ -galactosa-deshidrogenasa (Gal-DH) (2).



La cantidad de NADH formado en la reacción (2) se encuentra en relación estequiométrica con la cantidad de lactosa y D-galactosa respectivamente. El incremento de NADH se determina espectrofotométricamente a 340 nm.

Las condiciones de reacción empleadas fueron: temperatura de reacción de 28°C, celdas de cuarzo de volumen reducido (0.8 ml) con 1 cm de paso óptico, longitud de onda de 340 nm y calibración con aire. Las proporciones de cada uno de los reactivos recomendadas en el instructivo fueron modificadas para tener un volumen final de 0.9 ml, con la finalidad de aumentar el número de determinaciones. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada caso.

El ensayo se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el instructivo y se muestra en el siguiente cuadro:

Solución	Lactosa	Galactosa
1	60 µl	60 µl
2	15 µl	--
Muestra	30 µl	30 µl
Mezclar e incubar 15 min		
3	303 µl	303 µl
H <sub>2</sub> O	576 µl	591 µl
Mezclar, reposar 2 min		
4	15µl	15 µl
Leer absorbancia 1 (A1)		
Mezclar e incubar 15 min		
Leer absorbancia 2 (A2)		

Para realizar las determinaciones fue empleado un espectrofotómetro SPECTRONIC 21D. Los valores de absorbancia se procesaron de la siguiente manera:

1. Obtener diferencias de absorbancia:  $\Delta A = A2 - A1$ .
2. La concentración de la muestra fue determinada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$c = \frac{V \text{ (PM)}}{e \cdot d \cdot v \cdot 1000} \Delta A \text{ (g/l)}$$

donde:

V = volumen final (ml)

v = volumen muestra (ml)

PM = peso molecular de sustancia a analizar (g/mol)

d = paso óptico de la celda de cuarzo

$\epsilon$  = coeficiente de absorción para el NADH a 340nm = 6.3 (l mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

## 8. Determinación de actividades enzimáticas.

Para determinar los perfiles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa, enzimas responsables de la formación de los precursores UDPglucosa y UDPgalactosa respectivamente y su relación con la producción del EPS producido por la cepa filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* se realizaron cultivos en lote en matraces erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio Bellinker modificado. De estos, 50 ml de cultivo se emplearon para determinar la cantidad de EPS producido y los restantes para la determinación de los niveles de actividad de estas enzimas. Todas las fermentaciones fueron relizadas por duplicado.

## 8.1 Lisis celular.

Para la obtención de extractos celulares para la determinación de la actividad de estas enzimas se separaron las células por centrifugación del cultivo y se lisaron por acción mecánica con perlas de vidrio, de acuerdo al siguiente protocolo (Hansen, et al. 1966):

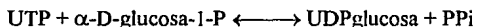
CONDICIÓN	VOL	OBSERVACIONES
Centrifugar		10 000 rpm / 30 min / 4° C
Decantar sobrenadante		
Resuspender en buffer de fosfatos 0.05M pH 7.0	50 ml	
Centrifugar		10 000 rpm / 30 min / 4° C
Decantar sobrenadante		
Resuspender en buffer de fosfatos	3 ml	Mantener en hielo
Romper células con perlas de vidrio		Vórtex máxima velocidad 3 min , mantener en hielo
Pasar a tubos Eppendorf	1.5 ml	
Centrifugar		17 000 rpm / 10 min / 4° C
Separar sobrenadante		Mantener en hielo

El sobrenadante se mantuvo en hielo. Para garantizar una lisis celular adecuada fue conveniente medir la D. O. a 640nm antes de romper las células, de la cual al final del tratamiento debe de permanecer el 30-40% de la D.O. original. El sobrenadante se utilizó como la enzima cruda y fueron usadas fracciones de sobrenadante frescas para todos los ensayos.

## 8.2 Método de detección de actividad de la enzima UDPglucosa pirofosforilasa.

Para la determinación de actividad de esta enzima se empleo la metodología reportada por Hansen, *et al.* 1966 y Liberman, *et al.* 1970.

### REACCIÓN GENERAL:



**PROPIEDADES.** Especificidad. El UDPglucosa es el sustrato más activo para la pirofosforilasa purificada, pero no es completamente específica para los componentes pirimidina o hexosa del UDPglucosa. Con la sustitución de d-timina, cistina o guanosina por la uridina del UDPglucosa, la tasa de reacción es de 0.1-3% de la normal. Con la sustitución de inosina de adenosina por uridina, se observan solamente trazas de actividad. Cuando el componente glucosa del UDPglucosa se sustituye por xilosa, galactosa o manosa los niveles de actividad se reducen del 0.3-4% a trazas.



Afinidad del sustrato: la  $K_m$  para:

Gluc-1-P	es	$5.0 \times 10^{-5}$	M
UDPGluc		$6.0 \times 10^{-4}$	
PPi		$8.4 \times 10^{-5}$	
UTP		$2.0 \times 10^{-4}$	
d-TDP-Gluc		$3.5 \times 10^{-4}$	

Activación por metales. La enzima muestra requerimientos por cationes divalentes. El  $Mg^{2+}$  es el catión más importante mientras que los cationes  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  no parecen afectar su actividad.

Constante de equilibrio. En la dirección de la síntesis de UDP-Gluc, la constante de equilibrio es 0.28 - 0.34 bajo condiciones de ensayo. La concentración de cationes no parece afectar el equilibrio.

pH óptimo y estabilidad. La enzima pura tiene un rango de pH óptimo entre 7.0 - 9.0, mientras que el pH para una estabilidad óptima de la enzima es de 9.0-9.8.

Pureza y peso molecular. La enzima recristalizada es esencialmente homogénea en PAGE y en ultracentrifuga analítica. El peso molecular estimado en gradiente de sacarosa (5-20%) es de 350 000 Da.

**PRINCIPIO.** La formación de glucosa 1-P se sigue espectrofotométricamente por el acoplamiento de la pirofosforólisis de UDPgluc con la reducción de nucleótido de piridina en la presencia de NADP, fosfoglucomutasa, y Glucosa-6-P deshidrogenasa. La reacción se cuantifica midiendo la aparición de NADPH espectrofotométricamente a 340nm.

Reactivos:

Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.0

Buffer TRIS-acetatos, 0.1 M, pH 7.8 conteniendo 0.001M de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Acetato de magnesio, 0.1M, en buffer de TRIS-acetatos 0.1M, pH 7.8.

Pirofosfato tetrasódico, 0.1M, en buffer de TRIS-acetatos 0.1M, pH 7.8.

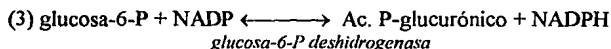
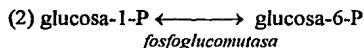
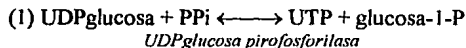
NADP, 0.02M.

UDPGlucosa, 0.02M.

Solución. 50 unidades de fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) y 2.5 unidades de Glucosa-6-P deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) / ml.

**Procedimiento.** Para las determinaciones de actividad de esta enzima se emplearon celdas de cuarzo de volumen reducido (0.8 ml) con 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21D.

El ensayo enzimático se basa en el acoplamiento de las siguientes reacciones:



Las condiciones de reacción se muestran en el siguiente cuadro:

Colocar en un tubo eppendorf de 0.5 ml en orden los siguientes reactivos:

CONDICIÓN	VOLUMEN
Acetato de magnesio	20 µl
NADP	20 µl
Pirofosfato tetrasódico	20 µl
Solución de enzimas	20 µl
UDPglucosa	20 µl
Extracto celular	20 µl
Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.0	380 µl Agitar
Medir D. O. 1 a 340 nm	
Incubar 20 min / 28° C en incubadora	
Medir D. O. 2 a 340 nm	

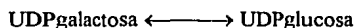
La actividad enzimática se determina con base en la cantidad de NADPH producido durante la reacción. La concentración de este compuesto se determinó del mismo modo en que fue calculada la cantidad de NADH para la determinación de lactosa y galactosa. En este caso el valor de  $\epsilon$  (coeficiente de absorción para el NADPH a 340nm) es también  $6.3 \text{ (l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$ .

**Definición de actividad.** Una unidad de enzima se define como la cantidad que cataliza la pirofosforólisis de  $1 \mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a  $25^\circ\text{C}$ . La actividad se expresa como unidades de actividad por minuto. La actividad enzimática es directamente proporcional a la cantidad de extracto añadido y el valor del ensayo es el promedio de tres réplicas.

### 8.3 Método de detección de actividad de la enzima UDPgalactosa 4-epimerasa.

La actividad de la epimerasa se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Maxwell, *et al.* 1961 y Wilson & Hognes, 1966.

## REACCIÓN GENERAL:



## PROPIEDADES.

Afinidad del sustrato: la  $K_m$  para

Glc-1-P	es	$2.4 \times 10^{-4}$	M
UDP-Gluc		$1.5 \times 10^{-4}$	
UDP-Gal		$2.5 \times 10^{-4}$	
Gal-1-P		$3.5 \times 10^{-4}$	

**Estructura.** El peso molecular de la UDPgal 4-epimerasa es de  $7.9 \pm 0.8 \times 10^4$  Da cuando se determina por sedimentación al equilibrio o por sedimentación y por coeficientes de difusión. Esta molécula consiste de dos polipéptidos idénticos con una molécula de NADP fuertemente adherida.

**Catálisis:** la constante de equilibrio  $k = [\text{UDPglucosa}] / [\text{UDPgalactosa}]$  para una reacción a  $27^\circ \text{C}$  es  $3.5 \pm 0.1$  entre pH's de 7 a 9. A pesar de la adición de NADP o NADPH no se incrementa la tasa de catálisis. El NADP de la enzima purificada no toma parte en la reacción de epimerización.

**pH óptimo:** el rango efectivo de esta enzima es muy grande. A pH entre a 9.64. La  $K_m$  y el número de recambio ( $k_{cat}$ ) para el UDPgal bajo condiciones de ensayo estándar es igual a  $1.6 \times 10^4$  y  $5.0 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$ . (Wilson y Hognes, 1966).

**PRINCIPIO.** La UDPglucosa formada se determina a partir de un extracto celular libre de proteína por medio de una deshidrogenasa específica dependiente de NADP (UDP-Gluc deshidrogenasa), la cual cataliza la reacción  $\text{UDPglucosa} + 2\text{NADP} \longrightarrow \text{ácido uridín difosfoglucurónico} + 2\text{NADPH}$ . Esta última reacción se desarrolla en una incubación analítica. La cantidad absoluta molar de NADPH formado dividida por dos proporciona una medida directa de la actividad de la enzima UDPgalactosa 4-epimerasa en un extracto celular. La reacción se cuantifica midiendo la aparición de NADPH espectrofotométricamente a 340nm.

### Reactivos:

Glicina 1M, pH 8.7.

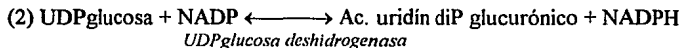
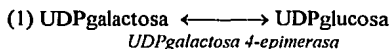
UDPgalactosa,  $2.2 \mu\text{M} / \text{ml}$ .

NADP  $0.0025 \mu\text{M} / \text{ml}$ .

