



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Identificación de la diversidad de bacterias lácticas productoras de polisacáridos extracelulares y la caracterización estructural de los polímeros producidos en una muestra de aguamiel y pulque.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

David Rodrigo López Soto

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Marcela Ayala Aceves
Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. José Adelfo Escalante Lozada en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca 329359/384226 y el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado para la asistencia a congresos durante los estudios de maestría.

El proyecto contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IN207914. Durante el desarrollo de la tesis se contó con una beca de este proyecto.

La línea de investigación en la que se ubica este proyecto forma parte de la Red Temática Mexicana de Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, AGARED – CONACYT.

*A Daniel,
Leticia y David.
Pilares de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada por su valiosa dedicación y confianza que me brindó durante mis estudios de maestría. Reconociendo la calidad de persona que encontré en él.

A la M.C María Elena Rodríguez Alegría por su tiempo y conocimiento que me compartió durante la ejecución de los experimentos del proyecto. Mucho de este proyecto se debe a su paciencia y a su siempre energía positiva, enseñándome a ser perseverante en cada momento.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves y la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo por formar parte de mi Comité Tutor y guiar mi formación con sus sabios consejos y comentarios en cada tutorial.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dr. Guillermo Gosset Lagarda y la Dra. Noemí Flores Mejía por sus comentarios durante mis seminarios de grupo.

Al Biol. Manuel Saucedo Ramírez y a Aurelia González Guzmán por ser grandes pilares del laboratorio.

A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su apoyo técnico en el uso del cromatógrafo y a la Q.I Luz María Martínez Mejía por su apoyo en las técnicas moleculares.

Al M. en C. Ramón de Anda Herrera por sus enseñanzas en el laboratorio y en las canchas de tenis. Porque la vida se gana set a set. Gracias.

A Mario Alberto Caro Bermúdez por su apoyo técnico en la planta piloto, gracias a él pude materializar muchos polímeros.

A mi estimada Aurelia Ocampo Vargas y a su esposo, en ellos encontré a dos grandes personas que saben dar todo por los demás. Muchas gracias.

A mis amigos Crispín Zavala y Emilio Guinto por todos aquellos grandes momentos que pasamos juntos. La vida es más ligera con amigos como ustedes.

A mis entrañables amigos y compañeros de laboratorio: Ale Mejía, Susy Contreras, Fabián Moreno, Yerli Marín, Diego Muguera, Andrés Martínez, Dulce Díaz, Karina Salcedo, Alejandra Vargas, César Aguilar, Jesús Salgado, Mariana Martínez, Andrea Sabido, Juan Carlos Fragoso.

Y por último pero no los menos importantes, a cada productor del pulque que sigue castrando y raspando el maguey, tradición milenaria en México, gracias por continuar con esta historia.

Índice

Lista de siglas, acrónimos y abreviaturas.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	IX
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Generalidades.....	4
4.1 Alimentos fermentados: una visión global.....	4
4.1.1 Aguamiel y pulque.....	8
4.2 Bacterias ácido lácticas.....	13
4.3 Polisacáridos extracelulares.....	15
4.3.1 Homopolisacáridos: Glucanos y Fructanos.....	17
4.3.2 Heteropolisacáridos.....	18
4.3.3 Importancia industrial de los EPS bacterianos.....	21
4.4 Glucansacarosas.....	22
4.4.1 Metodologías para la selección de BAL-EPS.....	25
5. Justificación.....	26
6. Objetivos e hipótesis.....	26
6.1 Hipótesis.....	26
6.2 Objetivo general.....	26
6.3 Objetivo particulares.....	26
7. Materiales y Métodos.....	27
8. Resultados y Discusión.....	36
8.1 Diversidad de BAL en el aguamiel y el pulque de la zona de Apan, Hidalgo.....	36
8.1.1 Cuantificación y aislamiento de BAL totales y BAL-EPS en aguamiel y pulque.....	36
8.1.2 Identificación de BAL-EPS por ARDRA.....	38
8.2 Actividad glicosiltransferasa y crecimiento celular de las BAL-EPS.....	47
8.3 Caracterización química de los polisacáridos extracelulares producidos.....	50
8.4 Resonancia magnética nuclear de los HoPS de las cepas de <i>Leuconostoc</i>	55
8.5 Zimogramas de la fracción celular y sobrenadante de las BAL-EPS.....	64
9. Conclusiones.....	67
10. Perspectivas.....	68
11. Bibliografía.....	69
12. Anexos.....	80

Lista de siglas, acrónimos y abreviaturas.

ABC	ATP-binding cassette.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal.
APT	Medio de cultivo para bacterias ácido lácticas.
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. Análisis del perfil de restricción del ADN.
ATP	Adenosine 5´-triphosphate. Adenosina 5´-trifosfato.
BAL	Bacterias ácido lácticas.
BAL-EPS	Bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos extracelulares.
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. Herramienta de búsqueda para alineamiento básico.
Da	Dalton.
EFSA	European Food Safety Authority. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
EPS	Polisacáridos extracelulares.
FDA	Food and Drug Administration. Administración de Alimentos y Medicamentos.
GP	Grado de polimerización.
GRAS	Generally Recognized as Safe. Reconocida generalmente como segura.
h	Hora
HePS	Heteropolisacáridos.
HoPS	Homopolisacáridos.

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía líquida de alta resolución.
MALDI-TOF	Matrix-assited Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight. Desorción/ionización laser asistida por matrix – Tiempo de vuelo.
MHz	Megahercio.
min	Minutos.
mm	Milímetros.
MS	Mass Spectrometry. Espectrometría de masas.
MRS	Man Rogosa Sharpe, medio de cultivo para bacterias ácido lácticas.
ppm	Partes por millón.
PCR	Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
QPS	Qualified Presumption of Safety. Presunción cualificada de seguridad.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
TLC	Thin Layer Chromatography. Cromatografía de capa fina.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages.
δ	Desplazamiento químico.

Índice de figuras

Figura 1	Esquema de la vía de síntesis de HoPS y HePS en las BAL.	16
Figura 2	Estructura química de la inulina y dextrana.	17
Figura 3	Diagrama de síntesis de los HePS en la bacteria <i>Lactococcus lactis</i> .	20
Figura 4	Estructura cristalográfica de las enzimas: inulinsacarasa y glucansacarasa.	24
Figura 5	Diagrama metodológico para el análisis de la diversidad de BAL-EPS.	27
Figura 6	Fenotipos viscosos de colonias BAL-EPS en aguamiel y pulque.	38
Figura 7	Perfiles ARDRA únicos de las muestras de aguamiel y pulque. G1, grupo I; G2, grupo II; G3 grupo III y G4, grupo IV, del dendrograma.	39
Figura 8	Dendrogramas de las BAL-EPS en aguamiel y pulque.	40
Figura 9	Árbol filogenético de las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas de aguamiel y las secuencias de referencia de la base de datos del NCBI.	42
Figura 10	Árbol filogenético de las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas del pulque y las secuencias de referencia de la base de datos del NCBI.	44
Figura 11	Fenotipos únicos de BAL-EPS aisladas de aguamiel (izquierda) y pulque (derecha). Cepa A51 (<i>L. citreum</i>), cepa A63 (<i>L. mesenteroides</i>), cepa A1 (<i>L. kimchii</i>), cepa P8 (<i>L. mesenteroides</i>), cepa P29 (<i>Lactobacillus plantarum</i>) y cepa P30 (<i>L. brevis</i>).	46
Figura 12	Gráficas de crecimiento celular y actividad enzimática específica para las cepas: <i>L. mesenteroides</i> P8 y <i>L. mesenteroides</i> A63 ▲ pH; ■ crecimiento celular.	47
Figura 13	Gráficas de crecimiento celular y actividad enzimática específica para las cepas: <i>L. kimchii</i> A1 y <i>L. citreum</i> A51. ▲ pH; ■ crecimiento celular.	48
Figura 14	Hidrólisis enzimática de los polímeros de la fracción celular y fracción sobrenadante: C. Control; 1. <i>L. citreum</i> A51C; 2. <i>L. citreum</i> A51S; 3. <i>L.mesenteroides</i> A63C; 4. <i>L.mesenteroides</i> A63S; 5 . <i>L. kimchii</i> A1; 6. <i>L.mesenteroides</i> P8C; 7. <i>L.mesenteroides</i> P8S; 8. <i>Lb.plantarum</i> P29; 9. <i>Lb.brevis</i> P30.	51

Figura 15	Perfil cromatográfico de los productos de la hidrólisis ácida de los polímeros de <i>L. plantarum</i> P29 y <i>L. brevis</i> P30	52
Figura 16	Espectros de ¹ H de las dextranas de las cepas <i>L. kimchii</i> A1; <i>L. mesenteroides</i> A63; <i>L. citreum</i> A51 y <i>L. mesenteroides</i> P8.	57
Figura 17	Espectros de ¹³ C de las dextranas de las siguientes cepas: <i>L. kimchii</i> A1, <i>L. mesenteroides</i> A63, <i>L. citreum</i> A51 y <i>L. mesenteroides</i> P8.	61
Figura 18	Zimogramas de la fracción celular. <i>L. kimchii</i> A1, <i>L. mesenteroides</i> A63, <i>L. citreum</i> A51, <i>L. mesenteroides</i> P8, <i>L. plantarum</i> P29, <i>L. brevis</i> P30, C- <i>E. coli</i> DH5α, C+ <i>L. kimchii</i> EPSA.	64
Figura 19	Zimogramas de la fracción celular. <i>L. kimchii</i> A1, <i>L. mesenteroides</i> A63, <i>L. citreum</i> A51, <i>L. mesenteroides</i> P8; <i>L. plantarum</i> P29, <i>L. brevis</i> P30, C- <i>E. coli</i> DH5α, C+ <i>L. kimchii</i> EPSA.	65
Figura 20	Hidrólisis ácida de las dextranas sintetizadas por <i>L. citreum</i> A51 y <i>L. mesenteroides</i> P8	84
Figura 21	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. kimchii</i> A1.	85
Figura 22	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. citreum</i> A51 fracción asociada a la célula.	85
Figura 23	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. citreum</i> A51 fracción sobrenadante.	86
Figura 24	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. mesenteroides</i> A63 fracción celular.	86
Figura 25	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. mesenteroides</i> A63 fracción sobrenadante.	87
Figura 26	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. mesenteroides</i> P8 fracción asociada a la célula.	87
Figura 27	Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de <i>L. mesenteroides</i> P8 fracción sobrenadante.	88

Índice de tablas

Tabla 1	Bebidas fermentadas y destilados en el mundo.	6
Tabla 2	Especificaciones fisicoquímicas en la producción de aguamiel y pulque.	10
Tabla 3	Diversidad microbiana durante la producción del pulque.	11
Tabla 4	Alimentos fermentados y BAL.	15
Tabla 5	Metodologías para la identificación de BAL-EPS.	25
Tabla 6	Volúmenes de reacción para la reacción de PCR.	29
Tabla 7	Volúmenes de reacción para la digestión enzimática.	30
Tabla 8	Distribución de las colonias en el dendrograma de aguamiel y pulque.	41
Tabla 9	Peso molecular y grado de polimerización de los polímeros sintetizados.	53
Tabla 10	Desplazamientos químicos de los espectros ^1H para las dextranas de las cepas: <i>L. kimchii</i> A1; <i>L. mesenteroides</i> A63; <i>L. citreum</i> A51; <i>L. mesenteroides</i> P8.	56
Tabla 11	Desplazamientos químicos de ^{13}C para las dextranas producidas por las cepas: <i>L. kimchii</i> A1, <i>L. mesenteroides</i> A63, <i>L. citreum</i> A51 y <i>L. mesenteroides</i> P8.	60
Tabla 12	Porcentaje del enlace glucosídico en las dextranas.	62
Tabla 13	Fenotipos únicos de colonia viscosa de cada grupo del dendrograma del pulque.	80
Tabla 14	Fenotipos únicos de colonia viscosa de cada grupo del dendrograma del aguamiel.	81
Tabla 15	Resultados del análisis BLAST de las secuencias BAL-EPS aguamiel	82
Tabla 16	Resultados del análisis BLAST de las secuencias BAL-EPS pulque	83

1. Resumen

El pulque es la bebida alcohólica fermentada de mayor tradición en México, posee un sabor ácido, color blanco y una textura viscosa al paladar. Con el objetivo de estudiar la diversidad microbiana en esta bebida, el presente trabajo reporta los resultados de la investigación de diversidad de bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos extracelulares y la caracterización estructural de estos polímeros en una muestra de aguamiel y una de pulque de la región de Apan, Estado de Hidalgo. A partir de cada una de las muestras se realizó una cuantificación total de bacterias ácido lácticas obteniendo una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL en aguamiel y 1.7×10^4 UFC/mL en el pulque, la relación de bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos extracelulares con respecto a las totales es del 40 % (6×10^5 UFC/mL) en aguamiel y en el pulque es del 70 % (1.3×10^4 UFC/mL). El estudio de diversidad microbiana se desarrolló mediante una tipificación de las bacterias aisladas, empleando el análisis del perfil de restricción del gen ADNr 16S. Los microorganismos aislados fueron asignados a las especies de *Leuconostoc mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. citreum* y *L. kimchii* en el aguamiel y *L. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis* en el pulque.

La síntesis de polisacáridos extracelulares por las cepas de *Leuconostoc* es mediante las enzimas glicosiltransferasas. Durante el crecimiento celular de las cepas se presentó mayor actividad enzimática cuando el pH del medio se encuentra entre 4.5 – 5.5, el rango de peso molecular que presentan estas enzimas es de 140 – 250 kDa. La presencia de enzimas del mismo tamaño (170 kDa) en la fracción sobrenadante y celular en los zimogramas indica posiblemente que sea la misma proteína en ambos casos. Al realizar la caracterización química de los polisacáridos sintetizados por las cepas *Leuconostoc*, estos fueron identificados como dextranas; el análisis estructural por resonancia magnética nuclear de 1 dimensión (^1H y ^{13}C) y 2 dimensiones (HSQC) demostró una variación en la cantidad de enlaces α -(1→6) del 70 – 87 %, α -(1→2) 3.4 – 22 % y α -(1→3) 6.8 – 27 %. Los polisacáridos extracelulares de *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30 son de tipo heteropolisacáridos con una composición monomérica de glucosa y galactosa. Su síntesis probablemente es citoplasmática al no reportar actividad glicosiltransferasa en la fracción sobrenadante ni asociada a la célula. Los resultados obtenidos contribuyen a los ya reportados en el estudio de la diversidad microbiana de esta bebida, siendo este trabajo el primero en estudiar la diversidad de BAL-EPS en el aguamiel.

2. Abstract

Pulque is the most traditional fermented alcoholic beverage in Mexico; it has a sour taste, white color and viscous texture. The following research studies the diversity of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides and the structural characterization of the polymer in a sample of aguamiel and pulque from the region of Apan, Hidalgo, in order to expand the knowledge of the microbial diversity in the system. The concentration of total lactic acid bacteria in aguamiel was 1.5×10^6 CFU/mL and 1.7×10^4 CFU/mL in pulque, the ratio of lactic acid bacteria producing exopolysaccharides with respect to the total was 40% in aguamiel and 70% in pulque. The study of bacterial diversity was performed by typing of isolated bacteria using the amplified ribosomal DNA restriction analysis. The isolated microorganisms were assigned to the species *Leuconostoc mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. kimchii* and *L. citreum* in aguamiel and *L. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* and *L. brevis* in pulque.

The exopolysaccharide synthesis by *Leuconostoc* strains is by extracellular glycosyltransferases. During the cell growth of strains, the higher activity of this enzymes occurred when the pH of the medium is 4.5 - 5.5, the molecular weight range exhibited by these enzymes is 140 - 250 kDa. The presence of enzymes with the same weight (170 kDa) in the cellular and supernatant fractions possibly indicates that is the same enzyme in both cases. The chemical characterizations of the exopolysaccharides synthesized by the *Leuconostoc* strains were shown to be dextran type. Structural analysis by nuclear magnetic resonance of 1 dimension (^1H and ^{13}C) and 2 dimension (HSQC) showed a variation of the number of linkages α -(1 \rightarrow 6) 70 – 87 %, α -(1 \rightarrow 2) 3.4 – 22 % and α -(1 \rightarrow 3) 6.8 – 27 %. The exopolysaccharides synthesized by *L. plantarum* P29 and *L. brevis* P30 are heteropolysaccharide type, with a monomer composition of glucose and galactose, their synthesis is probably by the action of glycosyltransferase at the cytoplasmic because it was not showed enzymatic activity in the supernatant fraction. The results presented contribute to earlier reports on the study of microbial diversity in pulque, in our knowledge this work being the first to study the diversity of BAL-EPS in aguamiel.

3. Introducción

El pulque es una bebida alcohólica no destilada de textura viscosa al paladar, color blanco y de sabor ácido, producto de la fermentación espontánea de la savia de diferentes especies de agave: *Agave salmiana*, *A. atrovirens*, *A. ferox* y *A. mapisaga*. Los estados con mayor producción en México son: Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala (Escalante *et al.*, 2016; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). La producción del pulque en la mayoría de las regiones productoras del país conserva su forma tradicional de preparación, la cual presenta un sistema con dos fermentaciones (alcohólica y ácida) y una bioconversión de sacarosa en polímeros de diferente peso molecular. Los criterios de grado alcohólico y viscosidad del producto final son utilizados como parámetros para controlar el proceso de fermentación (Escalante *et al.* 2012; Valadez-Blanco *et al.* 2012).

Una de las razones del aumento de la viscosidad durante la fermentación del aguamiel aunado al incremento de la biomasa es la producción de polisacáridos extracelulares (EPS). Varios grupos de investigación han reportado la producción de dextranas y levanas por parte de diferentes especies del género *Leuconostoc* presentes en el pulque (Chellapandian *et al.* 1998; Sanchez-Marroquin and Hope 1953; Torres-Rodríguez *et al.* 2014). Los géneros de las bacterias ácido lácticas (BAL): *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* han sido identificados en alimentos fermentados como productores de una gran diversidad de EPS. Dependiendo de su composición y biosíntesis, los EPS son divididos en: heteropolisacáridos (HePS) y homopolisacáridos (HoPS). Los HoPS son polímeros conformados por unidades repetidas de un solo tipo de monosacárido. Sí el polímero está compuesto por unidades de glucosa es denominado glucano, mientras que los fructanos son todos aquellos polímeros conformados por residuos de fructosa, ambos polisacáridos son sintetizados por las enzimas glicosiltransferasas (Van Hijum *et al.* 2006).

En los últimos años el estudio de los diferentes EPS ha recibido una atención especial por el valor agregado de los productos que se desarrollan a partir de estos, fungiendo como ingredientes en las formulaciones de la industria cosmética y alimenticia. En la industria alimenticia se utilizan como: hidrocoloides, emulsificantes y ganadores de peso en alimentos; mientras que en la medicina se han utilizado para el control de la hipovolemia y como prebióticos (Maina *et al.* 2008; Torres-Rodríguez *et al.* 2014).

El presente proyecto pretende aportar información sobre la diversidad microbiana de BAL-EPS y la caracterización estructural de los EPS presentes en muestras de aguamiel y

pulque de la región de Apan, Hidalgo. Esta región fue seleccionada por su gran historia en la producción de esta bebida, habiendo sido considerada en el siglo XIX como la “capital del pulque” del país. Hoy en día la producción de pulque en esta zona sigue conservando su forma tradicional y la región sigue siendo un referente en la comercialización de esta bebida (INAFED, 2016). El presente estudio enriquecerá la información de la diversidad microbiana en otras regiones productoras del país, siendo los estados de Morelos y Estado de México las regiones donde previamente se ha estudiado esta diversidad por parte de nuestro grupo de trabajo (Escalante *et al.*, 2004, 2008).

4. Generalidades

4.1 Alimentos fermentados: una visión global.

Los métodos más antiguos utilizados por la humanidad para preservar los alimentos son: el secado, el salado y la fermentación. El proceso de fermentación fue descubierto por la humanidad al principio del periodo Neolítico, al convertirse los antiguos nómadas en agricultores, existiendo la evidencia de la producción de quesos hace aproximadamente 8000 años en la región ubicada entre los ríos Tigris y Éufrates, actualmente Irak. Con el movimiento de los asentamientos humanos y el desarrollo del comercio se propició a una transferencia tecnológica de este proceso a diferentes regiones del mundo, teniendo como resultado de estas actividades una diversidad de alimentos y bebidas fermentadas. Estos alimentos se han convertido en parte importante de la cultura de las poblaciones hasta formar parte integral de su dieta, ocupando en algunos lugares el 40 % de la ingesta diaria (Campbell-Platt 1994; Ross *et al.* 2002).

La fermentación es el proceso por el cual los carbohidratos son convertidos en alcoholes, ácidos orgánicos y dióxido de carbono mediante el empleo de bacterias o levaduras, bajo condiciones anaerobias. Entre los microorganismos presentes con mayor frecuencia en los alimentos fermentados se encuentran las BAL de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*; hongos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y levaduras del género *Saccharomyces* (Campbell-Platt 1994; Marshall & Mejia 2012; Tamang *et al.* 2016). El consumo de alimentos y bebidas fermentados tradicionalmente está considerado como inocuo y seguro, aún sin tener una etapa de pasteurización durante su elaboración, esto es debido a las condiciones antagónicas que producen los microorganismos durante la fermentación. Siendo las BAL

las responsables de la producción de metabolitos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de patógenos, entre estos compuestos se encuentran: ácidos orgánicos (láctico y acético), etanol, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. La experiencia en la producción tradicional de estos alimentos ha guiado a los productores al empleo de la técnica de re-inoculación (el uso del producto fermentado como inóculo) observando una disminución del tiempo inicial de fermentación y la obtención de un producto con características reproducibles (Campbell-Platt 1994; Cook 1994).

La mayor producción de alimentos fermentados en el mundo se encuentra en Europa, América y África subsahariana. Sudamérica es la región con mayor diversidad de bebidas fermentadas, Medio Oriente se caracteriza por la producción de productos lácteos y en el sureste asiático sobresalen los alimentos fermentados a partir de pescados y leguminosas; contribuyendo estos alimentos en todas las regiones del mundo a la ingesta proteica de los pobladores. La producción de estos alimentos ayuda a la subsistencia de la población rural a través del mejoramiento de la seguridad alimentaria y la generación de trabajo a través de la venta de estos productos. La demanda de los alimentos fermentados no solamente se presenta en las zonas rurales, también en grandes centros urbanos como resultado de la migración campesina a las ciudades, llevando en su consumo diferentes ritos y tradiciones, ya que estos productos forman parte de una variedad de actividades sociales, religiosas y culturales (Giraffa 2004).

Diversas poblaciones han atribuido al consumo de los alimentos fermentados el carácter de ser remedios o medicamentos, al ser utilizados como paliativos contra enfermedades. Esto es particularmente cierto al observarse en las poblaciones africanas que tienen una ingesta limitada de niacina o ácidos nicotínicos debido a su dieta a base de maíz, estas personas no presentan síntomas de pelagra a causa del enriquecimiento nutricional de los alimentos fermentados por el metabolismo de los microorganismos presentes durante su producción. Otro ejemplo es en personas con una ingesta limitada de tiamina por tener una dieta en arroz se ha observado una ausencia de la enfermedad beriberi en estos individuos, debido al consumo de alimentos fermentados. Algunos microorganismos presentes durante la fermentación tienen propiedades probióticas, que por definición es todo microorganismo vivo que al ser administrado en cantidades adecuadas confiere un beneficio a la salud del hospedero (Boirivant & Strober 2007).

Existen aproximadamente 5000 variedades de alimentos y bebidas fermentadas a través del mundo, desde la cerveza hasta el sauerkraut, consumidas hoy en día por billones de personas. Varios de estos productos fermentados cuentan con certificados de denominación de origen. Los alimentos fermentados están clasificados en 9 grupos con base en sus sustratos: cereales, vegetales, legumbres, tubérculos/raíces, lácteos, cárnicos, pescado, bebidas alcohólicas (Tamang *et al.* 2016). En la tabla 1 se presenta algunas de las bebidas fermentadas y sus destilados más populares en el mundo (Marshall & Mejia 2012). Es importante señalar que en México el tequila y el mezcal se producen de la cocción y fermentación del tallo del agave (*A. tequilana* var. *azul*, *A. angustifolia*, *A. americana* var. *oaxacensis*, etc) conocido como “piña”, un proceso distinto a la elaboración del pulque.

Tabla 1.- Bebidas fermentadas y destilados en el mundo.

Materia prima	Nombre de la bebida fermentada	Nombre de la bebida destilada
Cebada	Cerveza	Whisky escocés
Centeno	Cerveza de Centeno	Whisky Centeno
Maíz	Cerveza	Whisky boubon
Trigo	Cerveza de trigo	Korn (Alemania)
Arroz	Sake sonti	Sochu (Japón) soja (Korea)
Jugo de frutas (diferente a manzana o peras)	Vino (en la mayoría de los casos de jugo de uva)	Brandy, cognac (Francia), Branntwein (Alemania), pisco (Peru/Chile)
Jugo de manzanas	Sidra, apfelwein (Alemania)	Brandy de manzana (Applejack)
Jugo de peras	Perry o sida de pera (Inglaterra)	Brandy de pera
Agave	Jugo de piña de agave cocido	Tequila, mezcal (México)
Miel	Hidromiel	Brandy
Papa	Cerveza (Canadá)	Vodka (Rusia)
Leche	Kumis (Asia Central)	Araka (Sureste Asiático)

Modificado de Marshall & Mejia (2012).

