



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE POLISACARIDO EN Streptococcus salivarius SUBSP. thermophilus.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

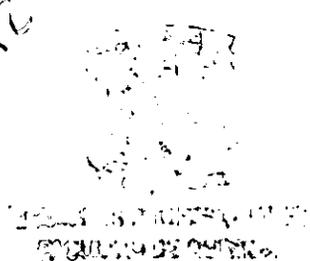
YAZMIN EDURNE HERNANDEZ CAMACHO



MEXICO, D.F.

2001

292957





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: María Elena Cañizo Suárez.

Vocal: Dr. Hermilio Leal Lara.

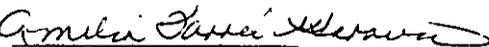
Secretario: Dra. Amelia Farrés González Saravia

1er Suplente: Marcos Francisco Baez Fernández.

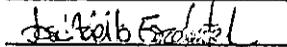
2do suplente: Dr. Francisco Ruíz Terán.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 312 del Edificio E de la Facultad de Química y en el laboratorio de Microbiología Industrial y Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

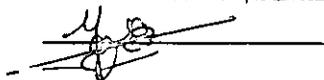
Asesor del tema: Dra. Amelia Farrés González Saravia



Supervisor técnico: Dr. J. Adelfo Escalante Lozada.



Sustentante: Yazmín Edurne Hernández Camacho.



A mis padres, María Eugénia y José Luis, por su apoyo incondicional, consejos y paciencia en todos estos años. Gracias por confiar en mí.

A mi abuelita, Sara, por su fortaleza y ganas de seguir adelante ante toda situación. Por todo el cariño que me ha dado en todos este tiempo.

A Amílcar por su cariño, ayuda y todos los buenos momentos que hemos compartido.

A mi familia.

A mis amigos, en especial a Paola, Tlalla, Omar y Ricardo que me han brindado una verdadera amistad y muy buenos momentos.

A la Dra. Amella Farrés por confiar en mí para realizar este trabajo, por su apoyo ilimitado y por sus consejos en los momentos de decisión.

A la M. en C. Idalia Flores por su ayuda en la realización del análisis estadístico, por su apoyo y sugerencias en el tiempo de realización de este momento.

A la Dra. Carmen Wachter por su ayuda y valiosos comentarios en todo momento.

A Alicia Marmolejo por su apoyo en los momentos difíciles y a mis compañeras del laboratorio 312 que en su momento me brindaron su ayuda.

Al Dr. Sergio Sánchez y todo su grupo de trabajo por las facilidades para la realización de este trabajo.

Al Ing. Abel Blancas y los chicos de la Planta Piloto por su apoyo y facilidades para llevar a cabo este proyecto

Al Dr. Adelfo Escalante por sus críticas y comentarios realizados a esta investigación

A Simón Guzmán por sus comentarios y apoyo en los momentos difíciles.

A el QFB Agustín Reyo y a mis compañeros por todos los buenos y no tan buenos momentos que compartimos.

A la Facultad de Química.

*Una vida sin errores, sin
tropiezos, sin fracasos, es sin duda
una vida a medias, porque significa
que no se intentó nunca nada.*

(Anónimo)

Índice.

	Página
CAPITULO 1.	
Introducción.	1
Generalidades.	
1. Bacterias Lácticas.	4
2. Yogurt, definición, proceso y microbiología.	6
2.1 Consistencia y textura del yogurt.	9
3. Exopolisacáridos bacterianos.	10
4. Producción de exopolisacárido en <i>Streptococcus thermophilus</i> .	11
4.1 Composición y estructura del exopolisacárido.	13
Planteamiento del problema.	15
Objetivos.	16
CAPITULO 2.	
Materiales y Métodos.	17
1. Microorganismos.	18
2. Medio de Cultivo.	19
3. Preparación del inóculo.	20
4. Condiciones de fermentación	20
5. Determinación de crecimiento.	21
6. Extracción y cuantificación del exopolisacárido.	21
CAPITULO 3.	
Resultados y discusión.	
1. Reactivación de cepas.	22
2. Efecto de fuentes de carbono.	22
3. Efecto de la concentración de lactosa sobre el crecimiento y producción de exopolisacárido en tres resiembras de la cepa filante y no filante	27
3.1 Cepa Filante	27
3.2 Cepa No Filante.	34
4. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de exopolisacárido.	42

5. Efecto de las combinaciones de la fuente de carbono en el crecimiento y producción de exopolisacárido .	46
Conclusiones.	57
Recomendaciones.	59
Bibliografía.	60
Apéndice.	66

Nota. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ha cambiado a *Streptococcus thermophilus*.

Capítulo 1.

Introducción.

Para un crecimiento óptimo, las bacterias ácido lácticas requieren de medios complejos para su desarrollo como son leche, suero ultrafiltrado o medios sintéticos como MRS o M17. El uso de un medio definido es particularmente importante cuando se estudia la producción de exopolisacárido (EPS), cuantitativa o cualitativamente. En los experimentos iniciales en este y otros grupos de trabajo la producción de exopolisacárido se había estudiado en cultivos en leche, donde las bacterias filantes se identificaban por su capacidad de formar filamentos al momento de tocar el medio de cultivo con algún objeto, lo cual representa desventajas metodológicas en la producción del polímero (Salcedo, 1992, Cerning, 1990). En trabajos posteriores se valoró la producción específica de polímero por el método de Escalante y col. (1993), utilizando una cepa filante y no filante de *Streptococcus thermophilus* en cultivo sintético MRS-lac líquido, y se observó que la producción del polímero es mayor en la cepa filante que en la no filante, en la que se detecta también la producción de un polímero. Las cepas filantes confieren mayor viscosidad al medio de cultivo. El estudio de la producción de yogurt utilizando cepas filantes y no filantes del cultivo iniciador mostró que la producción de polímero es mayor para la cepa filante y se obtiene un producto con baja sinéresis para estas cepas, utilizando leche con 12 % de sólidos totales (Wacher et al, 1993).

Cabe mencionar que el carácter filante de una cepa no está sólo determinada por la producción de un exopolímero si no que la interacción entre el exopolisacárido con la micela de caseína y la bacteria misma tienen un papel primordial en la estabilidad del gel.

La elaboración de yogurt con cepas iniciadoras filantes (CF) provoca una estructura con grandes espacios situación que no se presenta al emplear cepas no filantes (CNF), las cuales también sintetizan el exopolisacárido pero proporciona una menor firmeza y estabilidad al gel. Dichos espacios pueden afectar la integridad de la

matriz proteica ya que se forma un coágulo poco firme (Hassan *et al*, 1995; 1996), además se obtienen geles más adhesivos en cepas filantes de *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* que con no filantes (Domínguez *et al*, 1997).

La producción del polímero es altamente inestable, pues si se evalúa la producción en cinco transferencias de cultivo, ésta disminuye a lo largo de las resiembras (Villegas, 1995). También se encontraron diferencias en el comportamiento reológico de leches fermentadas con las dos cepas. El mismo comportamiento se observó para ambas cepas en medio Bellinker modificado pero se incrementaron los valores de producción (Escalante, 1993) y en leche al 11% de sólidos se obtuvieron valores más bajos a lo largo de ocho resiembras (Salcedo, 1992). La inestabilidad en la producción de EPS ya se había reportado anteriormente para diferentes cepas de bacterias lácticas (Cerning, 1990). Una tendencia similar la señala Gancel *et al* (1994) pero con una resiembra de dos cepas filantes de *Streptococcus thermophilus* S22 en un medio ST con lactosa (10g/l) y en un medio ST con sacarosa (10g/l).

Esta inestabilidad en la producción de exopolisacárido se atribuía a la presencia de plásmidos, los que se consideraba que influían en el carácter filante o no filante de las cepas. En cepas no filantes de *Lactobacillus delckebreki* subsp. *bulgaricus* se encuentra plásmido pero su presencia o ausencia no está relacionada con el carácter filante o no filante o en el nivel de producción (Salcedo, 1992). Gancel *et al* (1994) reportan una ausencia de plásmido en las cepas filantes de *Streptococcus thermophilus* utilizadas en el estudio.

Actualmente se conoce la secuencia de los genes involucrados en la producción de exopolisacárido para algunas cepas de *Streptococcus thermophilus*. Para la cepa de *Streptococcus thermophilus* Sfi6 el cluster *eps*, localizado a nivel cromosomal, codifica 13 genes, *eps A* a *eps M*. Se identificó a Eps E, Eps G, Eps I, Eps F como β -galactosidasa, α -1,3-N-acetylgalactosamina, β -1,3 glucosa transferasa y α -1,6-galactosiltransferasa, respectivamente (Stingele *et al*, 1996, 1998). Asimismo, otro estudio revela que el gene que codifica a la glicosiltransferasa, la cual une el primer

azúcar a el acarreador lipídico, sólo se encuentra en cepas de *Streptococcus thermophilus* (Griffin et al, 1996) por lo que se sugiere que el producto de la actividad de este gene podría ser el paso limitante en la biosíntesis del exopolisacárido en las bacterias ácido lácticas (Van Kranenburg et al, 1998).

La mayoría de los estudios sobre los cambios en la producción del polímero, composición química o estructural del mismo, caracterización reológica o niveles de actividad enzimática se han realizado con lactosa como fuente de carbono, en un medio sintético elaborado o en leche descremada. Son pocos los estudios en los que se ha observado el efecto de una fuente de carbono diferente, distintas concentraciones sobre dichos parámetros o entre cepas filantes y no filantes de *Streptococcus thermophilus*. Se han reportado diferencias en la producción de EPS entre cepas filantes y no filantes de *Streptococcus thermophilus* en leche descremada. Si se compara el nivel de producción con el obtenido con cepas filantes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, éste produce más que *Streptococcus thermophilus* (Cerning et al, 1988), sin embargo el método de extracción del polisacárido fue por precipitación con etanol, en tanto que el utilizado por el grupo de trabajo fue por medio de "Haze Assay" para de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (García Garibay, 1991) y por el tratamiento proteico del paquete celular en *Streptococcus thermophilus* (Escalante, 1994).

En lo que se refiere a estudios sobre el efecto de la fuente de carbono en producción de polímero o crecimiento, Thomas et al (1983) reportan el desarrollo de cepas de *Streptococcus thermophilus* en lactosa y sacarosa, con una acumulación de glucosa y fructosa en el medio, pero no realizaron la cuantificación del polímero. Gancel et al (1994) reportan producción de EPS con fructosa, glucosa, lactosa y sacarosa en una concentración de 10g/l con una cepa de *Streptococcus thermophilus*, la cual es mayor con las dos primeras. Los valores de crecimiento son inversamente proporcionales a la producción del polímero.

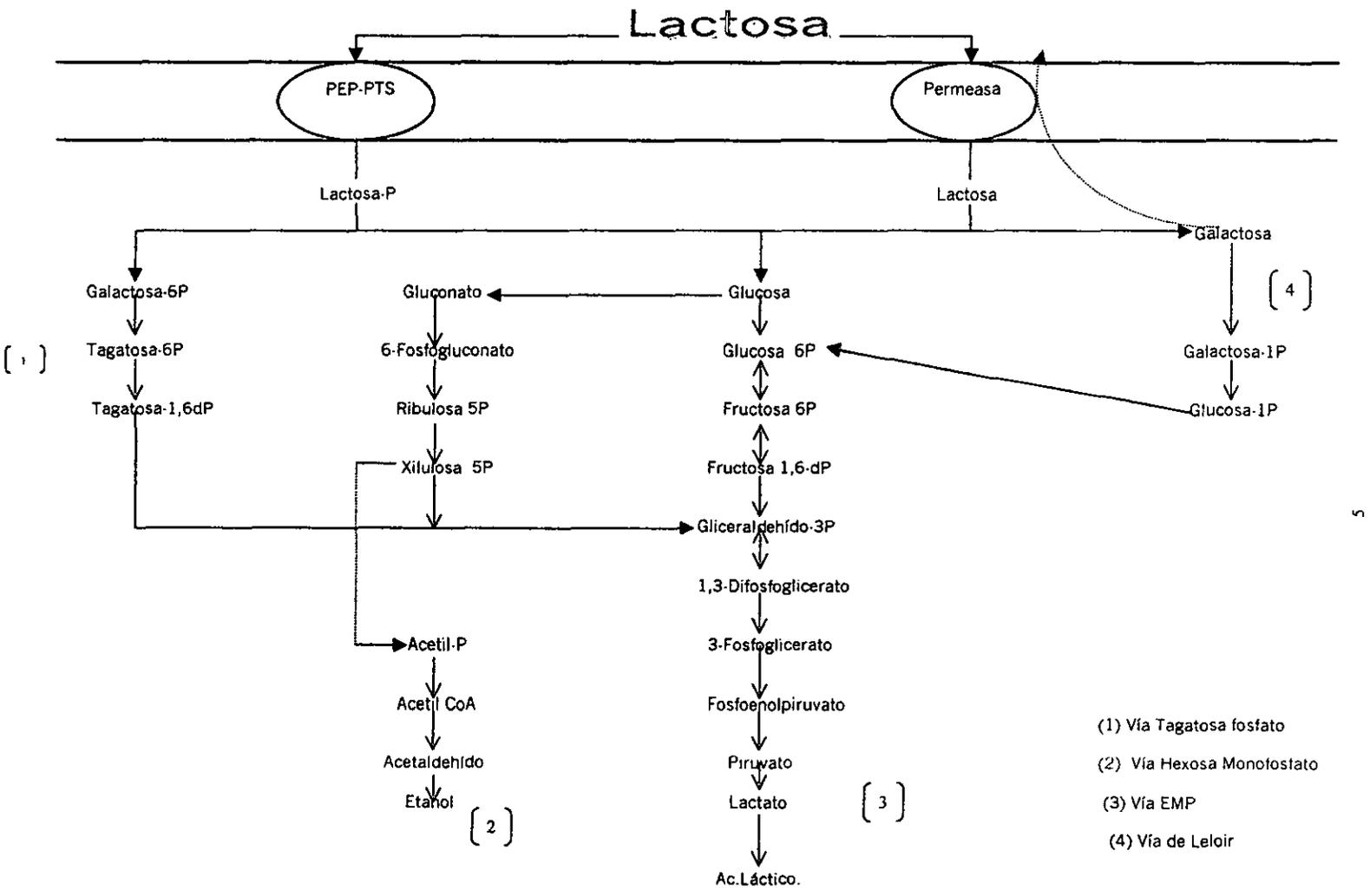
Generalidades.

1. Bacterias Lácticas.

Las bacterias ácido lácticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están asociadas con hábitats ricos en nutrimentos como lo son la carne, la leche y vegetales, ya que sus requerimientos nutricionales son complejos. Los géneros comúnmente utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y *Leuconostoc*. En todos los casos se trata de bacterias Gram positivo, no esporuladas, catalasa negativo, anaeróbicas pero aerotolerantes, ácido tolerantes y estrictamente fermentativas (Axelsson, 1992).

Con base en sus características bioquímicas las bacterias lácticas han sido agrupadas como homofermentativas, producen ácido láctico aparentemente como único producto de fermentación, y heterofermentativas, produce otros productos como son bióxido de carbono y etanol. Asimismo las bacterias heterofermentativas, como *Lactococcus lactis*, cuentan con un sistema PTS para el transporte de lactosa y otros carbohidratos al interior de la célula, en el cual el fosfoenolpiruvato es el donador para la fosforilación de la lactosa a nivel membrana y permitir su paso al interior celular; posteriormente, la lactosa es hidrolizada por una fosfo- β galactosidasa a glucosa y galactosa. La glucosa es metabolizada vía EMP y la galactosa por la vía Tagatosa. Las bacterias homofermentativas, como *Streptococcus thermophilus*, utilizan un sistema permeasa protón dependiente a nivel membrana, donde la lactosa es hidrolizada por una β -galactosidasa y la glucosa resultante se metaboliza vía EMP y la galactosa por la vía de Leloir (Axelsson, 1992, Kandler, 1983)

En la Figura 1 se muestran las vías metabólicas para carbohidratos propuestas para bacterias lácticas.