Solución de UDPglucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.22) 2.5 unidades / ml

**Procedimiento.** Para las determinaciones de actividad de esta enzima se emplearon celdas de cuarzo de volumen reducido (0.8 ml) con 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21D.

El ensayo enzimático se basa en el acoplamiento de las siguientes reacciones:



La actividad enzimática se determinó del mismo modo que para la enzima UDPglucosa pirofosforilasa.

Las condiciones de reacción se muestran en el siguiente cuadro:

Colocar en un tubo eppendorf de 0.5 ml en orden los siguientes reactivos:

CONDICIÓN	VOL
Glicina	85µl
Extracto enzimático	35µl
UDPgalactosa	50µl
H <sub>2</sub> O destilada	330µl
Incubar 20 min / 28° C en incubadora	
Parar reacción: colocar en hielo 5 min	
Centrifugar 17 000 rpm / 20 min / 4°C	
Sobrenadante	295µl
Glicina	103µl
NADP	34µl
UDPglucosa deshidrogenasa	30µl
Medir D. O. 1 a 340 nm	
Incubar 20 min / 28° C en incubadora	
Medir D. O. 2 a 340nm	

## 9. Determinación de los componentes del polímero.

Se realizó una vez extraído el polisacárido y con la finalidad de eliminar la cantidad de proteína que pudiera estar aún asociada al EPS una segunda hidrólisis con pronasa bajo las mismas condiciones (20 horas / 40 °C). Las muestras transferidas a tubos eppendorf se centrifugaron 17 000 rpm durante 15 min. El polisacárido sedimentado se colectó y se transfirió a un tubo eppendorf. La determinación de los componentes se realizó por hidrólisis ácida del polímero. Se agregó al tubo eppendorf con el EPS 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se mantuvo de tres a cuatro horas en un baño en ebullición (Spiro, 1966).

El análisis de la muestra hidrolizada se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) empleando placas de sílica gel de 20 x 20 cm y como fase móvil una mezcla de butanol:etanol:H<sub>2</sub>O (10:1:2 v/v). Las condiciones de CCF se muestran en el Apéndice III.

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1. Extracción y cuantificación del polisacárido extracelular.

En los primeros intentos para cuantificar el EPS por las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* no fue posible obtener el polisacárido a partir de extracciones en cultivos en leche o en sobrenadantes de cultivos en medio sintético MRS-lac por precipitación con etanol absoluto, ni cuantificando por métodos colorimétricos, por cromatografía en capa fina y por HPLC (Escalante, 1992).

Con base en estos antecedentes, se propuso que el EPS producido por este microorganismo se encuentra asociado a la célula, de tal modo que en el proceso inicial de extracción del polímero, éste sedimenta con el paquete celular durante la centrifugación para la obtención de sobrenadantes tanto de cultivos en leche y en MRS-lac, lo que explica el porqué no es posible cuantificar el EPS en sobrenadantes libres de células.

La metodología empleada para la extracción y cuantificación del EPS producido por las cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* empleadas en este trabajo, se basa en el tratamiento del paquete celular por existir una estrecha relación con el polímero, propuesta que fue confirmada con la amable contribución del Dr. Morris de la Universidad de Minnesota, E.U.A. (Schellhaass y Morris, 1985; Teggatz y Morris, 1990).

Esta evidencia permitió observar en fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido que el EPS producido por cepas de esta bacteria se mantiene unido a la célula. El EPS se observa como "apéndices" no presentes en la cepa no filante. Este material mucoide está asociado a la célula así como también con la matriz proteínica del gel formado, mientras que el EPS producido por *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* se libera al medio. Esta evidencia gráfica respalda los resultados obtenidos con el método utilizado por García-Garibay (1985) y Salcedo (1992), basado en la precipitación del EPS con etanol con el cual fácilmente se obtiene el polisacárido del bacilo y explica el por qué es necesario procesar el paquete celular para el caso del *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

La relación EPS-célula en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* se ha reportado por varios autores proponiéndose que la disminución del fenómeno de sinéresis en la producción de yoghurt, como consecuencia del empleo de cepas iniciadoras filantes se debe a la capacidad del material mucoide de retener agua y por su interacción con la matriz proteínica del gel. De esta manera la relación EPS-proteína ayuda a la prevención de una excesiva interacción proteína-proteína favoreciendo una alta hidratación. Se ha propuesto también que los espacios libres que rodean a las células iniciadoras del yoghurt introducen estrés a la matriz de caseína. La presencia de material mucoide en la superficie celular y extendiéndose

hacia la caseína genera una reducción del estrés causado por los espacios libres generando una reducción en la sinéresis (Teggatz y Morris, 1985).

## **2. Selección de un medio de cultivo para diferenciar entre una cepa filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.**

Una vez desarrollada una metodología que permitió extraer y cuantificar el EPS producido por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* se empezó a determinar las diferencias en la producción del polímero a lo largo de una fermentación entre la cepa filante y la cepa no filante de esta bacteria en medio sintético MRS-lac.

El medio sintético MRS-lac era empleado en nuestro grupo de trabajo de manera rutinaria para el cultivo de cepas de *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. El medio MRS comercial (DIFCO, 1985), fue desarrollado por deMan, Rogosa y Sharpe (1960), para el cultivo de manera exuberante de lactobacilos de origen fecal, bucal y lácteo. La presentación comercial de este medio contiene en su composición glucosa como fuente de carbono. Para el cultivo de las bacterias lácticas del yoghurt manejadas en nuestro grupo fue necesario adicionar lactosa (20 g/l) por la mayor afinidad hacia el disacárido (Zourari, *et al.* 1992). Sin embargo, se observó que con este medio la cepa no filante del *Streptococcus* alcanza un mayor crecimiento y produce más exopolisacárido que la cepa filante, resultado que concuerda con lo observado por Cerning, *et al.* (1986) (Figura 8). Con base en estas observaciones y de acuerdo a los objetivos propuestos para este trabajo se decidió buscar un medio en el que fuera posible determinar: (1) una diferencia cuantitativa entre la cantidad de EPS producido por la cepa filante respecto a la no filante y (2) utilizar una sola fuente de carbono, por lo que se seleccionó y modificó el medio sintético Bellinker.

El medio sintético Bellinker se reportó en trabajos de formación y regeneración de esferoplastos de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (Mercenier, *et al.* 1988), como un medio osmoprotector. En la composición de este medio se encuentran lactosa, sacarosa y glucosa como fuentes de carbono y sales como el cloruro de sodio, que a la concentración recomendada en la composición original (4 g/l) inhibe el crecimiento de las cepas empleadas, (Salcedo, 1992). De acuerdo a los objetivos propuestos para este trabajo, se mantuvo la lactosa como única fuente de carbono y se aumentó su concentración de 5 a 20 g/l, tomando como base la cantidad de este azúcar en el medio MRS-lac, evitando así la interferencia de cualquier otro azúcar sobre el crecimiento y producción del polisacárido. Se mantuvo también el acetato de sodio como única sal, eliminándose el ácido ascórbico y el cloruro de sodio por la alta concentración. La proporción total de fuente de nitrógeno orgánico a partir de hidrolizados y extractos se mantuvo en el medio Bellinker modificado (35 g/l) (DIFCO, 1985).

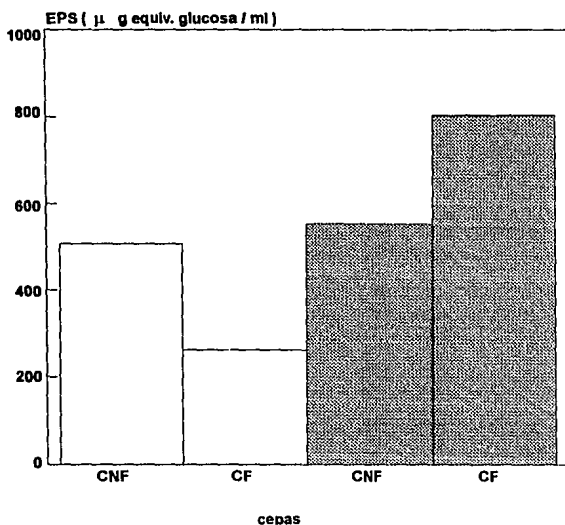
El probable efecto del medio MRS-lac sobre la mayor producción del polímero en la cepa no filante respecto a la filante puede residir en alguno de los componentes no presentes

en el medio Bellinker modificado tales como el Tween 80 (polioxiétilen sorbitan monoleato), o bien, la presencia de sales como son el citrato de amonio, fosfato de potasio dibásico o sulfatos de magnesio y manganeso.

## **2.1 Efecto del medio sintético Bellinker modificado sobre la producción del EPS.**

La técnica de extracción, separación y cuantificación del polisacárido extracelular producido por la cepa filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* empleadas en cultivos con medio sintético Bellinker permitió observar por primera vez en el trabajo con estas bacterias una diferencia cuantitativa en la producción del EPS asociada a las diferencias fenotípicas entre estas dos cepas (Figura 8).

Es importante aclarar que una idea manejada por mucho tiempo era de que la cepa filante por poseer este fenotipo debería de producir una mayor cantidad de EPS respecto a la denominada como no filante. Estos resultados muestran que ambas cepas producen un polisacárido extracelular, el cual para el caso de la cepa filante es determinante del carácter mucoide o filante de esta bacteria. Sin embargo, para el caso de la cepa no filante el EPS producido no genera la característica mucoide en el cultivo en medio sintético.



CRECIMIENTO ( UFC / ml )		
Cepa	MRS-lac	BELLINKER
Filante	$9.8 \times 10^7$	$9.33 \times 10^7$
No filante	$2.35 \times 10^{10}$	$2.45 \times 10^9$

Figura 8. Producción de EPS en cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en medio sintético MRS-lac (□) y medio Bellinker modificado (▨) en una fermentación de 20 horas. CF, cepa filante. CNF, cepa no filante.



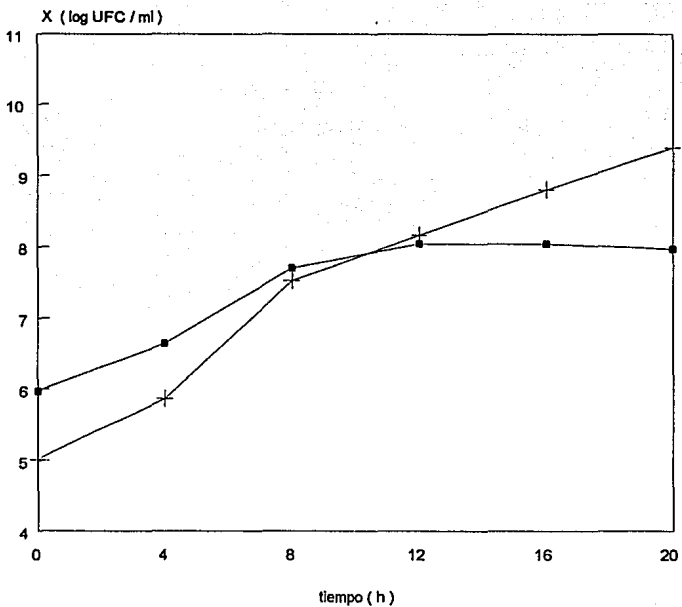
## 2.2 Efecto del medio sintético Bellinker sobre el crecimiento.