Los alimentos fermentados son una fuente potencial de microorganismos para la producción de diferentes compuestos; sin embargo, muy pocos han sido aislados y utilizados en la industria. A continuación se describen ejemplos de estos compuestos producidos por microorganismos (Cook 1994):

- Pigmentos: Algunas especies del género *Mucor* sp. se han reportado como productoras de carotenoides en el micelio, mientras que la síntesis de naftoquinona (pigmento rojo/violeta) se ha estudiado en bacterias del género *Brevibacterium*. Actualmente se utiliza en China el hongo *Monascus* para la producción de pigmentos violetas de uso alimenticio.
- Compuestos aromáticos: Nuevos compuestos de aromas y sabores son producidos durante la fermentación incluyendo entre estos a los ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, ésteres y pirazinas. Estos últimos compuestos, son característicos de alimentos tratados al calor y su formación es debida a la reacción de Maillard, pero también pueden ser sintetizados biológicamente por las especies de *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Pseudomonas*.
- Compuestos antimicrobianos: A los ácidos orgánicos, alcoholes, diacetilo, acetoína, bacteriocinas y ésteres producidos durante la fermentación se les atribuyen actividades antimicrobianas, al suprimir el crecimiento de bacterias patógenas. Del grupo de las bacteriocinas, la nisina es el péptido policíclico empleado como conservador en la industria alimenticia, inhibiendo el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum*. Esta proteína fue la primera bacteriocina en entrar al mercado del Reino Unido en 1953 y desde ese momento a la fecha se ha aceptado su uso en más de 48 países.
- Polímeros microbianos: La industria alimentaria es el campo de trabajo donde mayor introducción han tenido los EPS de origen microbiano. Entre los polímeros microbianos de mayor producción a nivel industrial se encuentran: la xantana (*Xanthomonas campestris*), el gelano (*Pseudomonas elodea*, *Sphingomonas paucimobilis*), el alginato (*Pseudomonas* y *Azotobacter*) y la dextrana (*Leuconostoc mesenteroides*).

A pesar de las ventajas nutricionales y tecnológicas que presentan los alimentos fermentados, estos siguen siendo asociados al prejuicio social de ser alimentos para la clase pobre de la población, asumiendo que la familia no puede tener acceso a alimentos procesados. En regiones del mundo donde la relación entre la cultura y los alimentos

fermentados es muy fuerte, este problema de prejuicio social es muy poco marcado, por ejemplo: el kimchi, un alimento fermentado a base de col, es consumido por toda la población de Corea e incluso es considerado parte de la herencia nacional del país (Marshall & Mejia 2012). Se ha propuesto que con el devenir de los años se observará la fusión del conocimiento tradicional con las nuevas tecnologías para el estudio y conocimiento de la fisiología, metabolismo y genómica de los microorganismos presentes en estos alimentos para lograr una fermentación controlada mediante el diseño de inóculos estandarizados, que logren mejorar los procesos de producción de estos alimentos (Soni & Dey 2014).

4.1.1 Aguamiel y pulque.

El pulque es probablemente la bebida alcohólica de mayor historia y tradición en México. Producto de la fermentación del aguamiel de diferentes especies de agave, en especial de las especies denominadas “magueyes pulqueros”: *Agave atrovirens* var. *salmiana*, *A. americana*, *A. mapisaga*, *A. salmiana* var. *angustifolia*, *A. salmiana* var. *ferox* y *A. salmiana* var. *salmiana*. Estas especies son endémicas de México y geográficamente se encuentran en la región central del país en zonas con un clima semiárido, suelos poco fértiles con una escasa precipitación pluvial (Escalante *et al.* 2016; Frias *et al.* 2016; Lappe-Oliveras *et al.* 2008; Ortiz-Basurto *et al.* 2008).

El origen de la producción y consumo de esta bebida en México pre-hispánico se le atribuye a la antigua civilización otomí, quienes poblaron la región central del territorio mexicano hace 2000 años a.C. Mediante el uso de técnicas analíticas se ha podido realizar un registro más exacto sobre la antigüedad del consumo de esta bebida, a partir de una metodología desarrollada en una investigación por Correa-Ascencio *et al.* (2014) en la cual, mediante el empleo de un biomarcador lipídico, detectaron la presencia de hopanoides derivados de la membrana citoplasmática de la bacteria *Zymomonas mobilis* en una muestra de estudio de 300 recipientes de barro procedentes de La Ventilla que datan de la época del esplendor de la cultura teotihuacana (200 - 550 a.C.). El consumo de esta bebida en el país se ha mantenido principalmente en las zonas rurales de los estados productores. Una de las razones de su prevalencia en la dieta mexicana es debida a ser considerada como una bebida-alimento-medicina. Estudios realizados por Backstrand *et al.* (2002) demuestran que después de la tortilla y las legumbres, el pulque es la tercera fuente de hierro (no-hemo), ácido ascórbico, riboflavina y vitaminas B, además de proveer cantidades importantes de ácido fólico. En relación con el aporte de

aminoácidos se ha reportado el contenido (g/16 g de N) de: Ile (4.04), Leu (8.65), Lys (1.76), Cys (1.59), Phe (6.45), Tyr (2.76), Thr (4.21), Trp (2.35), Val (5.12) y His (2.01) (Morales de León *et al.* 2005). Sin embargo, no se puede hacer una sugerencia de consumo de esta bebida como un suplemento alimenticio, al tener un contenido alcohólico de 4 – 6 % vol. y su ingesta debe realizarse con moderación.

La composición química del aguamiel se ve influenciada por el periodo de producción, la especie de agave, las condiciones de siembra de la planta, la precipitación pluvial, la humedad del aire y las propiedades de la tierra de cultivo. El aguamiel tiene 11.5 % (p/p) de masa seca compuesta principalmente de azúcares 75 % (glucosa, fructosa y sacarosa), 3 % de proteínas, 0.03 % de aminoácidos libres y 3 % de cenizas (Ortiz-Basurto *et al.* 2008). Durante su fermentación uno de los principales cambios en su composición es la disminución de la concentración de azúcares y el aumento de productos del metabolismo microbiano (Backstrand *et al.* 2001).

El proceso de producción del pulque inicia con la “castración” del agave en el momento previo a su floración (6 – 15 años de maduración), este proceso consiste en retirar las hojas centrales y realizar una cavidad en el tallo de la planta denominada “cajete”, esta actividad es realizada por una persona conocida como “tlachiquero” quien determina el momento preciso para realizar la castración. Una castración temprana puede tener como resultado un aguamiel de baja calidad y una producción de muy bajo volumen.

Después de que se dejó madurar el cajete (3 meses – 1 año), el aguamiel diariamente recolectado durante 3 a 6 meses, hasta que la planta muere, obteniendo un volumen de aproximadamente 1000 L/planta. El proceso de recolección se realiza haciendo un raspado de las paredes de la cavidad induciendo la extracción de la savia, la cual es recolectada utilizando una calabaza seca (*Lagenaria siceraria*) denominada “acocote”. El aguamiel es transportado en contenedores de plástico, madera u otro material hacia el cuarto de fermentación (tinacal) y es depositado en los fermentadores, comúnmente estos son recipientes de piel-vacuno, fibra de vidrio, plástico o madera. La fermentación se realiza adicionando al aguamiel un volumen de pulque de la producción anterior. El tiempo de fermentación (6 - 8 h) puede variar dependiendo de la calidad del inóculo, temperatura del ambiente, la concentración de azúcares en el aguamiel (en temporadas de lluvias, la concentración es baja), la región productora, etc (Escalante *et al.* 2016).

La norma mexicana NMX-V-037 define dos tipos de pulque: el primero es el denominado de *semilla y puntas*, correspondiente a la bebida que se obtiene de las primeras fermentaciones y en cuya preparación se utiliza el aguamiel del Tipo 1, y el pulque de Tipo 2 es el producto que se elabora con diferentes tipos de aguamieles. En la tabla 2 se muestran las especificaciones que define la norma mexicana para el aguamiel y pulque.

Tabla 2.- Especificaciones fisicoquímicas de aguamiel y pulque.

Especificaciones	Aguamiel			Pulque			
	Tipo I		Tipo II	Tipo 1		Tipo II	
	Min.	Max.	Menor de:	Min.	Max.	Min.	Max.
pH	6.6	7.5	4.5	>3.7	4.2	3.5	4.0
Índice de refracción con refractómetro de inmersión a 20 °C	59	100	27	1,3390	1,3406	1,3365	1,3380
Acidez total (ácido láctico) mg/100 mL	0.9	1.03	4.00	400	750	400	700
Sólidos totales (g/100 mL)	13	17	7	-	-	-	-
Azúcares reductores totales (g/100 mL)	8	12	6	0.10	0.80	0.20	0.50
Densidad (Grados Baumé)	5	7	4.5	32	34	25	-
Grado alcohol (% alcohol por volumen)	-	-	-	6.0	9.0	4.0	6.0

NMX-V-037 (Secretaría de Economía 1972a, 1972b).

Los microorganismos presentes en el aguamiel y el pulque son los que se encuentran naturalmente en el ambiente de la planta, en los utensilios de recolección-transporte del aguamiel y los que intencionalmente son adicionados en el momento de la inoculación con pulque de la fermentación anterior. En el aguamiel previo a inoculación existe una predominancia de bacterias ($8 - 15 \times 10^8$ UFC/mL) sobre las levaduras ($3 - 6 \times 10^6$ UFC/mL), y mientras se lleva a cabo la fermentación la cantidad de levaduras incrementa gradualmente hasta alcanzar una mayor concentración ($2.5 - 3 \times 10^8$ UFC/mL) sobre las bacterias ($1.0 - 2.0 \times 10^8$ UFC/mL) (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

En estudios realizados por Escalante *et al.* (2004, 2008) utilizando metodologías no dependientes de cultivo se han podido identificar con mayor detalle la diversidad de microorganismos presentes en cada etapa del proceso de producción, desde el aguamiel hasta el producto final. En la tabla 3 se presenta un resumen de los microorganismos presentes en esta bebida fermentada.

Tabla 3. Diversidad microbiana durante la producción del pulque.

Tiempo de fermentación	Microorganismo		Técnica de identificación	Referencia
	Bacteria	Levadura		
Aguamiel	<i>Serratia grimensis</i> , <i>St. devriesei</i> , <i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Citrobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Kluyvera cochleae</i> , <i>Lactococcus</i> sp., <i>L. citreum</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mesenteroides</i> .	<i>Candida lusitaneae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>capensis</i>)	-Aislamiento con método de cultivo y caracterización morfológica -Librería genómica del gen ADNr 16S	(Cruz-Guerrero <i>et al.</i> 2005; Escalante <i>et al.</i> 2008; Estrada-Godina <i>et al.</i> 2001; Lappe-Oliveras <i>et al.</i> 2008)
Inoculación	<i>Acetobacterium malorum</i> , <i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Kluyvera ascorbate</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. hilgardii</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. citreum</i> , <i>L. gasicomitatum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Serratia grimensis</i> , <i>Sterotrophomonas</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-Librería genómica del gen ADNr 16S	(Escalante <i>et al.</i> 2008)
Fermentación 3 h	<i>Acetobacterium malorum</i> , <i>Acinetobacter radioresistens</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Kluyvera ascorbata</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Pediococcus urinaeequi</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>		-Librería genómica del gen ADNr 16S	(Escalante <i>et al.</i> 2008)

Tabla 3 (continuación).- Diversidad microbiana durante la producción del pulque

Tiempo de fermentación	Microorganismo		Técnica de identificación	Referencia
	Bacteria	Levadura		
Fermentación 6h	<i>Acetobacterium malorum</i> , <i>Acetobacter orientales</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. acidophilus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Providencia</i> sp.		-Librería genómica del gen ADNr 16S	(Escalante <i>et al.</i> 2008)
Pulque	<i>Kokuria rosea</i> , <i>Lb. acidophilus</i> sp., <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbruecki</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. vermiforme</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Microbacterium arborescens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Sarcina</i> sp., <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	<i>Candida valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>chevalieri</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>capensis</i>), <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> , <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. valida</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces carsonii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>Pichia guillermondii</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>	-Aislamiento con método de cultivo y caracterización morfológica -Librería genómica del gen ADNr 16S	(Cruz-Guerrero <i>et al.</i> 2005; Escalante <i>et al.</i> 2008; Estrada-Godina <i>et al.</i> 2001; Lappe-Oliveras <i>et al.</i> 2008)

Trabajos de identificación y secuenciación del gen ADNr 16S de los microorganismos presentes en el pulque han demostrado que el 80.97 % de la diversidad microbiana en esta bebida está dominada por especies de *Lactobacillus*. Principalmente al término de la fermentación están presentes las BAL: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*,

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (Escalante *et al.* 2004, 2008). La capacidad de síntesis de EPS por las BAL y la basta cantidad de estos microorganismos en el pulque, han orientado a diferentes grupos de investigación al aislamiento de cepas capaces de sintetizar estos polímeros. En trabajos por Chellapandian *et al.* (1998) se reporta el aislamiento de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ a partir de una muestra de pulque de la zona de Apan (Hidalgo), este microorganismo produce un HoPS de tipo dextrana. En otro estudio más reciente se reportó la producción de HoPS de tipo dextrana y levana producidos por las cepas *L. kimchii* EPSA y EPSB presentes en una muestra de pulque de la región de Huitzilac, Morelos (Torres-Rodríguez *et al.* 2014).

4.2 Bacterias ácido lácticas.

A principios del siglo XX, el término de “bacterias ácido lácticas” se usaba para referirse a todo aquel organismo responsable de acidificar la leche. Trabajos por Orla-Jensen en 1919 fundaron las bases para la clasificación de este grupo de bacterias. El criterio utilizado dependía de la morfología celular, la fermentación de la glucosa, las temperaturas de crecimiento y el patrón de consumo de azúcares, reconociendo en un principio únicamente 4 géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Orla-Jensen, 1919). Las BAL constituyen un grupo amplio de bacterias Gram-positivas que comparten las siguientes características morfológicas, metabólicas y fisiológicas: son no esporulantes, morfología de cocos o bacilos, anaerobias facultativas, aerotolerantes, catalasa negativas, carecen de citocromos y el producto principal de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico (D o L) (Carr *et al.* 2002; Von Wright & Axelsson 2011).

Con las nuevas tecnologías que permiten secuenciar genomas completos y la gran disponibilidad de bases de datos se ha podido ir realizando una clasificación más exacta de este grupo de microorganismos. Las BAL pertenecen al filio *Firmicutes*, clase *Bacilli* y al orden *Lactobacillales* e incluyen a las siguientes familias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. (Von Wright & Axelsson 2011). Estudios de genómica comparativa proponen que el ancestro en común de las *Lactobacillales* tenía aproximadamente entre 2100 - 2200 genes y se cree que durante su divergencia evolutiva habrá perdido entre 600 - 1200 genes (25 – 30 %) y ganado <100 genes (Makarova *et al.* 2006; Makarova & Koonin 2007).

Como consecuencia de esa pérdida de genes se ha observado la sustitución del uso de un metabolismo eficiente como el aeróbico por uno fermentativo. Un ejemplo de esa reducción cromosomal se observa en las BAL de los géneros de *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Weissella* que presentan una cadena de transporte de electrones trunca, producto de la pérdida de genes responsables de la síntesis de menaquinonas y grupos hemo (Pedersen *et al.* 2012). El empleo de un metabolismo fermentativo presenta una desventaja en el rendimiento energético en comparación con la respiración (2 moles contra 32 de ATP por mol de glucosa); en cambio se obtiene una ventaja en la ganancia de una mayor tasa de producción de ATP. Esto podría implicar que una población bacteriana que utilice una vía metabólica de bajo rendimiento pero alta tasa de producción de ATP, podría colonizar mejor un lugar y lograría reemplazar aquellas poblaciones que utilizan una vía de baja tasa de producción de ATP (Pfeiffer *et al.*, 2001).

Con base en la vía metabólica que se utilice para la degradación de las hexosas, las BAL han sido clasificadas en dos categorías: en la primera están los microorganismos denominados homofermentativos, los cuales catabolizan una mol de glucosa bajo limitación de oxígeno en dos moles de ácido láctico mediante la ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas. Los miembros de este grupo son: *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *L. acidophilus*, *L. delbruecki*, *L. helveticus*, *L. salivarius*; en el segundo grupo, denominado heterofermentativo, se encuentran las bacterias del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y los lactobacilos *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. reuteri*, los cuales metabolizan una mol de glucosa en una mol de ácido láctico, etanol y CO₂ mediante las rutas de la pentosas fosfato o la ruta pentosas-fosfocetolasa (Patel *et al.*, 2012).

Una de las características más importantes que presenta este grupo de microorganismos es el número amplio de transportadores de membrana, ocupando aproximadamente el 13 - 18% del genoma (un número más grande en comparación a los encontrados en otras bacterias). Esta cantidad de transportadores les aporta una gran capacidad de adaptarse a diferentes ambientes ricos en nutrientes; por tal razón, han sido asiladas a partir de diferentes nichos ecológicos, desde alimentos fermentados hasta el conducto gastrointestinal de mamíferos (Makarova & Koonin 2007; Schroeter & Klaenhammer 2009). En la Tabla 4 se presentan los alimentos fermentados en donde están presentes diferentes especies de BAL.

Tabla 4.- Alimentos fermentados y BAL.

Producto	Microorganismos	Sustratos
Vino, Cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	Uvas, cereales
Pan	<i>S. cerevisiae</i> , BAL	Trigo, arroz, cereales
Queso Cheddar	<i>Lactococcus cremoris</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i>	Leche
Quesos estilo suizo	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i>	Leche
Yogurts	<i>S. thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>	Leche
Kéfir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lactococcus</i> , levaduras	Leche
Carnes fermentadas	<i>Pediococci</i> , <i>Stephylococci</i> , LAB	Cerdo, Res
Salsa de soja	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , lactobacilli y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	soja
Sauerkraut	<i>L. lactis</i> , <i>Leu. Mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus (brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>	Col (Repollo)
Vegetales fermentado	<i>Enterococcus (mundtii, faecium)</i> , <i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> <i>Lactobacillus (plantarum, casei)</i>	Vegetales
Pescado fermentado	<i>Carnobacterium (psicicola, divergens)</i>	Pescado

(Fleet 1999)

4.3 Polisacáridos extracelulares.

Los polisacáridos producidos por los microorganismos están clasificados de acuerdo a su función biológica en: polisacáridos intracelulares que sirven de almacenamiento de carbono para la célula (glucógeno), polisacáridos de cápsula que se encuentran unidos a la superficie celular (antígeno-O) y los polisacáridos extracelulares (xantana, alginato, celulosa, dextranas) que forman parte fundamental en la estructura de la matriz de biopelículas. Estos últimos son secretados al medio, lo que ha facilitado su obtención a escala industrial. Actualmente se han descrito cuatro mecanismos de síntesis de estos EPS en bacterias: los dependientes del mecanismo Wzx/Wzy, los de transportador de tipo ABC, los que utilizan sintasas y los de síntesis extracelular mediante una única glicosiltransferasa (Schmid *et al.*2015).

En las BAL se han descrito dos modelos de síntesis de EPS, el primero es mediante la síntesis de enzimas glicosiltransferasas extracelulares que utilizan como sustrato di- o trisacáridos (sacarosa, rafinosa) para la producción de HoPS y el segundo modelo propuesto es a partir de un mecanismo dependiente de Wzx/Wzy utilizando un acarreador lipídico de membrana y monosacáridos activados para la síntesis de HePS en el citoplasma. En la figura 1 se ejemplifican estos dos modelos propuestos (Ryan *et al.* 2015).

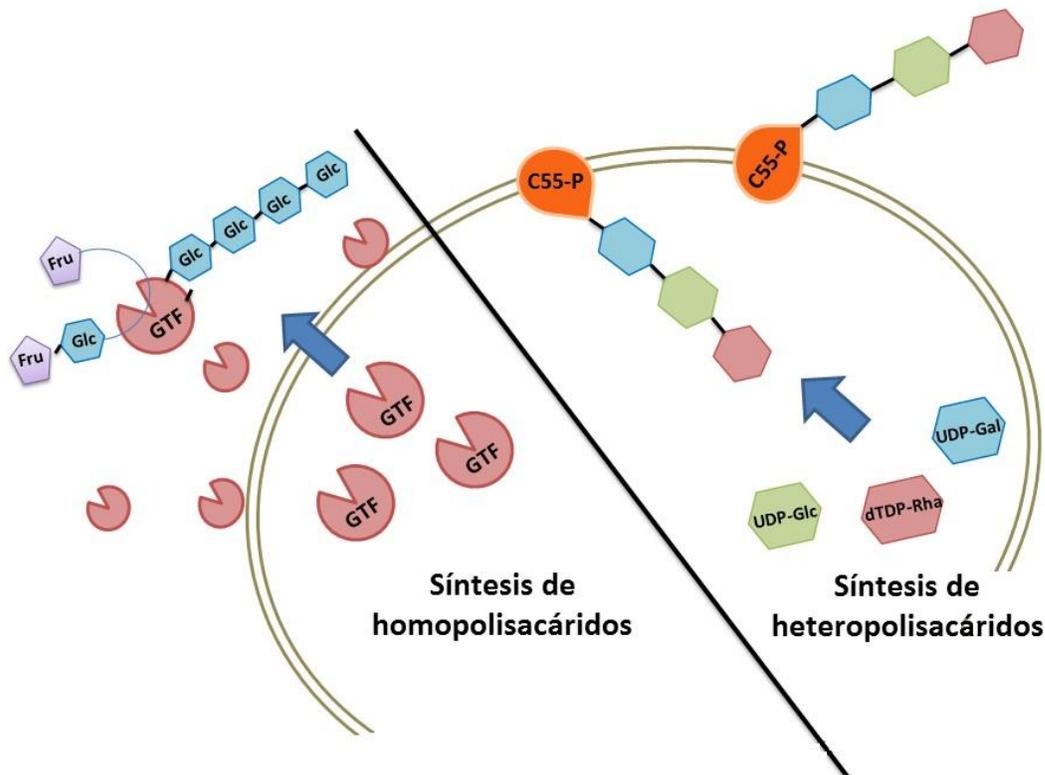


Figura 1.- Esquema de la vía de síntesis de HoPS y HePS en las BAL. Glc glucosa, C55-P acarreador lipídico de membrana, Gal galactosa, Rha ramnosa, Fru fructosa, GTF glicosiltransferasa. Modelo propuesto por Ryan *et al.* (2015).

A los EPS bacterianos se les atribuyen diferentes funciones fisiológicas, siendo estos agentes protectores contra factores ambientales de estrés celular (bacteriofagos, calor, acidez, estrés osmótico), como estabilizadores estructurales en la formación de biopelículas y como moléculas señalizadoras (Ruas-Madiedo *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2007; Welman & Maddox 2003).

4.3.1 Homopolisacáridos: Glucanos y Fructanos.

Los HoPS son polímeros conformados por unidades repetidas de un solo tipo de monosacáridos. En las BAL estos polímeros pueden estar compuestos por unidades de D-glucosa (glucanos) o D-fructosa (fructanos). La síntesis de estos EPS es un proceso relativamente sencillo al no requerir de intermediarios de alguna vía metabólica y no ser un gran gasto de energía a la célula, únicamente la energía empleada para la síntesis de las enzimas glicosiltransferasas. Estas enzimas son las encargadas de polimerizar el HoPS en el medio extracelular utilizando como sustrato la sacarosa. El peso molecular de los glucanos está en un rango de 4×10^4 y 6×10^6 Da (Ryan *et al.* 2015).

En las últimas décadas, diferentes investigaciones se han enfocado en la caracterización estructural de estos HoPS y en el aislamiento de bacterias que los sintetizan, aumentando el interés industrial de estos polímeros por sus propiedades fisicoquímicas y su potencial nutricional en aplicaciones para la salud (Galle & Arendt 2014; Lynch *et al.* 2014; Tingirikari *et al.* 2014). Las BAL de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* y *Lactobacillus* producen HoPS mediante la acción de las enzimas glucansacarasas y fructansacarasas. En la figura 2 se muestra el ejemplo de la estructura química de dos HoPS, uno de glucosa (dextrana) y otro de fructosa (inulina).