2. Yogurt: definición, proceso y microbiología.

El yogurt es un producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de ésta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los cultivos lácteos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (NOM-F444-1983). Existen tres principales tipos de yogurt : firme, batido y líquido. El proceso general de elaboración de yogurt batido se muestra en la Figura 2.

La elaboración inicia con la leche clarificada, después se pasteuriza con el fin de eliminar la flora asociada a la leche y permitir el desarrollo de las bacterias iniciadoras. Así como mejorar la viscosidad del producto final y disminuir la sinéresis ya que existe una agregación de proteínas. La homogenización se efectúa antes o después de la pasteurización a una temperatura de 60°C y 1000-3000 psi. Posteriormente, la leche se enfría hasta 40-45 °C y se inocula con 2-5% de un cultivo compuesto de una mezcla de *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en una relación (1:1). La leche se incuba de 3 a 6 horas, tiempo en el que el producto alcanza una acidez de 0.8%-1.4% de ácido láctico y pH 3.7-4.6. La fermentación se detiene con el enfriamiento del producto hasta una temperatura de 5-7°C, se le adiciona el preparado de fruta y se procede a la agitación del mismo a bajas velocidades para evitar la formación de fenómenos de cizalla, los cuales alteran la estructura del coágulo y por lo tanto las características del producto. El yogurt se envasa y almacena a temperaturas inferiores de 5°C (Sinha, 1989, Tamime, 1991).

La obtención de un producto con características deseables depende de un buen manejo de la materia prima y de la actividad simbiótica del cultivo iniciador. Las características generales de éste, que es un cultivo mixto, son: *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* es un bacilo largo homofermentativo, gram positivo, no móvil, el cual produce ácido D-(-) láctico. Es capaz de fermentar la glucosa, lactosa fructosa y galactosa, pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45°C, pero normalmente tiene su óptimo entre 40°C y

43°C; no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15°C. Tiene la capacidad de crecer a pH inferiores a 5.0, y presenta metabolismo fermentativo aún en presencia de aire. En tanto, *Streptococcus thermophilus* es una bacteria gram positiva, esférica, la cual se observa en pares o en cadenas, es homofermentativo y produce ácido L-(+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40°C a 45°C, aunque puede crecer hasta 50°C, pero no a menos de 20°C (Tamime 1991).

Estas especies tienen requerimientos nutricionales complejos pero por su composición, la leche puede cubrirlos. La lactosa satisface los requerimientos energéticos de ambos microorganismos, los aminoácidos indispensables se encuentran en abundancia, en forma de proteínas, así como las vitaminas y los minerales (Sharpe, 1989). Ambas bacterias transforman la lactosa a ácido láctico, el cual es responsable del coágulo, de la firmeza del producto, del sabor ácido característico del yogurt y de la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables, como *Streptococcus aureus*, bacterias patógenas, *Salmonella*, o coliformes, *E.coli*. El suministro de aminoácidos se satisface por las mismas bacterias al hidrolizar las proteínas de la leche. *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* produce proteasas y peptidasas extracelulares activas dentro de un amplio rango de temperatura y pH, en tanto que *Streptococcus thermophilus* sólo posee una proteasa externa. Mientras *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* hidroliza activamente las proteínas, lo que ayuda a cubrir las necesidades del coco, *Streptococcus thermophilus* produce ácido fórmico y bióxido de carbono, los cuales son estimulantes para el lactobacilo (Marshall, 1986). El acetaldehído es el responsable del sabor característico del yogurt, mientras que el diacetilo y la acetoina contribuyen al mismo pero tienden a desaparecer rápidamente (Tamime, 1991).

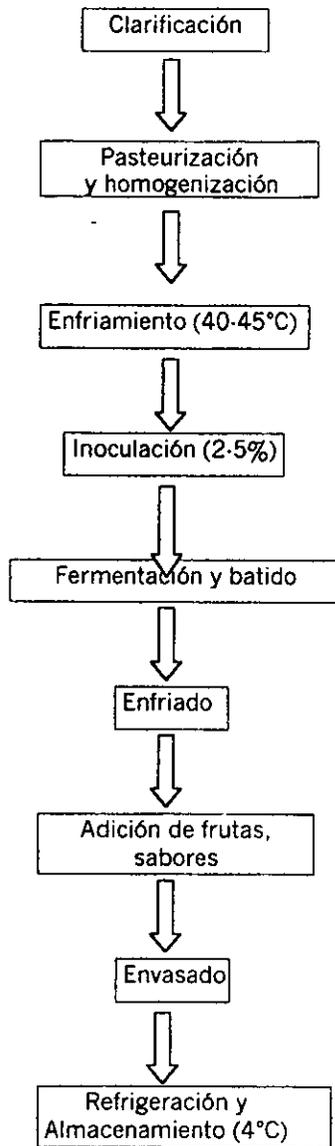


Figura 2 . Proceso general de la elaboración de yogurt batido.(Tomado de García Garibay, 1993).

2.1 Consistencia y textura del yogurt.

La consistencia y textura del yogurt se logran básicamente por efecto del ácido láctico sobre las micelas de caseína, lo cual provoca la formación de un coágulo consistente y firme, el que, sin embargo, es susceptible a efectos mecánicos, temperatura y cambio de pH, lo cual lo convierte en inestable. Con el propósito de evitar alteraciones se aumentan los sólidos totales de la leche a usar y se le adiciona leche en polvo y/o estabilizantes, como son gernetina, almidón, carragenina, alginatos, goma guar, goma de algarrobo, pectina, etc., sin embargo pueden causar alteraciones en el sabor y aroma del producto. En algunos países no se permite el uso de estabilizantes, por lo que los exopolisacáridos bacterianos siempre serán una alternativa para conservar una textura deseable en el producto.

Los exopolisacáridos bacterianos contribuyen de manera natural a la estabilización del gel ya que interactúan tanto con las micelas de caseína como con la superficie bacteriana. Sin embargo, la cantidad de exopolisacárido presente no es la suficiente como para eliminar la necesidad de adición de estabilizantes, además de que la naturaleza del mismo influye en la interacción de éste con las micelas de caseína y con las bacterias presentes en el producto.

3. Exopolisacáridos bacterianos.

Un exopolisacárido es un polisacárido extracelular que puede estar asociado a la superficie celular en forma de cápsula o que puede ser secretado al medio en forma de filamento (Sutherland , 1990). Los exopolisacáridos microbianos que se aplican en la industria alimentaria son dextranas, xantanas, gelanas, pululanos, glucanos fúngicos y alginatos bacterianos. Sin embargo, los exopolisacáridos bacterianos representan una pequeña fracción en el mercado de biopolímeros. Esto se debe, en parte, a las limitaciones que existen en la producción de los polímeros bacterianos ya que se requiere de un pleno conocimiento de su biosíntesis, tecnología adecuada para el procesamiento y altos costos de recuperación. Su composición es muy variada ya que depende del microorganismo que lo sintetice, pero principalmente se encuentran unidades de D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en su forma piranosa. También llegan a estar presentes L-ramnosa y 6-desoxihexosas. Algunos polisacáridos pueden contener N-acetilaminoazúcares, glicerol-3-fosfato, fosfato y grupos acetilo (Bubb *et al*, 1997; Cerning *et al*, 1988; Doco *et al*, 1990; Faber *et al*, 1998; Lemoine *et al*, 1997).

Los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas se dividen en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos poseen como único componente a la D-glucosa con enlaces tipo α y β , se sintetizan fuera de la célula en presencia de una molécula donadora y de un aceptor. Entre éstos se encuentran las dextranas y los levanos producidos por *Leuconostoc mesenteroides* y *S. mutans*. Los heteropolisacáridos, producidos por bacterias lácticas mesófilas y termófilas, están compuestos por dos o más tipos de residuo de monosacárido, poseen ácidos urónicos como el D-glucurónico y pequeñas cadenas laterales. Son producidos a nivel membrana celular utilizando una serie de precursores formados intracelularmente, como los gluco-nucleótidos, los cuales juegan un papel esencial en la síntesis debido a su interconversión y en la activación de azúcares necesarios para la polimerización de monosacáridos (Sutherland, 1990).

4. Producción de exopolisacárido en *Streptococcus thermophilus*.

Debido a que *Streptococcus thermophilus* es un microorganismo homofermentativo, el mecanismo de transporte de carbohidratos al interior de la célula es por medio de un sistema permeasa protón dependiente. En el caso de la glucosa, se metaboliza vía EMP con la formación de ácido láctico. La fructosa es fermentada al entrar a la misma ruta metabólica al nivel de fructosa-6-P después de sufrir una isomerización y fosforilación; debido a que la mayoría de las cepas de este microorganismo poseen un fenotipo Gal(-) este monosacárido no se utiliza como fuente de carbono. Para la fermentación de sacarosa se requiere que la enzima sacarasa actúe y de lugar a glucosa y fructosa, las cuales entran a la vía metabólica principal como se indicó anteriormente (Axelsson, 1992). La lactosa es hidrolizada por una β -galactosidasa intracelular a glucosa y galactosa. La glucosa se metaboliza vía EMP mientras que la galactosa se excreta al medio por medio del mismo sistema permeasa-antiporte con la lactosa. *Streptococcus thermophilus* posee las enzimas involucradas en la vía de Leloir, por medio de la cual la galactosa es transformada a glucosa 6-P. Se sugiere que dichas enzimas están involucradas en la síntesis de precursores para la formación del polímero, para lo cual la glucosa-1-P es el primer precursor en la síntesis del polisacárido ya que se forma a partir de glucosa-6-P por la acción de una fosfoglucomutasa, enzima que conecta la vía de utilización de lactosa (generación de energía) con la biosíntesis del exopolisacárido (biosíntesis de gluco-nucleóticos) (De Vuyst *et al*, 1999; Escalante, 1994).

La síntesis de exopolisacárido se realiza por la polimerización de residuos azucarados activados por nucleótidos por la acción de glicosiltransferasas específicas. Se unen al undecaprenil fosfato, el cual es un lípido isoprenoide localizado en la membrana celular y actúa como receptor del primer residuo azucarado. Conforme la cadena se alarga la estructura intermediaria incrementa su hidrofobicidad y es entonces cuando el polisacárido puede liberarse del lípido isoprenoide por medio de una translocación a través de la membrana y es excretado al medio.

La biosíntesis de polisacáridos es un proceso que requiere energía, ya que en un inicio es necesario de una molécula de ATP para la conversión de glucosa a glucosa-6-P. Posteriormente, se requiere energía para la síntesis de cada gluco-nucleótido y para la fosforilación del acarreador lipídico isoprenoide y, por último, el transporte del polímero demanda energía. Debido a que la generación de energía en bacterias ácido lácticas es menor que en microorganismos aeróbicos, esto puede ser un factor limitante en la cantidad de exopolisacárido producido. Por otra parte, el lípido isoprenoide está involucrado en la biosíntesis de la pared celular, por lo que existe una competencia por este lípido durante las diferentes fases de crecimiento (De Vuyst *et al*, 1999, Looijesteijn P.J. *et al*, 2000). La naturaleza y composición del exopolisacárido dependen de la composición del medio de cultivo, de las vías biosintéticas, de la fase y de la velocidad de crecimiento y del transporte y polimerización del mismo durante su síntesis. En la figura 3 se muestra el diagrama propuesto de síntesis de polímero.

4.1 Composición y estructura del polímero.

El exopolisacárido producido por *Streptococcus thermophilus* está constituido por glucosa y galactosa, principalmente, en ocasiones contienen grupos fosfato o acetil. La galactosa puede encontrarse en conformación furanosa o piranosa. Los monosacáridos se encuentran unidos por enlaces α o β en la cadena principal conformada por 4 a 7 monosacáridos, la cual se repite en todo el polímero. El peso molecular del polisacárido es del orden de 10^6 Da (Cerning *et al*, 1995; Doco *et al*, 1990).

La primera caracterización estructural de un polímero producido por *Streptococcus thermophilus* mostró una composición de glucosa, galactosa y N-acetil-D-galactosamina en una proporción 1:2:1 (Doco *et al*, 1990). Estudios posteriores con diferentes cepas muestran un exopolisacárido compuesto por ramnosa y galactosa, de estructura idéntica (Ariga *et al*, 1992; Bubb *et al*, 1997; Faber *et al*, 1998). Asimismo se encontró que entre dos cepas de *Streptococcus thermophilus* el

exopolisacárido producido tiene la misma estructura y composición pero, difieren en el peso molecular lo cual influye en las características del medio, ya que con el polímero de bajo peso molecular el medio es ligeramente viscoso y con apariencia "grumosa", mientras que con el polímero de alto peso molecular el medio es muy viscoso (Faber *et al*, 1998). Lo anterior sugiere que las diferencias de viscosidad en el medio producidas por el exopolisacárido no sólo dependen de la composición del polímero sino también de las interacciones entre la red polímero-proteína en el medio lácteo.

Se ha identificado una cepa de *Streptococcus thermophilus* capaz de producir dos diferentes polímeros a la vez, con la misma composición (gal,glu,4:1) pero con diferente peso molecular. La proporción por la cual se generan se debe a la relación carbono-nitrógeno presente en el medio de cultivo y la cantidad de exopolisacárido producida depende de la naturaleza de la fuente de carbono empleada (Degeest *et al*, 1999: 2000). Un estudio con una cepa filante y otra no filante mostró un exopolisacárido compuesto por glucosa y galactosa, cuando se emplea glucosa o lactosa en el medio como fuente de carbono (Escalante, 1994).

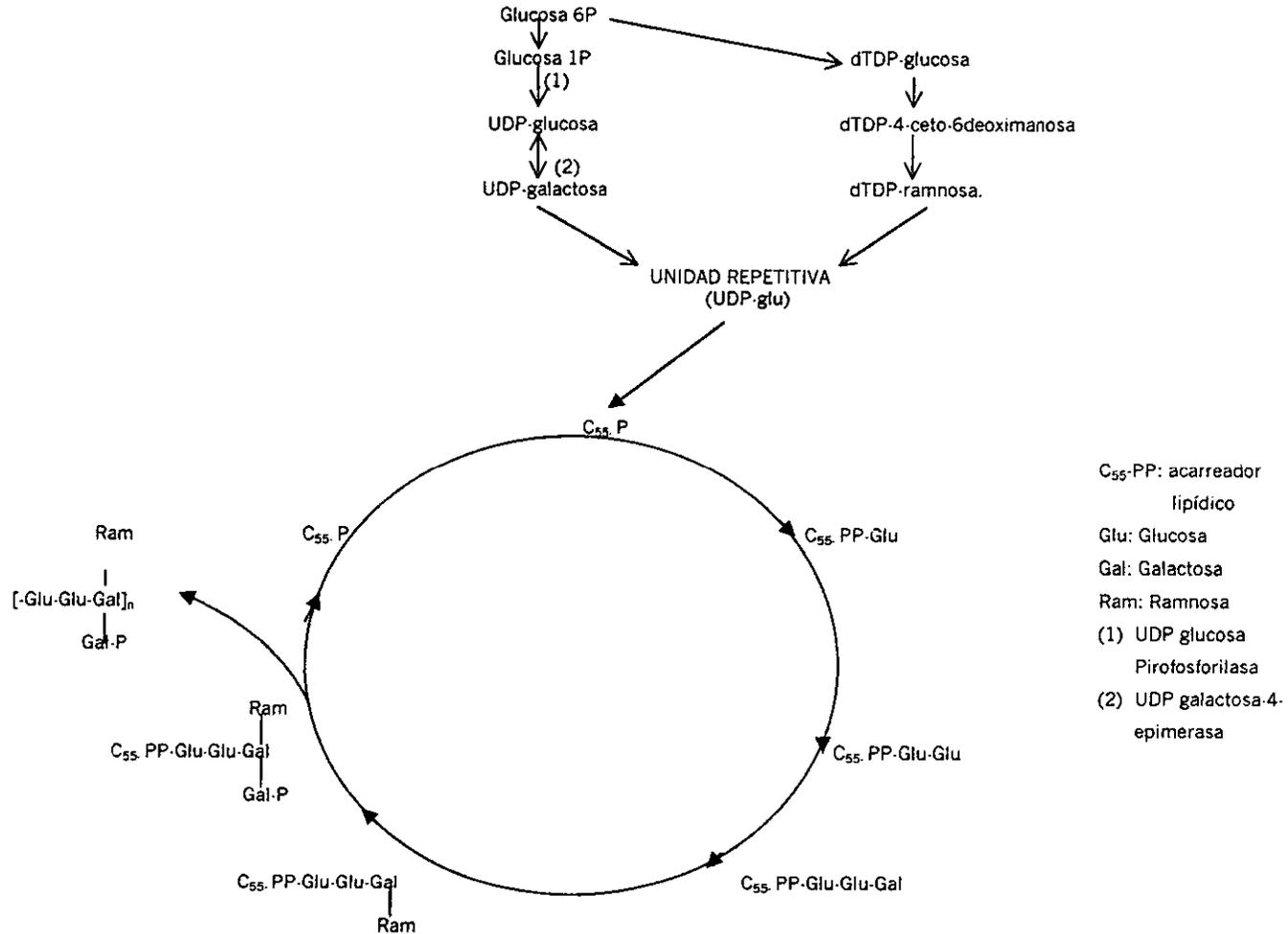


Figura 3. Modelo de biosíntesis de EPS en *Lactococcus lactis* NIZO b40 (Tomado de De Vuyst et al, 1999).