En la Figura 9 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa filante y no filante obtenidas. Los resultados de un cultivo de 20 horas se resumen en el siguiente cuadro:

CEPA	CREC. MÁXIMO UFC/ml	$\mu$ h <sup>-1</sup>
Filante	$9.33 \times 10^7$	0.1
No filante	$2.45 \times 10^9$	0.197

El valor de  $\mu$  fue determinado a partir del cálculo de la pendiente entre dos puntos de la curva en la hora 20 de crecimiento de ambas cepas de la Figura 9. Estos resultados muestran que la cepa no filante presenta un mayor crecimiento y una mayor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), respecto a la cepa filante. El mayor crecimiento en la cepa no filante es una característica observada también en cultivos con medio MRS-lac.

Al observar que tanto en el medio sintético MRS-lac y Bellinker modificado la cepa no filante alcanza un mayor crecimiento, es importante considerar que el aparente efecto del medio sobre la producción del EPS en la cepa no filante es sobre la cantidad de polímero producido y que este efecto resulta independiente de las propiedades fenotípicas de esta cepa, ya que a pesar de presentarse una mayor producción de EPS no se observó un cambio al fenotipo filante apreciable visualmente en un cultivo en medio sintético.



**Figura 9.** Cinética de crecimiento (X) de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en medio Bellinker modificado. Ceba filante (■). Ceba no filante (+).

### 2.3 Producción del exopolisacárido.

En la Figura 10, se muestran las curvas producción del exopolisacárido producido por las cepas filante y no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en medio Bellinker modificado empleando la técnica de extracción y cuantificación del EPS desarrollada, durante una fermentación de 20 horas. En esta figura se observa que existen diferencias en la curva de producción del EPS entre ambas cepas. En la cepa filante la producción de polímero se observa a partir del inicio de la fermentación alcanzando la máxima producción a partir de la hora 16 de cultivo, mientras para la cepa no filante se observa una fase lag de 4 horas en la curva de producción del EPS, alcanzándose también para esta cepa la máxima producción a partir de la hora 16 de cultivo.

En la Figura 11, se muestran las curvas de producción del EPS y la curva de crecimiento de la cepa filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Se observa que la producción del EPS está asociada al crecimiento, alcanzándose la máxima producción del EPS a las 12 horas de cultivo, momento en el que se alcanza también el máximo crecimiento. Entre la hora 0 y 4 se observa un gran incremento en la producción del EPS asociado con un pequeño incremento en el crecimiento. A partir de la hora 4 se observan únicamente pequeños incrementos en la producción del EPS. En esta gráfica se observa que la cepa filante presenta muy poco crecimiento respecto a la cepa no filante, fenómeno asociado a una gran cantidad de EPS producido (Figura 12), siendo ésta una de las características distintivas de la cepa filante.

La Figura 12 muestra las curvas de producción del EPS y crecimiento de la cepa no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. En este caso se observa una fase lag en la formación del EPS de 4 horas paralela a la curva de crecimiento observándose el punto de máxima producción a la hora 20 de cultivo. En este caso, la producción del EPS se encuentra también asociada al crecimiento.

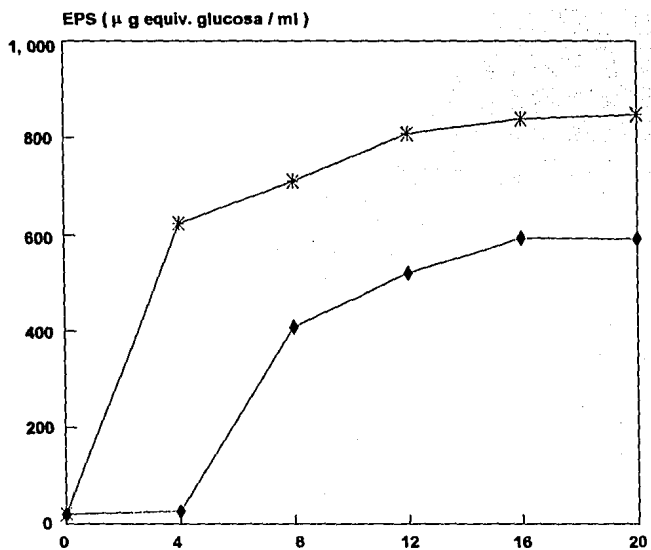


Figura 10. Producción del EPS en medio Bellinker modificado en *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Cepa filante (\*). Cepa no filante (♦).

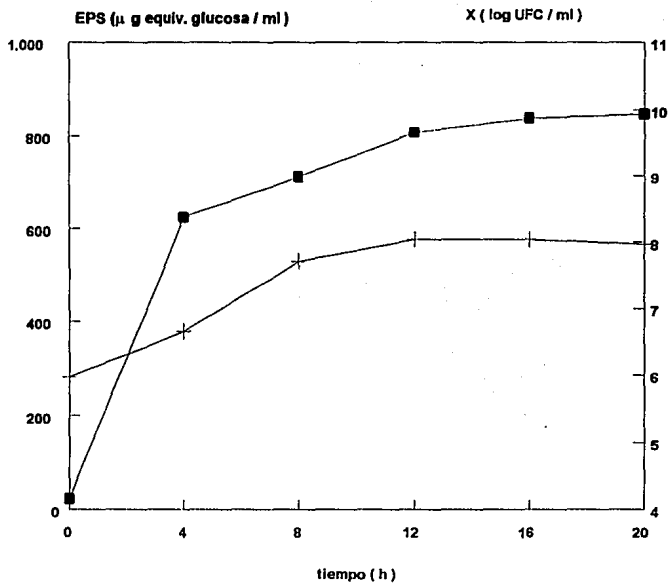


Figura 11. Curva de producción de EPS de la cepa filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en medio sintético Bellinker modificado. Producción de EPS (■). Crecimiento (X) (+).

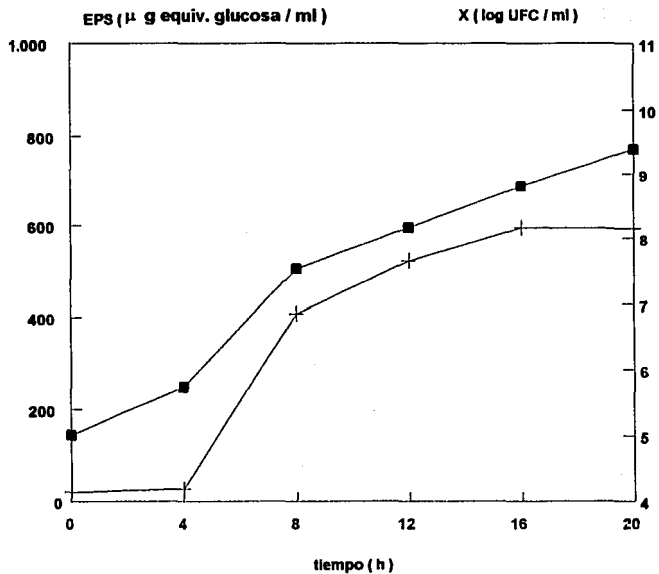


Figura 12. Curva de producción de EPS de la cepa no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en medio sintético Bellinker modificado. Producción de EPS (■). Crecimiento (X) (+).

### 3. Origen de la galactosa incorporada al EPS.

Se ha reportado que el EPS producido por cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* está compuesto principalmente por galactosa y glucosa con trazas de otros azúcares que varían de acuerdo a las condiciones de hidrólisis empleadas por el autor que lo reporta (Cerning, 1990).

El modelo de ruta biosintética propuesto para la formación de heteropolisacáridos que involucra la formación de precursores a nivel citoplasmático a partir del sustrato (en este caso lactosa), implica al menos dos formas probables de incorporación de galactosa al polímero en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Gal-. Una posibilidad es a partir de la incorporación del residuo de galactosa proveniente de la hidrólisis de lactosa antes de ser excretada al medio, y otra a partir de la incorporación de este azúcar como resultado de una desviación en el metabolismo de la glucosa con una posterior epimerización (Figura 7).

El análisis de sobrenadantes de cultivos de la cepa filante en medio Bellinker modificado (Figura 13) muestra que la galactosa empieza a excretarse a partir de la hora 4 de crecimiento, concomitante a una gradual disminución de lactosa, llegando a consumirse únicamente 38.8% de la cantidad inicial del sustrato.

La cantidad de lactosa consumida (expresada en moles) en cada punto de la curva de la figura 13 muestra que de cada mol de lactosa (360 g/l) que utiliza el cultivo, la mitad (180 g/l) se cuantifica como galactosa residual en el sobrenadante del cultivo. Esto permite observar que la galactosa se excreta al medio en su totalidad, mientras que únicamente el residuo de glucosa se metaboliza.

Este resultado indica que la galactosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa no interviene en la síntesis del polímero producido por esta cepa, dejando como única y probable vía de incorporación al EPS una desviación de la glucosa 6-P a partir de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas.

El análisis de la cantidad de azúcares residuales en la cepa no filante (Figura 14), muestra la aparición de galactosa a partir de la hora 4. Sin embargo, en este caso la cantidad de lactosa consumida es mayor respecto a la cepa filante (55% del total), por lo que también existe una mayor cantidad de galactosa residual. Se observa para esta cepa que por cada mol de lactosa que se consume se cuantifica en el sobrenadante una mol de galactosa (proporción molar), por lo que en este caso la galactosa se excreta también en su totalidad al medio y no se incorpora a la síntesis del polímero.

En ningún caso, tanto para la cepa filante como para la cepa no filante, se detectó glucosa en los sobrenadantes por CCF. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Terence y Crow (1984), en donde se observa que en cultivos de estas bacterias con exceso de lactosa, solamente el residuo de glucosa se consume y se excreta la galactosa. En

contraste con estos datos existe un reporte de Terence y Crow (1983), en donde se detecta la presencia de residuos de glucosa y galactosa en sobrenadantes de cultivos con limitación de lactosa de algunas cepas de *S. thermophilus salivarius* subsp. *thermophilus*, observándose el consumo de estos dos residuos al agotarse la lactosa del medio.

Por otro lado, la mayor cantidad de lactosa consumida por la cepa no filante en relación a la cepa filante, y las diferencias en EPS producido, podrían ser las causas del mayor crecimiento de esta cepa respecto a la cepa filante, suponiendo que ocurre una menor desviación de glucosa hacia la síntesis del polímero.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los de O'Learly y Woychik (1976), en donde se determinó que el catabolismo de 0.74% de lactosa en cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* genera de 0.35 a 0.4% de galactosa indicando que virtualmente toda la galactosa se excreta al medio, aunque Hutkins y Ponne (1991) mencionan que cierta proporción de galactosa permanece asociada a la célula, aunque no se especifica en qué forma ni en qué proporción.

Se ha propuesto que la excreción al medio del residuo de galactosa proveniente de la hidrólisis de lactosa en las cepas Gal- de estas bacterias es el fenómeno responsable de proporcionar la fuerza que dirige la toma de lactosa, sugiriéndose un sistema de simporte en donde la entrada de lactosa y la salida de galactosa ocurren a tasas equimolares (Hutkins y Ponne, 1991; Zourari, *et al.* 1992).