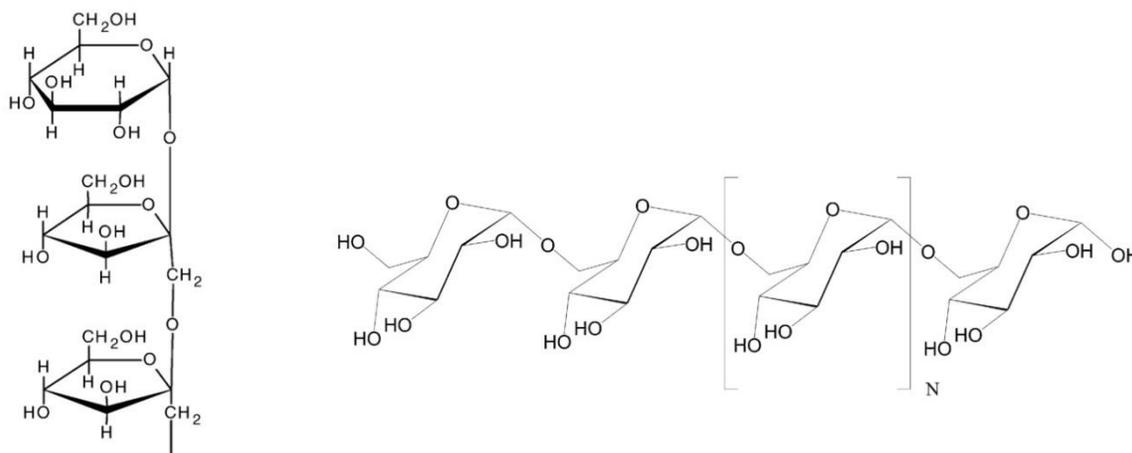


Figura 2: Estructura química de la inulina (izquierda) y dextrana (derecha) (Monsan *et al.*, 2001; Korakli & Vogel 2006).

El polímero denominado dextrana es un HoPS de tipo glucano, su estructura está compuesta principalmente por enlaces glucosídicos α -(1→6) D-glucosa con ramificaciones α -(1→3), α -(1→2) y α -(1→4); en la mayoría de los casos el tamaño de la ramificación es corta y representa el 5 – 33 % de la estructura. La solubilidad de estos polímeros depende del patrón de la ramificación y la configuración de los enlaces glucosídicos entre los monómeros. Un polímero con 95 % de enlaces α -(1→6) es muy soluble en agua, esta característica le permite tener varias aplicaciones en la industria. La dextrana de mayor comercialización presenta en su estructura 95 % de enlaces α -(1→6) con 5 % α -(1→3) y es sintetizada por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Los polímeros de tipo dextrana han tenido relevancia en el área de la medicina como recuperadores de volumen sanguíneo, en la industria química para la elaboración de la matriz de las columnas para cromatografía de exclusión (Sephadex) y en la industria alimenticia como espesantes (Morris & Harding 2009; Patel *et al.* 2012; Purama *et al.* 2009; Vettori *et al.* 2012)., Recientemente se ha empleado en la biorremediación de mantos acuíferos, mediante el diseño de copolímeros de dextrana y polilactatos que tienen propiedades emulsificantes (Raynaud *et al.*, 2008).

Los polímeros de tipo fructano que presentan enlaces glucosídicos β -(2→1) D-fructosa se denominan inulina, estos han tomado un gran interés nutricional como prebióticos al no ser metabolizados por el hombre y solamente por bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el intestino. Un prebiótico está definido como: todo ingrediente alimenticio no digestible por el cuerpo humano que brinda efectos benéficos al hospedero mediante la estimulación selectiva del crecimiento de un limitado número de bacterias en el colon, lo cual produce una mejora en la salud del hospedero (Rastall, 2010).

4.3.2 Heteropolisacáridos.

Los HePS son polímeros conformados por subunidades repetidas de tres a ocho monosacáridos diferentes que pueden estar presentes en su forma α - o β -anomérica. En BAL la síntesis de HePS se realiza en el citoplasma y al estar ya polimerizados se externalizan al medio. Su síntesis se ha reportado en BAL mesófilas (*Lactococcus lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *L. sake*, *L. brevis*) y termófilas (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*) (Ryan *et al.* 2015). De los HePS caracterizados a la fecha, se ha observado que en su estructura están presentes con mayor frecuencia los monosacáridos de glucosa, galactosa, fructosa y ramnosa; sin embargo, es posible que estos monosacáridos presenten diferentes modificaciones como:

fosforilaciones y acetilaciones (De Vuyst *et al.* 2001). El peso molecular de estos EPS esta reportado entre 10^4 y 10^7 Da, con una producción de 50 - 200 mg/L (Korakli & Vogel 2006).

Un modelo de la vía de síntesis de los HePS está ilustrado en la figura 3. Esta ruta biosintética se basa en cuatro pasos:

1. El transporte de los azúcares al citoplasma.
2. La síntesis de los monosacáridos activados.
3. La polimerización de las subunidades.
4. La exportación de los EPS al medio extracelular.

El transporte de glucosa es mediante el sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PEP-PTS) obteniendo una molécula glucosa-6-fosfato, después por la acción de la fosfoglucomutasa se obtiene glucosa-1-fosfato, la cual es activada a UDP-glucosa por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa. A partir de la glucosa-1-fosfato también puede generarse UDP-galactosa mediante la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa. Esta enzima forma parte de la ruta metabólica de *Leloir* involucrada en el catabolismo de galactosa (De Vuyst *et al.* 2001). La acción de diferentes enzimas glicosiltransferasas en el citoplasma llevan a cabo la síntesis de la unidad base del HePS empleando como sustrato los monosacáridos activados UDP-glucosa, UDP-galactosa, GDP-fructosa, dTDP-ramnosa, los cuales son polimerizados sobre un acarreador lipídico de membrana que después, por la acción de una flipasa, es externalizado al medio (Ryan *et al.* 2015). La síntesis de los HePS comparte varios pasos con el proceso de formación de los polímeros de la pared celular, peptidoglicano y lipopolisacáridos de la célula, por tal razón cada uno de estos pasos es crucial y pueden ser manipulados para modificar la cantidad de EPS sintetizado y su composición monomérica (Patel *et al.* 2012;Kumar *et al.* 2007).

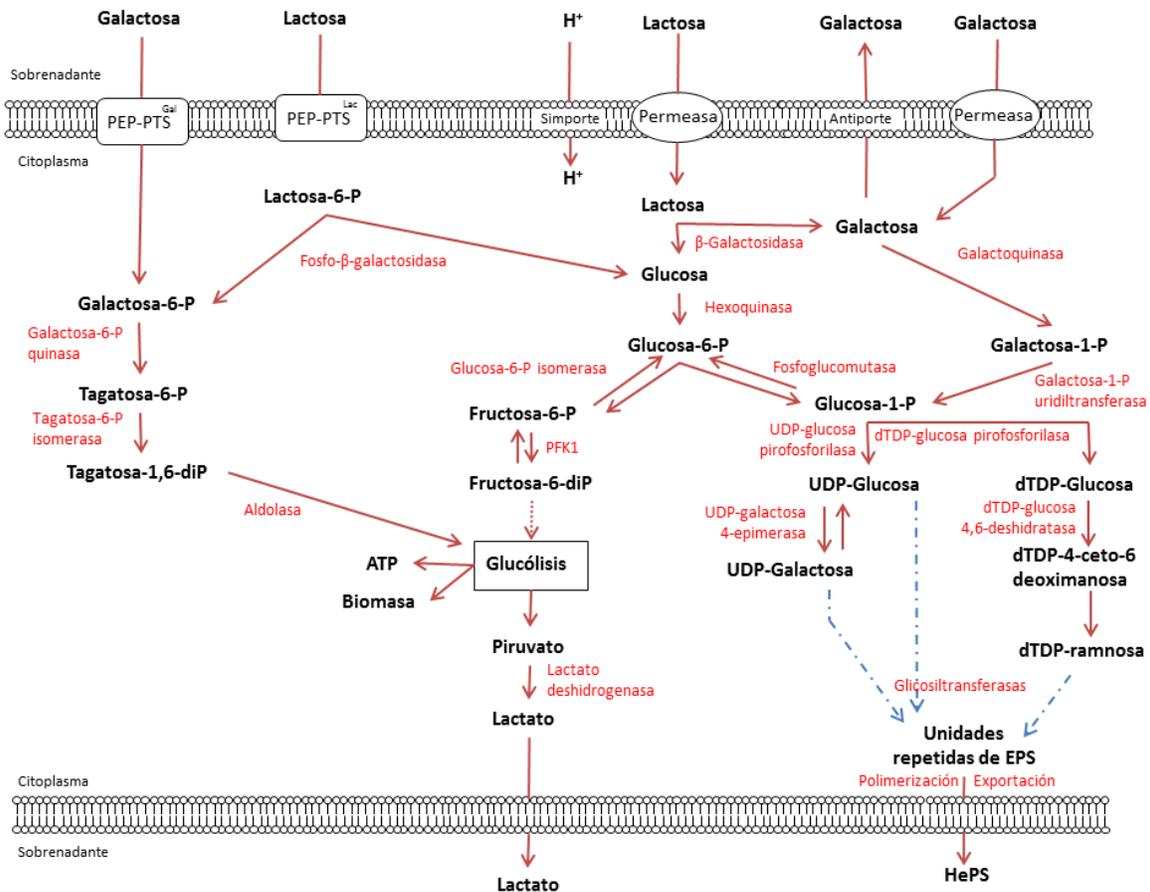


Figura 3.- Diagrama de síntesis de los HePS en la bacteria *Lactococcus lactis*. Modelo propuesto por De Vuyst *et al.* (2001).

Diferentes investigaciones se han centrado en dilucidar la función fisiológica de la síntesis de estos HePS, al ser su producción un gran gasto de energía para la célula. La hipótesis planteada por Badel (2011) es que la célula utiliza a los HePS como reserva energética. En estudios de crecimiento celular de la bacteria *Lactococcus lactis* se observa un crecimiento diaúxico empleando como único sustrato la glucosa, reportando que al terminó de la principal fuente de carbono la célula empieza a consumir al polímero sintetizado. En otras investigaciones se ha demostrado que en condiciones de crecimiento celular donde se obtienen mayores concentraciones de ATP la eficiencia de producción de los HePS es mayor, siendo estos polímeros productos asociados al crecimiento celular (De Vuyst *et al.* 2001).

Los genes responsables de la biosíntesis y exportación de los HePS en las BAL están organizados en operones con tamaños de 12 – 17 kb (Kumar *et al.* 2007). Además de los genes específicos *eps/cps*, la síntesis de estos polímeros requiere de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono como la hexoquinasa y la fosfoglucomutasa para la síntesis de los monosacáridos activados que conforman las subunidades de los HePS (De Vuyst *et al.* 2001). El aumento del conocimiento en relación con la estructura de los HePS, las enzimas que polimerizan las subunidades repetidas, la organización molecular de los genes *eps* y los factores que regulan la expresión de estos genes hará posible el mejoramiento de la producción de los HePS en condiciones de fermentación definidas.

4.3.3 Importancia industrial de los EPS bacterianos.

En las últimas décadas se ha reportado una gran cantidad de biopolímeros sintetizados por diferentes microorganismos. Entre los EPS bacterianos producidos a escala industrial se encuentran los siguientes: la xantana (*Xanthomonas campestris*), el gelano (*Pseudomonas elodea*, *Sphingomonas paucimobilis*) y el alginato (*Pseudomonas* y *Azotobacter*). Con una capitalización en el mercado de 235 - 270 millones de dólares y una producción anual de 90 – 100,000 toneladas, la goma xantana es el EPS de mayor importancia. Comparado con una producción de 260 millones de toneladas de los polímeros derivados del petróleo el mercado de los biopolímeros es muy pequeño; sin embargo, este presenta un crecimiento anual del 25 – 30 % y una cuota del mercado del 5%, estimando que en el año 2020 la capacidad de producción sea de 3 millones de toneladas. La baja cuota del mercado en los biopolímeros es debido a los altos costos de producción y los requerimientos técnicos de producción microbiana en comparación con la síntesis química de estos productos o la extracción a partir de plantas. Por ejemplo, la producción microbiana del polihidroxiburitato es 5 a 10 veces mayor en costos en comparación con la síntesis química de un polímero análogo derivado del petróleo. (Kreyenschulte *et al.*, 2014). Una mejor comprensión de las vías de síntesis y regulación de estos EPS es fundamental para realizar ingeniería de proteínas, metabólica y genética con enfoques en el aumento del rendimiento que logre disminuir los costos de producción (Schmid *et al.* 2015; Vasanthakumari *et al.* 2015; Xu & Zhang 2016)

Las BAL tienen la capacidad de síntesis de EPS que presentan una composición variable y por consecuencia presentan propiedades físicas que vuelven atractivos a estos polímeros para su aplicación industrial, especialmente en el área de alimentos. La

aplicación de estos polímeros tiene un efecto en la modificación de la viscosidad, la textura y la sensación al paladar (mouthfeel) de los alimentos debido a la capacidad de interactuar con proteínas y a la formación de uniones con moléculas de agua (Caggianiello *et al.* 2016; Zannini *et al.* 2016). Una de las aplicaciones más atractivas de los EPS es en la elaboración de productos de panadería libres de gluten, estos alimentos han tenido un aumento en su demanda entre los consumidores de los países industrializados. Esta aplicación ha sido desarrollada utilizando un inóculo con las cepas *W. cibaria* y *L. reuteri* en la fermentación de masas de sorgo, observando un mejoramiento de la reología de la masa debido a la síntesis de oligosacáridos por estas bacterias (Galle *et al.* 2012). Otra de sus aplicaciones es en la producción de yogurt bajo en grasa empleando la cepa productora de EPS *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, observando un mejoramiento en la viscosidad del yogurt y una disminución en la sinéresis del producto después de 28 días de almacenamiento (London *et al.* 2015).

Además de su aplicación en la elaboración de alimentos, las dextranas de BAL han tenido una introducción en el campo de la medicina, al ser utilizadas en pruebas clínicas para tratar la hipovolemia, en especial aquellas dextranas de un peso molecular de 40 – 100 kDa. Actualmente se ha reportado que estos polímeros son útiles en la síntesis de nanopartículas que puedan reemplazar a los liposomas, al tener mayor estabilidad y una versatilidad de aplicaciones (Moscovici 2015). Por otra parte, los oligosacáridos de tipo ciclodextranas han sido empleados en el tratamiento de caries y úlceras gástricas. En la industria química las dextranas han sido utilizadas comúnmente en la elaboración de la matriz de columnas de cromatografía de exclusión, como las Sephadex (Patel *et al.*, 2012). En la última década se ha estudiado la propiedad prebiótica que pueden tener los oligosacáridos derivados de las dextranas, estimulando el crecimiento celular de Bifidobacterias y Lactobacilli en el colon del hospedero (Bajpai *et al.* 2015)

4.4 Glucansacarosas.

Las enzimas que catalizan la síntesis de carbohidratos representan aproximadamente el 1 – 3 % de las proteínas codificadas en el genoma de la mayoría de los organismos (Davies *et al.*,2005). De este tipo de enzimas, las proteínas glucósido hidrolasas posiblemente son las más estudiadas. Dentro de la clasificación realizada por CAZy (base de datos de enzimas activas de carbohidratos) se enlista aproximadamente 100 familias correspondiente a las enzimas glucósido hidrolasas, de las cuales existen estructuras cristalográficas de 60 de estas familias (Davies *et al.*,2005). La síntesis de HoPS por las

BAL es mediante las enzimas glucósido hidrolasas: glucansacarasa y fructansacarasa. La primera sintetiza un polímero de tipo α -glucano conformado por monómeros de glucosa, mientras que las fructansacaratas sintetizan un polisacárido extracelular de tipo β -fructano (Korakli & Vogel 2006; Van Hijum *et al.* 2006).

El mecanismo de reacción de las glucansacaratas para la síntesis de los HoPS inicia con la hidrólisis del enlace glucosídico de la sacarosa liberando una fracción glucosídica al medio, seguido de la transferencia de un monómero a un aceptor. El aceptor de la reacción puede ser: el polímero en elongación, una molécula de agua u otro monosacárido. La energía de la hidrólisis del enlace acetal-cetal de la sacarosa (16.7 - 20.9 kJ/mol) es la utilizada por la enzima para realizar la reacción sin el gasto de una molécula de ATP o algún cofactor (Naessens *et al.*, 2005; Van Hijum *et al.*, 2006).

Las glucansacaratas son enzimas que están clasificadas dentro de la familia glucósido hidrolasa 70 (GH70) y presentan un tamaño molecular promedio de 160 kDa. Dentro de la familia GH 70 se encuentran las siguientes clases de enzimas que sintetizan polímeros con distinta configuración del enlace glucosídico (Monsan *et al.*, 2001):

- Dextransacarasa (E.C.2.4.1.5): Estas enzimas producen un polímero que contiene enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 6) en su cadena base y pueden presentar ramificaciones con enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4). Las dextransacaratas tiene una secuencia de aproximadamente 1527 aminoácidos con un peso de 170 kDa.
- Mutansacarasa (E.C.2.4.1.5): Son proteínas que sintetiza un polímero de tipo glucano denominado mutana. Este polímero posee en su estructura monosacáridos de glucosa unidos en α -(1 \rightarrow 3) y ramificaciones α -(1 \rightarrow 6).
- Alternansacarasa (E.C.2.4.1.140): Son enzimas que sintetizan un polímero de tipo alternana, el cual contiene en su cadena base enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 3).
- Reuteransacarasa (E.C.2.4.1.5): Estas enzima sintetiza un polímero de glucosa que posee en su cadena base 70 % de enlaces α -(1 \rightarrow 4) y en un 16 % α -(1 \rightarrow 6).

Las fructansacaratas son enzimas que están clasificadas en la familia GH 68 de las enzimas glucósido hidrolasas. Estas enzimas, a diferencia de las glucansacaratas, tienen capacidad de utilizar como sustrato a los siguientes carbohidratos: sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Galle & Arendt 2014; Torino *et al.* 2015). Las dos clases de

enzimas que han sido caracterizadas y que pertenecen a esta familia son (Van Hijum *et al.*, 2006):

- Inulinsacarasa (E.C.2.4.1.9): Son enzimas que sintetizan un polímero denominado inulina. Este EPS posee monómeros de fructosa unidos con enlaces glucosídicos β -(2→1).
- Levansacarasa (E.C.2.4.1.10): Es una enzima que está presente en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Sintetiza un polímero denominado levana que posee enlace glucosídicos β -(2→6) entre monómeros de fructosa.

Los genes que codifican para estas enzimas son de origen plasmídico en microorganismos mesófilos como *Lactococcus*, mientras que en bacterias termófilas del género *Streptococcus* y *Lactobacillus* son de origen cromosomal (Patel *et al.*, 2012). En la figura 4 se presenta la estructura cristalográfica de una dextransacarasa de *S. mutans* y una inulinsacarasa de *L. johnsonii* NCC533.

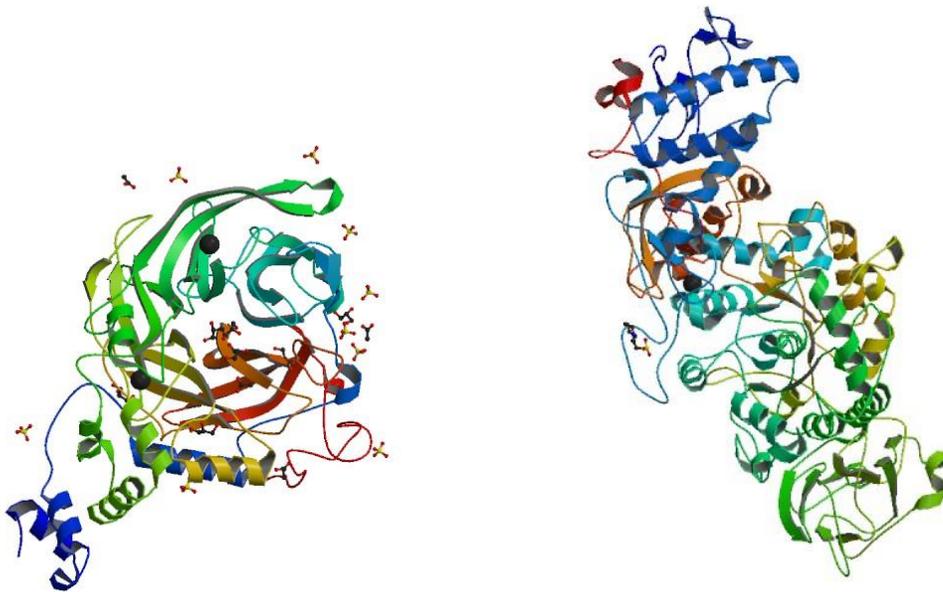


Figura 4.- Estructura cristalográfica de las enzimas: inulinsacarasa (izquierda) y glucansacarasa (derecha) (Ito *et al.* 2011; Pijning *et al.* 2011).

4.4.1 Metodologías para la selección de BAL-EPS.

El gran interés de la industria por la aplicación de los EPS sintetizados por BAL ha conducido a la búsqueda de bacterias con la capacidad de sintetizar grandes cantidades de EPS. Los alimentos fermentados como: los productos lácteos, masas fermentadas, cidra, vino y pulque han sido nichos naturales donde varios grupos de trabajo han realizado esfuerzos en la caracterización microbiológica de BAL-EPS (Patel *et al.* 2012). En la tabla 5 se describen las diferentes metodologías para la selección de bacterias que producen estos polímeros. Estas metodologías se basan en las propiedades que presentan estos EPS en medio líquido al aumentar la viscosidad del fluido conforme aumenta la concentración de estos polímeros en el sobrenadante o en medio sólido al observar fenotipos de colonias viscosas.

Tabla 5.- Metodologías para la identificación de BAL-EPS.

Metodología	Descripción	Limitación	Referencia
Análisis reológico	El aumento de la concentración de polímeros en el medio de cultivo produce cambios en el comportamiento reológico del líquido. Esta metodología se basa en el estudio del aumento de la viscosidad durante la fermentación.	El aumento de la viscosidad podría deberse a la concentración de biomasa	(Sanni <i>et al.</i> 2002; Vanderberg 1995)
Precipitación del polímero	La purificación parcial de los exopolisacáridos mediante la precipitación con etanol o acetona y su cuantificación gravimétrica	La precipitación contigua de polisacáridos contaminantes del medio	(Van Geel-Schutten <i>et al.</i> 1998; Vaningelgem <i>et al.</i> 2004; Welman and Maddox 2003)
Detección molecular de los genes	La amplificación de la región homóloga del gen que codifica para las glicosiltransferasas.	La amplificación de falsos positivos por el uso de primers degenerados	(Krajl <i>et al.</i> 2003; Tieking <i>et al.</i> 2003)
Ultracentrifugación y cromatografía de exclusión	La concentración del polímero mediante la ultracentrifugación del sobrenadante del medio de cultivo y el análisis del tamaño molecular del polímero.	La presencia de polisacáridos contaminantes del medio y la selección de un tamaño de poro de membrana adecuado.	(Van der Meulen <i>et al.</i> 2007)
Análisis visual de fenotipos viscosos.	La selección de bacterias productoras de exopolisacáridos se realiza en un medio de cultivo enriquecido con sacarosa. Se selecciona visualmente las colonias que muestren un fenotipo viscoso en medio sólido.	El sesgo a la comunidad bacteriana no cultivable.	(Malang <i>et al.</i> 2015; Ruas-Madiedo <i>et al.</i> 2005; Bivolarski <i>et al.</i> 2014; Bounaix <i>et al.</i> 2009; Torres-Rodríguez <i>et al.</i> 2014)

5. Justificación

En estudios anteriores sobre la diversidad microbiana en muestras de pulque de los estados de Morelos, Estado de México e Hidalgo se reportan especies comunes de BAL. Teniendo participación únicamente de dos especies de BAL (*L. mesenteroides* y *L. kimchii*) en la producción de EPS en esta bebida. La evaluación de la diversidad de BAL productoras de EPS en una muestra de aguamiel (previo a la fermentación) y en el pulque (producto final de la fermentación) de una región diferente permitirá contribuir al conocimiento de la diversidad microbiana de BAL-EPS en este alimento fermentado; además de poder realizar el aislamiento de bacterias con capacidad de síntesis de EPS con una estructura diferente a la ya reportada.

6. Objetivos e hipótesis.

6.1 Hipótesis.

El análisis de la diversidad de BAL-EPS presentes en el aguamiel y pulque permitirá el aislamiento de nuevos EPS.

6.2 Objetivo general.

Identificación de la diversidad de bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos extracelulares y la caracterización estructural de los polímeros producidos a partir de estos microorganismos, en una muestra de aguamiel y pulque de la región de Apan, Estado de Hidalgo.

6.3 Objetivos particulares.

1. Aislamiento, purificación e identificación de las BAL-EPS mediante la comparación de las secuencias del gen ADNr 16S para determinar la diversidad presente en una muestra de aguamiel y pulque procedente de la región de Apan, Estado de Hidalgo.
2. Caracterización del crecimiento celular de las cepas productoras y la actividad enzimática de las glicosiltransferasas responsables de la síntesis de los EPS durante el crecimiento.
3. Caracterización de la composición y estructura química de los EPS por cromatografía de capa fina y resonancia magnética nuclear.

7. Materiales y Métodos

Diagrama Metodológico.