Planteamiento del problema.

Los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración del yogurt son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*, ya que tienen la capacidad de producir polisacáridos exocelulares que contribuyen en el aumento de viscosidad, textura y menor susceptibilidad a sinéresis, con lo cual se promueve una disminución en el uso de estabilizantes. Sin embargo no es del todo conocido cómo se afecta la producción del exopolisacárido en *Streptococcus thermophilus* cuando se emplean fuentes de carbono diferentes a la lactosa, así como tampoco se ha determinado el efecto de estos carbohidratos es el mismo en la producción con cepas filantes y no filantes. Asimismo se desconoce el efecto de la variación de concentración en la fuente de carbono sobre la producción del exopolisacárido, por lo que se propone que distintas fuentes de carbono pueden favorecer la producción de exopolisacárido en cepas de *Streptococcus thermophilus* y que la variación en el nivel de producción dependerá de la concentración y naturaleza en la cual se encuentre la fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán emitir recomendaciones sobre el manejo de las cepas de *Streptococcus thermophilus* a emplearse como iniciadoras en yogurt.

Objetivo general.

Determinar el efecto de la fuente de carbono en la producción de exopolisacárido en resiembras de una cepa filante y no filante de *Streptococcus thermophilus*.

Objetivos particulares.

- Determinar las fuentes de carbono fermentables y el efecto de diferentes concentraciones sobre la producción de exopolisacárido en la cepa filante y no filante.
- Evaluar la estabilidad de producción de exopolisacárido de resiembras en tres concentraciones de lactosa .
- Evaluar si la concentración de lactosa afecta la producción del exopolisacárido de tres resiembras de la cepa filante y no filante, así como elegir la condición de mejor producción .
- Determinar la producción de exopolisacárido con las fuentes de carbono fermentables por las dos cepas en las condiciones elegidas.
- Conocer el efecto de diferentes combinaciones de fuente de carbono en la producción de EPS de ambas cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

La estrategia metodológica empleada en este trabajo se presenta en el siguiente esquema (Figura 4):

Reactivación y manejo de cepas de *Streptococcus thermophilus*
(medio Bellinker modificado y leche descremada 11%)



Determinar las fuentes de carbono fermentables por medio
de la producción de EPS, pH y crecimiento en fructosa,
sacarosa, lactosa, glucosa, [10-30g/l], 1ª Resiembra CF y CNF



Evaluar el efecto de la concentración de lactosa en
la cinética de crecimiento y producción de EPS .
Lactosa [10, 20, 30]g/l. 1ª,3ª,5ª Resiembra CF y CNF
Elegir condición de mejor producción.



Cinética de crecimiento y producción de EPS en glucosa,
lactosa y sacarosa con la concentración
y resiembra con mejor producción de la CF, CNF



Cinética de crecimiento y producción de EPS en
glucosa y lactosa [5] g/l, lactosa-glucosa, glucosa-galactosa.
Resiembra con mejor producción de CF, CNF

1. Microorganismos.

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

a) Cepa NCFB 859, la cual proviene de la colección NCFB (National Collection of Food Bacteria, Reading, Inglaterra). Esta cepa posee el fenotipo Ga $\bar{\Gamma}$, mucóide o filante y es una bacteria de forma esférica que crece formando cadenas de longitud variable. 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 al 11% e incubada a 37°C 24h.

b) Cepa ST 233, proveniente de la colección INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia). Esta cepa posee el fenotipo Ga $\bar{\Gamma}$, no filante y es una bacteria de forma esférica que crece en pares. 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 al 11% e incubada a 37°C 24h. 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.

Los carbohidratos que metaboliza el microorganismo son glucosa y lactosa para la cepa filante y lactosa, glucosa y sacarosa para la cepa no filante. El patrón de fermentación no cambia entre resiembras aspecto en el que difiere de *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* en la que se observó que dicho patrón difiere entre cada resiembra (Ibarra, 1995).

2. Medio de cultivo.

En este trabajo se utilizó el medio sintético Bellinker modificado (Escalante, 1994), el cual tiene la siguiente composición:

Ingrediente	Conc. (g/l)
Triptona	20
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Lactosa	20
Acetato de sodio	1.5

Los medios preparados se esterizaron en autoclave a 15 lb/pulg² (121°C) por 15 minutos. El pH inicial del medio fue de 7.0 ± 0.05 .

3. Preparación del inóculo.

Se tomó una perla de vidrio de glicerol y se colocó en un tubo con leche descremada al 11%. Este se incubó a 37°C/24h. Se realizó un precultivo de 24h en 10ml de medio sintético Bellinker modificado, para lo cual se inoculó con 1% (v/v) del tubo en leche en que fue recuperada cada cepa. Posteriormente se realizaron las cinco resiembras en tubos con 10ml de medio sintético Bellinker modificado, para lo cual se inoculó con 1% (v/v) de los tubos de precultivo. En la realización de cada resiembra se incubó a una temperatura de 37°C/24h. De las cinco resiembras realizadas se utilizaron la primera, tercera y quinta de cada cepa para los estudios a los que se refiere este trabajo.

4. Condiciones de fermentación.

Para cada experimento se realizaron cultivos en lote por triplicado con matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio sintético. Cada matraz se inoculó con 1% de la resiembra correspondiente e incubados a 37°C en un cuarto de temperatura constante.

5. Determinación de crecimiento.

En la determinación de crecimiento se utilizó un sistema de filtración Millipore y membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.45µm tipo HA. Previo a su utilización, cada membrana se mantuvo a peso constante. Se filtraron 25ml de muestras a diferentes tiempos de cultivo en medio sintético modificado. Posteriormente se colocaron en una estufa a 60°C hasta registrar un peso constante y por diferencia de peso de cada membrana antes y después de filtradas las mezclas se determinó el peso seco (mg célula/ml).

6.Extracción y cuantificación del exopolisacárido.

Extracción del polisacárido.

Los 25 ml restantes de las muestras se centrifugaron a 12 100 g /20 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el pellet se lavó con 5 ml de solución salina estéril (0.9%). Se centrifugó a 1000 g /5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó nuevamente y el pellet se resuspendió con 1ml de TCA (5%). Se agitó con vortex 1min a máxima velocidad y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5ml, se centrifugó a 1000 g /10 min. La muestra se lavó con 1 ml de buffer de reacción dos veces y se resuspendió en 1 ml de buffer de reacción de pronasa, se le agregó 125µl de Pronasa (20mg/ml) y se incubó 40°C/20h. Lo anterior se ajustó a 5ml con agua destilada y se dializó 24h/4°C contra agua destilada.

Cuantificación de exopolisacárido.

La cuantificación se realizó por el método de azúcares totales por fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956), en el cual 1 ml de muestra y 1 ml de fenol (5%) se colocaron en un tubo, se mezclaron y se añadieron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se incubó por 25 min a 25°C y se midió la absorbancia a 490nm. El ensayo se realizó por triplicado.

La concentración de azúcares totales de las muestras se obtuvo extrapolando los valores de absorbancia contra una curva patrón realizada bajo la misma metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Reactivación de cepas.

En bacterias lácticas, principalmente en cultivos iniciadores de yogurt, existe inestabilidad en la producción de polímero y en ocasiones pérdida del carácter productor del mismo, por lo que para el estudio de estos microorganismos es necesario realizar su reactivación y para el análisis de los patrones de producción y efectos regulatorios se debe considerar el efecto de la resiembra. Las cepas del microorganismo en estudio se encontraban conservadas en perlas de vidrio a partir de las cuales se realizaron cinco resiembras. El perfil de producción muestra que el valor máximo se alcanza a partir de la tercera resiembra (Figura 5).

2. Efecto de fuentes de carbono.

Sólo se contaba con información (Escalante et al, 1998, Villegas 1995) sobre la producción de exopolisacárido con lactosa como única fuente de carbono en una concentración de 20g/l. Entonces se planteó evaluar dicha producción con lactosa, glucosa, sacarosa y fructosa en concentraciones de 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l en 20 horas de incubación con la primera resiembra de de las cepa filante (CF) y cepa no filante (CNF) de *Streptococcus thermophilus*.

En la Tabla 1 se observa que la cepa filante produce el exopolisacárido (EPS) y presenta crecimiento con lactosa y glucosa en las tres concentraciones probadas, mientras que con fructosa sólo presenta un crecimiento mínimo. El nivel de crecimiento disminuye al aumentar la concentración, efecto más marcado con glucosa. La producción de exopolisacárido presenta una tendencia parabólica, ya que la producción mínima ocurre con 20g/l y la máxima con 30g/l de fuente de carbono.

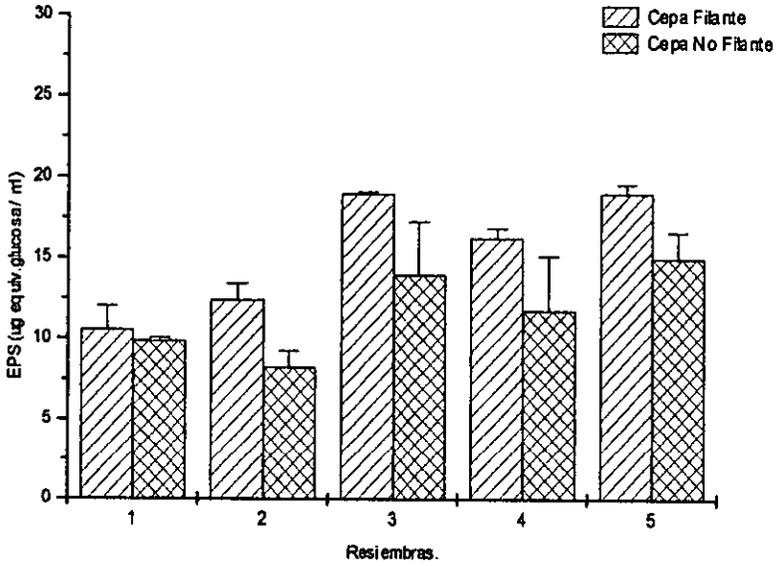


Figura 5. Producción de exopolisacárido en cinco resiembras de la cepa filante y cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

Tabla 1. Efecto de la concentración de diferentes carbohidratos en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH final en la primera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*. 20 h de cultivo.

Cepa Filante	pH	Biomasa (mg célula/ml)	Producción de EPS (µg equiv. glucosa /ml)	Producción Específica de EPS (µg equiv.glucosa/mg célula)
Lactosa				
10 g/l	4.6	1.057 ± 0.074	13.4087 ± 1.0026	12.6857
20 g/l	4.56	1.043 ± 0.185	9.2603 ± 1.3844	8.8786
30 g/l	4.74	0.821 ± 0.196	20.3682 ± 1.3157	20.3682
Glucosa				
10 g/l	4.9	0.76 ± 0.022	7.5045 ± 0.8382	9.8744
20 g/l	4.89	0.877 ± 0.035	9.338 ± 1.0472	10.6477
30 g/l	4.6	0.607 ± 0.157	10.6314 ± 2.4073	17.5148
Fructosa				
10 g/l	6.7	0.291 ± 0.041	0	.
20 g/l	6.5	0.324 ± 0.018	0	.
30 g/l	6.6	0.328 ± 0.14	0	.

En fructosa la producción de polímero es nula y el nivel de crecimiento es muy bajo, lo cual se refleja en que sólo se registran pequeños cambios de pH. Es posible que la actividad de las enzimas involucradas en su metabolismo sea baja, pues se tienen reportes de cepas de este microorganismo capaces de utilizar este monosacárido (Gancel *et al*, 1994; Thomas *et al*, 1983). En sacarosa no se presentó crecimiento ni producción de polímero. Cabe señalar que anteriormente la cepa reportó actividad en este disacárido (Escalante *et al*, 1998), lo que reafirma la alta inestabilidad de esta característica.

La cepa no filante produce el exopolisacárido y presenta crecimiento en lactosa, sacarosa y glucosa (Tabla 2). En sacarosa se observa que al incrementarse la concentración de carbohidrato el crecimiento y producción de EPS disminuye, posiblemente por efecto osmótico en el sistema, ya que para *L.mesenteroides* se observó que al incrementar la concentración de sacarosa en el medio la osmolaridad del mismo incrementa (Quirasco, comunicación personal).

En lactosa el mayor crecimiento se obtuvo en una concentración de 30 g/l y la producción mayor de EPS en una concentración de 10 g/l en tanto que con glucosa en una concentración de 20 g/l se obtiene el mayor crecimiento y la producción de EPS aumenta con el incremento de la concentración del monosacárido. En fructosa no se presenta crecimiento y producción de EPS lo cual se refleja en el hecho de no observar cambios en el pH del medio.

El comportamiento en la producción de exopolisacárido en lactosa es diferente para las cepas. En ambas se presenta un mínimo en 20g/l, pero en la cepa no filante el máximo se presenta en 10 g/l.

Con glucosa se observa que para ambas cepas la producción de exopolisacárido aumenta al incrementarse la concentración del monosacárido pero es mayor en la cepa filante que en la cepa no filante.

El experimento anterior se realizó con la primera resiembra de ambas cepas debido a que es con ésta que se tenía información de la producción de EPS. Dicha resiembra presenta una menor producción que las sucesivas resiembras y la

Tabla 2. Efecto de la concentración de diferentes carbohidratos en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH final en la primera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

Cepa No Filante	pH	Biomasa (mg célula/ml)	Producción de EPS (μg equiv. glucosa /ml)	Producción Específica de EPS (μg equiv. glucosa /mg célula)
Lactosa				
10 g/l	5.22	1.07 ± 0.2485	18.1891 ± 2.6021	16.9992
20 g/l	4.88	0.851 ± 0.148	2.3925 ± 0.5581	2.8114
30 g/l	5.63	1.354 ± 0.165	15.1695 ± 2.0999	11.2035
Glucosa				
10 g/l	6.58	0.473 ± 0.247	1.1585 ± 0.9310	2.4494
20 g/l	6.22	0.894 ± 0.145	2.2762 ± 0.0521	2.5461
30 g/l	6.18	0.287 ± 0.098	2.4926 ± 1.7883	8.6853
Sacarosa				
10 g/l	4.48	0.857 ± 0.113	14.693 ± 1.4664	17.1448
20 g/l	4.15	0.929 ± 0.086	9.4518 ± 1.7933	10.1742
30 g/l	4.28	0.664 ± 0.164	9.8306 ± 1.0783	14.8052
Fructosa				
10 g/l	6.89	0.287 ± 0.016	0	0
20 g/l	6.9	0.307 ± 0.109	0	0
30 g/l	6.9	0.3 ± 0.0871	0	0

muestra fue tomada a las 20 horas de cultivo, lo cual no significa que es el punto en el cual se presenta la producción máxima de exopolisacárido, como se muestra más adelante. Se realizó un cultivo de 20 horas ya que sólo se requería conocer el perfil de utilización de carbohidratos, por lo que no se consideró necesario realizar la cinética de producción.