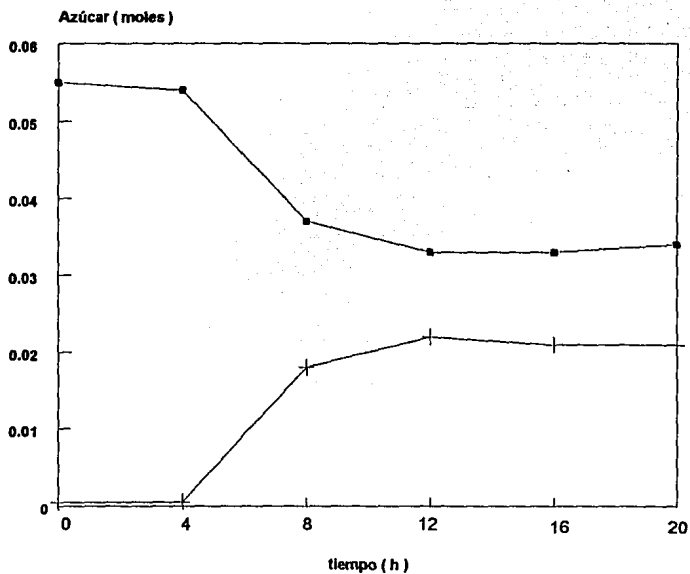
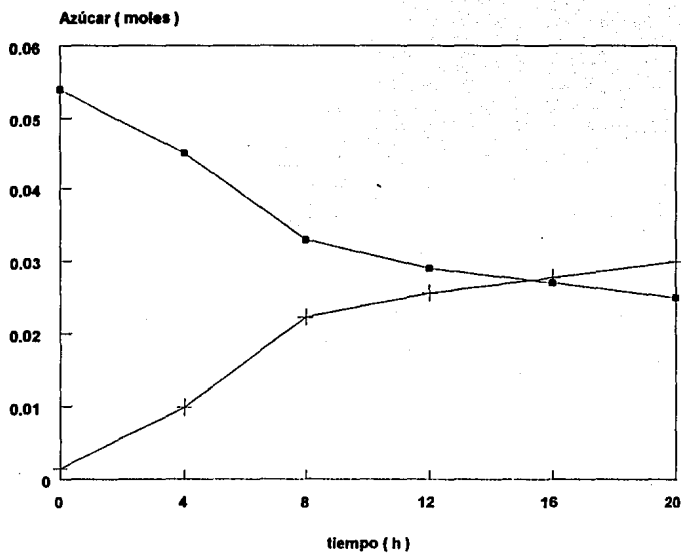


Figura 13. Consumo de lactosa y aparición de galactosa en la cepa filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en medio Bellinker modificado. Lactosa (■). Galactosa (+).



**Figura 14. Consumo de lactosa y aparición de galactosa en la cepa no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* en medio sintético Bellinker. Lactosa (■). Galactosa (+).**

#### **4. Determinación de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa.**

##### **4.1 Efecto de lactosa como única fuente de carbono.**

##### **4.1.1 Efecto sobre los niveles de actividad enzimática.**

El papel de las enzimas formadoras de precursores nucleótido-azucarados ha sido muy poco estudiado en bacterias lácticas. Existen solamente algunos reportes para bacterias del género *Lactococcus* (Försén y Häivä, 1981; Sjöberg y Hahn-Hägerdal, 1989), y muy pocos trabajos en este contexto con *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Para la determinación de los niveles de actividad de estas enzimas se realizaron cultivos en lote con 100 ml de medio sintético Bellinker modificado. De estos cultivos se determinaron la cantidad de EPS y los niveles de actividad de ambas enzimas.

Los perfiles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa de la cepa filante a lo largo del período de crecimiento se muestran en la Figura 15. La curva de actividad de la enzima pirofosforilasa posee un perfil parecido hasta las 12 horas con la curva de producción de EPS. Esto sugiere que durante la síntesis del polímero por la cepa filante el UDPglucosa es incorporado en el proceso de síntesis hasta la hora 12. Se observa un punto máximo de actividad a la hora 12 con una posterior disminución asociada también al EPS. El perfil de actividad de la enzima epimerasa muestra un comportamiento no asociado a la curva del EPS, aunque existen pequeños incrementos en su actividad, observándose un máximo de actividad a la hora 12 al igual que para la pirofosforilasa con una posterior disminución del nivel de actividad.

La diferencia en los perfiles de actividad de ambas enzimas a lo largo de la curva de producción del EPS sugiere que durante el crecimiento del microorganismo se forma el EPS con diferente proporción de componentes debido a la diferencia de UDPglucosa y UDPgalactosa formados hasta la hora 12.

Los niveles de actividad de ambas enzimas en la cepa no filante se muestran en la Figura 16. En este caso se puede observar que ambas enzimas poseen una fase lag de ocho horas con un punto máximo de actividad a la hora 12. Aunque este punto corresponde con el valor máximo de producción de EPS se observa que la síntesis del polímero empieza a la hora 4 existiendo un aparente retraso en los niveles de actividad de las dos enzimas, siendo más evidente para el caso de la epimerasa, respecto a la curva de producción del EPS. Los niveles de actividad de la epimerasa son mayores que para la pirofosforilasa para el punto de máxima actividad, respecto a lo observado para la cepa filante. Después del punto de máxima actividad de ambas enzimas (hora 12) se observa también una disminución en los niveles de actividad.

Las diferencias en los perfiles de actividad de ambas enzimas entre las dos cepas sugieren una diferencia en el papel en el proceso de síntesis del polímero, esperándose como consecuencia una diferencia en la proporción de los componentes del EPS durante el crecimiento.

La aparición del polímero a partir de la hora 4 y la presencia de un fase lag en los niveles de actividad de estas enzimas hasta la hora 8 sugieren que para el caso de la cepa no filante no existe una relación entre la actividad de estas enzimas con la síntesis del EPS. Estos resultados muestran que para el caso de la cepa filante existe una relación en el incremento de los niveles de actividad de la enzimas pirofosforilasa con la producción del EPS, pero no para el caso de la cepa ST233 que posee un fenotipo no filante.

Sutherland (1990) propone que existen evidencias indirectas de que la mayor afinidad hacia la formación de polímeros asociados a la pared celular tiene como resultado la reducción en la producción de exopolisacáridos. Si se considera que la cepa no filante posee un mayor crecimiento y un mayor consumo de lactosa como sustrato, aunado a una menor producción de EPS respecto a la cepa filante, es posible suponer que en este caso y como consecuencia del mayor crecimiento es más importante para la célula la formación de componentes asociados a la pared celular.

La disminución en los niveles de actividad de ambas enzimas para la cepa filante y no filante a partir de la hora 12 puede deberse a que en este momento se formó, como resultado de la actividad de las enzimas pirofosforilasa y epimerasa, un "pool" de precursores en el interior de la célula, que puede ejercer un efecto inhibitorio sobre estas enzimas. La síntesis de EPS continúa después de la hora 12 a pesar de la disminución en los niveles de actividad de estas enzimas. Este fenómeno puede ser el resultado de que a partir de ese "pool" de precursores tiene lugar únicamente otra serie de eventos en la síntesis del polímero, como son la traslocación de unidades repetitivas a través de la membrana citoplásmica, o bien, el proceso de excreción del polímero.

Terence y Crow (1984) reportaron en cultivos en quimiostato de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Gal<sup>+</sup> el fenómeno de disminución de actividad de la enzima galactocinasa conforme aumenta la concentración de UDPgalactosa. Cuando se han acumulado ciertos niveles de este compuesto se empiezan a incrementar de forma considerable la actividad de la UDPgal 4-epimerasa para formar UDPglucosa hasta que disminuyen los niveles de UDPgal. Este comportamiento apoyaría la hipótesis de que la disminución en los niveles de actividad de la pirofosforilasa y la epimerasa en este trabajo se deba a una acumulación de precursores que provoque algún efecto regulatorio.

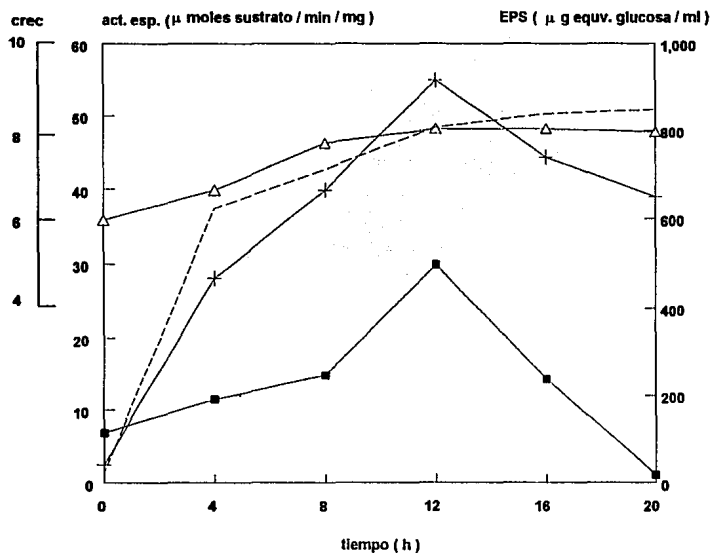


Figura 15. Actividades enzimáticas de la cepa filante. Pirofosforilasa (+). Epimerasa (■). EPS (-). Crec. (log UFC / ml) (Δ).

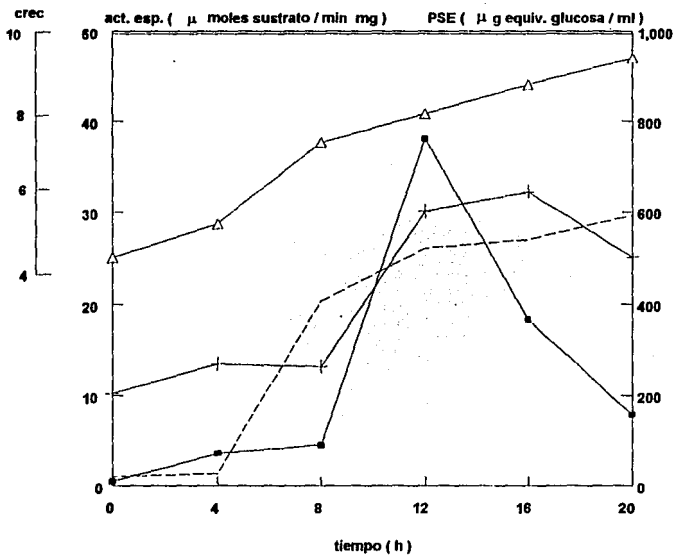


Figura 16. Actividades enzimáticas de la cepa no filante. Pirofosforilasa (+). Epimerasa (■). EPS (-). Crec. (log UFC / ml) ( $\Delta$ ).