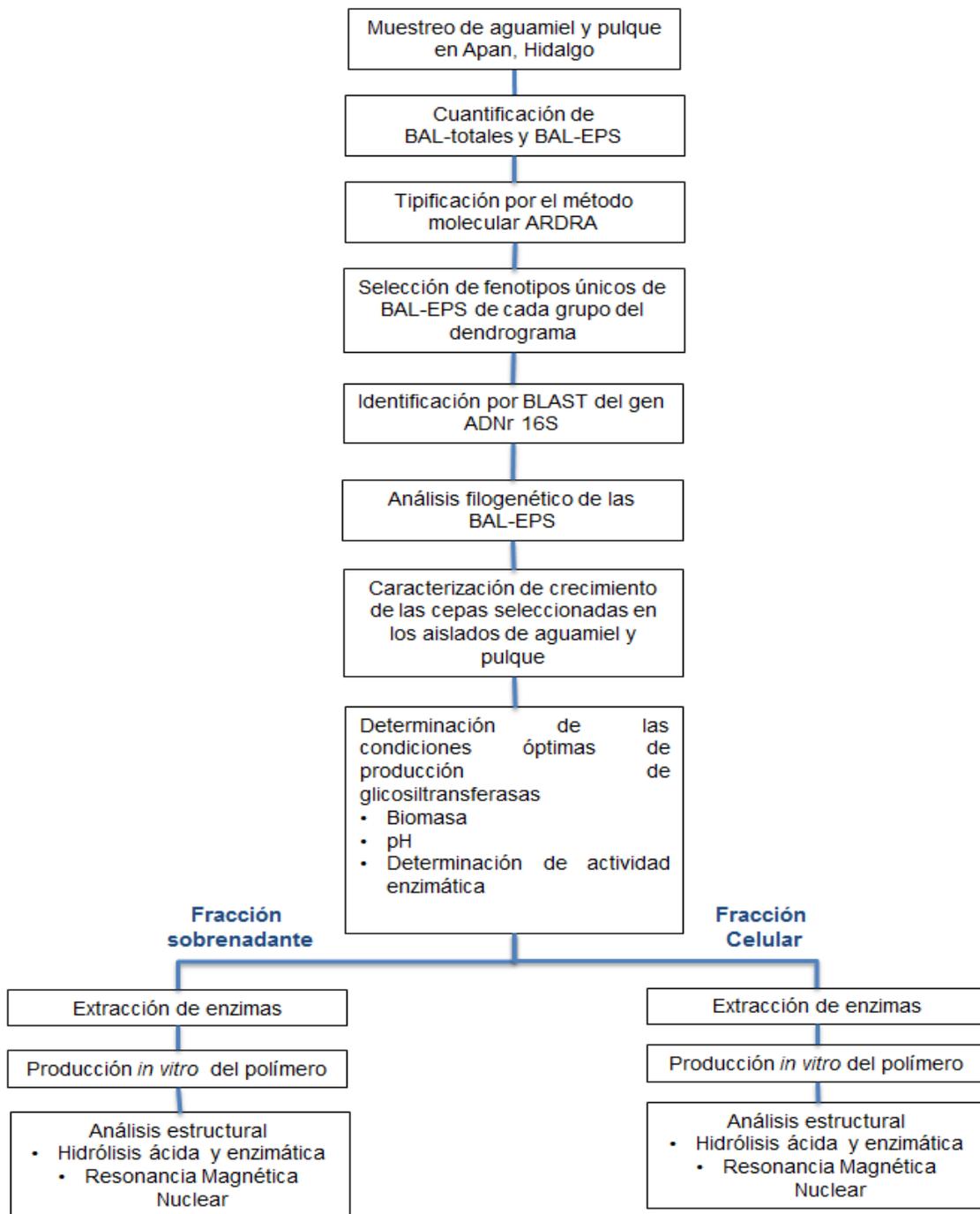


Figura 5.- Diagrama metodológico para el análisis de la diversidad de BAL-EPS en la muestra de aguamiel y pulque.

Muestras de estudio.

El muestreo de aguamiel y pulque se realizó en el municipio de Apan con el apoyo de la Dra. Adriana Cortázar de la Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. A partir de cada una de las muestras se llevaron a cabo diluciones decimales seriales hasta 10^{-7} empleando agua peptonada 0.1 % (p/v) (DIFCO). De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembraron placas de agar APT (DIFCO) para realizar la cuantificación de BAL totales y en cajas de agar APT con sacarosa 10 % (p/v) y 0.2 % (p/v) de ciprofloxacino para la cuantificación de BAL-EPS, el uso del antibiótico fue para inhibir el crecimiento de las bacterias *L. mesenteroides*. La cuantificación de colonias se efectuó después de 24 h en las placas Petri que contenían entre 25 a 250 UFC/mL.

Caracterización microbiológica de BAL-EPS.

Se realizó la selección de colonias productoras de fenotipo viscoso de las placas Petri que se utilizaron para el conteo de BAL-EPS. Cada colonia fue purificada realizando una serie de siembras en placas de agar APT partiendo de una sola colonia en cada paso. La cepa purificada fue conservada en glicerol al 40 % en ultracongelación (-70 °C), para este paso se picó una sola colonia para inocular 5 mL de medio líquido APT hasta conseguir una saturación de biomasa. De cada tubo se tomó 1 mL de cultivo y se mezcló con 1 mL de glicerol al 80% en un criovial. A cada colonia aislada se le realizó una caracterización microbiológica mediante las técnicas de prueba de catalasa, tinción de Gram y análisis morfológico.

Identificación y selección de BAL-EPS.

La identificación de la diversidad de BAL-EPS se realizó mediante una tipificación basada en el análisis del perfil de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA).

- Amplificación del gen ADNr 16S.

Se realizó un cultivo en 5 mL de APT sin sacarosa de las 148 colonias aisladas, incubándose durante 24 h a 30 °C. De cada cultivo se llevó a cabo la extracción del ADN cromosomal utilizando el *UltraClean Microbial DNA isolation kit* siguiendo las indicaciones del proveedor (MOBIO Laboratories, Inc). El ADN extraído se utilizó como templado para la amplificación del gen ADNr 16S empleando el par de primers Fd1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') que fueron diseñados para la amplificación del

gen ADNr 16S en eubacterias (Borneman *et al.*,1996). La mezcla de reacción para llevar a cabo la amplificación del gen fue la siguiente:

Tabla 6.- Volúmenes de reactivos para la reacción de PCR.

Reactivo	Volumen
Templado	1 µL
Buffer 10x	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL
dNTP mix	1 µL
Primer Fd1 (10 µM)	2.5 µL
Primer Rd1 (10 µM)	2.5 µL
Enzima Taq polimerasa recombinante (ThermoScientific) (1 U/ µL)	1 µL
H ₂ O	35 µL
Volumen reacción	50 µL

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (95 °C, 5 min), amplificación (95 °C, 1 min; 42 °C, 1 min; 72 °C, 1.5 min x 30 ciclos) y una amplificación final a 72 °C, 5 min. El producto amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con 4 µL bromuro de etidio (4 mg/mL) en 100 mL de buffer TBE 1x, utilizando un potencial eléctrico de 110 volts. El tamaño del fragmento se determinó utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb *DNA ladder* de ThermoScientific.

- ARDRA (análisis del perfil de restricción del gen ADNr 16S).
El producto amplificado del gen ADNr 16S de cada cepa fue digerido por la enzima de restricción *HaeIII* utilizando la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 7.- Volúmenes de reacción para digestión enzimática.

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	15 - 20 μ L
Enzima <i>HaeIII</i> (NEBLabs) (10000 U/mL)	0.5 μ L
1 x Buffer #2 (NEBLabs)	2.5 μ L
H ₂ O	2 μ L

La reacción fue llevada a cabo a 37 °C por 3 h, los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 % con 4 μ L de bromuro de etidio (4 mg/mL) en 100 mL de buffer TBE 1x, utilizando un potencial eléctrico de 80 volts. Los perfiles de restricción fueron analizados utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad), la matriz de restricción se obtuvo en el programa Phylip 3.2 (Felsenstein 1989) a partir de las bandas del perfil de restricción evaluando la presencia (1) o la ausencia (0) de cada fragmento en el gel. Las bandas menores a 100 pb no fueron consideradas para realizar la matriz. A partir de la matriz de distancia se construyó un dendrograma utilizando el programa TREEVIEW (Page, 1996) empleando el método UPGMA. Se realizó un análisis de Bootstrap para proporcionar la confianza estimada de la topología del dendrograma en el método UPGMA (1000 réplicas) utilizando el programa Phylip 3.2.

- Secuenciación del gen ADNr 16S, identificación y análisis filogenético.
A partir del dendrograma de las BAL-EPS de aguamiel y pulque se realizó una evaluación visual de las colonias en placa MRS agar con sacarosa 20 % de cada grupo obtenido, seleccionando las colonias con fenotipos únicos para su secuenciación. Primeramente se amplificó el gen ADNr 16S y se purificó el producto de PCR utilizando el *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific). El producto purificado se utilizó como molde para la reacción de secuenciación que se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de

Biotecnología, UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos no redundante del National Center of Biotechnological Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) realizando un BLAST para conocer la identidad de las secuencias, la cual fue confirmada empleando el programa Ribosomal Data Project. Para corroborar la identidad molecular de cada secuencia, se realizó la construcción de un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) incluyendo las secuencias de referencia del ADNr 16S. Para realizar el alineamiento se empleó el algoritmo CLUSTAL W y el modelo Jukes & Cantor para calcular la matriz de distancia. Se ejecutó un Bootstrap para brindar confianza a la topología del árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining (1000 réplicas).

Cinética de crecimiento BAL-EPS.

A partir del árbol filogenético se realizó una selección de una cepa de cada especie de BAL de la muestra de aguamiel y pulque. Después de la selección se obtuvieron las siguientes 6 cepas: *Leuconostoc mesenteroides* P8, *L. mesenteroides* A63, *L. kimchii* A1, *L. citreum* A51, *Lactobacillus plantarum* P29 y *L. brevis* P30. El código A corresponde a las cepas de aguamiel y el código P a las del pulque. La caracterización del crecimiento celular se realizó para obtener las condiciones de crecimiento donde se obtuvieran las mayores actividades enzimáticas en la fracción celular y sobrenadante.

Las cepas seleccionadas de aguamiel y pulque se recuperaron de los cultivos en glicerol almacenados a -70 °C sembrando en placa Petri con MRS agar a 30 °C. A partir de una sola colonia de las cajas Petri sembradas, se realizaron los inóculos en 50 mL con medio líquido de MRS incubándose a 30 °C hasta conseguir 1 DO_{600nm}, este cultivo se empleó como inóculo al 10 % (v/v) en matraces de 250 mL con 100 mL volumen de trabajo con medio líquido MRS con sacarosa 20 % (p/v). Las condiciones de fermentación fueron a 30 °C, 200 rpm. Durante el cultivo se realizó el seguimiento del aumento de la densidad óptica midiendo a cada hora a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro Beckman DU650.

Ensayo de actividad global de las enzimas glicosiltransferasas.

Se realizó una cinética de crecimiento de cada cepa productora de EPS en medio MRS con sacarosa 20 % (p/v), de la cual se tomó una muestra de 2 mL en diferentes tiempos durante el crecimiento para realizar el ensayo de actividad enzimática de la fracción asociada a la célula y la sobrenadante. Los 2 mL de cultivo se centrifugaron a 4 °C (8000 rpm, 20 min) para separar las células y el sobrenadante. Las células recolectadas fueron lavadas dos veces con un amortiguador de acetato de sodio (50 mM, pH 5.5), al finalizar se resuspendieron en un volumen de 1 mL del mismo amortiguador. La fracción del sobrenadante se mezcló con polietilenglicol 2000 al 50 % (p/v) en una relación 1:1 (v/v) y se incubó durante 12 h a 4 °C, el precipitado obtenido se centrifugó a 4 °C (6000 rpm, 15 min) y se resuspendió en un volumen de 2 mL del amortiguador de acetato de sodio. La actividad enzimática de las enzimas de la fracción celular y sobrenadante se determinó mediante el método de azúcares reductores totales por DNS (Sumner & Howell 1935). El método consiste en cuantificar el total de azúcares reductores liberados a partir de la hidrólisis de la sacarosa en la mezcla de reacción, mediante la reducción del ácido 3,5-dinitrosalisílico. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de glucosa por minuto a 30 °C en un amortiguador de acetato de sodio (50 mM pH 5.5) en presencia de 277 mM de sacarosa.

Cuantificación de peso seco de biomasa.

La cuantificación de biomasa se realizó indirectamente empleando el método de Lowry para la determinación de proteína total utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.* 1951). De la fracción celular obtenida para el ensayo de actividad enzimática, se tomaron 100 μ L de una dilución 1:10 del concentrado celular y se mezcló con 500 μ L del reactivo C (1 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 %, 1 mL tartrato de sodio y potasio al 1 % y 98 mL de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N) se incubó por 10 min y se agregaron 50 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu, incubando la muestra 30 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 590 nm. La concentración de biomasa se calculó considerando que la concentración de proteína es el 55 % del total de peso seco.

Electroforesis de proteínas y zimogramas.

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel estuvo constituido de una fracción concentradora al 4 % y una fracción separadora al 8 % con un espesor de 2 mm. Los geles se corrieron en una cámara de Bio-Rad con un potencial de 110 V empleando una solución amortiguadora (Tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L y SDS 5 g/L). Se utilizó el marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Después de correr los geles se lavaron tres veces con una solución amortiguadora (acetatos 50 mM y pH 5.5) que contenía Tween 80 al 1 % (v/v), con el propósito de re-naturalizar las enzimas. Al término del lavado, los geles se incubaron toda la noche a 30 °C en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM y pH 5.5 con una concentración de sacarosa 10 % (p/v). Para observar la presencia de enzimas glicosiltransferasa en los geles incubados con sacarosa, estos se tiñeron con reactivo de Schiff (Sigma). Este reactivo se utiliza para detectar la presencia de aldehídos de acuerdo a la siguiente metodología: los geles fueron sometidos a un tratamiento con etanol al 75 % durante 30 min, posteriormente se incubaron 1 h en ácido peryódico 0.7 % (p/v) en ácido acético 5 % (v/v) y se lavaron tres veces con metabisulfito de sodio 0.2 % (p/v) en ácido acético 5 % (v/v) durante 20 min cada lavado, por último los geles se pusieron en contacto con el reactivo de Schiff.

Hidrólisis enzimática de los EPS y TLC.

Los polímeros asociados a las fracciones celular y sobrenadante de cada cepa seleccionada fueron sometidos a una hidrólisis enzimática con FructozymeL (Novozymes), esta es una preparación comercial de enzimas obtenidas del microorganismo *Aspergillus niger* que tiene actividad endoinulinasa β -(2→1) y endolevanasa β -(2→6) D-Fru empleando un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5 y 60 °C. Se utilizó también la enzima dextranasa (Enzimas y Productos Químicos S.A. de C.V.) que hidroliza enlaces α -(1→6) D-Glcp empleando un amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5 y 50 °C. Una enzima endolevanasa de *Bacillus licheniformis* que degrada enlaces glucosídicos β -(2→6) D-Fru en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6 y 37 °C; y una enzima endoinulinasa Novozym 960 (Batch KNN00120 de Novozymes) que hidroliza enlaces endo- β -(2→1) D-Fruc empleando un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6 y 60 °C.

Las enzimas fueron proporcionadas amablemente por el laboratorio del Dr. Agustín López-Munguía. Todas las hidrólisis enzimáticas se realizaron en un volumen de 0.5 mL a una concentración 2 % (p/v) de cada EPS liofilizado y las reacciones fueron incubadas durante 12 h. Se utilizaron como control los siguientes polisacáridos: una inulina de *L. citreum*, una levana de *B. subtilis* y una dextrana de *L. mesenteroides* B-512 PM 69,000 Da (Sigma). Los productos de la hidrólisis fueron analizados por TLC usando como fase móvil ácido acético:cloroformo:etanol:agua en una relación 11:3:11:1. La placa se reveló asperjando directamente una solución de α -naftol en ácido sulfúrico, seguido de un tratamiento térmico de 120 °C por 3 min.

Determinación del peso molecular de los EPS.

El análisis de distribución de pesos moleculares de los polímeros sintetizados se llevó a cabo en un sistema de columnas de permeación en gel Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8x 300 mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 Da, empleando como eluyente nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 35 °C. La determinación del peso molecular de los polímeros de las bacterias aisladas del género *Leuconostoc* se realizó mediante la metodología propuesta por Muñoz (2008). Se realizó una hidrólisis ácida de los polímeros a 121 °C por 35 min usando HCl a una concentración de 0.4 N y se determinó la concentración de fructosa y glucosa antes y después de la hidrólisis. La cuantificación de fructosa y glucosa se realizó por HPLC empleando la columna Carbohydrate High Performance Column empleando como fase móvil agua. La determinación del grado de polimerización (GP) se obtuvo empleando la siguiente ecuación, asumiendo que por cada molécula de dextrana existe una molécula de fructosa.

$$GP = n + 1$$

$$GP_{promedio} = \frac{[Glucosa\ total] - [Glucosa\ libre]}{[Fructosa\ total] - [Fructosa\ libre]} + 1$$

Obtenido el GP promedio se prosiguió a calcular un peso molecular de los polímeros, contemplando un balance de materia en el cual por cada enlace glucosídico se pierde una molécula de agua, empleando la siguiente ecuación:

$$PM = (GP)180 - (GP - 1)18$$

180 = Peso molecular de fructosa y glucosa

18 = Peso molecular del agua

Resonancia Magnética Nuclear.

Una muestra de 40 mg de cada EPS se disolvió en D₂O, se empleó el equipo Agilent DD2 600 en una sonda OneNMR con una frecuencia de sintonía de 599.5 MHz para ¹H y 150 MHz para ¹³C. El trabajo de resonancia se realizó en la Unidad de RMN de la UAM-Xochimilco. Como referencia en las pruebas de resonancia se utilizó tetrametilsilano para los espectros de ¹H (δ 0 ppm) y en los espectros de ¹³C se empleó dimetil sulfóxido como referencia (δ 39.9 ppm). Los porcentajes de los enlaces α-(1→6), α-(1→2) y α-(1→3) de los polímeros se calcularon a partir de las intensidades de las señales correspondientes a los protones anoméricos. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C.

8. Resultados y Discusión.

En el siguiente apartado se presenta el análisis de los resultados de los experimentos que se realizaron para cumplir con los objetivos planteados en el proyecto. El capítulo está dividido en 5 secciones, el orden en el cual se presentan fue de acuerdo con la secuencia de las actividades propuestas en el diagrama metodológico. En la sección 8.1 se presenta el análisis de los resultados del muestreo, cuantificación, tipificación, secuenciación e inferencia filogenética de la diversidad microbiana de BAL-EPS en la muestra de aguamiel y pulque de Apan, Hidalgo. En la sección 8.2 se presentan los resultados del crecimiento celular de las BAL y los ensayos de actividad de las enzimas glicosiltransferasas de estas bacterias. En la sección 8.3 y 8.4 se presentan los resultados de los experimentos de hidrólisis química y resonancia magnética nuclear que guiaron a resolver la composición y estructura química de los polisacáridos extracelulares de las BAL-EPS. En la última sección se presenta el análisis de los zimogramas de la fracción celular y sobrenadante de las BAL-EPS.

8.1 Diversidad de BAL en el aguamiel y el pulque de la zona de Apan, Hidalgo.

8.1.1 Cuantificación y aislamiento de BAL totales y BAL-EPS en aguamiel y pulque.

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y cuantificación de las BAL-EPS en una muestra de aguamiel (savia del agave) y una de pulque de la región de Apan, Hidalgo (19° 42' latitud norte, 98° 27' latitud oeste). Las muestras fueron tomadas en el mes de noviembre, con el apoyo de la Dr. Adriana Cortázar quien logró conseguir el pulque y aguamiel del mismo productor. Al asegurar que ambas muestras sean de un mismo productor se podría confirmar que la muestra de pulque es el producto de la fermentación del aguamiel que el productor recolecta de su propia magueyera.

La siembra de las muestras se realizó en el mismo día de su recolección utilizando los medios sólidos de APT y APT con sacarosa 10 % (p/v), dicha actividad se realizó en los laboratorios de microbiología de la Escuela Superior de Apan. La cuantificación de BAL totales en aguamiel fue de 1.5×10^6 UFC/mL y en el pulque fue 1.7×10^4 UFC/mL, la concentración de BAL-EPS en el aguamiel fue de 6×10^5 UFC/mL y en el pulque fue 1.3×10^4 UFC/mL. De las cajas Petri donde se realizó la cuantificación de BAL-EPS se seleccionaron las colonias que presentaban un fenotipo viscoso, este fenotipo es un

indicador clave de la capacidad de síntesis de EPS por estas bacterias, teniendo un total de 148 cepas productoras de EPS: 84 en aguamiel y 64 en pulque. Al realizar las pruebas microbiológicas, todas las cepas seleccionadas resultaron ser Gram-positivas y catalasas negativas.

La concentración de BAL totales en el aguamiel es mayor con respecto al pulque, este comportamiento podría deberse a las diferentes condiciones que se encuentran en cada ambiente. En el pulque, el 87.3 % de los azúcares que inicialmente estaban en el aguamiel se han consumido por la microbiota presente, obteniendo una recuperación de carbono del 66.18 % en forma de metabolitos secundarios (etanol, ácido acético, ácido láctico, diacetilo) debido al metabolismo microbiano durante la fermentación (Escalante *et al.* 2008). El aumento de la concentración de estos metabolitos además de la disminución de fuentes de carbono convierte al producto de la fermentación, el pulque, en un ambiente inhibitorio para el crecimiento de los microorganismos presentes al principio de la fermentación. Este comportamiento en la concentración de BAL también fue reportado en trabajos realizados por Valadez-Blanco *et al.* (2012), en los cuales se realizó una cuantificación de BAL totales en aguamiel de tres ranchos productores de la región de Tamazulapa, Oaxaca, obteniendo una concentración en aguamiel de $6 \times 10^7 - 3.7 \times 10^9$ UFC/mL y en el pulque es de $7 \times 10^7 - 8.3 \times 10^7$ UFC/mL. Los autores propusieron que la variabilidad de la concentración inicial en el aguamiel probablemente puede deberse a dos factores: el primero, es al ambiente que está presente en el terreno de cultivo, debido a que la cavidad de donde se obtiene el aguamiel se encuentra permanentemente expuesto a diferentes factores ambientales como tierra, insectos y lluvia; la segunda razón propuesta está relacionada al tiempo de maduración del cajete, observando que una semana después de haber realizado la castración del maguey la concentración de BAL fue de 5×10^7 UFC/mL y después de cinco semanas la concentración aumenta a 3.5×10^8 UFC/mL. Estos factores no pudieron ser controlados en la presente investigación debido a que la producción de esta bebida y el acceso a los agaves está muy reservada por el productor, de la muestra únicamente se puede confirmar que el aguamiel pertenece a la misma plantación del cual obtuvo el pulque.

En la figura 6 se presentan fotografías de las colonias viscosas obtenidas en medio sólido. De esta evaluación visual se puede inferir que la diversidad de bacterias BAL-EPS presentes en la bebida se va homogenizando durante la fermentación, al observar un fenotipo liso que se repite en la mayoría de las colonias BAL-EPS del pulque. La relación

de BAL-EPS en el aguamiel es del 40 % con respecto a la concentración de BAL totales y en pulque es del 70 %. Este aumento de la concentración de BAL-EPS en el sistema de fermentación es reportado por Torres-Rodríguez *et al.* (2014) al observar una relación del 47% de BAL-EPS en una muestra de aguamiel del estado de Morelos y al final de la fermentación la relación aumenta a 50%. La presencia de estas bacterias productoras en el aguamiel posiblemente nos puede indicar que la bioconversión de sacarosa en HoPS puede estar sucediendo desde su recolección en el maguey, siendo la concentración de sacarosa en el aguamiel de 7 – 13 % (p/v).

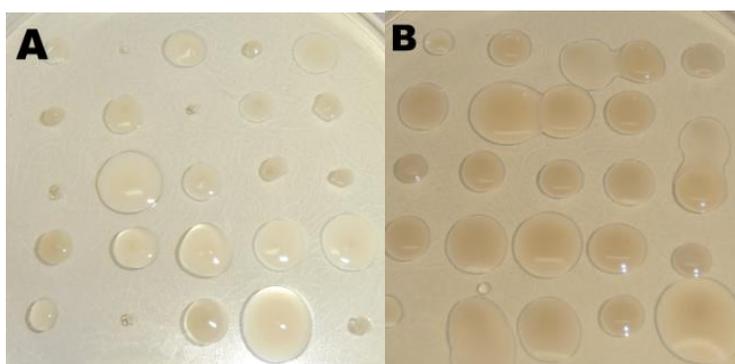


Figura 6.- Fenotipos viscosos de colonias BAL-EPS en aguamiel (A) y pulque (B).

8.1.2 Identificación de BAL-EPS por ARDRA.

Con el objetivo de identificar la diversidad taxonómica de BAL-EPS aisladas en la muestra de aguamiel y pulque, se realizó una tipificación por el método molecular ARDRA. Seguido de una identificación de tipos ARDRA únicos y la secuenciación e identificación del gen ADNr 16S realizando un BLAST en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

La tipificación por el método ARDRA consistió en la extracción del ADN cromosomal de las 148 cepas BAL-EPS aisladas, seguido de una amplificación del gen ADNr 16S y una digestión del producto de PCR con la enzima de restricción *HaeIII*. Del patrón de restricción obtenido de cada una de las cepas se realizó una matriz correspondiente a la población de cada una de las muestras. Para realizar la matriz de restricción se utilizó el programa Phylip. A partir de la matriz de restricción se realizó un dendrograma de agrupamiento empleando el programa Treeview y para brindar mayor confianza a la topología del dendrograma se realizó una prueba bootstrap con el mismo programa.