Por ello se determinó evaluar la producción de exopolisacárido en concentraciones de 10 g/l, 20 g/l y 30 g/l de lactosa en una fermentación de 20 horas con la primera, tercera y quinta resiembra de las dos cepas debido a que son las que presentan mejor producción (Figura 5) y se determinó la producción y el crecimiento a diferentes tiempos.

3. Efecto de la concentración de lactosa sobre el crecimiento y producción de exopolisacárido en tres resiembras de la cepa filante y no filante.

3.1 Cepa Filante.

Se evaluó el efecto de tres concentraciones de lactosa en la primera resiembra de la cepa filante. La producción de exopolisacárido es mayor en una concentración de lactosa de 10 g/l durante toda la fermentación, con un valor máximo a las 12 horas. Se observa que la producción está asociada al crecimiento en concentraciones de 10 y 20 g/l, ya que coinciden los tiempos en que se alcanzan tanto la máxima producción como el máximo crecimiento. Sin embargo, cuando se emplean 30g/l a las 12 horas se obtiene el valor máximo de crecimiento, mientras que la producción de EPS permanece casi constante de las 4 a las 20 horas (Figura 6a). También se observa un rápido incremento en el crecimiento en las tres concentraciones y el pH final es muy similar a partir de las 12 horas de cultivo (Figura 6a), por lo que las diferencias en producción no se pueden atribuir a este factor. La producción de exopolisacárido difiere significativamente entre las tres concentraciones usadas en la primera resiembra, en tanto que entre la tercera y quinta no existe diferencia significativa (Tabla I, IA-C, Apéndice).

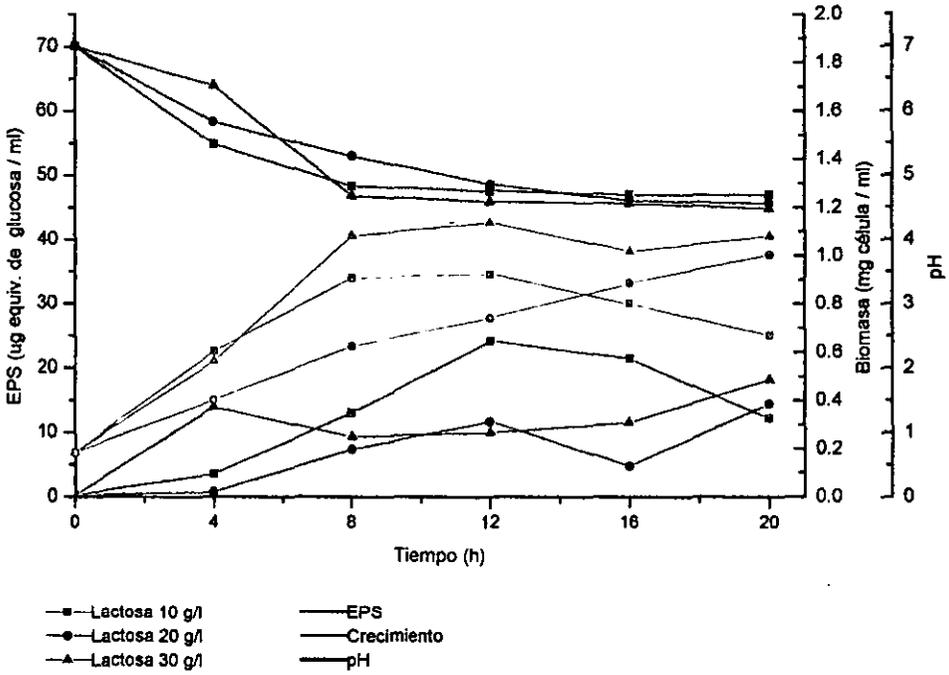


Figura 6a. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Primera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

En la figura 6b se observa que la mejor producción de EPS para la tercera resiembra de la cepa filante es en 10 g/l de lactosa a las 20 horas de cultivo. Con 20 g/l y 30 g/l la producción máxima se obtiene a las 12 horas. Para esta resiembra se observa que la producción está asociada parcialmente al crecimiento como ocurre también con el cultivo proveniente de la primera resiembra. El crecimiento cuando la fuente de carbono se emplea a una concentración de 10 g/l alcanza niveles menores que en las otras concentraciones pero la producción del polímero es mayor, aunque no durante toda la fermentación. El pH final es similar para las concentraciones utilizadas.

El cultivo proveniente de la quinta resiembra de la CF produce el polímero en niveles muy similares entre las concentraciones empleadas. El incremento en la producción se observa a partir de las 4 horas en 10 g/l y 30 g/l. En ésta última se presenta un decremento en la producción a las 8 horas de cultivo y un aumento a partir de las 12 horas, en tanto que el incremento en producción se presenta desde el inicio en 20 g/l. El mismo comportamiento se observa para el crecimiento celular (figura 6c).

La curva de crecimiento en 10 g/l se mantiene por debajo de las obtenidas en las otras concentraciones pero la producción de EPS es muy cercana al valor máximo. En 30 g/l los niveles de crecimiento son mayores y la producción del polímero es muy parecida a la obtenida en 10 g/l.

De los resultados mostrados se puede decir que con la tercera y quinta resiembra se obtiene una mejor producción de exopolisacárido que con la primera resiembra y que 10 g/l de lactosa es la concentración que la favorece. Como se observa, existe variabilidad en el comportamiento de producción entre resiembras y concentraciones. Los niveles de crecimiento parecen depender de la presencia de grandes concentraciones de fuente de carbono, ya que son mayores en 30 g/l para las tres resiembras, seguidos por los obtenidos con 20 g/l y después por 10 g/l. Sin embargo, este fenómeno no se presenta cuando el cultivo proviene de la primera resiembra.

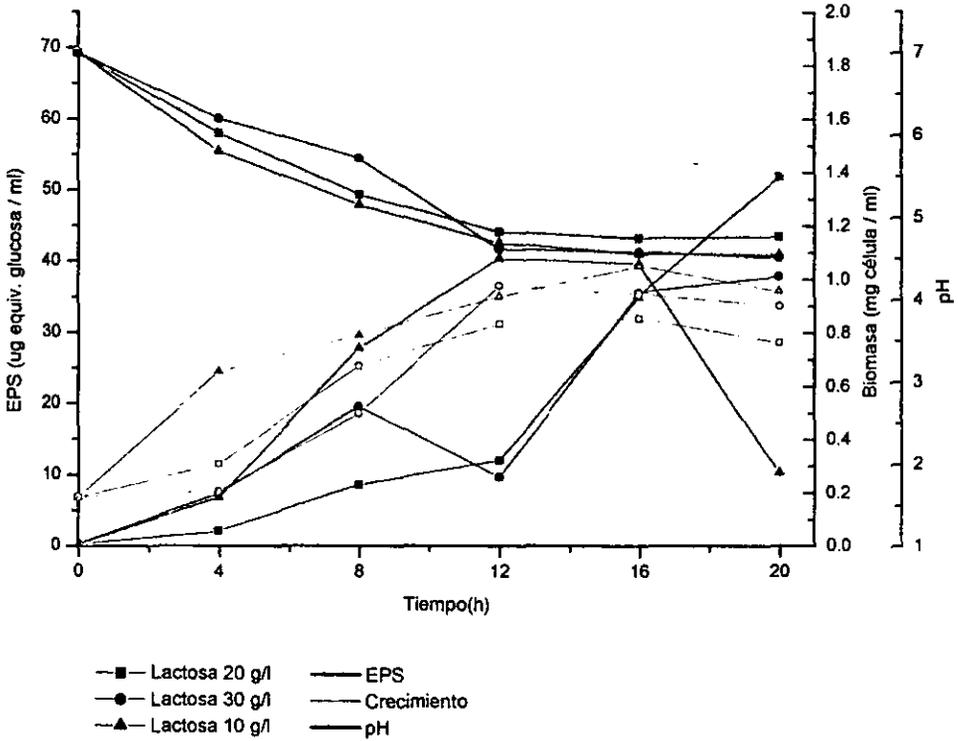


Figura 6b. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

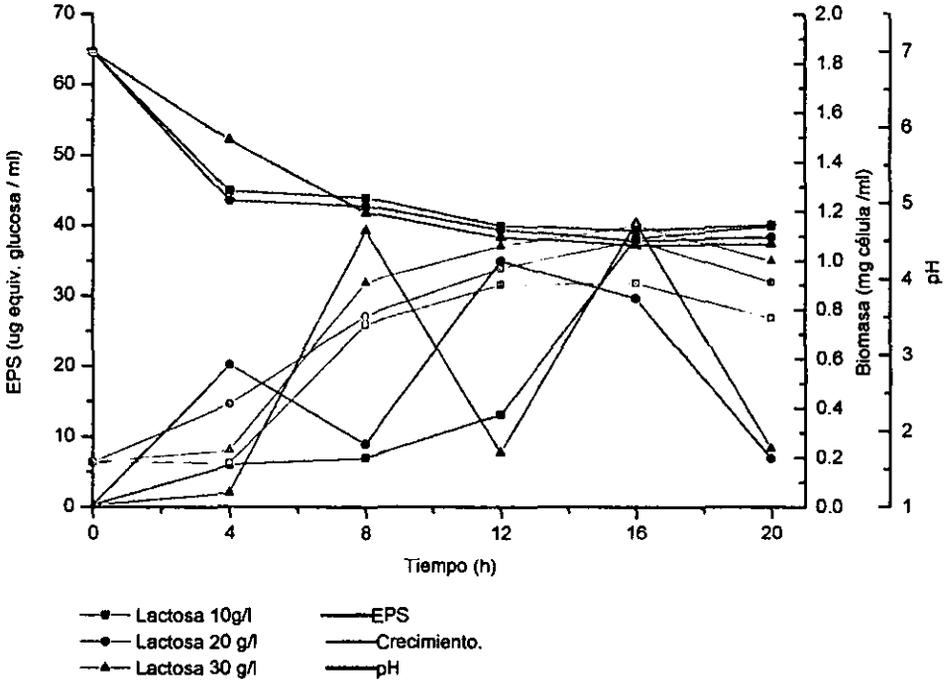


Figura 6c. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Quinta resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

El análisis estadístico de los resultados indica que al aumentar la concentración de lactosa la producción máxima de polímero se obtiene en tiempos de fermentación más cortos. Para la tercera y quinta resiembra en una concentración de 10g/l es hasta las 20 horas cuando se obtiene la máxima producción de polímero, en tanto que en 30 g/l es desde las 4 horas (primera resiembra), por lo que es posible detener la fermentación desde el momento en el que se obtiene el punto máximo (Tabla IA, IB, IC, Apéndice).

Las diferencias entre valores máximos de producción no son significativas, lo cual indica que es posible utilizar cualquiera de las tres concentraciones y la quinta o tercera resiembra ya que entre éstas no existe diferencia significativa. Se decidió trabajar con la tercera resiembra ya que los valores de producción son relativamente mayores que con la quinta resiembra y en una concentración de 10 g/l para los experimentos posteriores.

3.2 Cepa No Filante.

Se evaluó el efecto de tres concentraciones de lactosa en la primera resiembra de la cepa no filante, la cual presenta la máxima producción de exopolisacárido en 30 g/l. Con las tres concentraciones usadas la producción inicia a partir de las 12 horas de cultivo. Los valores máximos de producción en las tres concentraciones de lactosa son de 2.34 a 16.40 μg equiv. glucosa /ml menos que las obtenidas con la cepa filante. Se aprecia una tendencia lenta a la disminución de producción en 10 g/l y 20 g/l de lactosa. En tanto, cuando se emplean 30 g/l la disminución es rápida. Sería interesante prolongar el tiempo de incubación y observar el perfil de producción, ya que ésta inicia más tarde que con la primera o tercera resiembra de esta cepa, o que en los casos analizados para la cepa filante.

La curva de producción de exopolisacárido para esta cepa se muestra en la figura 7a. El crecimiento inicia a partir de las 4 horas de fermentación y el pH del medio disminuye rápidamente a partir de las 12 horas en las tres concentraciones. Se observa claramente que la producción de exopolisacárido está asociada al crecimiento y que los bajos valores de producción de EPS ocurren cuando se presenta un elevado crecimiento, ya que existen menos grupos fosfatoisoprenoide disponibles para la síntesis del polímero (Degeest *et al*, 1999; Ramos *et al*, 2001).

En la tercera resiembra la producción de polímero se presenta desde el inicio de la fermentación en las tres concentraciones. La mayor producción se alcanza en 30 g/l a las 16 horas. La producción de polímero está asociada al crecimiento. Esto se observa en la figura 7b.

El comportamiento de la quinta resiembra es muy similar al de la primera. La producción de EPS incrementa rápidamente a partir de las 12 horas y alcanza la máxima producción a las 16 horas en las tres concentraciones. El valor máximo se alcanza con 30 g/l (figura 7c). El crecimiento es rápido a partir de las 12 horas y los valores máximos se alcanzan a las 16 horas en las tres concentraciones, sin embargo esto no se refleja muy claramente en el pH del medio ya que se observa una rápida disminución, mientras que el crecimiento es mínimo.

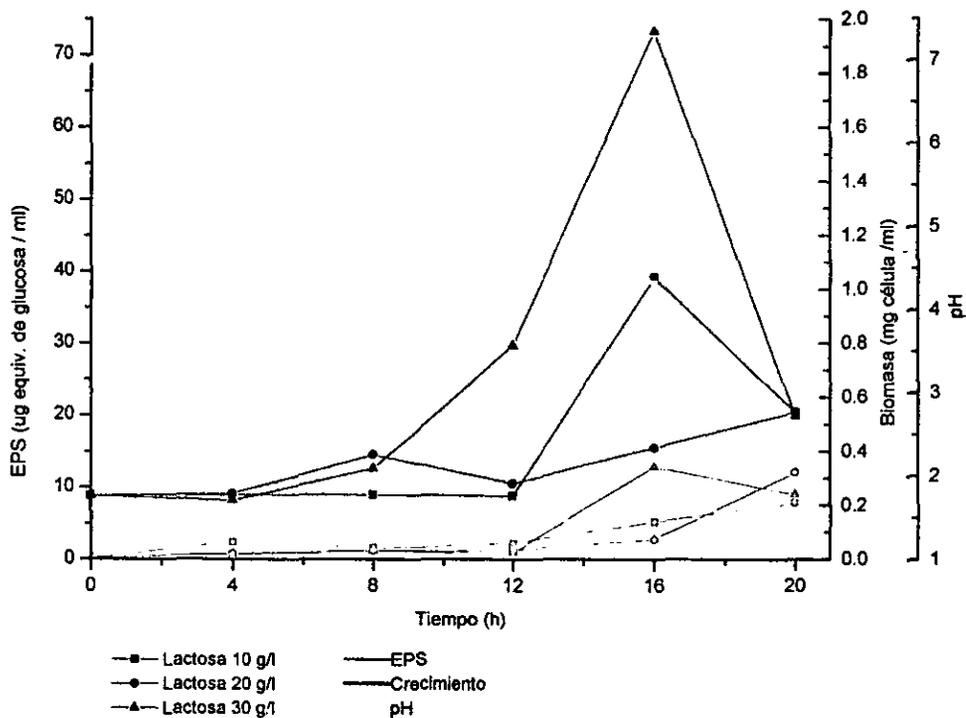


Figura 7a. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Primera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

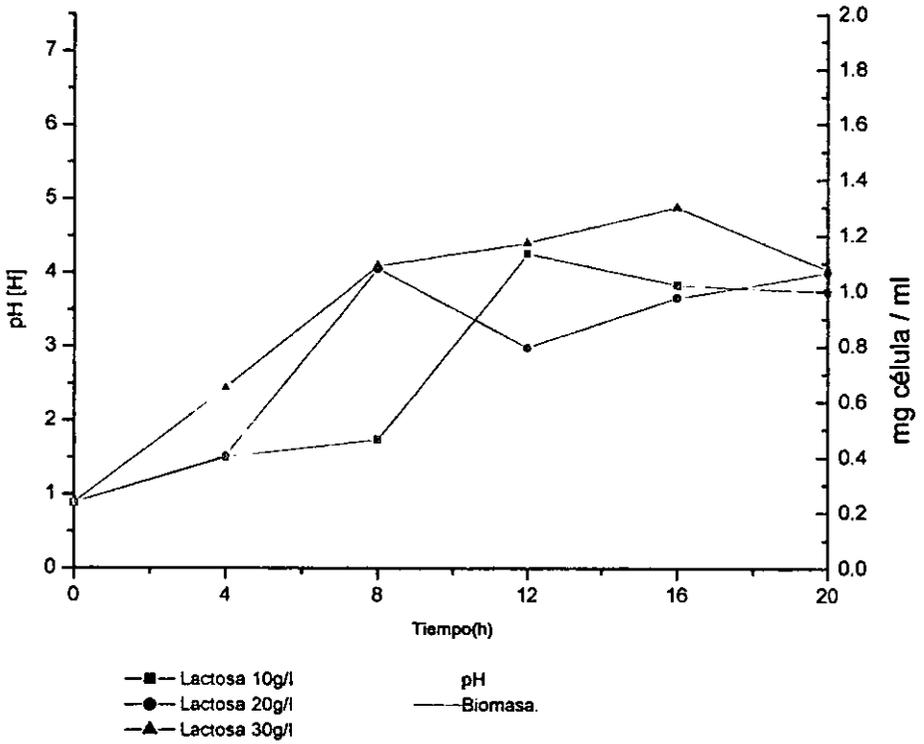


Figura 7b. Efecto de la concentración de lactosa en crecimiento, pH.
Tercera resiembra de la cepa no filante de
Streptococcus thermophilus.