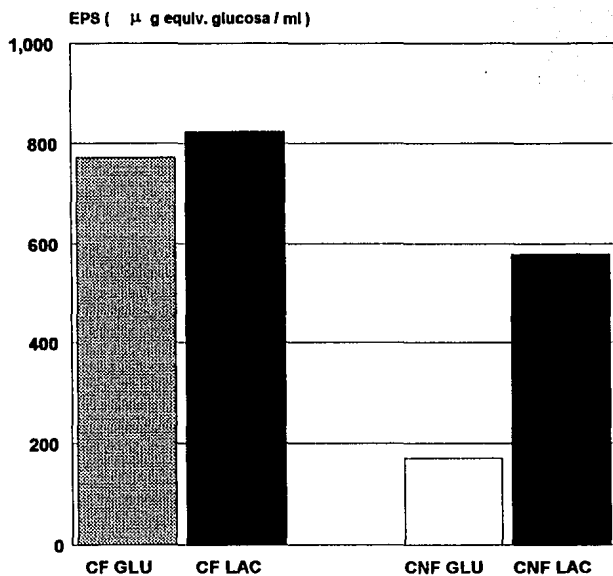
## **4.2 Efecto de glucosa como única fuente de carbono.**

Para determinar si la presencia de galactosa en el medio intracelular como resultado de la hidrólisis de lactosa antes de ser excretada tiene un efecto sobre los niveles de actividad de la enzima UDPGlu pirofosforilasa y UDPGal 4-epimerasa y su relación con la cantidad de EPS producido, se realizaron cultivos en lote con 100 ml de medio Bellinker modificado, empleando glucosa como única fuente de carbono para evitar el posible efecto de la presencia de galactosa. De este cultivo se determinaron la cantidad de EPS y los niveles de actividad de ambas enzimas a las 12 horas de cultivo por ser el tiempo en donde se empiezan a alcanzar los niveles de máxima producción.

### **4.2.1 Efecto sobre crecimiento y producción del exopolisacárido.**

En la Figura 17 se muestra el efecto de la glucosa como única fuente de carbono sobre el crecimiento y la producción de EPS en la cepa filante expresado como producción específica con base en crecimiento comparada con un control en el que se emplea lactosa y por lo tanto presencia de galactosa.

Se puede observar que para el caso de la cepa filante no existen diferencias significativas en el crecimiento y producción del EPS cuando se emplean como fuente de carbono glucosa y lactosa. Para el caso de la cepa no filante, existe una menor producción específica cuando se emplea como fuente de carbono glucosa únicamente. Este fenómeno puede ser el resultado de la diferencia en la capacidad de introducir del medio la fuente de carbono. Zourari *et al.* (1992), reporta que el transporte de galactosa (en cepas Gal+) y de glucosa es lento respecto al de lactosa y que la utilización preferencial del disacárido se debe a limitaciones en el transporte de monosacáridos.



CRECIMIENTO ( UFC / ml )		
Cepa	Lactosa	Glucosa
Filante	$2.00 \times 10^8$	$2.34 \times 10^7$
No filante	$4.35 \times 10^7$	$6.45 \times 10^6$

Figura 17. Efecto de la glucosa sobre la producción del EPS en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en medio sintético Bellinker modificado. CF, cepa filante. CNF, cepa no filante. glu, glucosa. lac, lactosa.



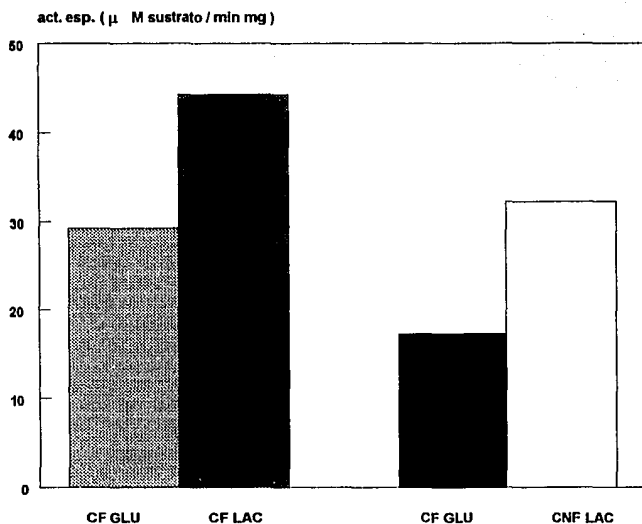
#### 4.2.2 Efecto de la glucosa sobre las actividades enzimáticas.

El efecto de la glucosa como única fuente de carbono sobre las actividades de las enzimas UDPGlu pirofosforilasa y UDPGal 4-epimerasa se muestra en la Figura 18, contra un control con lactosa.

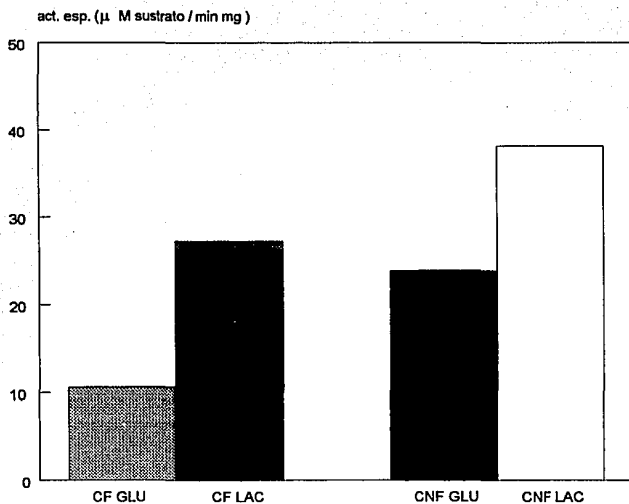
En la Figura 18 se observa que los niveles de actividad de la pirofosforilasa disminuyen cuando se emplea glucosa como única fuente de carbono en ambas cepas respecto a los observados en determinaciones a partir de cultivos con lactosa como fuente de carbono. En este caso la presencia de galactosa en el medio aparentemente tiene un efecto positivo sobre la actividad de la UDPGlu pirofosforilasa.

En la Figura 19 se observa en ambas cepas un incremento en los niveles de actividad de la enzima UDPGal 4-epimerasa cuando se emplea glucosa como única fuente de carbono respecto al nivel de actividad en cultivos con lactosa. En este caso parece ser que la presencia de galactosa tiene un efecto de tipo negativo sobre la actividad de esta enzima. Este resultado es similar al obtenido por Försén y Häivä (1981), para el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

La similitud en el comportamiento de la variación de los niveles de actividad de las dos enzimas cuando se realizan cultivos en glucosa como única fuente de carbono para ambas cepas sugieren un metabolismo similar en cuanto al efecto de la galactosa sobre estas enzimas. Sin embargo, las diferencias en el nivel de actividad en un cultivo de 20 horas sugieren una diferencia en el papel de cada una de estas enzimas en la biosíntesis del EPS en la cepa filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.



**Figura 18.** Efecto de la glucosa como fuente de carbono sobre los niveles de actividad específica de la enzima UDPglucosa pirofosforilasa en la cepa filante y no filante en diferentes fuentes de carbono. CF, cepa filante. CNF, cepa no filante. Glu, glucosa. Lac, lactosa.



**Figura 19. Efecto de la glucosa como fuente de carbono sobre los niveles de actividad específica de la enzima UDPgalactosa 4-epimerasa en la cepa filante y no filante en diferentes fuentes de carbono. CF, cepa filante. CNF, cepa no filante. Glu, glucosa. Lac, lactosa.**

El análisis de la posible participación de las enzimas UDPGlu pirofosforilasa (1) y UDPGal 4-epimerasa (2) se muestra en la Figura 20.

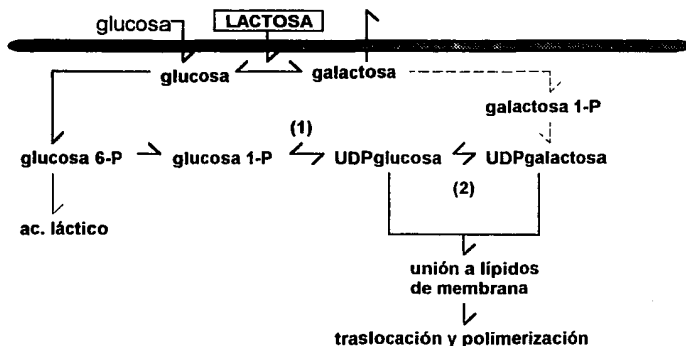


Figura 20. Rutas propuestas para la incorporación de glucosa y galactosa en la síntesis del EPS de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. (1), UDPglucosa pirofosforilasa. (2), UDPgalactosa 4-epimerasa.

Para el caso de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* la galactosa proveniente de la hidrólisis de lactosa es excretada al medio, pero aparentemente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, su presencia tiene un posible efecto positivo sobre la actividad de la pirofosforilasa y de la epimerasa, incorporando así, por la vía propuesta en la Figura 20 (líneas gruesas), glucosa para ser empleada posteriormente como sustrato de la epimerasa y formar UDPgalactosa para la síntesis del EPS. Este mecanismo es la única forma por la cual se puede incorporar galactosa al no poder metabolizar este residuo por la enzima inicial de la vía de Leloir (líneas punteadas de la Figura 20) (Zourari, *et al.* 1992).

La disminución en los niveles de actividad de la pirofosforilasa en extractos de cultivos en glucosa respecto a los niveles observados en extractos de cultivos con lactosa y el aumento en los niveles de actividad de la epimerasa sugiere que la cantidad de UDPglu formada es en gran parte utilizada como sustrato de la epimerasa para la síntesis de UDPgalactosa, por lo que es probable que la proporción de los componentes del EPS cambie dependiendo de la fuente de carbono empleada como sustrato. De este modo es probable esperar que si la actividad de la pirofosforilasa es mayor que la de la epimerasa, la proporción de glucosa en el polímero sería mayor que la proporción de galactosa y viceversa. Marshall (1994, comunicación personal) determinó en una cepa filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* que la proporción de glucosa:galactosa es de 6.7:1.3, resultados que apoyan esta hipótesis.

El incremento en los niveles de actividad de la epimerasa con glucosa como fuente de carbono sugiere que la única forma de incorporar galactosa a la síntesis del polímero es vía enzimas 1 (UDPglucosa pirofosforilasa) y 2 (UDPgalactosa 4-epimerasa) de la Figura 20.

Para demostrar las explicaciones que se proponen de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, resulta de interés conocer la proporción de los componentes del EPS en cultivos con glucosa y lactosa como fuentes de carbono.

### **4.3 Efecto de la *p*-fluorofenilalanina como probable inductor de la síntesis del exopolisacárido.**

#### **4.3.1 Efecto sobre crecimiento y producción de EPS.**

El uso en medios de cultivo de algunos análogos de aminoácidos, tales como la *p*-fluorofenilalanina, que son incorporados a proteínas generando una alta termolabilidad de ciertas enzimas se empleó en estudios regulatorios de la síntesis del material cápsular en *E. coli* (Försén y Häivä, 1981). Estos autores emplearon este compuesto a diferentes concentraciones para obtener cepas productoras de EPS de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a partir de cepas no productoras o pobremente productoras de polímero.

Con la finalidad de obtener un efecto similar en las cepas de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* empleadas en este trabajo se probaron diferentes concentraciones de *p*-fluoro-DL-fenilalanina (SIGMA), que fueron seleccionadas con base al trabajo de Försén y Häivä (1981).

El efecto de la *p*-fluorofenilalanina sobre la producción de EPS y el crecimiento en *S. salivarius* subsp. *thermophilus* se muestra en la Figura 21. Se puede observar que la *p*-fluorofenilalanina posee un efecto positivo pequeño sobre la producción de EPS en la cepa filante, siendo significativas las diferencias con una concentración de este compuesto de  $2.5 \times 10^{-6}$  M. Sin embargo, para la cepa no filante se observa un efecto negativo muy pequeño sobre la producción del EPS para ambas concentraciones de este compuesto.