En las bacterias, los genes ribosomales se encuentran codificados en el operón 30S, al ser transcrito este operón es cortado por una enzima ribonucleasa, teniendo como resultado tres ARN mensajeros: 16S, 23S y 5S. El tamaño del operón, la secuencia de nucleótidos y las estructuras secundarias de los tres ARN mensajeros se encuentran conservadas entre especies. Entre los tres ARN mensajeros codificados por el operón, el gen 16S es el que presenta mayores regiones conservadas y ha sido considerado como un “cronómetro evolutivo” (Rajendhran & Gunasekaran, 2011). En esta investigación se amplificó un producto de aproximadamente 1500 pb correspondiente al gen ADNr 16S de las cepas BAL-EPS, lo que permitió diferenciar entre las especies presentes en cada muestra. En la figura 7 se presentan los perfiles de restricción únicos obtenidos de la digestión del gen 16S de la población de BAL-EPS aisladas de la muestra de aguamiel y pulque.

Como se aprecia en la figura 7, únicamente se obtuvieron 4 tipos de ARDRA únicos en cada muestra. El número de patrones de restricción o ARDRA únicos dependerá de la diversidad filogenética presente en la población de microorganismos en una muestra. En la figura 8 se presentan los dendrogramas obtenidos del agrupamiento de la población de bacterias de acuerdo a su perfil de restricción. El número de grupos que conforman cada dendrograma está relacionado al número de perfiles de restricción únicos obtenidos en la población estudiada, por tal razón se obtuvieron 4 grupos en cada dendrograma.

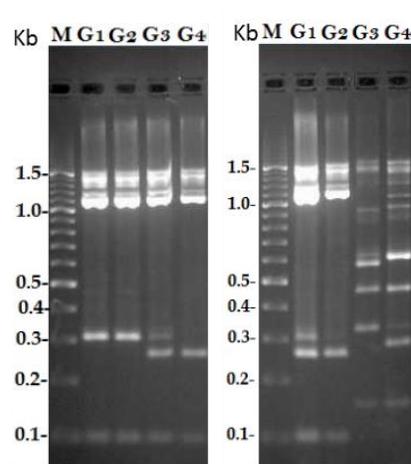


Figura 7.- Perfiles ARDRA únicos de la muestra de aguamiel (izquierda) y pulque (derecha). G1, grupo I; G2, grupo II; G3 grupo III y G4, grupo IV, del dendrograma.

Marcador 1Kb DNA ladder de ThermoScientific

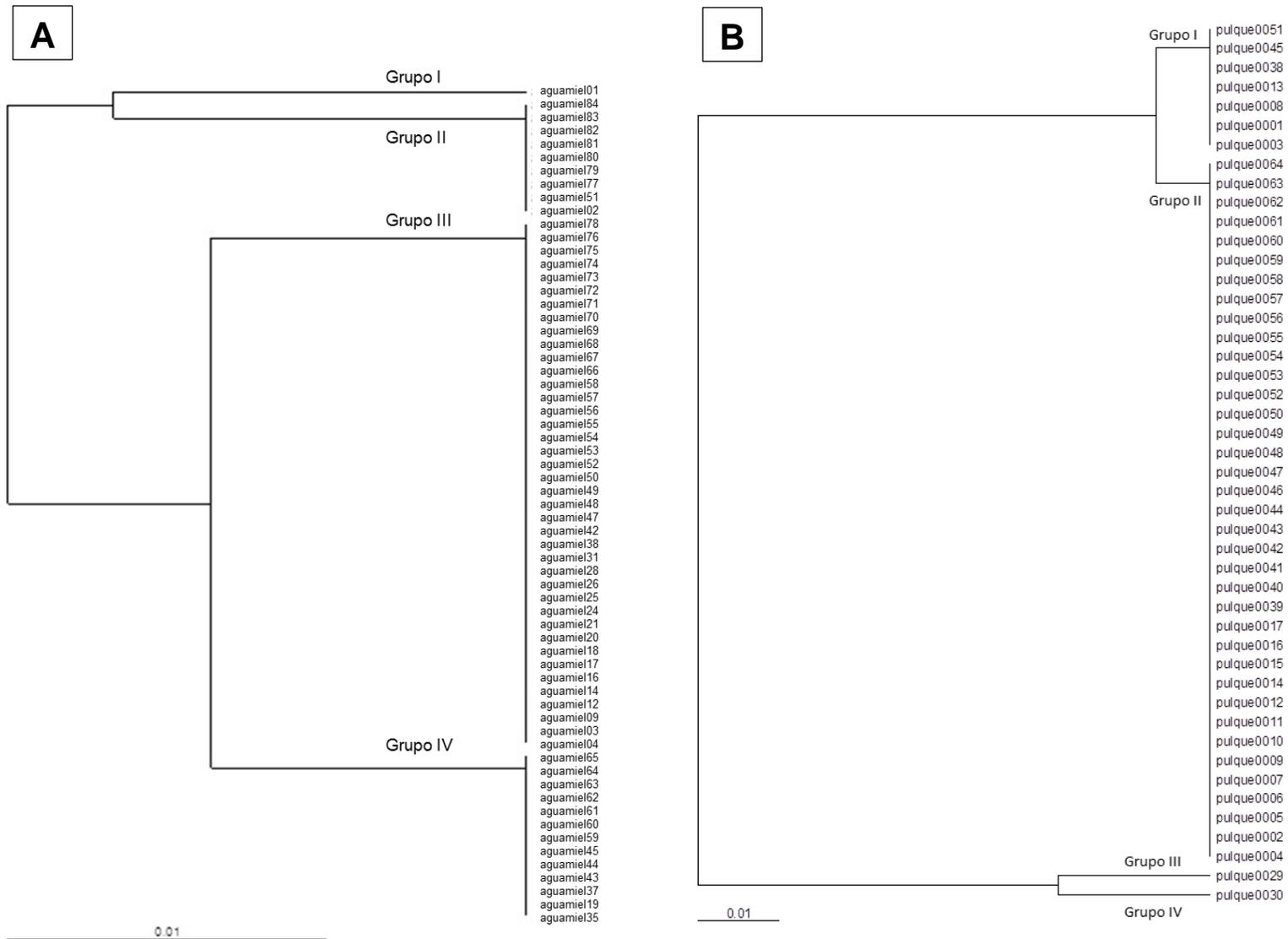


Figura 8.- Dendrogramas de las BAL-EPS en aguamiel (A) y pulque (B).

De cada grupo obtenido en los dendrogramas se analizaron visualmente los fenotipos de colonia de la población agrupada, seleccionando las bacterias que mostraban un fenotipo único en medio sólido (MRS agar con sacarosa al 20 %). En la sección de Anexos se presentan fotografías de las colonias seleccionadas de cada grupo del dendrograma. La identificación de las cepas seleccionadas se obtuvo realizando un BLAST de la secuencia ADNr 16S en la base de datos no redundante del NCBI, el resultado de este experimento se presenta en las tablas 15 y 16 de la sección de Anexos. En la tabla 8 se resume la información presentada en los dendrogramas de aguamiel y pulque.

Tabla 8.- Distribución de las colonias en el dendrograma de aguamiel y pulque.

Identidad	% (No.) de colonias		Grupo	
	Aguamiel	Pulque	Aguamiel	Pulque
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	64.2 (54)	11 (7)	III	I
<i>L. mesenteroides</i>	23.8 (20)	86 (55)	IV	II
<i>L. citreum</i>	10.7 (9)		II	
<i>L. kimchii</i>	1.3 (1)		I	
<i>L. plantarum</i>		1.5 (1)		III
<i>L. brevis</i>		1.5 (1)		IV

El estudio de la diversidad microbiana empleando el método ARDRA ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de las poblaciones bacterianas en diferentes nichos naturales, desde alimentos fermentados hasta en muestras de las mucosas humanas (Park *et al.* 2014; Rodas *et al.* 2003; Ventura *et al.* 2000). En la muestra de aguamiel se obtuvieron 4 especies de BAL, todas pertenecientes al género *Leuconostoc*. De acuerdo al dendrograma, el grupo de mayor población es el III correspondiente a la especie *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* siendo el 64.2 % de todas las BAL-EPS. Los grupos de menor población fueron el I y II con el 1.3 % y 10.7 % respectivamente; estos grupos corresponden a las especies de *L. kimchii* y *L. citreum*. La presencia de estas tres especies ya han sido reportadas en una muestra de aguamiel de la región de Huitzilac, Morelos y correspondían al 36 % de las BAL aisladas (Escalante *et al.* 2008). Es importante mencionar que es la primera vez que se reporta a *L. citreum* como una BAL-EPS en este nicho.

A continuación en la figura 9 se presenta el árbol filogenético que se construyó con las secuencias de las BAL-EPS seleccionadas del dendrograma de aguamiel.

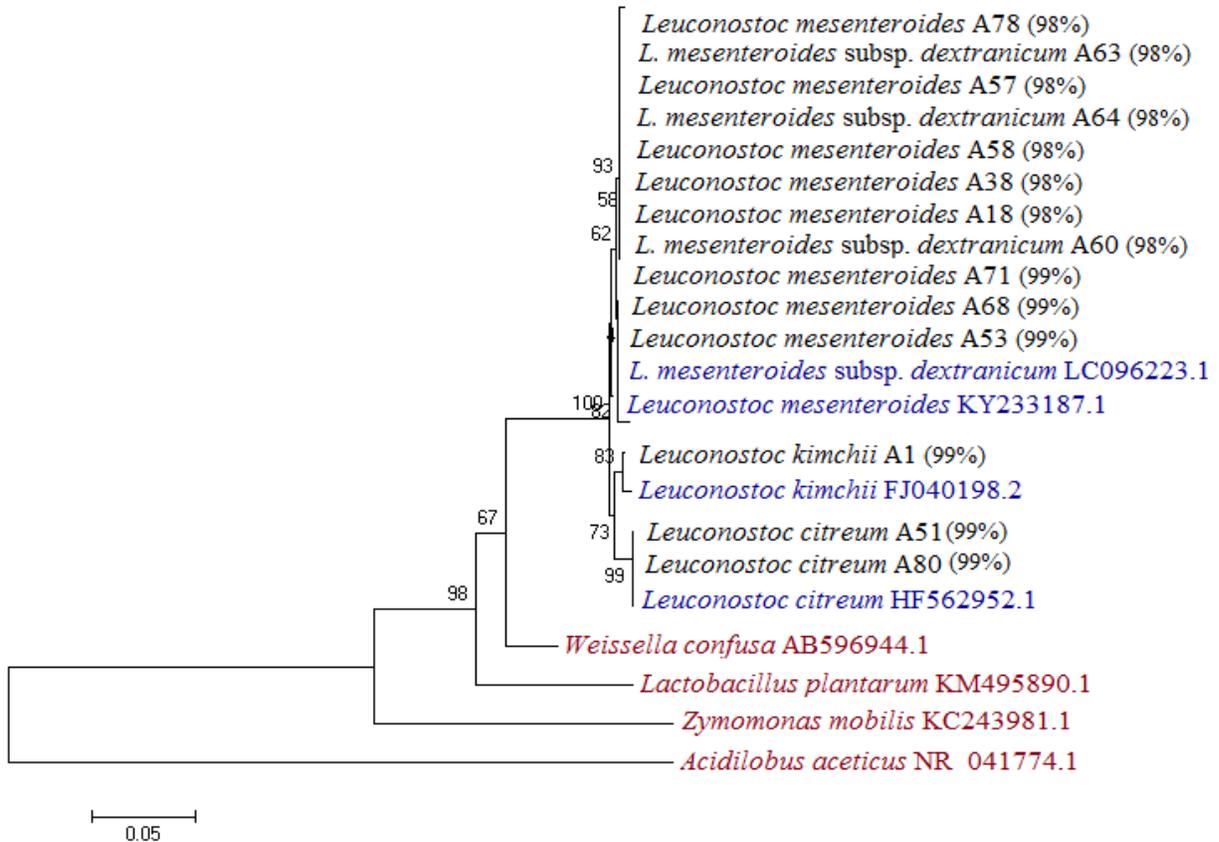


Figura 9.- Árbol filogenético de las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas de aguamiel y las secuencias de referencia (color azul) de la base de datos del NCBI. El número de referencia de la base de datos está indicada después del nombre taxonómico. Las secuencias del ADNr 16S de *Zymomonas mobilis*, *Acidilobus aceticus*, *Weissella confusa*, *Lactobacillus plantarum* se usaron como grupos externos (color rojo) para enraizar el árbol filogenético. Se realizó un bootstrap (1000 réplicas) de confianza a la topología del árbol elaborado por el método Neighbor – Joining.

Las BAL-EPS del aguamiel (color negro en la figura 9) fueron identificadas como *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *L. kimchii*. Estas especies ya han sido aisladas y reportadas en un estudio de diversidad microbiana a partir de una muestra de aguamiel del estado de Morelos (Escalante *et al.* 2008), en esa investigación se reportó por vez primera que la diversidad bacteriana del aguamiel está

conformada por las BAL heterofermentativas *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchii*, las Y-Proteobacteria *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter spp.* y *Acinetobacter radioresistens*. La semejanza en especies de BAL en muestras de aguamiel de distintas zonas geográficas del país puede deberse, a la capacidad que tienen las bacterias del género *Leuconostoc* para adaptarse a diferentes nichos naturales. Las especies del género *Leuconostoc* poseen la capacidad de transportar y metabolizar diferentes azúcares (pentosas, hexosas y disacáridos), ácidos orgánicos (citrato y malato) y aminoácidos. En estudios donde se realizaron la secuenciación del genoma de *L. mesenteroides* ATCC8293 y *L. citreum* KM20 han demostrado que un gran porcentaje de su genoma codifica para transportadores de carbohidratos (Gänzle 2015).

La evolución de las BAL ha conducido al abandono del uso de un metabolismo energéticamente eficiente como el aeróbico, debido a la reducción de su genoma. Esto les ha permitido tener una rápida adaptación a medios libres de hierro como plantas o nichos carentes de este elemento (Gänzle 2015). La presencia de diferentes especies de *Leuconostoc* se han reportado en alimentos fermentados de origen vegetal como: el sauerkraut, kimchi, pulque, vino, sidra y cereales. Por ejemplo, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* está presente al inicio de la fermentación del sauerkraut y la especie *L. kimchii* participa en la fermentación del kimchi, un alimento fermentado a base de col, rábano y pepino (Kim, Chun & Han, 2000).

En el dendrograma del pulque (figura 8B) se observan 4 grupos, dos de estos grupos (Grupo I y II) representan el 97% de la población aislada. El Grupo I correspondiente a la especie *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* posee una población de 7 colonias y el Grupo II posee una población de 55 colonias que corresponden a la especie *L. mesenteroides*. El enriquecimiento de la población total aislada por estas dos especies puede corroborar el fenómeno observado en el análisis visual del fenotipo de colonia en medio sólido de las bacterias aisladas en el pulque, donde únicamente se presenta un fenotipo liso en la mayoría de las colonias aisladas (figura 6). La presencia de *Leuconostoc* en el pulque ya ha sido caracterizada y reportada previamente en trabajos por Sánchez-Marroquín *et al.* (1953), sus investigaciones fueron los primeros esfuerzos por estudiar la diversidad microbiana en el pulque. En estos trabajos se definen tres tipos de fermentaciones en el pulque: una alcohólica, una ácida y una viscosa. La fermentación viscosa, que es la síntesis de polímeros, se le atribuyó a las especies *L. mesenteorides* y *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Trabajos más recientes por Escalante *et al.* (2004,2008) en los que se estudió la diversidad microbiana en el pulque de diferentes regiones y durante el proceso de producción utilizando una metodología molecular de generación de librerías genómicas a partir de las muestras, se reporta que al final de la fermentación el 80.97 % de la diversidad microbiana corresponde a especies del género *Lactobacillus*. En el presente proyecto las especies del género *Lactobacillus* corresponden al 3 % de la población cultivable. Hasta este momento en nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta la presencia de *L. brevis* y *L. plantarum* en el pulque como especies de BAL-EPS. En la figura 10 se muestra el árbol filogenético a partir de la secuencia del gen ADNr 16S de las colonias BAL-EPS del pulque y las secuencias de referencia del NCBI.

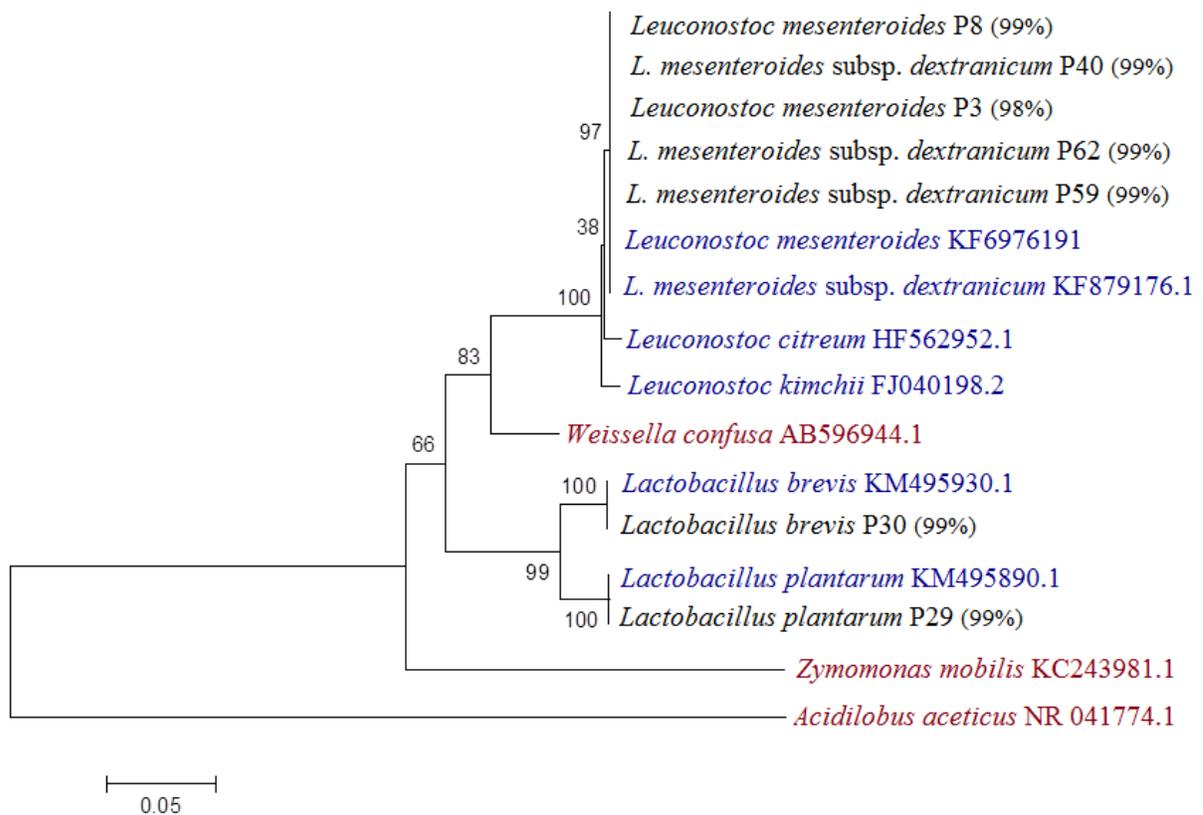


Figura 10.- Árbol filogenético de las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas del pulque y las secuencias de referencia (color azul) de la base de datos del NCBI. El número de referencia de la base de datos está indicada después del nombre taxonómico. Las secuencias del ADNr 16S de *Zymomonas mobilis*, *Acidilobus aceticus*, *Weissella confusa* se usaron como grupos salientes (color rojo) para enraizar el árbol filogenético. Se realizó un bootstrap (1000 réplicas) de confianza a la topología del árbol elaborado por el método Neighbor-Joining.

De acuerdo con el análisis filogenético de los aislados de la muestra de pulque, las BAL-EPS pertenecen a los géneros *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis*. La incorporación de las especies de *Lactobacillus* al sistema de fermentación probablemente puede suceder durante el momento de la inoculación del aguamiel con pulque de la fermentación anterior. Este fenómeno se describió en una investigación de Escalante *et al.* (2008) donde se estudió la distribución de la diversidad microbiana durante todo el proceso de fermentación. Reportando que en el momento de la inoculación del aguamiel con pulque de la fermentación anterior, el sistema se ve enriquecido por los siguientes microorganismos: BAL homofermentativas relacionadas a *L. acidophilus*, α -Proteobacteria *Zymomonas mobilis* y *Acetobacter malorum* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la misma investigación, se estudia la diversidad bacteriana durante 6 horas de fermentación concluyendo que al final del proceso la población microbiana de BAL está compuesta principalmente por *L. acidophilus*, *L. mesenteroides* y *L. lactis*. Se ha reportado con anterioridad que la presencia de esta serie de pasos de reinoculación en la producción de alimentos fermentados, ha tenido como consecuencia la evolución de las especies en el inóculo para el desarrollo de relativa tolerancia a los productos de su propio metabolismo y la formación de consorcios (Papadimitriou *et al.* 2015) por lo cual es posible que las especies de *Lactobacillus* presentes en el inóculo se estén adicionando al sistema cada vez que se añade pulque al aguamiel fresco.

Es la primera vez que se reporta la presencia de *L. brevis* en el pulque, esto puede deberse a las condiciones de producción, ya que el pulque es fermentado por los microorganismos presentes en la zona de producción, el agave y las condiciones del proceso (Valadez-Blanco *et al.* 2012). La presencia de la bacteria *L. plantarum* ya ha sido reportada en una muestra de pulque de la región de Tizayuca, Estado de México (Escalante *et al.* 2004). De las bacterias mesófilas, *Lactobacillus plantarum* ha sido aislada con mayor frecuencia en productos lácteos, carne y diferentes plantas. La presencia de este microorganismo en el pulque puede deberse a la plasticidad que presenta para adaptarse a diferentes nichos naturales. A partir del estudio del genoma de la cepa *Lactobacillus plantarum* WCFS1 aislada de una muestra de saliva humana, se concluyó que esta cepa posee aproximadamente de 25 transportadores tipo PTS además de tener todos los genes para la vías metabólicas de glucólisis y fosfocetolasa, estos resultados confirman la capacidad de esta bacteria para adaptarse a diferentes ambientes (Kleerebezem *et al.* 2003). La presencia de este microorganismo durante la fermentación del pulque puede favorecer a las características organolépticas de esta bebida, ya que al

ser un microorganismo heterofermentativo tiene como productos secundarios de su metabolismo la síntesis de diacetilo, acetoina, 2-3 butanodiol y ácido fórmico dependiendo del potencial oxidante del ambiente (Kleerebezem *et al.* 2003; Mora *et al.* 2013).

Varias preguntas quedan sobre la naturaleza, los mecanismos y el impacto que tienen las interacciones especie-especie y especie-ambiente en los consorcios de microorganismos. Existiendo diferentes barreras que dificultan la comprensión de la relación microorganismos-ecosistemas, la primera es la composición química de cada nicho que provoca una variación de especies que existe de un ambiente a otro y la segunda es en relación a la cantidad de especies que pueden estar en un nicho son del orden de miles. La inviabilidad de poder aislar la mayor cantidad de especies en el nicho natural por técnicas de cultivo es la barrera más importante para el estudio de estos consorcios. De los avances recientes en las tecnologías de secuenciación y metagenómica se ha podido ampliar el panorama de las bacterias, hongos y virus presentes en los alimentos fermentados tradicionales. Los alimentos fermentados pueden servir como modelo de estudio para entender los mecanismos por los cuales las cepas silvestres tienden a formar comunidades microbianas (Wolfe & Dutton 2015).

Del análisis filogenético de la muestra de aguamiel y pulque se seleccionaron los fenotipos únicos de cada especie (figura 11) con la finalidad de caracterizar polímeros con estructuras diferentes. De acuerdo con Naessens (2005), la morfología de colonia dependerá de la estructura, grado de ramificación y tamaño del polímero sintetizado. De cada cepa se realizó la caracterización estructural de los polímeros sintetizados, los resultados se presentaran en las próximas secciones.

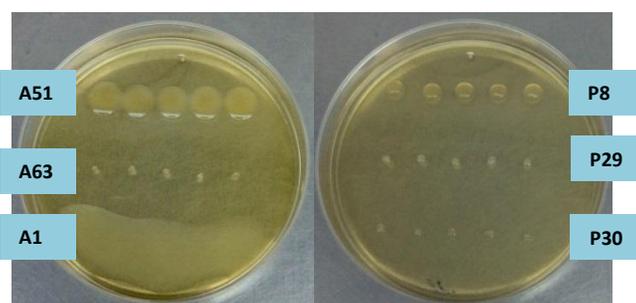


Figura 11.- Fenotipos únicos de BAL-EPS aisladas de aguamiel (izquierda) y pulque (derecha). Cepa A51 (*L. citreum*), cepa A63 (*L. mesenteroides*), cepa A1 (*L. kimchii*), cepa P8 (*L. mesenteroides*), cepa P29 (*Lactobacillus plantarum*) y cepa P30 (*L. brevis*).