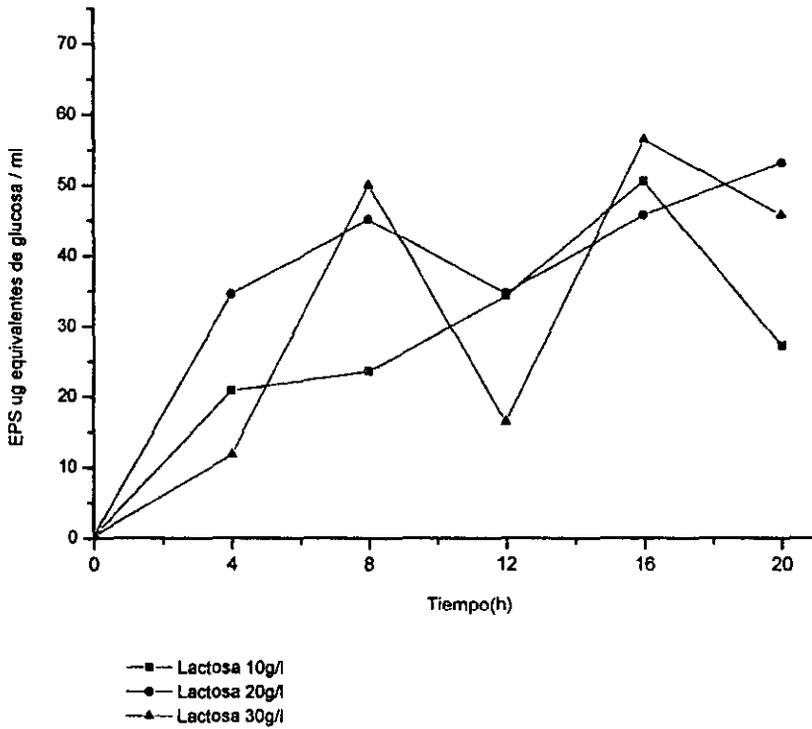


Figura 7b1. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido. Tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

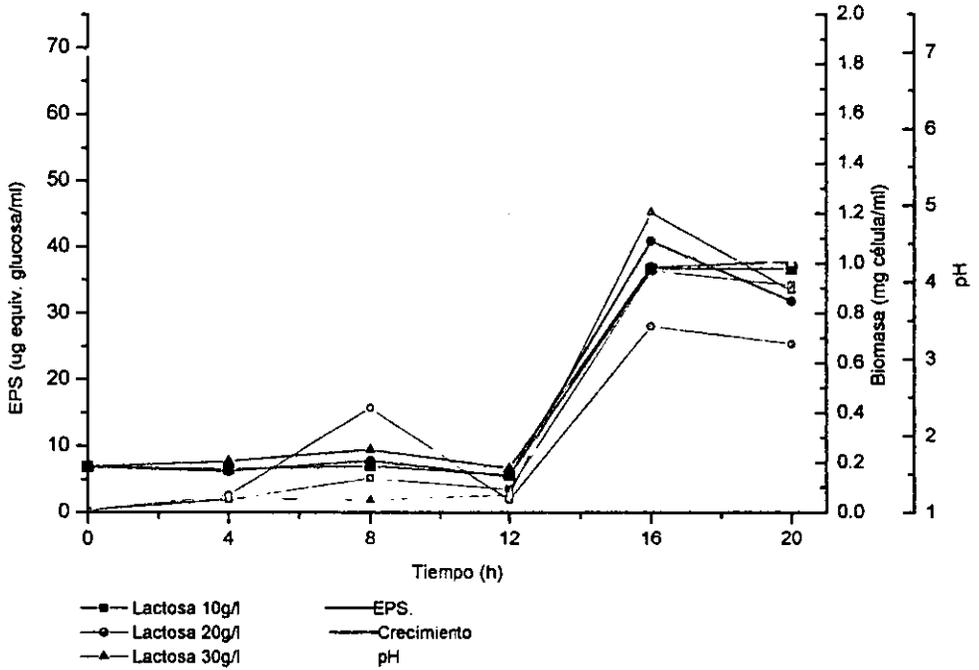


Figura 7c. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Quinta resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

El comportamiento de la primera y quinta resiembra es muy similar en las tres concentraciones de lactosa. En el caso de la tercera resiembra es muy similar al de la cepa filante. Se observa un inicio tardío en la producción de EPS cuando se emplea la primera resiembra, con la que también se obtienen los valores más bajos para la producción de polímero.

Se observa que 30 g/l es la concentración que favorece la mayor producción de polímero, la cual es seguida por 10g/l. El análisis estadístico realizado (Tabla II, Apéndice) indica que la diferencia en la producción de exopolisacárido entre resiembras es altamente significativa. No se observa un efecto del aumento o disminución de concentración de la fuente de carbono en la producción de EPS, tal como ocurre con la cepa filante.

Sin embargo, la producción de exopolisacárido disminuye rápidamente con 30g/L en las tres resiembras después de las 16 horas de cultivo, lo cual indica un posible efecto de saturación del sistema de transporte, ya que el crecimiento disminuye y el pH se estabiliza como con las otras concentraciones. En *L.casei* CG11 se reporta que al incrementar la concentración de fuente de carbono la producción aumenta, sin embargo no se probaron concentraciones de 30g/l (Cerning *et al*, 1995). En 10 g/l la disminución de producción después de las 16 horas puede ser debida a una insuficiencia de la fuente de carbono, efecto que sólo se observa en la tercera resiembra .

El estudio de la producción de exopolisacárido en resiembras de cepas de bacterias lácticas no se tiene reportado, por lo que este trabajo muestra que la producción difiere entre resiembras de las cepas utilizadas: la primera resiembra de ambas cepas muestra una menor producción que en las otras resiembras. La diferencia observada entre resiembras indica que conforme el microorganismo es resembrado la producción se activa, posiblemente por una mayor actividad de las enzimas involucradas en su síntesis o por la inestabilidad observada y reportada anteriormente, la cual se propone que se deba a una inestabilidad genómica generalizada como supresión y rearrreglos del ADN (Stingele *et al*, 1995).

La diferencia de producción de exopolisacárido entre las concentraciones de lactosa utilizadas para cada resiembra es no significativa por lo que se eligió la

concentración de 10 g/l de lactosa para los siguientes experimentos y a la tercera resiembra, porque es con la que se alcanza una producción mayor de EPS en comparación con las otras resiembras (Tablas IIA, IIB, IIC, Apéndice).

Al comparar la producción de la cepa filante con la de la no filante se observa que es mayor en la primera y tercera resiembra, y similar en la quinta. Para ambas cepas la producción es mayor en la tercera resiembra en comparación con las resiembras realizadas de cada cepa. No es posible observar una tendencia que relacione la concentración de carbohidrato con la producción ya que con 20g/l, en general, se observa una disminución de la producción en comparación de la obtenida con las otras concentraciones. Los valores de pH se encuentran en un intervalo de 4.3-4.7 en las tres concentraciones usadas, por lo que el pH final no se altera al aumentar la concentración de lactosa y el incremento en la producción de EPS no será significativamente mayor en concentraciones menores.

La concentración de carbono parece afectar la velocidad de crecimiento (Tabla 3), la cual aumenta con la concentración de lactosa utilizada en la primera resiembra de ambas cepas y en la quinta resiembra de la cepa filante, pero en la tercera de ambas cepas y quinta de la cepa no filante disminuye al incrementar la concentración. En *Lactobacillus bulgaricus* se reporta que (Grobben *et al*, 1995) al aumentar la fuente de carbono (glucosa) la producción de EPS no se incrementa .

El comportamiento observado entre las cepas sugiere diferencias en la afinidad de la permeasa por la lactosa ya que en un estudio anterior con la primera resiembra de estas cepas se observó un consumo menor de lactosa por la cepa filante (Escalante *et al*, 1998), más no en el metabolismo, lo cual lo indica el pH final similar.

Por otra parte la producción de EPS en la tercera y quinta resiembra de ambas cepas disminuye después de las ocho horas de cultivo e incrementa a partir de las 12 horas. Esta situación ocurre cuando se utilizan en 20 g/l de lactosa en la tercera resiembra de la cepa filante y en la quinta de la no filante, así como con 30 g/l en la quinta de la cepa filante y tercera de la no filante. Este perfil de producción

puede deberse a un efecto de regulación catabólica por CcpA (proteína de control catabólico) el cual activa la glicólisis por un incremento en el transporte de lactosa en *Streptococcus thermophilus* más que la producción de polímero (Van den Bogaard *et al*, 2000). Este comportamiento se observa en concentraciones de 20 g/l en la tercera resiembra y 30 g/l en la quinta resiembra por lo que podría ser que a estos niveles de fuente de carbono se establezca dicha regulación.

Tabla 3. Efecto de la concentración de lactosa en la velocidad específica de crecimiento de las dos cepas de *Streptococcus thermophilus*.

Cepa Filante	Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1}).		
	Resiembra		
	Primera	Tercera	Quinta
Lactosa 10 g/l	0.05728	0.07469	0.08778
Lactosa 20 g/l	0.07944	0.0947	0.07972
Lactosa 30 g/l	0.07685	0.07073	0.09645
Cepa No Filante			
Lactosa 10 g/l	0.0715	0.07797	0.09572
Lactosa 20 g/l	0.0391	0.07057	0.09291
Lactosa 30 g/l	0.0822	0.07014	0.09251

Tabla 4. Valores máximos de crecimiento, pH, producción de exopolisacárido y productividad. (Δ 4h, \square 8h, \circ 12h, \diamond 16h, \star 20h).

Cepa Filante	Concentración de lactosa (g/l)	Crecimiento (mg célula/ml)	pH	Exopolisacárido (μ g equiv.glucosa/ml)	Productividad (Producción máx. EPS/h)	Producción Específica (μ g equiv.glucosa/mg célula)
Resiembr						
1ª	10	0.09234 \square	4.69 \circ	24.2406 \circ	2.0200	26.84 \diamond
	20	1.0043 \star	4.56 \star	14.4323 \star	0.0721	15.75 \circ
	30	1.1361 \circ	4.48 \star	18.1942 \star	0.9097	24.85 Δ
3ª	10	0.8522 \diamond	4.75 \diamond	51.933 \star	2.5966	67.86 \star
	20	0.9435 \circ	4.52 \star	37.9975 \star	1.8998	42.12 \star
	30	1.0478 \diamond	4.55 \diamond	40.4286 \circ	3.3690	43.18 \circ
5ª	10	0.9083 \diamond	4.65 \diamond	39.8707 \star	1.9935	52.05 \star
	20	1.0809 \star	4.51 \diamond	34.9966 \circ	2.9163	48.35 \square
	30	1.1422 \diamond	4.45 \diamond	40.3826 \diamond	2.5239	43.12 \square
Cepa No Filante						
Resiembr						
1ª	10	1.0426 \diamond	4.67 \diamond	7.8317 \star	0.3915	15.74 Δ
	20	0.5447 \star	4.33 \diamond	12.0908 \star	0.6045	22.19 \star
	30	1.9565 \diamond	4.3 \diamond	12.8199 \diamond	0.8012	16.99 \star
3ª	10	1.1348 \circ	4.6 \circ	50.5283 \diamond	3.1580	52.174 Δ
	20	1.0809 \star	4.31 \star	53.1638 \star	2.6581	49.908 \star
	30	1.3022 \diamond	4.29 \star	56.4552 \diamond	3.5284	45.822 \square
5ª	10	0.9783 \diamond	4.8 \diamond	36.3449 \diamond	2.2715	37.15 \diamond
	20	1.0894 \diamond	4.6 \diamond	28.0063 \diamond	1.7503	29.96 \star
	30	1.0087 \diamond	4.6 \diamond	45.1564 \diamond	3.0104	45.93 \diamond

4. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento y la producción de exopolisacárido.

Para determinar el efecto de la naturaleza de la fuente de carbono en la producción de EPS se probó el efecto de lactosa y glucosa para la tercera resiembra de la cepa filante y de lactosa, glucosa y sacarosa para la cepa no filante con la misma resiembra. La concentración de la fuente de carbono empleada fue de 10 g/l, ya que no existe diferencia significativa en la producción de exopolisacárido entre las concentraciones, como se indicó anteriormente.

En la figura 8 se muestra la curva de crecimiento y de producción de EPS para la cepa filante, la cual produce el exopolisacárido en glucosa y lactosa desde el inicio de la fermentación. A partir de las 8 horas se incrementa en glucosa y a las 12 horas en lactosa, para llegar a la mayor producción a las 20 horas en ambos casos. La producción en lactosa es el doble de la obtenida en glucosa. Los niveles de crecimiento son mayores y por esto se observa una disminución rápida de pH, el que se estabiliza después de las 12 horas. En cambio en glucosa esto sucede lentamente.

La curva de producción de exopolisacárido podría indicar que la lactosa estimula la producción del mismo ya que hasta las 12 horas la producción es similar en ambas fuentes. El residuo que el microorganismo utiliza de la lactosa es la glucosa. Los resultados obtenidos sugieren que la galactosa puede ejercer algún efecto activador sobre el sistema de transporte o que la afinidad de éste sea mejor para lactosa que glucosa.

Para la cepa no filante, además de usar lactosa y glucosa, se utilizó sacarosa porque se demostró su capacidad para metabolizarla. En la figura 9 se muestran las curvas de producción de exopolisacárido, la cual es mayor en lactosa que en glucosa.