El efecto de este compuesto en la cepa no filante es contrario a lo que observaron Försén y Häivä (1981), para *Lactococcus*, en donde la *p*-fluorofenilalanina mostró un efecto estimulante sobre la producción de EPS en cepas no productoras o poco productoras.

#### **4.3.2 Efecto sobre los niveles de actividad enzimática.**

En las Figuras 22 y 23 se muestran los efectos de la *p*-fluorofenilalanina sobre los niveles de actividad de las enzimas pirofosforilasa y epimerasa en la cepa filante y no filante.

Los valores de actividad observados para la UDPglucosa pirofosforilasa en la cepa no filante y su relación con los niveles de EPS con ambas concentraciones de *p*-

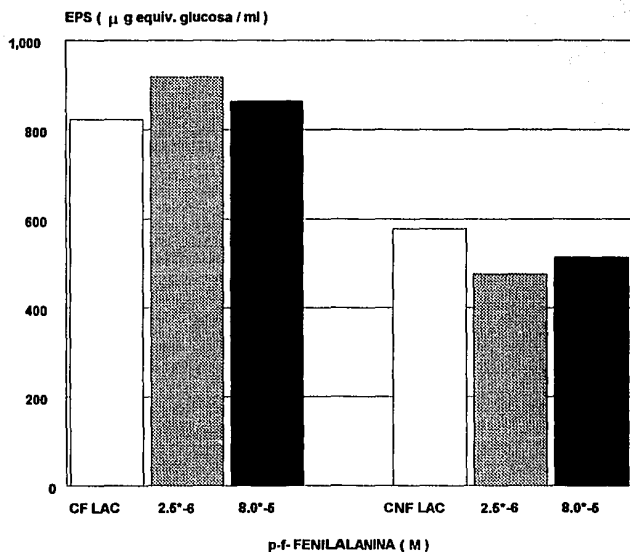
fluorofenilalanina no indican que la variación entre los niveles de actividad de esta enzima se vean afectados por la presencia de este compuesto.

Sin embargo, para el caso de la cepa filante a una concentración de  $2.5 \times 10^{-6}$  ocurre una disminución significativa en los niveles de actividad de esta enzima. Mientras que los niveles de actividad de la epimerasa se incrementan considerablemente respecto al control.

Para el caso de la cepa no filante se observa un efecto negativo sobre la actividad de la epimerasa, sin embargo no resulta clara la relación entre la variación de los niveles de actividad de esta respecto al control y la producción de EPS en ambas cepas.

Los resultados observados en las cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* empleadas en este trabajo, muestran que la *p*-fluorofenilalanina no posee el efecto inductor sobre la producción de EPS observado en las cepas no filantes de *Lactococcus* empleadas por Försén y Häivä (1981).

Es importante considerar que la ruta biosintética de EPS es compleja e involucra la participación de enzimas que no forman únicamente parte de la síntesis de exopolisacáridos (Figura 4), por lo que es importante buscar alguna(s) otra(s) enzima(s) blanco que pudiera(n) estar involucrada(s) en la ruta biosintética de EPS.



CRECIMIENTO ( UFC / ml )			
Cepa	Control	2.5 × 10 <sup>-6</sup> M	8.0 × 10 <sup>-5</sup> M
Filante	2.00 × 10 <sup>8</sup>	1.2 × 10 <sup>7</sup>	3.81 × 10 <sup>7</sup>
No filante	4.35 × 10 <sup>7</sup>	2.1 × 10 <sup>7</sup>	6.0 × 10 <sup>7</sup>

Figura 21. Efecto de la p-flourofencilalanina sobre la producción de EPS de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Control (□). 2.5 × 10<sup>-6</sup>M (▨). 8.0 × 10<sup>-5</sup>M (■). CF, cepa filante, CNF, cepa no filante.

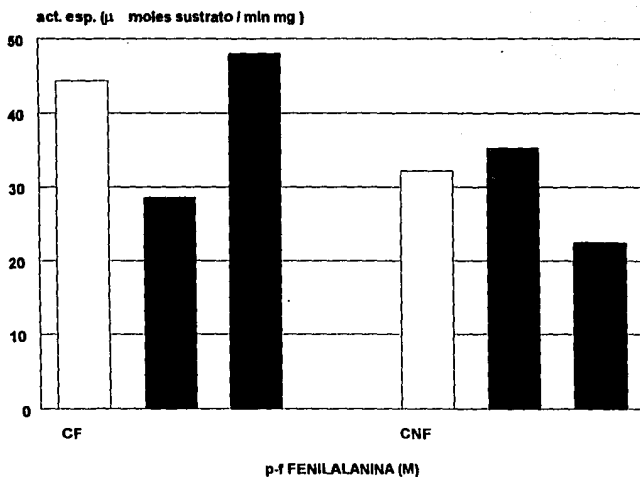


Figura 22. Efecto de la *p*-fluorofenilalanina sobre la actividad de la UDPglucosa pirofosforilasa en la cepa filante de *S. salivarius* subsp *thermophilus*. Control ( $\square$ ),  $2.5 \times 10^{-6} M$  ( $\text{▨}$ ),  $8.0 \times 10^{-6} M$  ( $\blacksquare$ ).



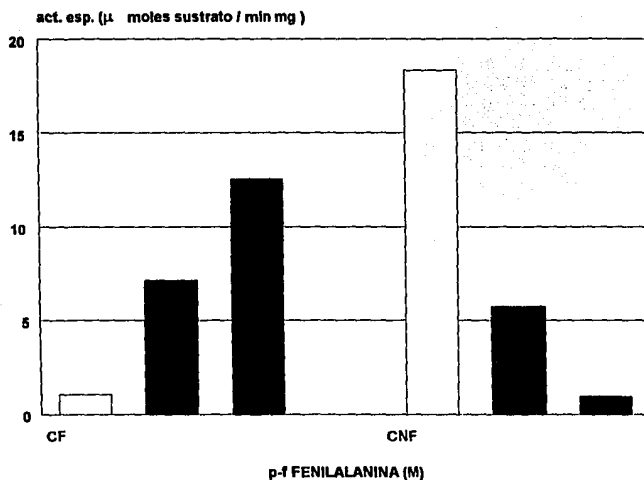


Figura 23. Efecto de la *p*-fluorofenilalanina sobre la actividad de la UDPgalactosa 4-epimerasa en la cepa no filante de *S. salivarius* subspp *thermophilus*. Control ( $\square$ ),  $2.5 \times 10^{-6} M$  ( $\square$ ),  $8.0 \times 10^{-6} M$  ( $\blacksquare$ ).

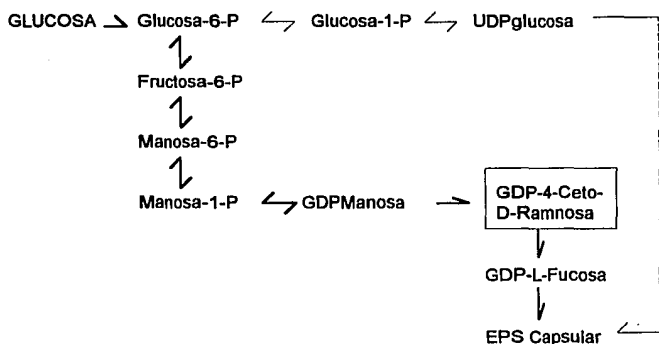
## 5. Determinación de los componentes del polímero.

Para comprobar la presencia de galactosa en el EPS producido por las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, como resultado de una interconversión de la glucosa por el mecanismo propuesto en la Figura 20, se determinó por cromatografía en capa fina (CCF), la composición del EPS extraído de cultivos de ambas cepas empleando como fuentes de carbono lactosa y glucosa.

La CCF de las muestras de EPS hidrolizadas permitió detectar como principales constituyentes del polímero extraído a partir de cultivos de ambas cepas con lactosa y glucosa como fuente de carbono a galactosa, glucosa, y ramnosa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por varios autores (Tabla 4; Cerning, *et al.* 1988; Cerning, 1990; Marshall, 1994, comunicación personal). La presencia de galactosa en el EPS producido a partir de cultivos con glucosa como única fuente de carbono resulta como una evidencia adicional en favor del planteamiento propuesto de que la glucosa es epimerizada a galactosa.

La  $\alpha$ -L-ramnosa es un azúcar de seis carbonos con un  $-\text{CH}_3$  en lugar de  $-\text{CH}_2\text{OH}$  en el carbono 6, y es un componente de la cadena lateral O de la capa de lipopolisacárido de la membrana exterior de bacterias gram negativas (Strayer, 1981), encontrándose un gen regulador para el metabolismo de este azúcar en *E. coli* (rhaBAD) (Neidhardt, *et al.* 1990). La presencia de este azúcar en el polisacárido extracelular producido por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* implicaría la participación de un precursor activado. En el caso de la cepa de *E. coli* K-12 se propone en la ruta biosintética del polisacárido capsular la formación de un precursor nucleótido-azucarado con ramnosa (Figura 24). Es probable que la ramnosa sea incorporada al exopolisacárido de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* en una forma similar, vía formación de un precursor similar al que se propone en la Figura 24.

Con base en que varios autores no siempre reportan el mismo tipo de carbohidratos presentes en el EPS, Cerning (1990) propone que la presencia de ciertos azúcares, tales como pentosas en el polímero, es el probable resultado de la modificación de algún azúcar durante las condiciones de hidrólisis. En este trabajo se descartó la posibilidad de modificación de un azúcar principal (glucosa o galactosa), como resultado de las condiciones de hidrólisis ya que se aplicaron simultáneamente sobre las placas de sílica gel estándares sometidos a condiciones de hidrólisis y en ningún caso se detectó una modificación que afectara la migración de alguna muestra.



**Figura 24. Fragmento de la ruta biosintética propuesta para el polisacárido capsular de *E. coli* K-12 en donde se muestra la formación de un precursor con ramnosa. Tomado de Markovitz, et al. 1967.**

## **CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES.**

Las conclusiones obtenidas con base en los resultados de este trabajo son:

### **1. Determinación del EPS.**

1.1 Se desarrolló una metodología que permitió la extracción y cuantificación del EPS extracelular producido por las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, que se basa en el tratamiento del paquete celular con una proteasa y su posterior cuantificación por azúcares totales. Las condiciones extremas a las que es sometido el paquete celular durante la extracción del EPS permiten suponer que existe una estrecha relación del polímero producido por estas cepas con proteínas. Esta metodología ha sido empleada de manera rutinaria en nuestro grupo para el trabajo con estas bacterias.

### **2. Crecimiento y producción del EPS.**

2.1 Se modificó el medio sintético Bellinker, que permitió observar por primera vez en el trabajo con estas cepas de bacterias una diferencia cuantitativa en la producción del EPS, característica que corresponde con las diferencias fenotípicas observadas en cultivos entre estas cepas.

2.2. Bajo las mismas condiciones de inóculo y cultivo, la cepa no filante alcanza un mayor crecimiento, respecto a la cepa filante en medio sintético Bellinker.