8.2 Actividad glicosiltransferasa y crecimiento celular de las BAL-EPS.

De las cepas seleccionadas se realizó una determinación de la actividad enzimática de las glicosiltransferasas durante el crecimiento celular de cada cepa, con el objetivo de obtener la condición de cultivo en la cual se obtengan las mayores actividades específicas para cosechar las enzimas y realizar una síntesis de los EPS. En la bibliografía se ha reportado que en las BAL las enzimas glicosiltransferasas son sintetizadas con un péptido señal y por tal razón durante el crecimiento celular se recolectó una fracción sobrenadante y una asociada a la célula (Purama & Goyal 2008; Vasileva *et al.* 2012). En la figura 12 y 13, se muestra la cinética de crecimiento y la actividad específica de las glicosiltransferasas de las bacterias del género *Leuconostoc*.

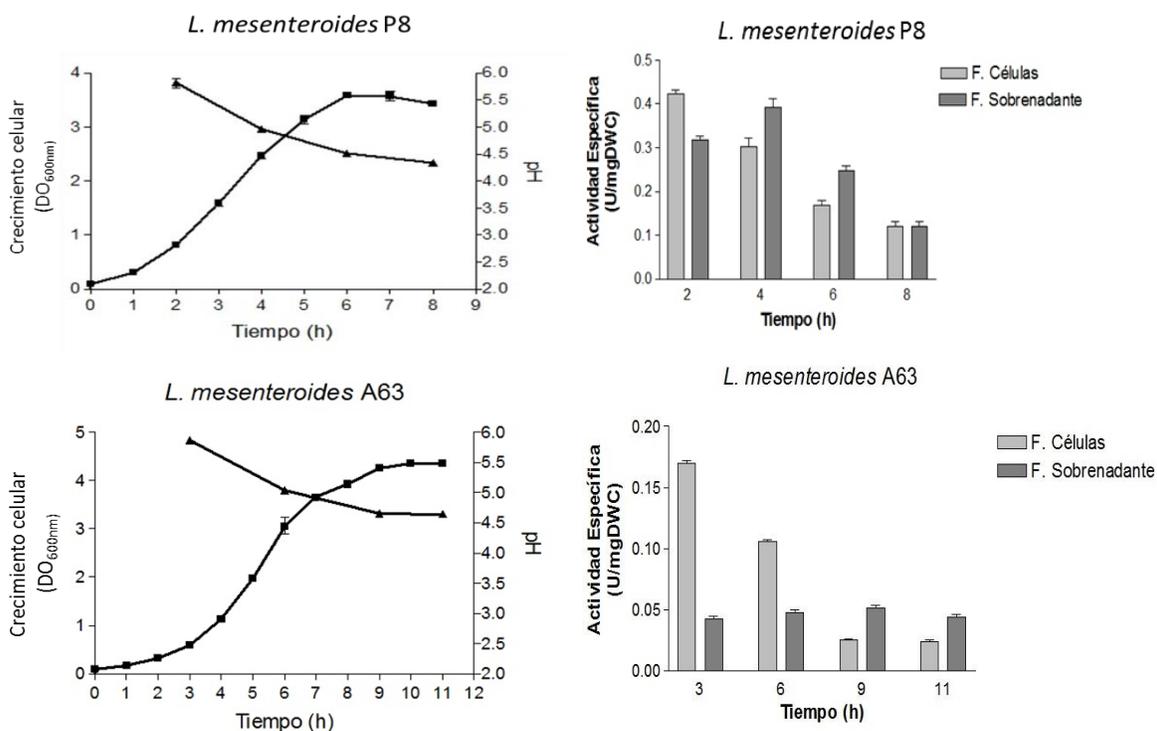


Figura 12.- Gráficas de crecimiento celular y actividad enzimática específica para las cepas: *L. mesenteroides* P8 y *L. mesenteroides* A63 en medio líquido MRS con sacarosa.

▲ pH; ■ crecimiento celular.

La actividad de las glicosiltransferasa asociada a las células en las cepas *L. mesenteroides* P8 y *L. mesenteroides* A63 disminuye conforme se acidifica el medio durante el crecimiento, esto debido a la producción de ácidos orgánicos por el metabolismo de las BAL, observando una actividad 4 veces menor al final con respecto al inicial en el caso de la cepa P8 donde el pH final es de 4.0. En diferentes estudios, se ha

reportado que el pH óptimo de actividad de las glicosiltransferasas es de 5 a 6 (Ortiz-Soto *et al.* 2004; Dols *et al.* 1997; Van Hijum *et al.* 2004; Monchois *et al.* 1999; Tieking *et al.* 2003; Vasileva *et al.* 2012), por tal razón en la fracción sobrenadante se muestra una mayor actividad enzimática durante la fase logarítmica de crecimiento, donde el pH es cercano a 5.5. En trabajos realizados por Lazic (1993) se reporta que en el rango de pH de 5.5 a 6.7 se obtienen los mayores rendimientos de producción de la enzima y el rendimiento de producción de dextrana es mayor cuando el pH del medio es controlado (pH 5.5) en comparación de una fermentación con pH variable.

Otra de las razones que probablemente responda la disminución de actividad durante la cinética de crecimiento es la poca estabilidad estructural de las glicosiltransferasas al presentar una proteólisis por parte de diferentes proteasas extracelulares que sintetizan las BAL. Trabajos por Argüello-Morales (2005) demuestran la disminución del peso molecular de la enzima glicosiltransferasa de *L. mesenteroides* B512F debido a la acción de proteasas en el sobrenadante.

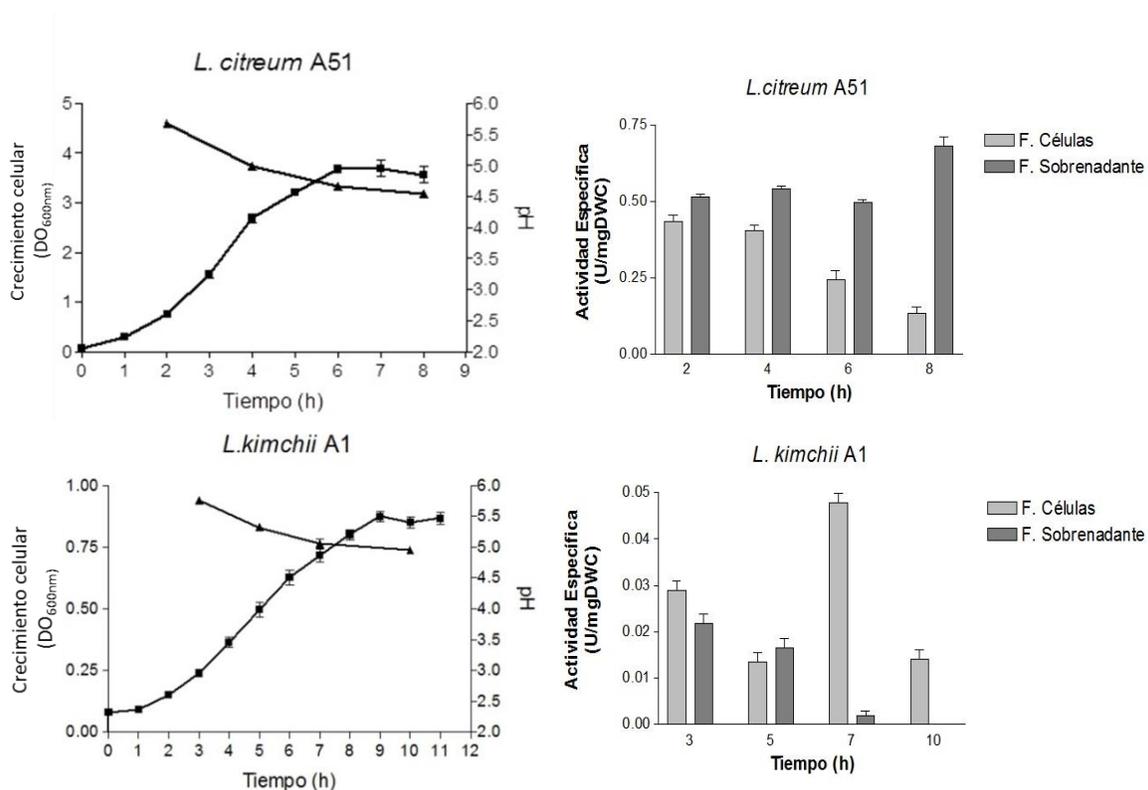


Figura 13.- Gráficas de crecimiento celular y actividad enzimática específica para las cepas: *L. kimchii* A1 y *L. citreum* A51 en medio líquido MRS con sacarosa. ▲ pH; ■ crecimiento celular.

Como se observa en la figura 13, la fracción sobrenadante de la cepa de *L. citreum* A51, presenta al final de su fase estacionaria de crecimiento un aumento en la actividad de la glicosiltransferasa a un pH de 4.5, efecto no mostrado en la fracción celular. Este aumento de actividad podría deberse a la síntesis de dos tipos de glicosiltransferasas por esta bacteria siendo la que presenta una mayor actividad a pH de 4.5 la que se encuentra en el sobrenadante, no así en la fracción asociada a la célula donde se puede observar el efecto del pH. La cepa *L. kimchii* A1 es la que menor actividad enzimática mostró en comparación con las demás *Leuconostoc*, esto puede deberse a la poca biomasa obtenida bajo las mismas condiciones (200 rpm, 30 °C). Varios factores se deben de tomar en cuenta cuando se estudian las condiciones óptimas para la producción extracelular de esta enzima por las especies de *Leuconostoc*, una de ellas es que la biosíntesis de las glicosiltransferasas está asociada al crecimiento, siendo la fase exponencial el momento en el cual se obtiene una mayor síntesis de estas enzimas. Estudios en ingeniería de bioprocesos han descrito que la mayor tasa de producción de esta enzima se observa cuando la tasa de transferencia de oxígeno es igual a la tasa de consumo de oxígeno del organismo; por tal razón, las condiciones óptimas de aireación es de 1.0 mmol/Lh para la producción de la enzima en *L. mesenteroides* (Veljkovic *et al.* 1992).

En las cinéticas de las cepas *L. plantarum* y *L. brevis*, no fue posible detectar actividad de enzimas glicosiltransferasas extracelulares, habiendo sido reportadas con anterioridad en diferentes especies de *Lactobacillus* (Krajl *et al.* 2003), lo que sugiere que la síntesis del polímero en estas cepas es por vía intracelular y una vez polimerizado se exporta al medio. Esta vía de síntesis de EPS por la especie *L. plantarum* ha sido reportada en trabajos de Zhang (2013), en los que determinó la producción de un polímero tipo HePS por la cepa *L. plantarum* C88. Este polímero tiene un peso molecular de 1.15×10^6 Da con una relación 1:2 de los monosacáridos glucosa y galactosa. En cuanto a *L. brevis* se ha reportado que la cepa *L. brevis* G-77, aislada a partir de un alimento fermentado a base de avena, posee la capacidad de síntesis de un exopolisacárido de tipo β -glucano (Mårtensson *et al.* 2003).

8.3 Caracterización química de los polisacáridos extracelulares producidos.

A partir de las enzimas glicosiltransferasas de la fracción sobrenadante y la fracción asociada a la célula de cada una de las cepas de *Leuconostoc* se realizó una síntesis de los polímeros para después caracterizarlos. En el caso de los polímeros sintetizados por las cepas de lactobacilos (P30 y P29), estos fueron precipitados del sobrenadante utilizando etanol absoluto. La obtención de estos polímeros se realizó de esta forma debido a que su síntesis no es a partir de glicosiltransferasas extracelulares. Una vez obtenido cada uno de los polímeros estos fueron liofilizados para después realizar su caracterización química.

La caracterización química de los polímeros se realizó a partir de una hidrólisis enzimática y ácida de cada uno de los polímeros de las cepas de BAL aisladas de la muestra de aguamiel y pulque. En la figura 14 se presentan las placas de la cromatografía de capa fina con los productos de hidrólisis. La hidrólisis enzimática demuestra que los EPS de ambas fracciones de las cepas *L. mesenteroides* P8, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51 y *L. kimchii* A1 únicamente se hidrolizaron con la enzima dextranasa y no con la endolevanasa, inulinasa o Fructozyme; por lo tanto los polímeros presentaron ser de tipo dextrana. El polímero de tipo dextrana está catalogado como un HoPS, este polímero está compuesto de monosacáridos de glucosa unidos con enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 6) en la estructura base y ramificaciones α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 4); el grado de ramificación que presenta el polímero dependerá de la enzima dextranasa que lo sintetice (Patel *et al.* 2012; Iliev *et al.* 2014).

La resistencia a la hidrólisis enzimática que se observa en el perfil cromatográfico de la TLC de cada uno de los hidrolizados (figura 14), puede indicar la diferencia estructural en las ramificaciones de los polímeros sintetizados, siendo los polímeros con mayor porcentaje de ramificación los que presentaron mayor resistencia. Esta observación se puede confirmar con los resultados de resonancia magnética nuclear. En la cromatografía de capa fina se puede observar que los polímeros sintetizados por *L. mesenteroides* A63 presentan mayor resistencia al mostrar un punto de aplicación más sombreado en comparación del polímero de *L. kimchii* A1 donde el punto de aplicación se observa más difuminado.

No se reporta en este estudio ningún polímero de fructana, habiendo sido reportada con anterioridad la biosíntesis del polímero de tipo inulina en cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* así como algunas bacterias del género *Streptococcus*. De este último se han reportado varias copias de los genes que codifican para la enzima inulinsacarasa (Anwar 2008, 2010; Olivares-Illana 2003; Van Hijum 2002).

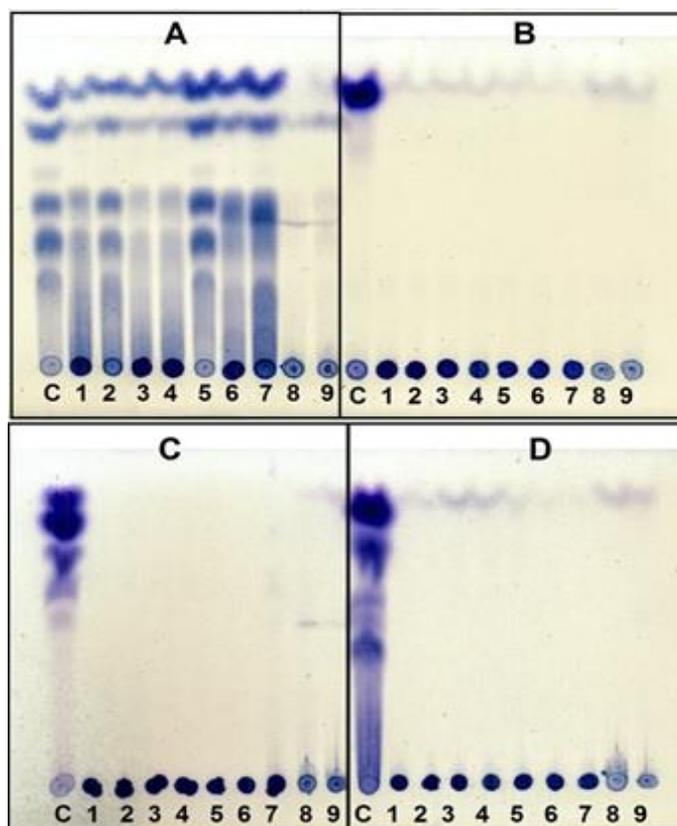


Figura 14.- Hidrólisis enzimática de los polímeros de la fracción celular y fracción sobrenadante: C. Control; 1. *L. citreum* A51C; 2. *L. citreum*A51S; 3.*L.mesenteroides*A63C; 4.*L.mesenteroides* A63S; 5.*L. kimchii* A1; 6.*L.mesenteroides*P8C; 7.*L.mesenteroides*P8S; 8. *Lb.plantarum*P29; 9. *Lb.brevis*P30. **A.** Hidrólisis con dextranasa (C. dextrana de *L. mesenteroides* B.512) **B.** Hidrólisis con Fructozyme L (C. levana de *B. subtilis*) **C.** Hidrólisis con levanasa (C. levana de *B. subtilis*) **D.** Hidrólisis Inulinasa (C. Inulina de *L. citreum*).

Los polímeros producidos por *Lb. plantarum* P29 y *Lb. brevis* P30 no mostraron un perfil de hidrólisis por las enzimas dextranasa, levanasa e inulinasa; por lo cual se realizó una hidrólisis ácida del polímero con HCl 0.4 N y se identificaron los carbohidratos por HPLC, en la figura 15 se muestran los perfiles cromatográficos de estos dos polímeros.

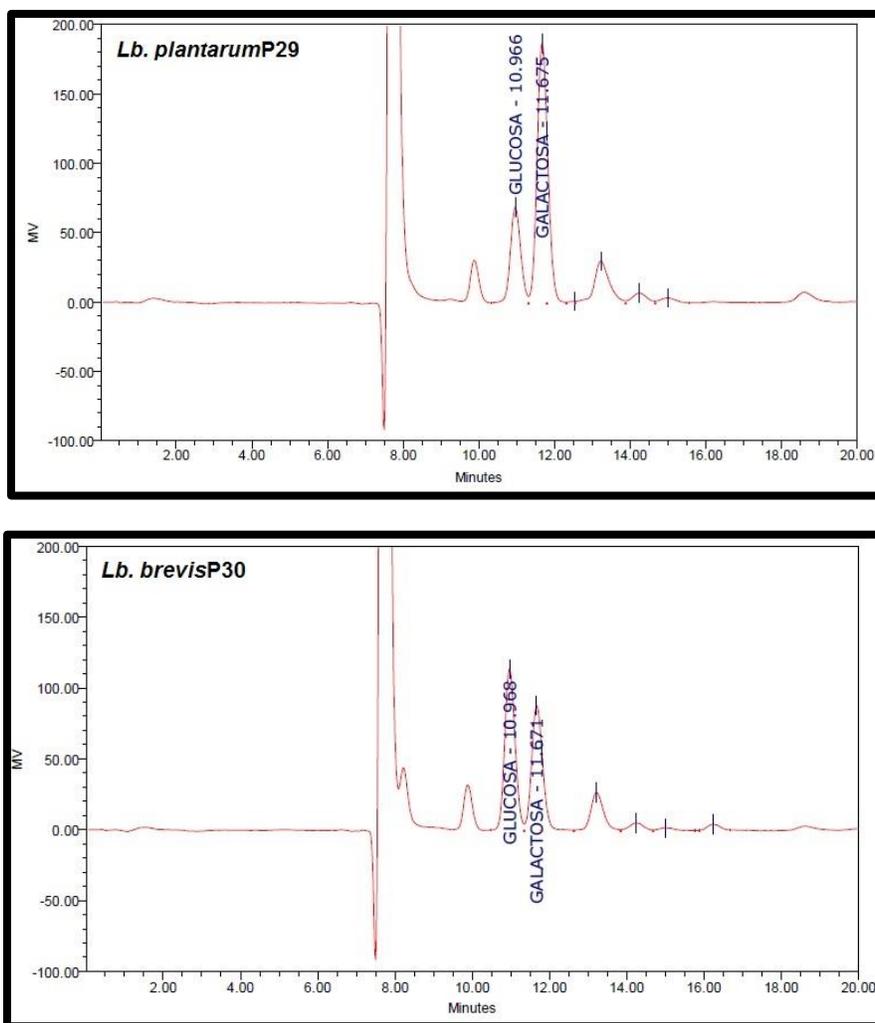


Figura 15.- Perfil cromatográfico de los productos de la hidrólisis ácida de los polímeros de *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30.

De acuerdo al perfil cromatográfico de ambos polímeros se puede concluir que son HePS conformados por los monosacáridos de glucosa y galactosa, además de un monosacárido con un tiempo de retención en columna de 13.5 min. Este tiempo de retención se comparó con estándares de D-fructosa (11.6 min) y L-ramnosa (12.39 min), sin resultar ser ninguno de los dos. Este tercer monómero posiblemente podría ser N-acetilgalactosamina. Esta hipótesis se basa en un trabajo por Tallon (2003), en el cual se aisló una cepa de *L. plantarum* a partir del rastrojo de maíz, la cual tiene la capacidad de producir un polímero en medio MRS de un peso molecular de 8.5×10^5 Da que en su composición química tiene glucosa, galactosa y N-acetilgalactosamina en una relación molar 3:1:1.

Los polímeros de tipo HePS en BAL usualmente están conformados en mayor proporción de los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa y L-ramnosa en diferentes concentraciones y en menor cantidad los monosacáridos acetilados (N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina), otros azúcares (fucosa y ribosa) y compuestos orgánicos e inorgánicos (ácido glucurónico, grupos acetilados, glicerol y fosfato) (Torino *et al* 2015; Ruas-Madiedo *et al.* 2002; Welman & Maddox 2003; De Vuyst *et al.* 2001).

Los perfiles cromatográficos entre los dos lactobacilos (P29 y P30) son muy similares al presentar los mismos tiempos de retención de los monosacáridos, la semejanza en estructura química de los dos polímeros podría deberse a la relación filogenética entre ambos microorganismos. En un estudio por Marshall *et al.* (2001) se determinó la estructura de los HePS de 9 cepas de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, reportando que las cepas con una estructura idéntica de EPS muestran una relación filogenética.

La determinación de los pesos moleculares de los polímeros de las cepas *Leuconostoc* se llevó a cabo mediante una hidrólisis total de estos con el uso de HCl (0.4 N) como catalizador de la hidrólisis ácida (121 °C, 35 min) y una cuantificación de la concentración de glucosa y fructosa antes y después de la hidrólisis. En la sección de Anexos se presentan las cromatografías de capa fina realizadas de los hidrolizados a diferentes concentraciones del ácido. A continuación, en la tabla 9 se presentan los grados de polimerización y el peso molecular de los polímeros del estudio.

Tabla 9.- Peso molecular y grado de polimerización (GP) de los polímeros sintetizados.

Polímero	PM promedio (kDa)	GP estimado
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> A63C	82.8	511.1
<i>L. mesenteroides</i> A63S	41.5	256.2
<i>L. citreum</i> A51C	41.5	256.2
<i>L. citreum</i> A51S	89.1	550.3
<i>L. kimchii</i> A1	17.6	108.9
<i>L. mesenteroides</i> P8C	40.1	247.6
<i>L. mesenteroides</i> P8S	39.7	245.4
<i>Lactobacillus platarum</i> P29	11.2*	-
<i>L. brevis</i> P30	9.9*	-

*: Los pesos moleculares de los polímeros P29 y P30 se determinaron por cromatografía de exclusión.

C: Polímeros sintetizados a partir de las glicosiltransferasas de la fracción celular.

S: Polímeros sintetizados a partir de las glicosiltransferasas de la fracción sobrenadante.

El peso molecular de las dextranas sintetizadas por las cepas de *Leuconostoc* en el presente trabajo muestra un rango de pesos moleculares entre 1.7×10^4 Da, correspondiente a la cepa *L. kimchii* A1, y 8.9×10^4 Da correspondiente al polímero sintetizado por la fracción celular de *L. mesenteroides* A63. El rango de valores obtenidos corresponden al peso molecular promedio de las dextranas reportadas en la bibliografía, siendo un rango de tamaños de $4 \times 10^4 - 6 \times 10^6$ Da (Ryan *et al.* 2015; Ruas-Madiedo *et al.* 2002).

Los HePS sintetizados por *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30 presentan tamaños de 1.1×10^4 Da y de 9×10^3 Da respectivamente. Tanto el peso molecular y la concentración de los HePS a comparación de los HoPS son muy bajos teniendo un rango de tamaños entre 1×10^4 a 6×10^6 Da y en condiciones óptimas de cultivo se pueden obtener concentraciones de 0.15 - 0.6 g/L (Patel *et al.* 2012). El microorganismo que lo sintetiza, el medio de cultivo, las condiciones de cultivo como temperatura, pH y la tensión de oxígeno disuelto son factores que pueden influir en la composición del HePS, su peso molecular y la variación de los enlaces glucosídicos (Patel *et al.* 2012).

Desde un punto de vista económico, se requeriría aumentar cien veces la producción de estos polímeros por BAL (10 - 15 g/L) para hacer factible el empleo de estos compuestos como aditivos en alimentos (Degeest *et al.* 2001). Investigaciones para el mejoramiento de los rendimientos de los HePS por BAL incluyen técnicas de cultivo, sea en cultivo continuo, fed-batch o en el empleo de ingeniería genética para la dirección del flujo de carbono hacia la biosíntesis de monosacáridos activados (Mozzi *et al.* 2003). En cuanto a técnicas de cultivo se ha reportado que las BAL mesófilas producen mayores cantidades de HePS en condiciones no óptimas para crecimiento celular; por ejemplo, el empleo de bajas temperaturas de crecimiento que tengan como consecuencia la disminución de la tasa de crecimiento celular que lleven a retrasar la biosíntesis de los polímeros de la pared celular, obteniendo como resultado mayores precursores disponibles para la síntesis de exopolisacáridos (Kumar *et al.* 2007). En estudios por Van der Berg *et al.*, (1995) se reporta que la conversión de azúcares en HePS es más eficiente a pH de 5.8 y a pH de 6.2 donde la fuente de carbono se convierte principalmente en biomasa. Mantener el pH alto puede dar como resultado una fase estacionaria más larga, lo cual puede producir que disminuya la síntesis de peptidoglicano y dar como resultado un aumento de la producción de HePS (Gassem *et al.* 1997).