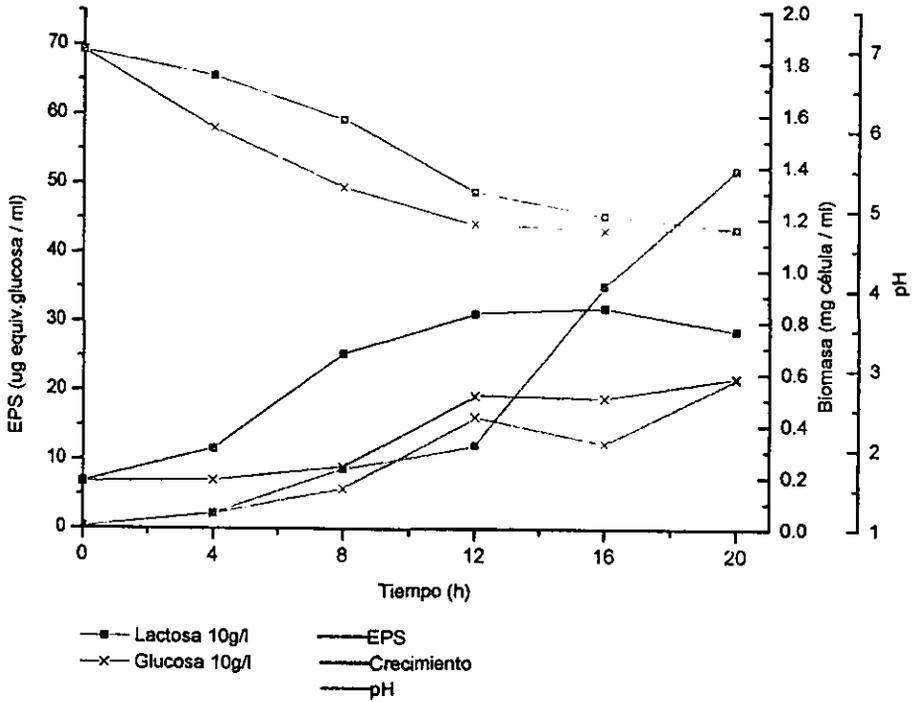


Figura 8. Efecto de la glucosa y lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

En sacarosa la producción se incrementa rápidamente y es a las 20 horas en que se obtiene la máxima producción que no difiere mucho de la alcanzada en lactosa. Las curvas de crecimiento son similares entre glucosa y lactosa, el nivel de crecimiento es bajo, pero en esta última a partir de las 12 horas se incrementa lo cual no se refleja en el pH que disminuye rápidamente en las primeras horas. En sacarosa se obtiene una curva normal de crecimiento con valores bajos y la disminución de pH es parecida a la obtenida en lactosa. La producción de EPS está asociada al crecimiento en lactosa y glucosa, mientras que en sacarosa la asociación es parcial.

La sacarosa entra a la célula por medio de un sistema permeasa (Axelsson, 1992) y posteriormente por la acción de una sacarasa se obtienen glucosa y fructosa, las cuales entran a la vía principal de fermentación, por lo cual se puede decir que se tienen dos fuentes de las cuales se puede obtener energía necesaria para crecimiento y producción de EPS, lo que concuerda con los resultados obtenidos pues los niveles de producción son mayores que los obtenidos en glucosa y parecidos a los de lactosa. Esto significa que existe una participación de la fructosa en el metabolismo y sugiere que la galactosa influye en la producción del polímero ya que la curva de en lactosa es mayor que en glucosa, se ha observado que *Streptococcus thermophilus* LY03 metaboliza pequeñas cantidades de galactosa al final de la fase exponencial de crecimiento, lo indican los niveles en lactosa y glucosa (Degeest et al, 2000)

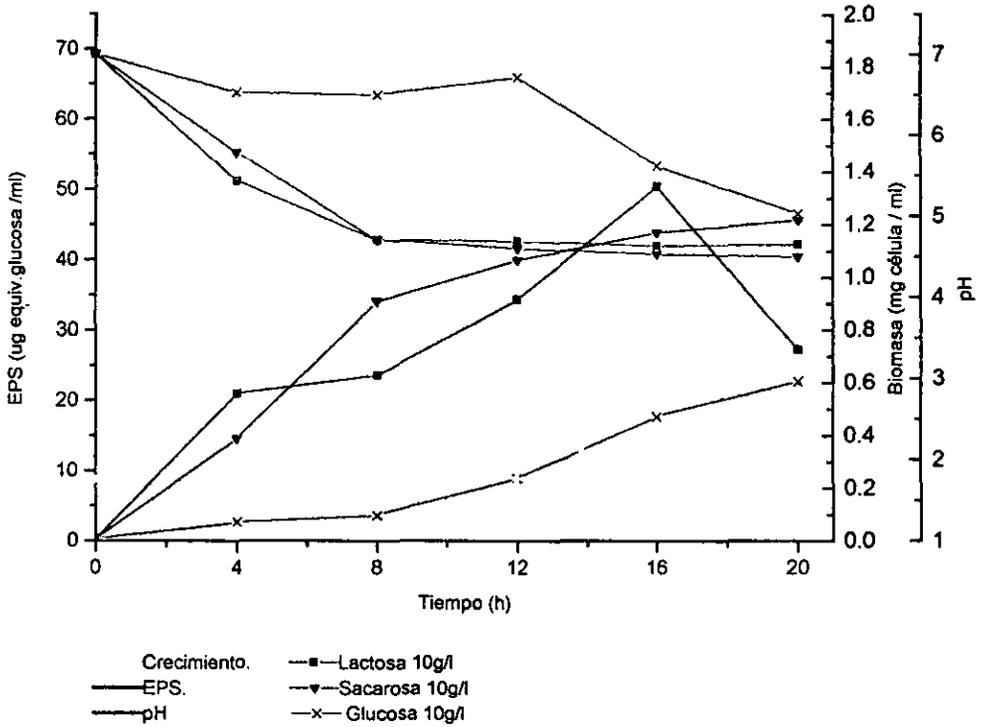


Figura 9. Efecto de la sacarosa, lactosa y glucosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento y pH. Tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

5.Efecto de combinaciones de la fuente de carbono en el crecimiento y producción de exopolisacárido.

Con base en los resultados obtenidos se decidió usar la concentración de 5 g/l de lactosa con el fin de observar su efecto en la producción de polisacárido o determinar si ésta es la concentración mínima para su biosíntesis. En el caso de glucosa se usa como control de las mezclas realizadas, mientras que la galactosa se utilizó con el fin de observar si ejerce algún posible efecto activador en la producción del EPS al estar junto con glucosa. La producción de exopolisacárido se determinó en una concentración de lactosa y glucosa de 5 g/l, y en las siguientes combinaciones equimolares: lactosa/glucosa (5:5 g/l) y glucosa/ galactosa (5:5 g/l) para la tercer resiembra de ambas cepas.

Con la cepa filante la producción de EPS, que se observa en la figura 10, en lactosa y lactosa/glucosa aumenta rápidamente a partir de las 8 horas para el disacárido y a partir de las 12 horas para la mezcla. El nivel máximo obtenido con lactosa es cinco veces menor que el alcanzado con la mezcla. Esto significa que la producción del polímero se debe en mayor parte a la lactosa, ya que las curvas son parecidas. El crecimiento es mayor en la mezcla durante toda la fermentación. El pH decrece rápidamente para ambos casos y se mantiene de manera paralela, es más bajo en la mezcla por la presencia de glucosa.

A partir de lactosa el monosacárido energéticamente aprovechable es la glucosa, por lo que en la mezcla se suministra doble fuente energética y se esperaría una mayor producción de EPS lo cual no sucedió por lo que es posible que exista un efecto de represión catabólica o que sea debido a que la afinidad de la permeasa por la glucosa es menor que para lactosa por lo que no se observa un incremento en la producción (Hickey *et al*, 1986, Poolman *et al*, 1993).

En glucosa y en la mezcla glucosa/galactosa se observa que los niveles de producción son muy similares, lo cual indica que se debe a la glucosa y que la galactosa no ejerce efecto en la producción; en la curva de crecimiento se presenta un comportamiento similar. En la mezcla el crecimiento no aumenta después de

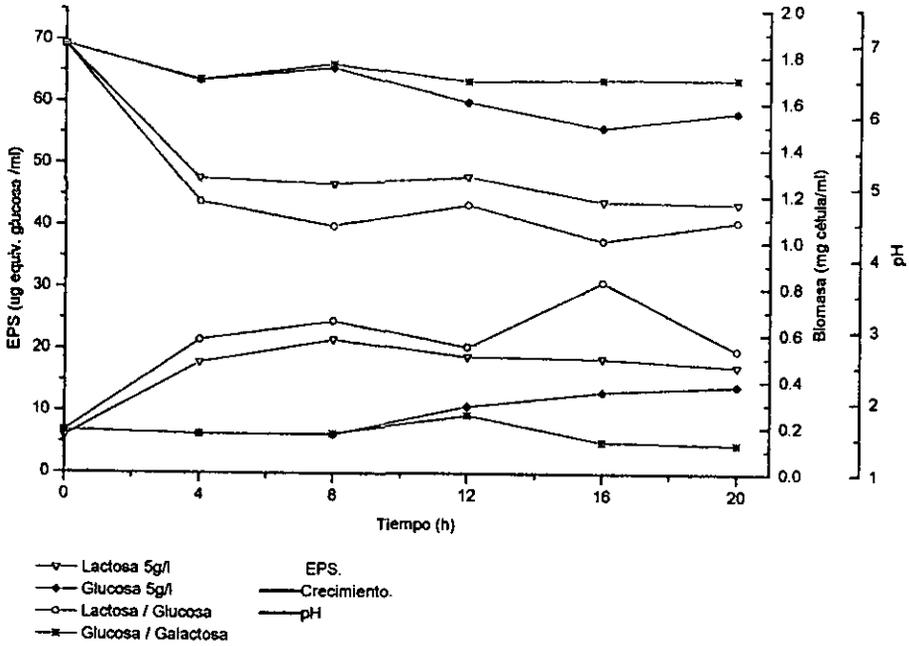


Figura 10. Efecto de la glucosa (5g/l), lactosa (5g/l) y de las combinaciones de lactosa/glucosa, glucosa/galactosa en la producción de EPS, crecimiento y pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

las 12 horas y el pH lo que indica que el microorganismo no utiliza la fuente de carbono, por lo que no existe suministro de energía. Posiblemente la galactosa no permite una buena asimilación de la glucosa, ya que la actividad de las enzimas fosfoglucosa isomerasa y 6-fosfofructocinasa disminuye en presencia de galactosa por lo que la glicólisis se ve afectada (Degeest et al, 2000), otros autores reportan una represión en la síntesis de β -galactosidasa, (Heckey et al, 1986), que afectaría la disponibilidad de monómeros.

La figura 11 muestra la curva de crecimiento de la cepa no filante y las curvas de producción de EPS. Con la cepa no filante la producción máxima entre lactosa y la mezcla glucosa/ lactosa difiere por dos unidades. En ésta última se obtiene en 8 horas y en la otra en 20 horas, lo cual sugiere un efecto de represión catabólica transitoria. El crecimiento es mayor en el disacárido que en la mezcla y el pH es menor con ésta por la presencia de glucosa.

En glucosa y en la mezcla glucosa/galactosa se observan producciones muy pequeñas e iguales hasta las ocho horas después en glucosa incrementa mientras en la mezcla permanece constante. Esto podría indicar que la galactosa inhibe la asimilación de glucosa, como se indicó para la cepa filante. El crecimiento es mayor en glucosa que en la mezcla y se observa que la disminución de pH es menor en ésta que en glucosa. Asimismo se observa que los niveles de producción son menores con la cepa no filante en todas las fuentes empleadas en esta parte experimental.

En la Tabla III del Apéndice se muestra el análisis de varianza realizado, en el cual se comparan la producción de EPS entre la concentración de 5g/l y 10 g/l de lactosa, de cada cepa. Se observa que los valores de producción son mayores en 10 g/l pero la diferencia con 5 g/l es no significativa. Esto se repite para las dos cepas. La producción del polímero entre cepas difiere de manera muy significativa y se observa en los valores alcanzados entre ellas. La producción de polímero no se favorece con una disminución de la concentración de lactosa en la cepa no filante.

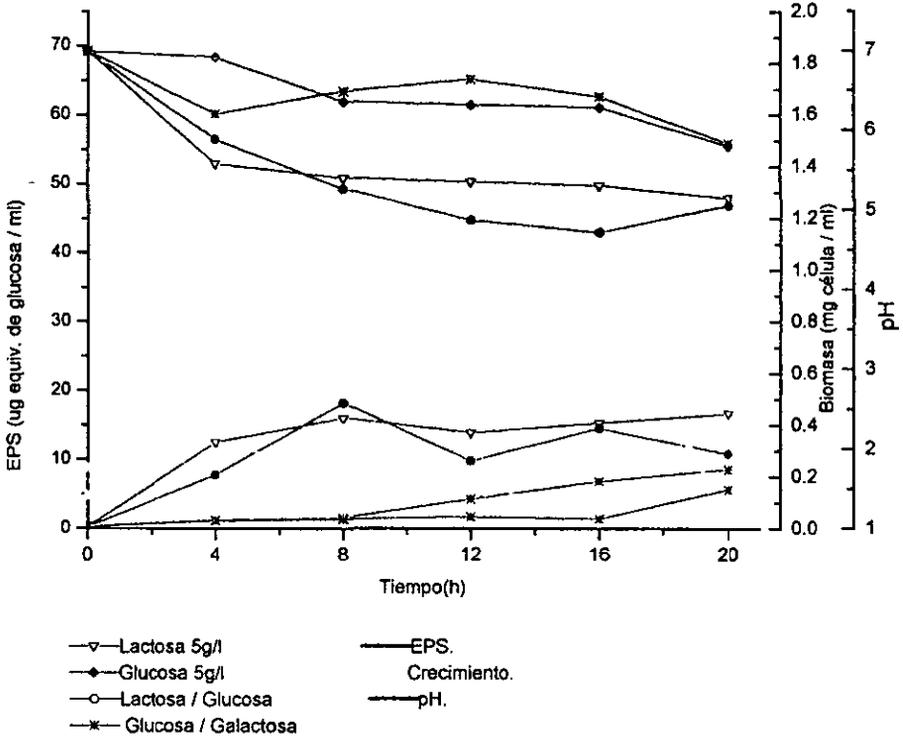


Figura 11. Efecto de la glucosa (5g/l), lactosa (5g/l) y de las combinaciones de lactosa/glucosa, glucosa/galactosa en la producción de EPS, crecimiento y pH. Tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*

En la figura 12 se muestra las curvas de crecimiento y pH obtenidas para la cepa filante en las 4 concentraciones de lactosa utilizadas. El crecimiento se incrementa al aumentar la concentración de lactosa pero entre las concentraciones 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l no se observan diferencias significativas, como en 5 g/l. La producción de EPS no difiere significativamente entre las concentraciones utilizadas, pero en el caso de 5 g/l se obtiene la menor producción debido a la baja concentración de sustrato. Se obtiene la mayor producción cuando se usan 10 g/l.

En 20 g/l la producción de EPS es buena pero, no es proporcional a la concentración, así como tampoco con 30 g/l con la cual posiblemente se presente la saturación del sistema. En la combinación lactosa/glucosa el nivel de producción es sólo mayor que el obtenido en 5 g/l de lactosa.

En la figura 13 se muestran las curvas de crecimiento y pH obtenidas para la cepa no filante en las 4 concentraciones de lactosa utilizadas. El crecimiento en 5 g/l es menor que el obtenido en las otras concentraciones y entre estas la diferencia es no significativa, esto se refleja en los valores de pH obtenidos. Los valores de las curvas de crecimiento son mayores que las de la cepa filante.

Con base en los resultados obtenidos es posible decir que no existe diferencia significativa en la producción de exopolisacárido en las concentraciones de lactosa de 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l. La concentración de carbohidrato a usar estará determinada por las variables costo-tiempo, es decir en 10 g/l se obtiene la mayor producción para un tiempo de 16-20 horas y en 30 g/l se obtiene en 8-12 horas por lo que la condición a elegir estará determinada por la necesidades experimentales.