2.3 La cepa denominada como no filante produce un EPS en menor cantidad que la cepa filante.

2.4 La producción de EPS se encuentra asociada al crecimiento tanto en la cepa filante como en la cepa no filante.

### **3. Origen de la galactosa del polímero.**

3.1 Las cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* empleadas en este trabajo excretan al medio la galactosa proveniente de la hidrólisis de lactosa empleando para su crecimiento y producción del EPS únicamente la glucosa proveniente de lactosa.

3.2 La cepa filante consume únicamente un 39% del total de la lactosa empleada como fuente de carbono, mientras que la cepa no filante consume un 55% de lactosa. Estas diferencias en el consumo de sustrato podrían explicar la diferencia en crecimiento que se observa en la cepa no filante respecto a la cepa filante.

#### **4. Relación entre las actividades enzimáticas y producción del EPS.**

- 4.1 Existe un relación entre el incremento en los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa con la producción de EPS en la cepa filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.
- 4.2 Los niveles de actividad de la pirofosforilasa son mayores que los de la epimerasa y se incrementan de manera paralela a la producción del EPS hasta la hora 12 en la cepa filante, mientras que la epimerasa incrementa su actividad cuando probablemente se han acumulado ciertos niveles de UDPglucosa en el interior de la célula.
- 4.3 Ambas enzimas poseen un máximo de actividad a la hora 12 de crecimiento, observándose una posterior caída en los niveles de actividad de ambas enzimas a pesar de que continúa la producción de EPS.
- 4.4 No existe un relación entre la actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa con la producción de EPS en la cepa no filante de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.
- 4.5 En cultivos con glucosa como fuente de carbono existe para ambas cepas una disminución en los niveles de actividad de la fosforilasa y de la epimerasa respecto a los observados en cultivos con lactosa. Esto sugiere que la presencia de galactosa proveniente de lactosa en el ensayo ejerce un probable efecto negativo sobre estas enzimas.

#### **5. Efecto de la p-fluorofenilalanina sobre la producción del EPS.**

- 5.1 El compuesto p-fluorofenilalanina no ejerce un efecto inductor sobre la producción del EPS en las cepas filante y no filante de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, como en el caso de cepas de *Lactococcus*.

#### **6. Determinación de los componentes del polímero.**

- 6.1 La hidrólisis con  $H_2SO_4$  2M permitió observar que el EPS producido está compuesto por glucosa, galactosa y ramnosa en las cepas filante y no filante cuando se emplean como fuente de carbono lactosa o glucosa.

## PERSPECTIVAS

Los procesos de biosíntesis de EPS en bacterias lácticas han sido muy poco estudiados y en especial en el caso de los iniciadores del yoghurt.

La producción del EPS resulta de gran interés desde el punto de vista industrial, sin embargo, la inestabilidad de la característica es uno de los principales problemas que impiden su uso a nivel industrial aunado a la poca información sobre sus causas, por lo que resulta de gran interés el estudio de los aspectos relacionados con la biosíntesis del polímero para determinar si existe relación entre las diferentes etapas que la integran con el fenómeno de inestabilidad para finalmente poder obtener en laboratorio cepas de interés industrial.

Con base en los objetivos planteados y los resultados obtenidos en este trabajo se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Identificar los componentes que puedan tener algún efecto sobre el crecimiento y producción del EPS en la cepa filante del medio sintético MRS-lac.
2. Cuantificar la cantidad de glucosa que es incorporada al polímero y la que es utilizada para el crecimiento en ambas cepas con el empleo de lactosa con glucosa marcada radioactivamente.
3. Investigar los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa en una cepa mutante filante- obtenida a partir de una filante para determinar su importancia en el proceso de biosíntesis de EPS.
4. Determinar la importancia de enzimas como la fosfoglucosa isomerasa que incorpora glucosa-6-P de la vía de EMP a la formación de precursores nucleótido azucarados.
5. Conocer la proporción de cada uno de los azúcares que forman parte del EPS en diferentes etapas de la curva de crecimiento y relacionarla con los perfiles de actividad de las enzimas estudiadas en este trabajo.
6. Determinar los niveles de actividad de las enzimas UDPglucosa pirofosforilasa y UDPgalactosa 4-epimerasa cuando se presenta una disminución en la cantidad del EPS como consecuencia de la inestabilidad tras varias resiembras.
7. Implementar una estrategia de análisis de la estructura del EPS producido por estas bacterias para determinar algunas características tales como tamaño de unidades repetitivas y tipos de enlace.
8. Determinar las propiedades reológicas del EPS producido por la cepa filante.

## APÉNDICES

### Apéndice I.

#### 1. Determinación de la identidad de la cepa mediante el sistema API 50 CH.

El sistema de identificación bioquímica mediante el sistema API se basa en la capacidad de un microorganismo de fermentar una serie de carbohidratos y en algunos casos hacer reaccionar a ciertas enzimas que permiten su identificación de acuerdo a la comparación de los resultados obtenidos con una base de datos.

El sistema API permite la identificación rápida y fácil de un determinado microorganismo evitando así la tediosa preparación de medios con un determinado sustrato.

El sistema API 50 CH permite la identificación de bacterias lácticas mediante la fermentación de 49 carbohidratos de una suspensión bacteriana en el medio 50CHL (bioMERIUX) el cual contiene púrpura de bromocresol como indicador. La fermentación se realiza en una serie de celdillas (con el carbohidrato) en las que únicamente se requiere colocar una muestra del medio 50CHL con una determinada densidad bacteriana en condiciones de temperatura de crecimiento normales del microorganismo.

En este trabajo se empleó una modificación de la metodología recomendada en las especificaciones del proveedor para obtener la cantidad suficiente de microorganismos necesarios para asegurar un crecimiento que genere un cambio de color del indicador en la celdilla (esta modificación fue realizada por el Biól. Jesús Villegas Cruz de nuestro grupo de trabajo):

Cultivo microorganismo en medio sintético Bellinker modificado
Centrifugación 5 000 rpm / 14 min / 4°C
Decantar sobrenadante cuidadosamente
Resuspender en 2 ml de H <sub>2</sub> O destilada estéril
Transferir gota a gota a un vial con 5 ml de H <sub>2</sub> O destilada estéril hasta igualar la turbiedad del estándar de McFarland (por comparación visual). <b>El número de gotas utilizadas para igualar la turbidez del estándar = n</b>
Tomar 2n y resuspender en medio 50 CHL
Tomar alrededor de 100µl de esta solución y llenar cada celdilla del "kit".
Cubrir con aceite de parafina estéril las celdillas, colocar agua en la base del contenedor del "kit" e incubar 24 hrs / 37 °C

## Apéndice II.

### 1. Composición de buffers de reacción para pronasa (Sambrook, *et al*, 1989).

En este trabajo fue empleada pronasa tipo XXV (Pronasa E) de SIGMA con una actividad de 5.9 unidades/mg sólido.

La pronasa es una mezcla de serina y proteasas ácidas aisladas de *Streptomyces griseus*. La enzima liofilizada es preparada disolviendo el polvo a una concentración final de 20 mg / ml en un buffer de:

TRIS-HCl 10 mM pH 7.5  
NaCl 10 mM

La enzima así preparada es conservada a -20°C.

El buffer de reacción está compuesto por:

TRIS-HCl 0.01M pH 7.5  
EDTA 0.01M  
SDS 0.5%.



### Apéndice III.

#### 1. Método de cuantificación de azúcares totales por fenol- $H_2SO_4$ (Dubois, *et al*, 1956).

**PRINCIPIO.** Este método se basa en la oxidación de los azúcares en presencia de sustancias ácidas como la mezcla de ácido sulfúrico-fenol, formando anillos furánicos coloridos cuantificables en el espectrofotómetro.

**VENTAJAS.** Es un método simple, rápido con resultados reproducibles que puede ser usado en la microdeterminación de azúcares, sus metilderivados, oligosacáridos y polisacáridos. La intensidad del color desarrollado está en función de la cantidad de fenol añadido, la cual debe ser constante. El color producido es estable por varias horas.

**DESVENTAJAS.** Si se varía la cantidad de fenol entre una y otra determinación varía la intensidad del color desarrollado. Algunas aldosas, cetosas y ácidos aldurónicos responden de diferente manera. La presencia de proteínas, cisteína, agentes reductores de naturaleza no carbohidrato, iones de metales pesados y la azida interfieren con este ensayo, pero a pesar de ello queda como un método útil y rápido, no específico para la detección de carbohidratos neutros.

**MÉTODO.** Reactivos:

Fenol al 5% disuelto en agua. Esta solución es estable indefinidamente.  
 $H_2SO_4$  concentrado.

Curva estándar: glucosa en un rango de 10 - 100  $\mu g$  / ml.

Técnica: Agregar los siguientes reactivos en orden:

Muestra	1 ml
Fenol 5%	1 ml. Mezclar
$H_2SO_4$ concentrado	5 ml.
<b>PRECAUCIÓN</b>	
La reacción es muy violenta y exotérmica. Agitar inmediatamente	
Incubar 25° C / 25 min.	
Leer absorbancia 490 nm	

La cantidad de azúcares totales determinada en cada muestra fue expresada como  $\mu g$  equivalentes de glucosa / ml a la dilución correspondiente.

## 2. Cromatografía en capa fina de carbohidratos (Randerath, 1965; Stahl, 1969).

La cromatografía en capa fina (CCF) es un método rápido y simple empleado para el análisis cualitativo y cuantitativo de varios tipos de moléculas. A partir de que Stahl y Kaltenbach en 1961 (Stahl, 1969) emplearon esta técnica para el análisis de mezclas de azúcares, el método ha sido adoptado para resolver una gran cantidad de problemas analíticos.

**PRINCIPIO.** La CCF se basa en el principio general de la cromatografía, el cual consiste en el empleo de una fase estacionaria la cual es un soporte inerte, siendo la sílica gel o la celulosa en vidrio o papel el material comúnmente empleado. Sobre esta fase estacionaria es aplicada una muestra la cual migra cierta distancia del punto de aplicación ( $R_f$ ) como resultado del movimiento en un fase móvil líquida, cuya composición y naturaleza polar está determinada por el tipo de sustancia a analizar, y finalmente se emplea un método de detección y registro.

Los carbohidratos son moléculas altamente hidrofílicas, por lo que son empleadas como fase móvil en su análisis sistemas de solventes polares los cuales tienen una tasa de migración variable de acuerdo al tamaño de la placa y condiciones de saturación. Cuando se emplea sílica gel como fase estacionaria para el análisis de estas moléculas se obtiene una limitada resolución de algunos azúcares sencillos, obteniéndose valores de  $R_f$  que decrecen en relación al peso molecular y al número de grupos hidroxilo (pentosas > hexosas > disacáridos > azúcares más complejos).

Una importante característica de los soportes inorgánicos empleados como fase estacionaria en la CCF para el análisis de carbohidratos es que las muestras pueden ser detectadas con un agente no específico y altamente destructivo como es el ácido sulfúrico, el cual permite la detección de cualquier tipo de azúcar o de sus derivados que no pueden ser visualizados por otros métodos.