8.4 Resonancia magnética nuclear de los HoPS de las cepas de *Leuconostoc*.

Como se estableció en los estudios de hidrólisis enzimática, las cepas de *Leuconostoc* producen un HoPS de tipo dextrana; por lo tanto, para continuar con la determinación de su estructura y conocer el porcentaje de ramificaciones que poseen estos EPS, se realizaron estudios de RMN de protón ^1H y carbono ^{13}C de los polímeros sintetizados. Los desplazamientos químicos de protón y carbono fueron asignados empleando el estudio de 2 dimensiones HSQC (Anexos). Los resultados obtenidos fueron comparados con la estructura reportada en la bibliografía para los polímeros de tipo dextranas sintetizadas por las bacterias *L. mesenteroides*, *L. citreum*, *L. kimchiii* y *Weissella* sp. (Bounaix *et al.* 2009; Maina *et al.* 2008; Seymour *et al.* 1976, 1979; Torres-Rodríguez *et al.* 2014; Uzochukwu *et al.* 2002). En la Tabla 10 y la Figura 16 se muestran los desplazamientos químicos obtenidos a partir de los espectros de protón ^1H de las dextranas.

El espectro de protón ^1H del polímero de tipo dextrana puede ser dividido en tres regiones principales: la región anomérica δ 4.5 - 5.5 ppm, la región de los protones del anillo δ 3.1 - 4.5 ppm y la región del alquilo δ 1.2 - 2.3 ppm. El desplazamiento químico de las señales que corresponden a los protones anoméricos de los monosacáridos que conforman la estructura del polímero son de gran relevancia para realizar una diferencia de enlaces en los carbohidratos (Purama *et al.* 2009; Vasanthakumari *et al.* 2015).

A partir de los resultados de resonancia de los espectros de protón de los polímeros sintetizados por las cepas de *Leuconostoc*, se concluye que todas las muestras se identificaron como HoPS de tipo dextranas sin evidencia de mezcla con otro polímero de estructura diferente. En los espectros de ^1H de todas las dextranas del presente estudio se observan los hidrógenos carbonilo de D-glucopiranososa (H-4) como una tripleta (*t*) en δ 3.46 ppm, H-2 se presenta como un doblete (*d*) en δ 3.53 ppm, H-3 se observa como un doblete (*dd*) en δ 3.66 ppm, H-5 en δ 5.86 ppm como un doblete (*d*), H-6 como un doblete en δ 3.94 ppm y finalmente en δ 4.99 ppm el doblete correspondiente al hidrógeno anomérico (H-1). Los HoPS de ambas fracciones (sobrenadante y asociada a la célula) de las cepas de *Leuconostoc* presentaron ramificaciones en su estructura observándose una diferencia en la intensidad de las señales con los desplazamientos químicos en δ 5.06, 5.13 y 5.27 ppm; la proporción de estas ramificaciones en su estructura difiere en cuanto a la especie de BAL que los sintetiza.

Tabla 10.- Desplazamientos químicos de los espectros de protón ¹H para las dextranas de las cepas: *L. kimchii* A1; *L. mesenteroides* A63; *L. citreum* A51; *L. mesenteroides* P8.

A1	A51 C	A51 S	A63 C	A63 S	P8 C	P8 S
5.27	5.27	5.26	5.27	5.27	5.27	5.27
					5.13	5.13
5.06		5.06			5.05	5.06
4.92	4.93	4.92	4.92	4.92	4.92	4.92
4.67	4.67	4.71	4.67	4.67	4.67	4.67
4.14	4.16	4.15	4.14	4.14	4.14	4.15
3.94	3.94	3.93	3.95	3.95	3.94	3.94
3.93		3.92			3.93	3.93
3.86	3.87	3.86			3.86	3.86
3.85	3.86	3.84	3.85	3.85	3.85	3.85
3.80	3.82	3.81	3.82	3.82	3.80	3.80
3.78	3.81		3.80	3.80	3.79	3.78
3.76	3.79	3.79		3.79		
3.71	3.77	3.78		3.76		
3.69	3.72	3.70	3.71	3.71	3.71	3.71
3.68	3.70	3.68	3.69	3.69	3.69	3.69
3.66	3.67	3.66	3.67	3.67	3.66	3.67
3.65		3.64	3.62	3.65	3.65	3.65
3.53	3.53	3.52	3.53	3.53	3.53	3.53
3.51	3.52	3.50	3.51	3.51	3.51	3.51
3.48	3.48	3.47			3.48	3.48
3.46	3.47	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46
3.45		3.44			3.45	3.45
3.41	3.42	3.41			3.41	3.41
3.40	3.40	3.39			3.39	3.39
3.38	3.38	3.37	3.39	3.39	3.38	
3.36	3.36		3.38	3.38	3.36	

S: Sobrenadante; C: Asociado a la célula

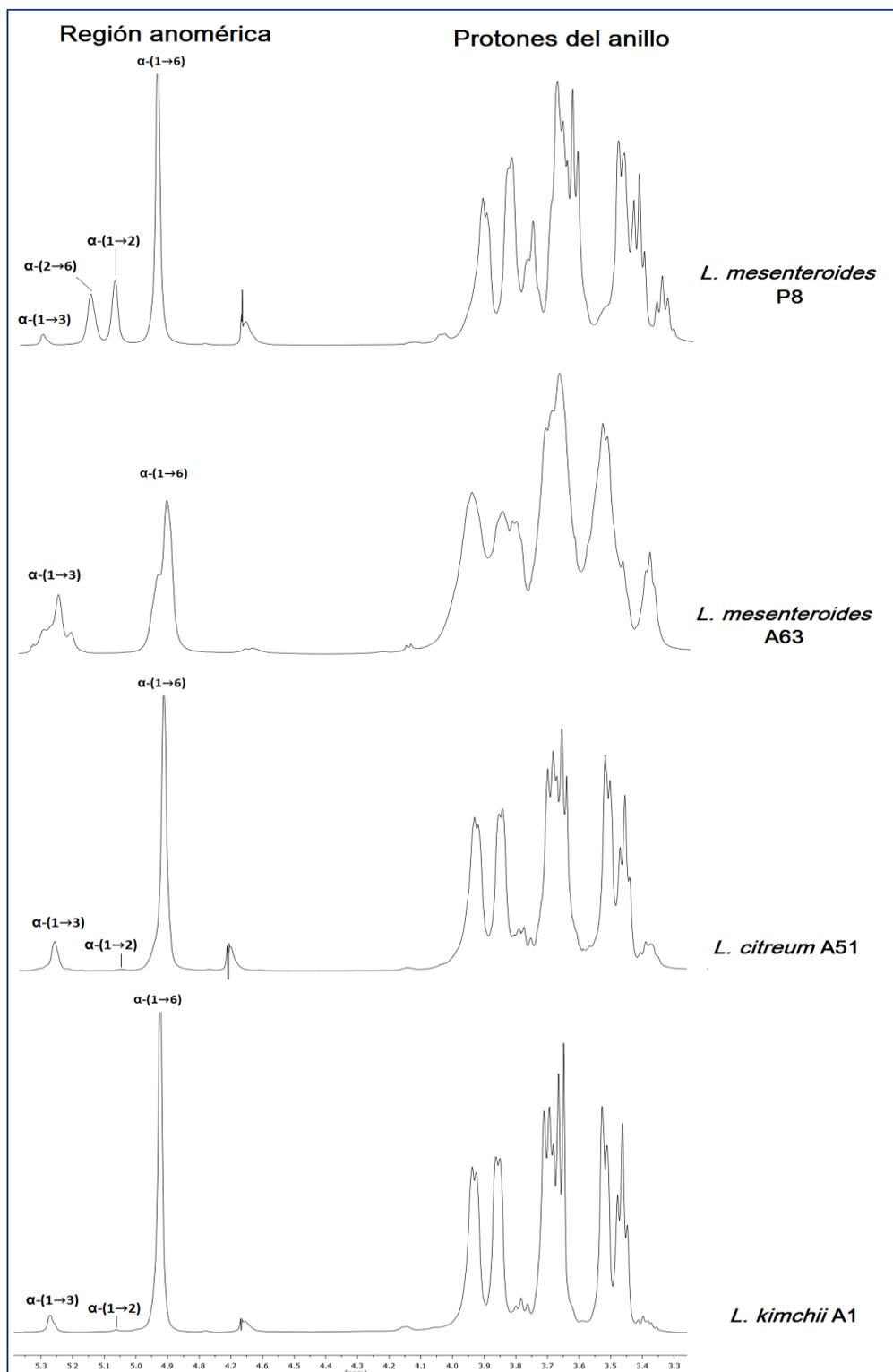


Figura 16.- Espectros de ^1H de las dextrans de las cepas *L. kimchii* A1; *L. mesenteroides* A63; *L. citreum* A51 y *L. mesenteroides* P8.

Los HoPS producidos por las enzimas glicosiltransferasas de la fracción sobrenadante y la fracción asociada a la célula de la cepa *L. mesenteroides* P8 fueron los que mostraron la mayor cantidad de ramificaciones al presentar señales con los desplazamientos químicos δ 5.06 ppm y 5.13 ppm, que corresponden a los protones del C1 de un residuo D-glucopiranosil y del C2 de otro residuo D-glucopiranosil en el enlace α -(1 \rightarrow 2) y una señal en δ 5.27 ppm correspondiente al protón anomérico del carbono en el enlace α -(1 \rightarrow 3) en su estructura. En comparación los polímeros sintetizados por la cepa de *L. mesenteroides* A63, aislada a partir de la muestra de aguamiel, corresponden a HoPS con una estructura menos ramificada al sólo presentar una señal con el desplazamiento químico de δ 5.27 ppm, el cual corresponde a una ramificación con enlace glucosídico α -(1 \rightarrow 3). La diferencia de estructura entre dextranas de la misma especie confirma lo reportado en los trabajos de Jeanes (1954) donde se realizó una determinación de 96 dextranas de diferentes especies de BAL, reportando que la estructura del HoPS depende de las condiciones de cultivo, la cepa productora, temperatura y concentración de sacarosa.

El polímero sintetizado por la fracción asociada a la célula de la cepa de *L. citreum* A51 corresponde a un HoPS de tipo dextrana con ramificaciones en α -(1 \rightarrow 3) al observarse una señal con el desplazamiento δ 5.27 ppm, mientras que la fracción sobrenadante produce un polímero más ramificado al presentar señales con los desplazamientos δ 5.27 ppm y 5.06 ppm correspondientes a las ramificaciones con enlaces α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 2) respectivamente. Esto sugiere que la cepa *L. citreum* A51 produce enzimas dextranacarasas con actividades distintas, ya que se ha reportado que la estructura del polímero depende de la enzima que los sintetiza (Leemhuis *et al.* 2013; Monsan *et al.* 2001). En una investigación por Bounaix *et al.*, (2009) se aisló una cepa *L. citreum* A7 a partir de una muestra de masas fermentadas, la cual sintetiza en su fracción sobrenadante un polímero con una proporción de enlaces α -(1 \rightarrow 6) del 71.6%, α -(1 \rightarrow 2) 27.45 % y α -(1 \rightarrow 3) 1.0%, el perfil de ramificaciones es similar a la fracción sobrenadante de la cepa de *L. citreum* A51 aislada del aguamiel.

Una de las cepas aisladas con menor actividad glicosiltransferasa en ambas fracciones durante su crecimiento celular fue la cepa de *L. kimchii* A1. Por esta situación, el polímero sintetizado fue recuperado a partir del medio de cultivo mediante una precipitación con etanol absoluto en una relación 3:1 (v/v) para concentrarlo y después poder liofilizarlo para su determinación estructural. En otras investigaciones, cuando la actividad

enzimática es muy baja para poder hacer una síntesis *in vitro* se opta por una recuperación del polímero a partir del fenotipo viscoso de colonia en la placa de Petri (Ruas-Madiedo *et al.* 2005). El polímero obtenido por esta cepa posee ramificaciones con enlaces glucosídicos α -(1→2) y α -(1→3), al presentar señales con desplazamientos químicos en δ 5.06 ppm y 5.27 ppm. El fenotipo viscoso que presenta *L. kimchii* A1 en medio sólido es muy particular en comparación con las demás cepas estudiadas, ya que se observa una colonia con un aspecto muy líquido (figura 11). Este fenómeno puede atribuirse a que el polímero que sintetiza *L. kimchii* A1 resultó ser el de mayor cantidad de enlaces α -(1→6) en su estructura. De acuerdo con la literatura, la solubilidad de este tipo de HoPS depende del tamaño del polímero, sus ramificaciones y la cantidad de estos tipos de enlace en su estructura (Naessens *et al.* 2005). No es la primera vez que se reporta la síntesis de este polímero por *L. kimchii* en esta bebida fermentada, existiendo una investigación previa por parte de Torres-Rodríguez *et al.*, (2014) donde se aisló dos cepas de *L. kimchii* EPSA y EPSB a partir de una muestra de pulque de la región de Morelos. La cepa EPSA sintetiza tanto en la fracción sobrenadante como en la fracción asociada a la célula un polímero de tipo dextrana con ramificaciones α -(1→2) y α -(1→3); mientras que la cepa EPSB en su fracción sobrenadante sintetiza un HoPS de tipo dextrana y en la fracción asociada a la célula sintetiza una mezcla de dextrana y levana.

En la tabla 11 y figura 17 se reportan los desplazamientos químicos obtenidos a partir de los espectros de carbono. En 1976 Seymour planteó a partir de experimentos de RMN con dextranas, la presencia de 4 regiones en los espectros de carbono de estos polímeros, estas regiones fueron confirmadas por experimentos posteriores en diferentes grupos de trabajo (Maina *et al.* 2008; Seymour *et al.* 1976; Uzochukwu *et al.* 2002):

1. La región δ 85 - 105 ppm, correspondiente a los carbonos anoméricos.
2. La región δ 75 - 85 ppm correspondiente a los carbonos C-2, C-3, C-4 y C-5 que están involucrados en las ramificaciones.
3. La región de δ 70 - 75 ppm, correspondiente a los carbonos C-2, C-3, C-4 y C-5.
4. La región de δ 60 - 70 ppm asociada a los átomos enlazados y no enlazados del carbono 6.

Los desplazamientos químicos de los espectros de ^{13}C de todos los polímeros de las especies de *Leuconostoc* aquí reportadas se encuentran en campo arriba de δ 102 ppm, lo cual indica que todos los glucanos en este estudio se encuentran unidos en

configuración alfa. La configuración alfa se presenta siempre en la región de δ 96 - 102 ppm (Seymour *et al.* 1976).

Los polímeros estudiados presentan una señal con mayor intensidad con el desplazamiento químico en δ 99.29 ppm, correspondiente al C1 unido en el enlace α -(1 \rightarrow 6). Una señal de igual intensidad se observa en la región campo arriba en δ 60 - 70ppm con un desplazamiento químico de δ 67.14 ppm que corresponde al C6 enlazado. La otra señal que se observa en esa región con un desplazamiento de δ 61.94 ppm corresponde a un C6 que no está involucrado en el enlace.

Tabla 11.- Desplazamientos químicos de ^{13}C para las dextranas producidas por las cepas: *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51 y *L. mesenteroides* P8.

A1	A51 C	A51 S	A63 C	A63 S	P8 C	P8 S
100.87	100.75	100.88	100.80	100.9	100.87	100.85
			99.92	99.38		
99.29	99.26	99.26	99.30	99.26	99.29	99.26
97.86		97.82			97.83	97.79
97.02		97.04			97.02	96.97
	81.72					
80.02	80.02	80.04	80.23	80.19	80.20	80.20
77.13		77.12			77.14	77.06
74.98	74.96	74.99	74.95	74.94	74.98	74.96
			74.67			
			74.52	74.53	74.49	74.45
			74.29	74.31		
			73.39	73.39	73.49	73.47
72.99	72.98	73.00	72.98	72.98	72.98	72.97
71.75	71.74	71.77	71.74	71.75	71.76	71.73
71.13	71.10	71.12	71.10	71.15	71.13	71.11
			70.87	70.88		
			68.19			
67.14	67.11	67.13	67.13	67.15	67.15	67.13
61.94	62.12	62.07	62.12	62.10	62.00	61.96

S: Sobrenadante; C: Asociado a la célula

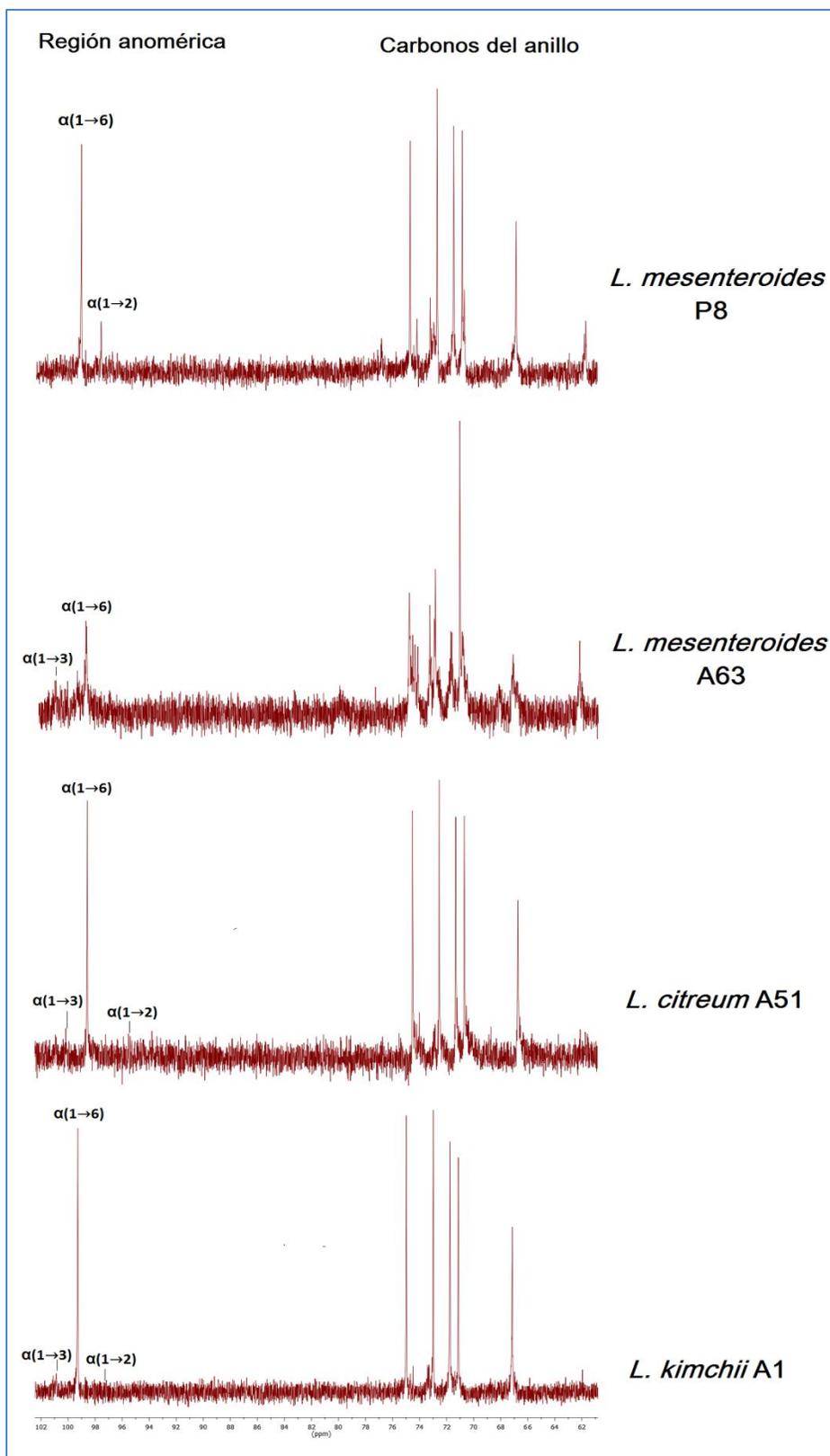


Figura 17.- Espectros de ^{13}C de las dextrans de las siguientes cepas: *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51 y *L. mesenteroides* P8.

Las dextranas analizadas en el presente trabajo presentan diferentes señales en la región δ 70 - 75 ppm del espectro de carbono ^{13}C , esta región corresponde a los carbonos C-1, C-2, C-3, C-4 y C-5. El carbono 2 del anillo de la glucosa presenta una señal con el desplazamiento químico de δ 72.99 ppm, el C-3 se observa en δ 74.98 ppm, C-4 en δ 71.13 ppm y el C-5 se observa en δ 71.75 ppm en todas las dextranas analizadas. En los polímeros que presentaron ramificaciones con enlaces α -(1 \rightarrow 3) se observa una señal en la región de campo bajo con un desplazamiento químico en δ 100.8 ppm que corresponde al carbón anomérico de esta ramificación. Las dextranas de la fracción sobrenadante de *L. kimchii* A1, *L. citreum* A51 y *L. mesenteroides* P8 presentaron ramificaciones con enlaces α -(1 \rightarrow 2), además de su ramificación α -(1 \rightarrow 3), lo que se corroboró con las señales en los desplazamientos δ 97 ppm y δ 97.8 ppm en sus respectivos espectros de carbono.

En los HoPS de tipo dextrana se ha observado que la intensidad de las señales en la región anomérica de los espectros ^1H es proporcional al número de carbonos que participan en el enlace, por lo que se puede realizar una estimación a partir de estas intensidades del porcentaje de ramificaciones en la estructura (Seymour *et al.* 1976). En la tabla 12 se reporta el porcentaje de cada tipo de enlace en la estructura de los polímeros estudiados.

Tabla 12.- Porcentaje del enlace glucosídico en las dextranas.

Polímero	α -(1 \rightarrow 6)	α -(1 \rightarrow 3)	α -(1 \rightarrow 2)	α -(1 \rightarrow 4)
<i>L. kimchii</i> A1	87.66	8.87	3.46	
<i>L. citreum</i> A51C	73.3	26.7		
<i>L. citreum</i> A51S	75.6	19.8	4.5	
<i>L. mesenteroides</i> A63C	77.78	22.23		
<i>L. mesenteroides</i> A63S	73	27		
<i>L. mesenteroides</i> P8C	70	6.8	22.2	
<i>L. mesenteroides</i> P8S	81.5	6.8	11.5	
<i>L. mesenteroides</i> B-512F*	95	5		
<i>L. mesenteroides</i> B-742*	87			13
<i>L. mesenteroides</i> B-1299*	66	7	27	
<i>S. mutans</i> G55*	13	87		

*Datos tomados de Monsan et al. (2001)

Los HoPS producidos por las cepas de *Leuconostoc* aisladas en este trabajo, tienen en mayor proporción enlaces α -(1→6), su valor está entre el 70 - 87 % del total de enlaces. De acuerdo con Jeanes (1954), quien realizó estudios sobre la estructura de las dextranas empleando el método de oxidación con peryodato, el porcentaje de enlaces α -(1→6) en un polímero de tipo dextrana puede variar entre el 50 - 97 % del total del número de enlaces glucosídicos. Las condiciones de cultivo, la cepa productora, la cantidad de sacarosa y la temperatura son variables que afectan significativamente al grado de ramificación en la estructura de las dextranas. En una investigación por Bounaix *et al.* (2009), se determinó la estructura de los polímeros sintetizados por 30 BAL aisladas a partir de una muestra de masas fermentadas, reportando diferentes estructuras de dextranas que presentaban en su estructura un porcentaje de 92.2 % - 99.1 % de enlaces α -(1→6) con participación de ramificaciones α -(1→3) de 0.4 - 39 %. En nuestro estudio todas las dextranas sintetizadas por las cepas *Leuconostoc* presentaron enlaces α -(1→3) en una cantidad de 6 - 27 % de su estructura. La mayor presencia de este tipo de ramificación se encuentra en los polímeros sintetizados por la enzima asociada a la fracción sobrenadante de la cepa *L. mesenteroides* A63.

Entre todas las especies productoras de dextrana, las cepas *L. mesenteroides* NRRL B512F y *L. mesenteroides* NRRL B-1299 han sido las más estudiadas y caracterizadas en la bibliografía. La dextrana de *L. mesenteroides* B512F contiene 95 % de enlaces α -(1→6) y 5 % de enlaces α -(1→3), siendo este un polímero soluble que imparte una alta viscosidad en soluciones. El HoPS producido por la cepa de *L. mesenteroides* B-1299 contiene 63 % de enlaces α -(1→6), 27 % de α -(1→2) y el 8 % α -(1→3), la presencia de las ramificaciones en el polímero ocasiona que su solubilidad disminuya. En el presente trabajo se reporta que las dextranas producidas en la fracción celular de la cepa de *L. mesenteroides* P8 son las que presentan mayor proporción de enlaces α -(1→2) con un 22 % en comparación con el EPS producido por la cepa de *L. kimchii* A1, que contiene en su estructura un 3.4 % de enlaces α -(1→2). Estudios reológicos contribuirían a conocer el efecto que tiene la cantidad de ramificaciones en estos polímeros y su viscosidad en soluciones acuosas.