Con 5g/l se obtiene la menor producción de exopolisacárido y con 30 g/l se obtiene el valor máximo, el cual es seis veces mayor que en 10 g/l; debido a que la producción de EPS no difiere significativamente entre las concentraciones utilizadas se recomienda el uso de 10 g/l para posteriores fermentaciones o de 30g/l si se desea obtener una producción de EPS en un menor tiempo. Los valores obtenidos en la cepa no filante son mayores desde el inicio de la fermentación que los

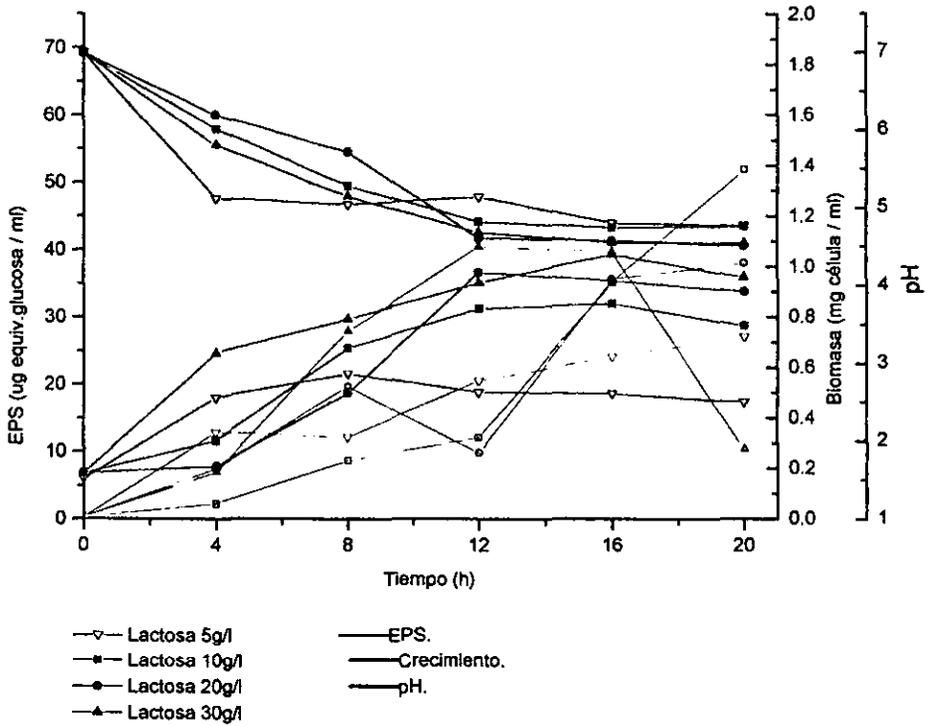


Figura 12. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido, crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

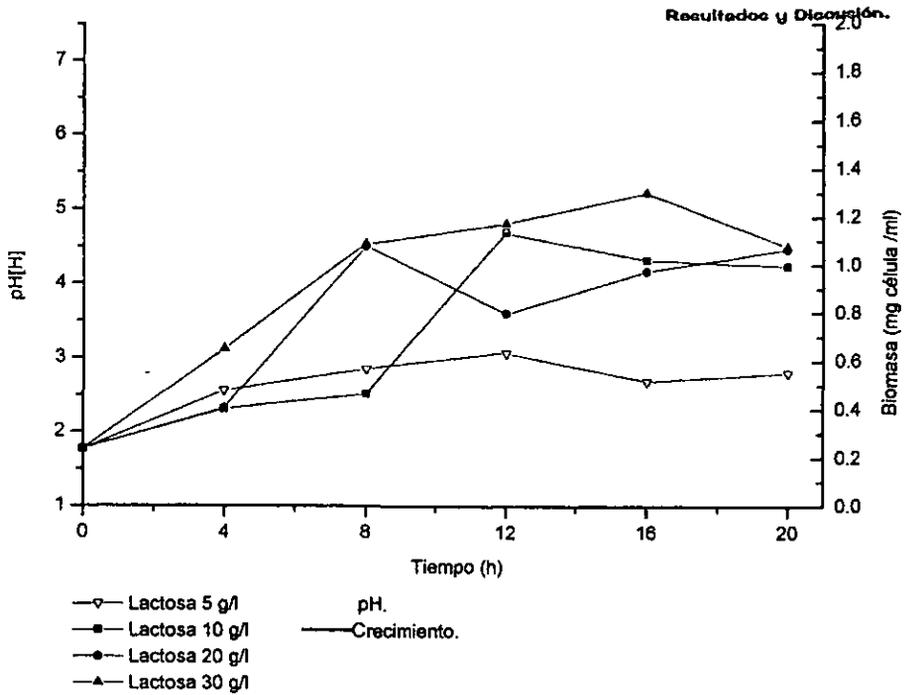


Figura 13a. Efecto de la concentración de lactosa en el crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

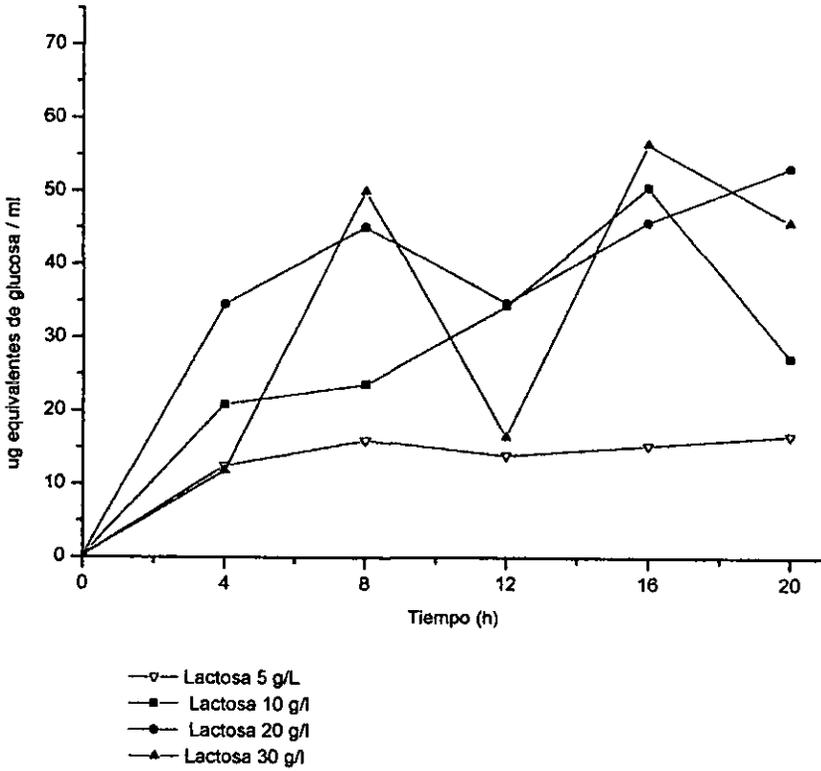


Figura 13b. Efecto de la concentración de lactosa en la producción de exopolisacárido. Tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*

obtenidos en la cepa filante, sin embargo la producción máxima se encuentra en el mismo orden de magnitud, con diferencias de una a seis unidades, así la velocidad de consumo es mayor en la cepa no filante, lo que sugiere mayor afinidad del sistema permeasa para incorporar la lactosa a la célula.

En la figura 14 se observa que en glucosa al incrementar su concentración la producción y crecimiento aumentarían ya que en 5 g/l prácticamente no se presenta biosíntesis de polímero y un mínimo crecimiento, en 10 g/l los valores son mayores pero no más que en lactosa, como se mostró anteriormente. Para la cepa no filante (figura 15) la tendencia es muy parecida pero en 5 g/l la producción aumenta en comparación con la cepa filante y en 10 g/l los valores alcanzados entre ambas cepas son similares.

La Tabla IV de Apéndice muestra el análisis de varianza realizado para ambas cepas en glucosa, la diferencia en la producción de EPS es altamente significativa para ambas cepas.

La producción de EPS es mayor en lactosa que en glucosa, una tendencia similar la reporta Degeest *et al* (2000); en *Lactobacillus bulgaricus* la producción es mayor en glucosa (Grobber *et al*, 1995), lo cual sugiere que el sistema permeasa es más eficiente para lactosa en *S.thermophilus* además de que se reporta para este microorganismo que la glucosa reprime la expresión de los genes del metabolismo de lactosa (Poolman *et al*, 1993), como lo son *lacS* (proteína de transporte de lactosa), *lacZ* (β -galactosidasa) y *galE* (UDP-glucosa epimerasa), (Poolman *et al*, 1990).

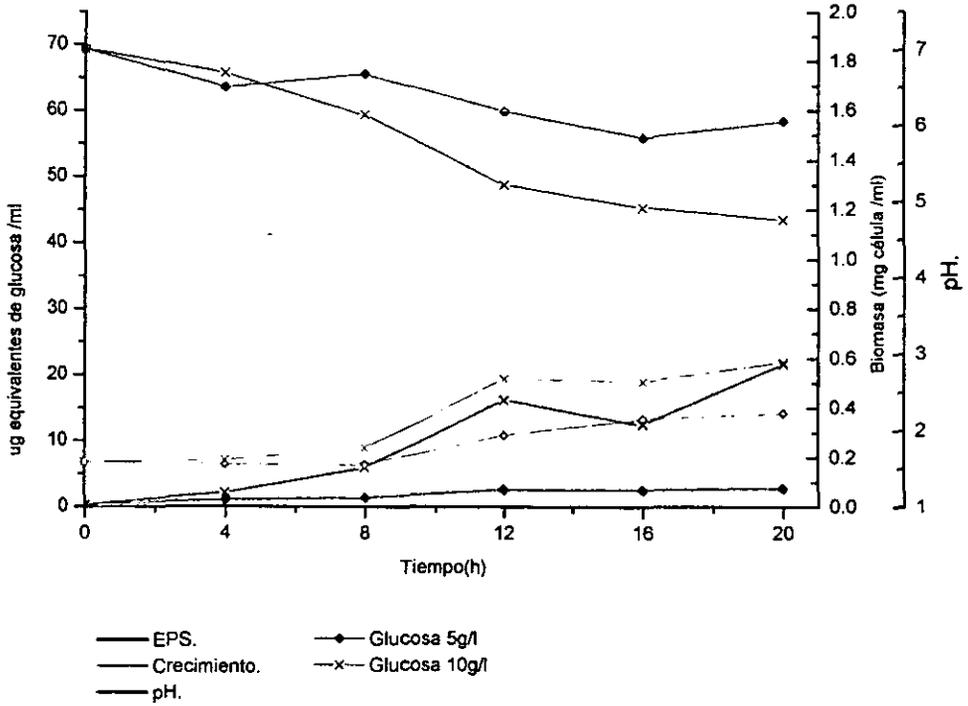


Figura 14. Efecto de la concentración de glucosa en la producción de EPS, crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

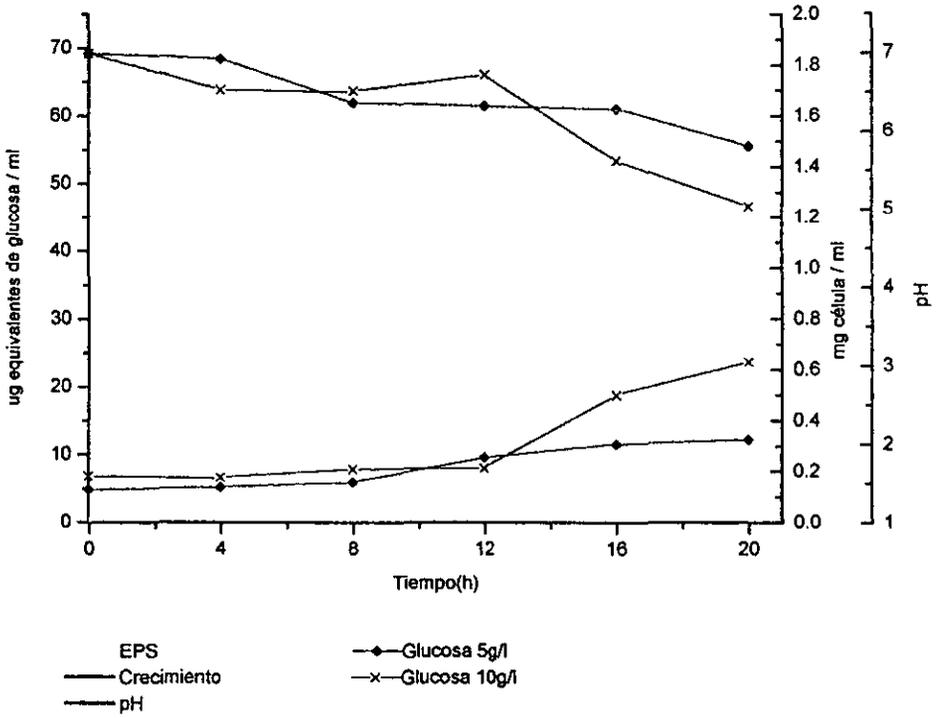


Figura 15. Efecto de la concentración de glucosa en la producción de EPS, crecimiento, pH. Tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

Conclusiones.

- Existen diferencias en los niveles de crecimiento y producción de EPS entre la primera, tercera y quinta resiembra de una misma cepa y entre la cepa filante y cepa no filante.
- La cepa filante produce el EPS con lactosa y glucosa, con fructosa y sacarosa no se presenta producción.
- La cepa no filante produce el EPS con lactosa, glucosa, sacarosa y no con fructosa.
- La producción de EPS difiere significativamente entre resiembras de cada cepa, sin embargo el nivel de producción es mayor en la tercera.
- La diferencia en producción de EPS entre las concentraciones 10g/l, 20g/l y 30g/l de lactosa es no significativa. Esta situación se presenta para la primera, tercera y quinta resiembra de ambas cepas.
- La concentración de fuente de carbono a usar estará determinada por las variables costo-tiempo, ya que con 10 g/l se obtiene la mayor producción para un tiempo de 16-20 horas y con 30 g/l se obtiene en 8-12 horas por lo que la condición a elegir estará determinada por las necesidades experimentales.
- La cantidad de EPS producida por la tercera resiembra de ambas cepas en glucosa es menor que con lactosa y sacarosa con una concentración de 10g/l.
- La producción de EPS es mayor con 10 g/l de lactosa con respecto a las obtenidas con 5 g/l y 20g/l.
- La combinación de lactosa/ glucosa no incrementa la producción de EPS en las cepas utilizadas, lo que sugiere un efecto represor de la glucosa sobre la producción.

- La presencia de galactosa en la combinación glucosa/ galactosa no influye en el incremento de producción de EPS, lo que indica que no ejerce efecto regulatorio ni de precursor.

Recomendaciones.

Para complementar los resultados obtenidos en este trabajo y comprender mejor el metabolismo involucrado en la biosíntesis de exopolisacárido se sugiere:

- 1) Determinar el consumo de carbohidrato en una cinética de producción de EPS de 20 h y las concentraciones de la fuente de carbono y resiembras de la cepa filante y no filante utilizadas en esta investigación.
- 2) Cuantificar la cantidad de glucosa, a partir de lactosa, que es utilizada para la síntesis del polímero y para el crecimiento en las tres resiembras de ambas cepas con las concentraciones probadas en este trabajo.
- 3) Determinar la actividad enzimática por lo menos de las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa y UDP galactosa 4-epimerasa en las diferentes resiembras de ambas cepas en las concentraciones y fuentes de carbono empleadas.
- 4) Determinar la composición de polímero en las diferentes fuentes probadas con las resiembras de las cepas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA.

Ariaga, H., Urashima, T., Michihata, E., Ito, M., Morizono, N., Kimura, T. and Takahashi, S. (1992) Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* OR 901 isolated by commercial yogurt. J.Food Sci. 57: 625-628.

Axelsson, L. T. (1992) Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc. Helsinki, Finland. Capitulo I.

Bubb, W.A., Urashima, T., Fujiwara, R., Shinnai, T. and Ariga, H. (1997) Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. Carbohydr. Res. 301: 41-50.

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeud, M. J. and M.Landon. (1988) Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 10 (4): 255-260.

Cerning, J., Renard C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeud, M. and Topisirovic, L. (1994) Carbon source requeriments for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3914-3919.

Cerning, J. (1995) Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Lait. 75: 463-472.

Degeest, B., and De Vuyst, L. (1999) Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolissaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2863-2870.

- Degeest, B., and De Vuyst, L. (2000) Correlation of activities of the enzymes α -fosfoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3519-3527.
- De Vuyst, L., Vanderveken, S., Van de Ven, S. and Degeest, B. (1998). Production by and isolation of exopolisaccharides from *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1059-1068.
- De Vuyst, L., and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 157-177.
- Doco, T., J. M. Wieruszkeski, and Fournet, B. (1990) Structure of an exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.* 198: 313-321.
- Domínguez, S., J. (1997) Caracterización reológica y de textura de un producto fermentado producido por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. and Rebers P. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Escalante, L.J.A. (1994) Metabolismo de carbohidratos en *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* productora de exopolisacáridos. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH. Facultad de Química, UNAM.
- Escalante, A., Wachter Rodarte, C., García-Garibay, M. and Farrés A. (1998) Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 108-114.