**PROCEDIMIENTO.** Se saturó una cámara de vidrio con la siguiente mezcla de solventes: butanol:etanol:agua destilada (grado analítico) (10:1:2 v/v). durante 2-4 horas. En este trabajo se emplearon placas de sílica gel de 20 x 20 cm (Merck) de 0.5 mm de espesor.

Las muestras fueron aplicadas de la siguiente manera: (1) Estándares: se prepararon a una concentración de 5 mg en 1 ml de  $H_2SO_4$  2M y fueron sometidas a las mismas condiciones de hidrólisis que las muestras problema. Fueron aplicados 2  $\mu$ l de cada estándar. (2) Las muestras de PSE hidrolizadas fueron centrifugadas 10000 rpm/10 min a temperatura ambiente tomando 2  $\mu$ l de muestra para ser aplicados sobre una línea a 1 cm del extremo de la placa. La fase móvil se dejó correr a todo lo largo de la placa y se dejó evaporar el eluyente completamente. Las muestras fueron detectadas por aspersion de una mezcla de metanol absoluto: $H_2SO_4$  (grado analítico) (8:2 v/v). Después de evaporar completamente el

metanol se reveló la placa en una estufa a 100 - 150°C por 5- 10 min (hasta que son detectadas visualmente las manchas de azúcares).

## BIBLIOGRAFÍA.

- Benateya, A., Bracquart, P. and G. Linden. (1990). Galactose-fermenting mutants of *Streptococcus thermophilus*. **Can. J. Microbiol.** 37: 136-140.
- Bouinois, G. J. and K. Jann. (1989). Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. **Mol. Microbiol.** 3 (12): 1819-1823.
- Cerning, J., Bouilliane, C. Landon, M. and J. M. Desmazeud. (1986). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides production from *Lactobacillus bulgaricus*. **Biotechnol. Lett.** 8: 255-260.
- Cerning, J., Bouilliane, C., Desmazeud, M. J. and M. Landon. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnol. Lett.** 10 (4): 255-260.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 113-130.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and J. M. Desmazeud. (1992). Isolation and characterization of exopolisaccharide from slime forming mesophilic lactic acid bacteria **J. Dairy Sci.** 75: 692-699.
- DIFCO. (1985). DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th Ed. Difco Laboratories.** USA 1155 pp.
- Doelle, H. W. (1981). Basic metabolic processes. In: H. J. Rehm and G. Reed (Ed). **Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 volumes. Volume 1.** pp: 113-210.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. and P. Rebers. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.
- Escalante, L. A. (1992) **Producción de polisacáridos exocelulares en bacterias lácticas del género *Streptococcus thermophilus*.** Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Farrés, A., Castillo, C., Salcedo, L. y R. Rosas (1991). Estado actual de fisiología y genética de bacterias lácticas. **Biotecnología.** 1 (3): 13-17.
- Filali, M., Cornet, J-F., Fonta, I., Fournet, B. and G. Dubertret. (1993). Production, isolation and preliminary characterization of the exopolisaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnol. Lett.** 15 (6): 567-572.

Försén, R. and V. H. Häivä. (1981) Induction of stable slime-forming and mucoid states by *p*-fluorophenylalanine in lactic streptococci. **FEMS Microbiol. Lett.** 12: 409-413.

Friend, B. A. and K. M. Shahani. (1985). Fermented dairy products. In: M. Moo-Young (Ed.). **Comprehensive Biotechnology. Volume 3.** Pergamon Press, U. K. pp. 567-592.

García-Garibay, M. (1985). **Studies on growth, slime production and slime composition of a strain of *Lactobacillus bulgaricus*.** Tesis de Maestría. Universidad de Reading, Inglaterra.

García-Garibay, M., Revah, S y L. Gómez-Ruiz. (1993). Productos lácteos. En: García Garibay, R. Quintero y A. López-Mungía. (Coordinadores). **Biología alimentaria.** LIMUSA. México. pp 153-179.

Garvie, E. I. (1984). Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. In: Davies, F. L. and B. A. Law. (Eds). **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.** Elsevier Applied Science Publishers. London. pp. 35-66.

Gasson, M. J. and D. F. Lyndon. (1985). The genetics of lactic acid bacteria. In F. L. Davies and B. A. Law (Ed). **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milks.** Elsevier Applied Sciences. London. pp. 99-125.

Hansen, R. G., Albretch, G. J., Bass, S. T. and L. L. Seinfert. (1966). UDP-Glucose Pirophosphorilase (crystalline) from liver. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan. (Ed). **Methods in Enzimology. Volume 8.** Academic Press: 248-253.

Hutkins, R. and C. Ponne. (1991). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a galactose-lactose antiporter. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (4): 941-944.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antoine van Leeuwenhoek.** 49: 209-224.

Kroger, M.; Kurman, J. and J. Räsik. (1989). Fermented milks -past, present and future. **Food. Technol.** 43 (1): 92-99.

Lieberman, M., Buchanan, C. E. and A. Markovitz. (1970). Derepression of GDP Glucose Manose and UDP-glucose Pirophosphorilase by a regulator gene mutation: Episomal dominance in partial diploids. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 65 (3): 625-632

Macrina, F., Jones, K. and P. Wood. (1980). Chimeric Streptococcal Plasmids and Their Use as Molecular Cloning Vehicles in *Streptococcus sanguis* (Challis). **J. Bacteriol.** 143 (3): 1425-1435.

Markovitz, A., Sydskis, R. and M. Lieberman. (1967a). Genetic and Biochemical Studies on Mannose-Negative Mutants That Are Deficient in Phosphomannose Isomerase in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 94 (5): 1492-1496.

Markovitz, A., Lieberman, M. and N. Rosenbaum. (1967b). Derepression of Phosphomannose Isomerase by Regulator Gene Mutations Involved in Capsular Polysaccharide Synthesis in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 94 (5):1497-1501.

Marshall, V. E. and B. A. Law. (1984a). The physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. In: Davies, F. L. and B. A. Law. (Eds). **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.** Elsevier Applied Science Publishers. London. pp. 66-98

Marshall, V. E. and B. A. Law. (1984b). Flavour development in fermented milks. In Davies, F. L. and B. A. Law. (Eds). **Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.** Elsevier Applied Science Publishers. London. pp. 153-186.

Marshall, V. E. (1986). The microflora and production of fermented milks. In M. R. Adams (Ed). **Progress in industrial microbiology.** Elsevier Applied Sciences Publishers. London .pp. 1-44.

McKay, A. (1986). Applications of genetic engineering techniques for dairy starter culture improvement. In: S. K. Harlander and T. P. Labuza (Ed). **Biotechnology in food processing.** Noyes Publications. New Jersey. pp. 145-155.

Maxwell, E. S., Kurashashi and H. M. Kalckar. (1961). Enzymes of the Leloir Pathway. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan. (Ed). **Methods in Enzymology, Volume 5.** Academic Press: 174-189.

Mercenier, A., Robert, C., Romero, D. A., Castellino, I., Slos, P. and Y. Lemoine. (1988) Development of an Efficient Spheroplast Transformation Procedure for *S. thermophilus*: The Use of Transfection to Define a Regeneration Medium. **Biochimie.** 70: 567-577.

Neidhardt, F., Ingraham, J. L. and M. Schaechter. (1990). **Physiology of The Bacterial Cell.** Sinauer Associates, Inc. Publ. Massachusetts. pp. 506

Oberg, C. J. and J. R. Broadbent. (1993). Thermophilic starter cultures: Another set of problems. **J. Dairy Sci.** 76: 2392-2406.

Oberman, H. (1985). Fermented milks. In: B. J. B. Wood (Ed). **Microbiology of Fermented Foods. Volume 1.** Elsevier Applied Science Publishers. London. pp. 167-195.

O'Leary, V. and J. H. Woychik. (1976). Utilization of Lactose, Glucose, and Galactose by a Mixed Culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Milk Treated with Lactate Enzyme. **Appl. Environ Microbiol.** 32 (1): 89-94.

Ono, J., Goto, T. and S. Okonogi. (1992). Metabolism and propagation rates in lactic acid bacteria. In: Y. Nakazawa and A. Hosono (Ed). **Functions of fermented milk. Challenges for the health sciences.** Elsevier Applied Science. London. pp. 165-190.

Pazur, J. H. (1986). Neutral polisaccharides. In: M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (Ed). **Carbohydrate analysis. A practical approach.** IRL Press. Whashington. pp. 55-96.

Petit, C., Maazouzi, J. and R. Marczack. (1991). Regulation of polisaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and feed-batch cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 216-221.

Quirasco, B. M. (1994). **Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosiltransferasa.** Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Randerath, K. (1965). **Thin layer chromatography.** Academic Press. USA. pp. 200-203.

Sambrook, J., Fritsch, E. and T. Maniatis. (1989). **Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Vol 3.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Appendix B.16.

Salcedo, B. L. (1992). **Factores genéticos relacionados con la expresión del fenotipo mucoide en bacterias lácticas utilizadas en la elaboración del yoghurt.** Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

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

Sinskey, A., Jamas, S., Easson, D. and C. Rha. (1985). Biopolymers and modified polysaccharides. In: S. K. Harlander and T. P. Labuza (Ed). **Biotechnology in food processing.** Noyes Publications. USA. pp. 73-74.

Sjöberg A. and B. Hahn-Hägerdal. (1989).  $\beta$ -Glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (6): 1549-1554.

Spiro, R. G. (1966). Analysis of sugars in glycoproteins. In: E. F. Neufeld and V. Ginsburg (Ed) **Methods in Enzimology. Volume 8**. Academic Press: 3-7.

Somkuty, G. A. and D. H. Steimberg. (1986). Distribution and analysis of plasmid in *Streptococcus thermophilus*. **J. Ind. Microbiol.** 1:157-163.

Sthal, E. (1969) **Thin layer cromatography. A laboratory handbook**. Springer Verlag, Germany. pp. 807-837.

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

Sutherland, I. W. (1992). **Microbial polysaccharides**. Pláticas impartidas en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Mor. Del 31 de marzo al 3 de abril.

Stryer, L. (1981). **Biochemistry**. 2nd Ed. W. H. Freeman and Co. San Francisco. pp. 783.

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

Terence, D. and V. L. Crow. (1983). Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 17: 13-17.

Terence, D. and V. L. Crow. (1984). Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limiting chemostat cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 48 (1): 186-191.

Thomson, J. (1988). Lactic acid bacteria: model systems for *in vivo* studies of sugar transport and metabolism in Gram-positive organisms. **Biochimie.** 70 (3): 325-336.

Tsakalidou, E. and I. Delezios (1993). A comparative study: Aminopeptidase activities from *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. **J. Dairy Sci.** 76 (8): 2145-2151.

Vedamuthu, E. R. and J. M. Neville. (1986). Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. **Appl. Environ. Microbiol.** 51(4): 667-682.

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



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

Wilson, D. and D. Hognes. (1966). Galactokinase and uridine diphosphogalactose 4-epimerase from *E. coli*. In: E. F. Neufeld and V. Ginsburg (Ed) **Methods in Enzymology. Volume 8.** Academic Press: 235-240.

William, G. C. (1989). Understanding microbes. **A laboratory textbook for microbiology.** W. H. Freeman and Company. New York. pp. 455-462.

Zourari, A., Accolas, JP. and J. M. Desmazeaud. (1992) Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. A review. **LAIT.** 72: 1-34.