- Faber , E.J., Zoon, P., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G.. (1998) The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. Carbohydr. Res. 310: 269-276.
- Gancel, F. and Novel, G. (1994) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. J. Dairy Sci. 77: 685-688.
- Gancel, F. and Novel, G. (1994) Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. J. Dairy Sci. 77: 689-695.
- García-Garibay, M. and Marshall V.M.E. (1991) Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. J. Appl. Bacteriol. 70: 325-328.
- García-Garibay, M., Revah, S. y Gómez-Ruíz, L. (1993) Productos Lácteos. En: García Garibay, R. Quintero y A. López -Munguía. (Coordinadores). Biotecnología alimentaria. LIMUSA. México. pp 153-179.
- Griffin, A.M., Morris, V.J. and Gasson, M.J. (1996) The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* strain NCFB 2393. Gene. 183: 23-27.
- Grobben. G.J., Sikkema, J., Smith. M.R. and De Bont, J.A.M. (1995) Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. J. Appl. Bacteriol. 79: 103-107.
- Grobben, G.J., Smith, M.R., Sikkema, J. and De Bont, J.A.M. (1996) Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 279-284.

Grobben, G.J. Chin-Joe, I., Kitzen, V.A., Boels, I.C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M.R. and De Bont, J.A.M. (1998) Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified medium. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1333-1337.

Hassan, A.N., Frank, J.F., Farmer, M.A., Schmidt, K.A. and Shalabi, S.I. (1995) Formation of yogurt microstructure and three dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. J.Dairy Sci. 78: 2629-2632.

Hassan, A.N., Frank, J.F., Schmidt, K.A. and Shalabi, S.I. (1996) Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. J.Dairy Sci. 79: 2098-2103.

Ibarra, G.,E.B. (1997) Estudio del comportamiento de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ante tres métodos de conservación. Tesis de maestría en Ciencia de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.

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

Lemoine, J., F. Chirat, J.-M. Wieruszkeski, G. Strecker, N. Favre, and Neeser, J.N. (1997) Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi39 and Sfi12. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3512-3518.

Moat, A.G. (1990) Biology of the Lactic, Acetic, and Propionic acid Bacteria. En: Demain, A.L., Solomon, N. A. Biology of Industrial Microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc., Menlo Park, California.

Marshall, V.M.E., The Microflora and Production of Fermented Milks, Progress in Industrial Microbiology, vol.23, M.R. Adams (comp), Amsterdam, Elsevier.p.1-44. 1986.

Norma Oficial Mexicana NOM-F444-1983.Alimentos-Yogurt o Leche búlgara.

Poolman, B., T. J. Royer, S. E. Mainzer, and B. F. Schmidt. (1990). Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus* : characterisation of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDPglucose 4-epimerase. J. Bacteriol. 12: 4037-4047.

Poolman, B. (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. Mol.Microbiol.Rev. 12: 125-147.

Ramos A., Boels I.C., de Vos W.M. and Santos H. (2001) Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosintesis in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ Microbiol.67 (1): 33-41.

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

Sharpe, M.E., Lactic Acid Bacteria in the Dairy Industry, J.Soc.Dairy Technol.,32(1),p. 9-18, 1989.

Sinha,R.P., H.W. Modler y D.b.Emmons, Cnhanges in Acidity and Starter Bacteria In Commercial Yogurts During Storage, Cultured Dairy Prod.J., 24(2), p.12-14, 16, 1989.

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

Stingele, F., Mollet, B. (1995) Homologous integration and transposition to identify genes involved in the production of exopolysaccharides in *Streptococcus thermophilus*. Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci. Vol.85: 487-493.

Sutherland, I. W. (1990). Microbial polysaccharides. Cambridge University Press. United Kingdom.

Tamime, A., Robinson, R. (1991) Yogurt, Ciencia y Tecnología. Ed. Acribia, España.

Thomas, T.D. and Crow, V.L. (1983) Lactose and sucrose utilization by *Streptococcus thermophilus* in lactose-limiting chemostat cultures. Appl. Environ. Microbiol. 48(1): 186-191.

Van Den Bogaard P., Kleerebezem M., Kuipers O. and De Vos W.M. (2000) Control of Lactose Transport, β -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus* : evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate- dependent phosphotransferase system sugar. J.Bacteriology. 182(21): 5982-5989.

Van Kranenburg, R., Van Swam, I.I.,Kleerebezem, M. and De vos, W.M. (1998) Expression, disruption, and complementation of *eps* genes essential for exopolysaccharide biosynthesis in *L.lacti*. Abstracts of the ASM conference on Streptococcal genetics, pp.45-46. Vichy, France.

Villegas, C.J. (1995) Estrategias para la obtención de una cepa hiperproductora de exopolisacáridos en bacterias lácticas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.

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

APENDICE

Los resultados obtenidos en este trabajo son el producto de al menos el triplicado realizado en cada condición estudiada.

La diferencia entre repeticiones es no significativa en todos los experimentos realizados.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (Statistics Program Social Science)

Tabla I. Efecto de la concentración de lactosa en resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

		CONCENTRACIÓN LACTOSA		TIEMPO
CEPA FILANTE	1a RESIEMBRA	LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)		0 horas a 20 horas
		FISHER	DUNCAN (0.05) * C2 C3 C1	FISHER **
	3a RESIEMBRA	LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)		0 horas a 20 horas
		FISHER	DUNCAN (0.05) N.S. C2 C1 C3	FISHER **
	5a RESIEMBRA	LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)		0 horas a 20 horas
		FISHER	DUNCAN (0.05) N.S. C3 C2 C1	FISHER **
	FISHER DUNCAN (0.05) ** 1aR 5aR 3aR		FISHER DUNCAN (0.05) N.S. C2 C1 C3	

(**) Indica una diferencia altamente significativa (p=95%)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.

Tabla II. Efecto de la concentración de lactosa en resiembros de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

CEPA NO FILANTE	RESIEMBRA	CONCENTRACIÓN DE LACTOSA	TIEMPO
		LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)	0 horas a 20 horas
		FISHER DUNCAN (0.05) N.S. C2 C1 C3	FISHER **
	3a RESIEMBRA	LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)	0 horas a 20 horas
		FISHER DUNCAN (0.05) N.S. C1 C3 C2	FISHER **
	5a RESIEMBRA	LAC 10 g/l (C1) LAC 20g/l (C2) LAC 30g/l (C3)	0 horas a 20 horas
		FISHER DUNCAN (0.05) N.S. C2 C1 C3	FISHER **
	FISHER DUNCAN (0.05) ** 1aR 5aR 3aR	FISHER DUNCAN (0.05) N.S. C1 C3 C2	

(**) Indica una diferencia altamente significativa (p=95%)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.

Tabla IA. Efecto de la concentración de lactosa en la primera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

R E S I E M B R A	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	μg eq. glucosa / ml	PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
	1a	Lactosa 10g/l	0	0.224 \pm 0.00
4			3.529 \pm 1.010	
8			13.003 \pm 1.488	
12			24.240 \pm 3.526	
16			21.473 \pm 2.009	
20			12.294 \pm 0.370	
Lactosa 20g/l		0	0.224 \pm 0.00	T0 T4 T16 T8 T12 T20
		4	2.004 \pm 0.8348	
		8	7.426 \pm 1.007	
		12	11.692 \pm 1.450	
		16	4.688 \pm 0.290	
		20	14.432 \pm 1.726	
Lactosa 30g/l		0	0.224 \pm 0.00	T0 T12 T16 T8 T4 T8 T4 T20
		4	13.819 \pm 0.332	
		8	13.785 \pm 0.450	
	12	10.150 \pm 3.166		
	16	11.570 \pm 0.844		
	20	16.927 \pm 4.768		
FISHER	-	**		

Tabla IB. Efecto de la concentración de lactosa en la tercera resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

R E S I E M B R A	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	μg eq. glucosa / ml	PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
	3a	Lactosa 10g/l	0	0.224 \pm 0.00
4			2.167 \pm 0.152	
8			8.658 \pm 0.638	
12			12.061 \pm 0.718	
16			35.158 \pm 1.901	
20			51.932 \pm 3.622	
Lactosa 20g/l		0	0.224 \pm 0.00	T0 T4 T12 T8 T20 T16
		4	7.454 \pm 1.035	
		8	19.664 \pm 2.600	
		12	9.827 \pm 1.622	
		16	35.597 \pm 2.177	
		20	33.634 \pm 8.347	
Lactosa 30g/l		0	0.224 \pm 0.00	T0 T4 T20 T8 T16 T12
		4	6.891 \pm 0.450	
		8	27.885 \pm 1.648	
	12	40.428 \pm 1.170		
	16	39.694 \pm 2.715		
	20	10.386 \pm 0.592		
FISHER	N.S.	**		

Tabla IC. Efecto de la concentración de lactosa en la quinta resiembra de la cepa filante de *Streptococcus thermophilus*.

	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	μg eq.glucosa / ml	PRUEBA DE RANGO
				MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
5a R E S I E M B R A	Lactosa 10g/l	0	0.224 \pm 0.00	T0 T4 T8 T12 T16 T20
		4	5.919 \pm 0.184	
		8	6.975 \pm 1.036	
		12	13.132 \pm 1.575	
		16	38.194 \pm 1.264	
		20	39.870 \pm 2.026	
	Lactosa 20g/l	0	0.224 \pm 0.00	T0 T20 T8 T4 T16 T12
		4	20.532 \pm 0.951	
		8	8.878 \pm 1.097	
		12	34.996 \pm 0.560	
		16	29.639 \pm 3.183	
		20	6.913 \pm 1.297	
	Lactosa 30g/l	0	0.224 \pm 0.00	T0 T4 T12 T20 T8 T16
		4	1.983 \pm 0.329	
		8	39.264 \pm 0.329	
		12	7.686 \pm 0.189	
		16	40.359 \pm 0.976	
		20	8.287 \pm 0.585	
FISHER	N.S.	**		

(**) Indica una diferencia altamente significativa ($p=95\%$)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.

Tabla IIA. Efecto de la concentración de lactosa en la primera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	$\mu\text{g eq. glucosa / ml}$	PRUEBA DE RANGO
				MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
R E S I E M B R A	Lactosa 10g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T8 T12 T4 T16 T20
		4	2.343 ± 0.516	
		8	1.5653 ± 0.446	
		12	2.146 ± 0.535	
		16	5.168 ± 0.744	
	20	7.831 ± 0.132		
	Lactosa 20g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T4 T12 T8 T16 T20
		4	4.073 ± 0.223	
		8	1.652 ± 0.094	
		12	1.191 ± 0.264	
		16	2.713 ± 0.239	
	20	12.090 ± 0.362		
	Lactosa 30g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T12 T4 T8 T20 T16
		4	3.056 ± 0.328	
		8	1.134 ± 0.290	
12		1.109 ± 0.411		
16		12.819 ± 4.279		
20	9.011 ± 0.573			
FISHER	N.S.	**		

Tabla IIB. Efecto de la concentración de lactosa en la tercera resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	$\mu\text{g eq. glucosa / ml}$	PRUEBA DE RANGO
				MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
R E S I E M B R A	Lactosa 10g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T4 T8 T8 T20 T12 T16
		4	20.869 ± 2.413	
		8	23.576 ± 0.488	
		12	34.367 ± 5.377	
		16	50.529 ± 2.212	
	20	27.230 ± 1.150		
	Lactosa 20g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T4 T12 T8 T16 T20
		4	34.543 ± 1.251	
		8	45.157 ± 1.899	
		12	34.708 ± 3.582	
		16	45.758 ± 3.222	
	20	53.162 ± 0.988		
	Lactosa 30g/l	0	0.251 ± 0.000	T0 T4 T12 T20 T8 T16
		4	11.775 ± 0.201	
		8	50.023 ± 1.860	
12		16.485 ± 1.096		
16		56.453 ± 2.999		
20	45.713 ± 2.056			
FISHER	N.S.	**		

Tabla IIC. Efecto de la concentración de lactosa en la quinta resiembra de la cepa no filante de *Streptococcus thermophilus*.

5a R E S I E M B R A	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	$\mu\text{g eq. glucosa / ml}$	PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
	Lactosa 10g/l	0	0.251 \pm 0.000	T0 T4 T12 T8 T20 T16
		4	1.878 \pm 0.062	
		8	5.103 \pm 0.531	
12		3.448 \pm 1.159		
16		36.344 \pm 8.453		
20	34.061 \pm 5.425			
Lactosa 20g/l	0	0.251 \pm 0.000	T0 T12 T12 T4 T8 T20 T16	
	4	2.570 \pm 0.121		
	8	15.753 \pm 1.023		
	12	1.887 \pm 0.417		
	16	26.897 \pm 1.187		
20	24.814 \pm 2.269			
Lactosa 30g/l	0	0.251 \pm 0.000	T0 T8 T4 T12 T20 T16	
	4	2.091 \pm 0.223		
	8	1.732 \pm 0.160		
	12	2.544 \pm 0.019		
	16	45.156 \pm 6.190		
20	33.400 \pm 1.827			
FISHER	N.S.	**		

(**) Indica una diferencia altamente significativa ($p=95\%$)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.

TablIII. Efecto de la concentración de glucosa en la tercera resiembra de de la cepa filante y no filante de *Streptococcus thermophilus*

	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	$\mu\text{g eq. glucosa / ml}$	PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
CEPA FILANTE	Glucosa 5g/l	0	0.224 ± 0.009	T0 T4 T8 T16 T12 T20
		4	0.961 ± 0.297	
		8	1.320 ± 0.010	
		12	2.571 ± 0.062	
		16	2.527 ± 0.068	
		20	2.808 ± 0.056	
	Glucosa 10g/l	0	0.224 ± 0.031	T0 T4 T8 T12 T16 T20
		4	2.100 ± 0.191	
		8	5.835 ± 1.079	
		12	16.183 ± 0.934	
16		12.641 ± 1.268		
20		21.668 ± 5.409		
FISHER **	FISHER **			
CEPA NO FILANTE	Glucosa 5g/l	0	0.251 ± 0.019	T0 T4 T8 T12 T16 T20
		4	1.249 ± 0.103	
		8	1.549 ± 0.149	
		12	1.483 ± 0.045	
		16	6.907 ± 0.699	
		20	8.645 ± 0.946	
	Glucosa 10g/l	0	0.251 ± 0.009	T0 T4 T4 T8 T12 T16 T20
		4	2.542 ± 0.522	
		8	3.640 ± 0.892	
		12	8.888 ± 4.441	
16		18.489 ± 4.202		
20		23.345 ± 4.060		
FISHER **	FISHER **			

(**) Indica una diferencia altamente significativa ($p=95\%$)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.

Tabla IV. Efecto de la concentración de lactosa en la tercera resiembra de de la cepa filante y no filante de *Streptococcus thermophilus*

	CONCENTRACIÓN	TIEMPO (h)	μg eq.glucosa / ml	PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE DUNCAN α 95%
CEPA FILANTE	Lactosa 5g/l	0	0.224 ± 0.011	T0 T8 T4 T12 T16 T20
		4	12.797 ± 3.722	
		8	12.293 ± 1.687	
		12	20.406 ± 0.5635	
		16	24.095 ± 0.731	
		20	27.0523 ± 0.079	
	Lactosa 10g/l	0	0.224 ± 0.019	T0 T4 T8 T12 T16 T20
		4	2.167 ± 0.152	
		8	8.658 ± 0.638	
		12	12.061 ± 0.718	
16		35.158 ± 1.901		
20		51.9323 ± 3.622		
FISHER N.S.	FISHER **			
CEPA NO FILANTE	Lactosa 5g/l	0	0.251 ± 0.012	T0 T4 T12 T16 T8 T20
		4	12.436 ± 0.304	
		8	15.980 ± 0.495	
		12	13.888 ± 0.391	
		16	15.277 ± 1.065	
		20	16.613 ± 0.312	
	Lactosa 10g/l	0	0.251 ± 0.020	T0 T4 T8 T20 T12 T16
		4	20.869 ± 2.413	
		8	23.576 ± 0.488	
		12	34.367 ± 5.377	
16		50.529 ± 2.212		
20		27.230 ± 1.150		
**	FISHER N.S.	FISHER **		

(**) Indica una diferencia altamente significativa ($p=95\%$)

(*) Indica una diferencia significativa.

N.S. Indica que no existe diferencia significativa.