El aislamiento de microorganismos que sinteticen dextranas con estructuras diversas, es importante ya que en la última década los EPS producido por las BAL han sido de gran interés para la industria agroalimentaria, lo cual abre un panorama para la innovación. Sumado a esto, varias especies de BAL han sido reconocidas con el estatus de GRAS por

la FDA y la categoría de QPS por la EFSA, facilitando la aplicación de estos polímeros como aditivos en la industria (Notararigo *et al.* 2012; Galle & Arendt 2014; Vettori *et al.* 2012). En esta investigación se presenta un acercamiento de la estructura de estos polímeros, pero es necesario realizar un estudio más detallado sobre su estructura para conocer el número de monómeros en la estructura base antes de una ramificación y la cantidad de unidades que conforman las ramificaciones así como las propiedades reológicas que presentan estos polímeros para poder guiar a un diseño de estas macromoléculas que permita controlar sus propiedades físicas como: la viscosidad y solubilidad las cuales están influenciadas por el tipo y cantidad de ramificaciones presentes en la estructura.

8.5 Zimogramas de la fracción celular y sobrenadante de las BAL-EPS.

En esta sección se tiene como objetivo presentar los zimogramas de las fracciones sobrenadantes y asociadas a la célula de las BAL-EPS aisladas en la muestra de aguamiel y pulque. Los zimogramas fueron realizados incubando los geles de proteína de la fracción sobrenadante y celular en un buffer de acetatos con sacarosa al 10 %. En la figura 18 y 19 se muestran los zimogramas obtenidos. Para este estudio se ocupó como control positivo (C+) la cepa *L. kimchii* EPSA que sintetiza en la fracción sobrenadante y asociada a la célula una dextranasa y como control negativo (C-) a la cepa de *E. coli* DH5 α de la cual se conoce que no expresa una glicosiltransferasa extracelular.

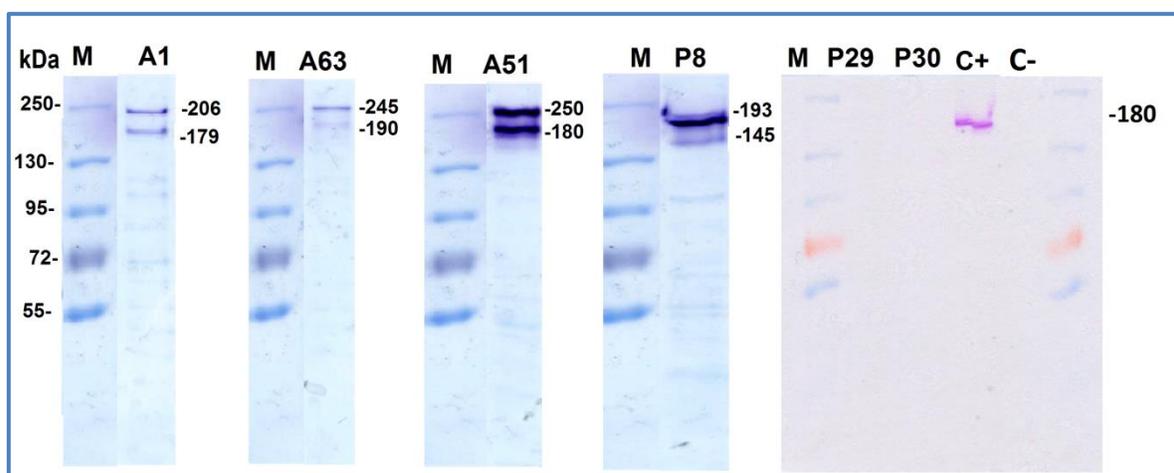


Figura 18.- Zimogramas de la fracción celular. *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51, *L. mesenteroides* P8, *L. plantarum* P29, *L. brevis* P30, C- *E. coli* DH5 α , C+ *L. kimchii* EPSA (Torres-Rodríguez *et al.* 2014).

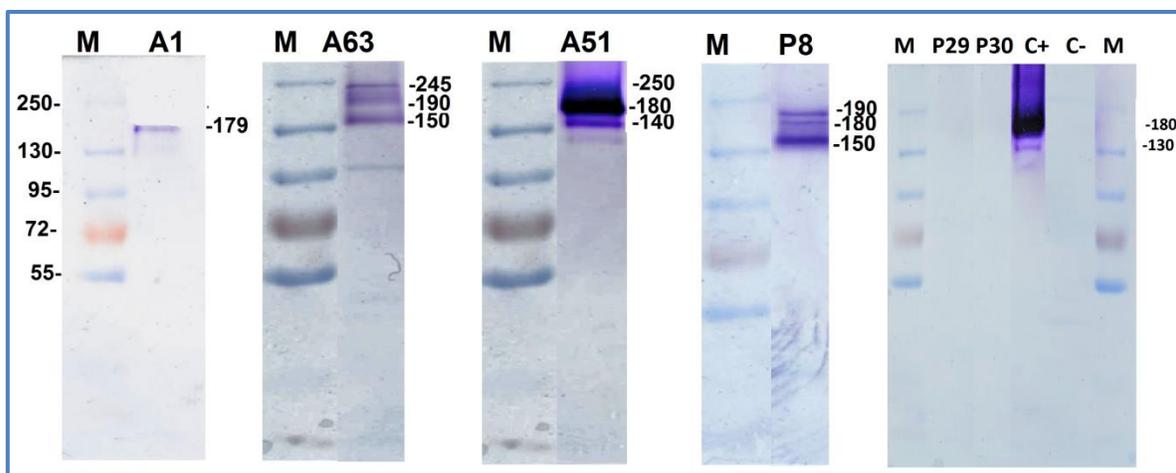


Figura 19.- Zimogramas de la fracción sobrenadante. *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51, *L. mesenteroides* P8; *L. plantarum* P29, *L. brevis* P30, C- *E. coli* DH5 α , C+ *L. kimchii* EPSA (Torres-Rodríguez et al. 2014).

Se analizaron las enzimas glicosiltransferasas asociadas a la célula y las del sobrenadante de cada una de las cepas de estudio mediante ensayos de actividad *in situ* en los zimogramas. La mayoría de las cepas productoras de dextrana presentan una proteína de tamaño de 180 kDa. En otros casos dependiendo del microorganismo se observan distintas bandas en un rango de 140 kDa a 250 kDa (figuras 18 – 19). Con los resultados de la caracterización química y resonancia magnética nuclear de los polímeros se puede afirmar que las enzimas responsables de la síntesis de los polímeros son de tipo dextranacarasa para las cepas *L. kimchii* A1, *L. citreum* A51, *L. mesenteroides* P8 y *L. mesenteroides* A63.

En la bibliografía se ha reportado con anterioridad que la enzima glicosiltransferasa de tipo dextranacarasa tiene una secuencia de aminoácidos aproximadamente 1527 residuos y presenta un peso molecular estimado de 170 kDa (Monsan *et al.* 2001). En los geles de proteínas se observan bandas de peso similar en ambas fracciones (celular y sobrenadante), lo que indica que las enzimas presentes en las dos fracciones sean probablemente del mismo tipo en cada uno de los casos. En un estudio por Bounaix *et al.*, (2010) se observó un comportamiento similar, en esa investigación se aislaron BAL del género *Weissella* que presentaban una expresión de enzimas dextranacarasas con un tamaño aproximadamente de 180 kDa. Estudios de secuenciación y estructura de proteínas podrían resolver que tan conservados están los genes *gft* que codifican a las enzimas glicosiltransferasas entre los géneros *Leuconostoc*, *Weissella* y *Streptococcus*.

Las actividades enzimáticas de las glicosiltransferasas en el medio de cultivo durante el crecimiento celular son variadas entre la fracción celular y la fracción sobrenadante, probablemente un factor que puede estar causando la variación de la actividad enzimática sumado a las condiciones de fermentación (pH, temperatura, etc.) es la pérdida de la estructura nativa debido a una posible proteólisis de la enzima en el medio. Esta hipótesis puede corroborarse en los zimogramas de la fracción sobrenadante, en los que se presentan más bandas de distintos peso moleculares.

La variedad de pesos moleculares puede deberse a la acción de enzimas proteolíticas en el sobrenadante o a una autoproteólisis, ambos fenómenos han sido estudiados por diferentes grupos de trabajo. En un estudio por Argüello-Morales *et al.* (2005) se estudió la producción simultánea de proteasas y dextransacarasas de la cepa *L. mesenteroides* B512F reportando una disminución del peso molecular de la enzima precursora, siendo esta de 170 kDa, hasta obtener dos formas activas de menor tamaño, una de 155 kDa y otra de 129 kDa. Esta disminución se le atribuyó a la acción proteolítica de diferentes proteasas presentes en el sobrenadante. El fenómeno de autoproteólisis ha sido estudiado por Morales-Arrieta *et al.* (2006), quienes reportaron que durante la expresión heteróloga de un gen que codifica una fructosiltransferasa en un microorganismo modelo libre de proteasas, se presentaron bandas de diferente tamaño con actividad *in situ* en los zimogramas realizados. La presencia de estas bandas sugiere que la propia enzima se *autoproteolisa*, teniendo como resultados formas activas de la misma enzima con diferentes pesos moleculares.

En las cepas de *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30 no se observó ninguna presencia de enzimas glicosiltransferasas en los zimogramas. Este resultado confirma que la síntesis de los polímeros por estas cepas es mediante la acción de distintas enzimas en el citoplasma y es el polímero el que se exporta al medio extracelular (modelo propuesto en la figura 1) (Jolly & Stinglee 2001). Cabe señalar que la polimerización en el citoplasma es mediada por glicosiltransferasas que utilizan como sustrato monosacáridos activados, en el presente estudio se utilizó sacarosa para los experimentos de los zimogramas, ya que este disacárido es el sustrato reportado para las enzimas glicosiltransferasas extracelulares de BAL (Chellapandian *et al.* 1998; Kitaoka & Robyt 1999; Monsan *et al.* 2001; Mozzi *et al.* 2006).

9. Conclusiones

La concentración de BAL en el aguamiel fue de 1.5×10^6 UFC/mL y en el pulque fue 1.7×10^4 UFC/mL. La relación de BAL-EPS en aguamiel es del 40% y en el pulque es del 70% con respecto a la concentración total de bacterias lácticas. La presencia de BAL-EPS en el aguamiel podría indicar que la bioconversión de sacarosa en polímeros puede estar sucediendo después de la castración del maguey.

El método de análisis de diversidad por fenotipo viscoso de colonia, permitió aislar las BAL de las especies *Leuconostoc citreum*, *L. kimchii*, *L. mesenteroides* en aguamiel y *L. mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* en pulque. Reportando por primera vez las bacterias *L. citreum*, *L. brevis*, *L. plantarum* ser productoras de EPS en esta bebida.

Las bacterias identificadas como *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* P8, *L. mesenteroides* A63 y *L. citreum* A51 presentaron actividad glicosiltransferasa en la fracción sobrenadante y celular. Siendo la cepa de *L. citreum* A51 la que presentó mayor actividad específica en la fracción sobrenadante (0.70 U/mgDWC) y celular (0.45 U/mgDWC) en comparación con las demás cepas. Las cepas *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30 no mostraron actividad glicosiltransferasa en la fracción sobrenadante ni en la fracción celular.

Las cepas *Leuconostoc* productoras de dextranas sintetizan enzimas glicosiltransferasas de alto peso molecular de un rango de 140 a 250 kDa, la mayoría de las cepas presentan una proteína de tamaño de 180 kDa. La presencia de enzimas del mismo tamaño en la fracción sobrenadante y en la fracción celular indica posiblemente que sea la misma enzima en ambos casos.

Los EPS de las especies de *Leuconostoc* aisladas en este trabajo son de tipo dextrana, presentando una configuración de enlace α -(1→6) entre 70 - 87 % de su estructura y ramificaciones en α -(1→2) 3.4 - 22 %, α -(1→3) 6.8 - 27%. Los polímeros de ambas fracciones de la cepa de *L. mesenteroides* P8 presentaron ser los de mayor cantidad de ramificaciones α -(1→2) 11.5 - 22.2 % y α -(1→3) 6.8 %. *L. plantarum* P29 y *L. Brevis* P30 sintetizan un HePS conformado por los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa en una relación 1:4 para el EPS de la cepa P29 y 1:1.2 para el HePS de la cepa P30.

10. Perspectivas

Realizar zimogramas de actividad de las cepas *L. mesenteroides* P8, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51 y *L. kimchii* A1 en aguamiel y pulque, para conocer si existe la misma expresión de proteínas glicosiltransferasas en comparación con el medio de cultivo MRS que se utilizó en el presente trabajo.

Realizar un estudio más detallado de la estructura de los EPS de las cepas *L. kimchii* A1, *L. citreum* A51, *L. mesenteroides* P8 y *L. mesenteroides* A63 con la finalidad de conocer cual dextrana podría tener una finalidad industrial. Entre estos estudios se propone también realizar experimentos reológicos para conocer la relación entre estructura y viscosidad de estos polímeros.

Determinar la naturaleza química del tercer monómero presente en la estructura química de los HePS de las especies de *L. plantarum* P29 y *L. brevis* P30 mediante estudios de resonancia magnética nuclear. Conociendo su composición monomérica de los dos HePS sería recomendable realizar estudios sobre su estructura: el orden en el cual están enlazados los monosacáridos en su estructura, la configuración de enlace y el porcentaje de ramificaciones.

Estudiar el mecanismo de síntesis de estos HePS en los lactobacilos P29 y P30, el modelo aquí propuesto es mediante una síntesis citoplasmática empleando otro tipo de glicosiltransferasas.

En un estudio más general sobre la microbiota del pulque, sería recomendable estudiar el efecto de los factores ambientales: variedad de planta, maduración de la planta, temporada del año de producción y condiciones de fermentación en la diversidad microbiana total o la productora de EPS. Los resultados presentados en el trabajo sugieren que tanto en el aguamiel y el pulque de diferentes regiones geográficas comparten especies en su microbiota.

11. Bibliografía

Anwar, M. A., Kralj, S., Van Der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2008). The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (11): 3426–3433.

Argüello-Morales, M., Sánchez-González, M., Canedo, M., Quirasco, M., Farrés, A., López-Munguía, A. (2005). Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87 (2): 131–41.

Backstrand, J. R., Allen, L. H., Black, A. K., de Mata, M., Pelto, G. H. (2002). Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 76 (1): 156–164.

Backstrand, J. R., Allen, L. H., Martinez, E., Pelto, G. H. (2001). Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Public Health Nutr*. 4 (4): 883–891.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 29 (1): 54–66.

Bajpai, V.K., Rather, I.A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S.C., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Lim, J., Park, Y.H. (2015) Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11(1): 1-24.

Bivolarski, V., Vasileva, T., Dzhambazov, B., Momchilova, A., Chobert, J.-M., Ivanova, I., Iliev, I. (2014). Characterization of glucansucrases and fructansucrases produced by wild strains *Leuconostoc mesenteroides* URE13 and *Leuconostoc mesenteroides* LM17 grown on glucose or fructose medium as a sole carbon source. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 27 (3): 3811–3820.

Boirivant, M., Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol*. 23 (6): 679–692.

Borneman, J., Skroch, P. W., O’Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J., Triplett, E. W. (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (6): 1935–1943.

Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (22): 10889–97.

- Bounaix, M.S., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C. (2010). Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 144 (1): 1–9.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (9): 3877–3886.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods: a world perspective. *Food Research International*. 27 (3): 253–257.
- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 28 (4): 281–370.
- Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M., Lopez-Munguia, A. (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from ' pulque ', a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21 (1–2): 51–56.
- Cook, P. E. (1994). Fermented foods as biotechnological resources. *Food Research International*. 27 (3): 309–316.
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R., Evershed, R. P. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (39): 14223–8.
- Cruz-Guerrero, A. E., Olvera, J. L., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (2005). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22 (2): 115–117.
- Davies, G.J., Gloster, T.M., Henrissat, B.(2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*. 15(6): 637-645.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vanningelgem, F., Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11 (9): 687–707.
- Degeest, B., Vanningelgem, F., De Vuyst, L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11 (9): 747–757.
- Dols, M., Remaud-simeon, M., Willemot, R. E. N., Vignon, M., Monsan, P. F. (1997). Characterization of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B- 1299. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 62 (June): 47–59.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel Flores, G., Matus Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque fermentation. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology (Vol II, pp. 691–706). CRC Press.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (2): 126–134.

Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7 (June): 1–18.

Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 235 (2): 273–9.

Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe-Oliveras, P., Ulloa, M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17 (August): 557–560.

Felsenstein, J. (1989) Phylip-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*. 5 (1):164-166

Fleet, G. H. (1999). Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 50 (1–2): 101–117.

Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E. (2016). Fermented foods in health and disease prevention. (1st ed.). Academic Press Oxford.

Galle, S., Arendt, E. K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54 (7): 891–901.

Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M. G., Arendt, E. K. (2012). Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*. 155 (3): 105–112.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. 2 (1): 106–117.

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

Giraffa, G.(2004).Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. 28 (2): 251–260.

Iliev, I., Ivanova, I., Ignatova, C. (2014). Glucansucrases from lactic acid bacteria (Lab). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 20 (3): 15–20.

INAFED (2016). Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Enciclopedia de los Municipios, disponible en <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM13hidalgo/municipios/13008a.html>

Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A.D., Iwata, S. (2011). Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*. 408 (2): 177–186.

Jeanes, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J.E., Fisher, B.E., Tsuchiya, H.M., Rist, C.E. (1954). Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (20): 5041–5052.

Jolly, L., Stinglele, F. (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11 (9): 733–745.

Kim, J., Chun, J., Han, H.(2000). *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(1): 1915-1919.

Kitaoka, M., Robyt, J. F. (1999). Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase : kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentrations. *Carbohydrate Research*. 320 (1): 183–191.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, E., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (4): 1990–1995.

Korakli, M., Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71 (6): 790–803.

Krajl, S., Van Geel-Schutten, G. H., Van Der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2003). Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in *Lactobacillus* strains. *Biocatalysis and Biotransformation*. 21 (4–5): 181–187.

Kreyenschulte, D., Krull, R., Margaritis, A. (2014) Recent advances in microbial biopolymer production and purification. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34(1): 1-15.

Kumar, A. S., Mody, K., Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - A perception. *Journal of Basic Microbiology*. 47 (2): 103–117.

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*. 8 (7): 1037–52.

Lazic, M. L., Veljkovic, V. B., Vucetic, J. I., Vrvic, M. M. (1993). Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme and Microbial Technology*. 15 (4): 334–338.

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*. 163 (2): 250–72.

London, L. E. E., Chaurin, V., Auty, M. A. E., Fenelon, M. A., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C. (2015). Use of *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, an exopolysaccharide-producing strain, positively influences the techno-functional properties of yoghurt. *International Dairy Journal*. 40 (1): 33–38.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (May): 265–275.

Lynch, K. M., McSweeney, P. L. H., Arendt, E. K., Uniacke-Lowe, T., Galle, S., Coffey, A. (2014). Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 34 (1): 125–134.

Maina, N. H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L. (2008). NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydrate Research*. 343 (9): 1446–1455.

Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189 (4): 1199–1208.

Makarova, K. S., Slesarev, A., Wolf, Y. I., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawstone, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O’Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (42): 15611–6.

Malang, S. K., Maina, N. H., Schwab, C., Tenkanen, M., Lacroix, C. (2015). Characterization of exopolysaccharide and rropy capsular polysaccharide formation by *Weissella*. *Food Microbiology*. 46 (Agust): 418–427.

Marshall, E., Mejia, D. (2012). Traditional fermented food and beverages for improved livelihoods. FAO Diversification booklet 21. Retrieved from [http://search.proquest.com/docview/1288988266?accountid=13042&nhttp://oxfordsfx.hosted.exlibrisgroup.com/oxford?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:book&genre=book&sid=ProQ:International+Bibliography+of+the+Social+Sciences+\(IBSS\)&atitle=&](http://search.proquest.com/docview/1288988266?accountid=13042&nhttp://oxfordsfx.hosted.exlibrisgroup.com/oxford?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:book&genre=book&sid=ProQ:International+Bibliography+of+the+Social+Sciences+(IBSS)&atitle=&)

Marshall, V. M., Laws, A. P., Gu, Y., Levander, F., Rastrom, P., De Vuyst, L., Degeest, B., Vaningelgem, F., Dunn, H., Elvin, M. (2001). Exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria cluster into groups according to their EPS structure. *Letters in Applied Microbiology*. 32 (6): 433–437.

Mårtensson, O., Dueñas-Chasco, M., Irastorza, a., Öste, R., Holst, O. (2003). Comparison of growth characteristics and exopolysaccharide formation of two lactic acid bacteria strains, *Pediococcus damnosus* 2.6 and *Lactobacillus brevis* G-77, in an oat-based, nondairy medium. *LWT - Food Science and Technology*. 36 (1): 353–357.

Monchois, V., Willemot, R. M., Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure function relationships. *FEMS Microbiology Reviews*. 23 (1): 131–151.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11(1): 675–685.

Mora, D., Arioli, S., Compagno, C. (2013). Food environments select microorganisms based on selfish energetic behavior. *Frontiers in Microbiology*. 4 (Nov): 1–6.

Morales de León, J., Bourges, H., Camacho, M. E. (2005). Amino acid composition of some Mexican foods.

Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A., Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*. 376 (1–2): 59–67.

Morris, G., Harding, S. (2009). Polysaccharides, Microbial. In Moselio (Ed.), *Encyclopedia of microbiology* (3rd ed., pp. 482–494). Academic Press Oxford.

Moscovici, M. (2015) Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. (Sep): 1-11.

Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. (2003). UDP-galactose 4-epimerase: A key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (2): 175–183

Mozzi, F., Vanningelgem, F., Hebert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M. R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6): 4431–4435.

Muñoz, I.G. (2008). Caracterización de la hidrólisis enzimática de fructanas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos.

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc dextranucrase* and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80 (8): 845–860.

Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. L., de Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Aznar, R., López, P., Prieto, A. (2012). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 93 (1): 57–64.

Olivares-illana, V., López-Munguía, A., Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*. 185 (12): 3606–3612.

Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dormer, M., Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(10): 3682–3687.

Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 22(4): 275–281.

Orla-Jensen, S. (1919) *The Lactic Acid Bacteria*. Host and Son, Copenhagen.

Page, R.D.M. (1996). Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12 (4):357-358

Papadimitriou, K., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015). How microbes adapt to a diversity of food niches. *Current Opinion in Food Science*. 2: 29–35.

Park, J.-M., Yang, C.-Y., Park, H., Kim, J.-M. (2014). Development of a genus-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Leuconostoc* species in kimchi. *Food Science and Biotechnology*. 23(2): 511–516.

Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 52(1): 3–12.

Ross, P., R., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79(1–2): 3–16.

- Pedersen, M.B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petir, M.A., Gruss, A. (2012). Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3(1): 37-58
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. 292 (April): 504–507.
- Pijning, T., Anwar, M. A., Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*. 412(1): 80–93.
- Purama, R. K., Goswami, P., Khan, A. T., Goyal, A. (2009). Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate Polymers*. 76(1): 30–35.
- Purama, R. K., Goyal, A. (2008). Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Bioresource Technology*. 99 (9):3635–42.
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P.(2011). Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*. 166(2): 99 – 1010.
- Rastall, R.A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *The Annual Review of Food Science and Technology*. 1(1): 305–339.
- Raynaud, J., Choquenot, B., Marie, E., Dellacherie, E., Nouvel, C., Six, J.L., Durand, A.(2008) Emulsifying properties of biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. *Biomacromolecules* 9(3): 1014-1021
- Rodas, A. M., Ferrer, S., Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26(1): 412–422.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12(2–3): 163–171.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct*. 6 (3): 679–693.
- Sanchez-Marroquin, A., Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1(3): 246–249.

- Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T., Fadahunsi, I. F., Afolabi, R. O. (2002). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria. *European Food Research and Technology*. 214 (5): 405–407.
- Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*. 6 (May): 1–24.
- Secretaría de Economía (1972a). *Aguamiel Normas Mex. Vigente*. Disponible en <http://www.economia-nmx.gob.mx/normasmx/detallenorma.nmx clave NMX-V-022-1972>
- Secretaría de Economía (1972b). *Pulque manejado a granel. Normas Mex. Vigente*. Disponible en <http://www.economia-nmx.gob.mx/normasmx/detallenorma.nmx clave NMX-V-037-1972>
- Seymour, F. R., Knapp, R. D., Bishop, S. H. (1976). Determination of the structure of dextran by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 51 (1):179–194.
- Seymour, F. R., Knapp, R. D., Bishop, S. H. (1979). Correlation of the structure of dextrans to their ¹H-N.M.MR Spectra. *Carbohydrate Research*. 74 (1): 77–92
- Soni, S., Dey, G. (2014). Perspectives on global fermented foods. *British Food Journal*. 116 (11): 1767–1787.
- Sumner, J. B., Howell, S. F. (1935). A method for determination of saccharase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 108 (1): 51–54.
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*. 154 (10): 705–712.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR):1-28.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10): 2731–2739.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. a., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (2): 945–952.
- Tingirikari, J. M. R., Kothari, D., Goyal, A. (2014). Superior prebiotic and physicochemical properties of novel dextran from *Weissella cibaria* JAG8 for potential food applications. *Food & Function*. 5 (9): 2324–2330.

Torino, M. I., Valdez, G. F. De, Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*. 6 (Apr): 834.

Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca Morales, R., López-Munguía, Bolívar, F., Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*. 3 (1): 583-597

Uzochukwu, S., Balogh, E., Loeffler, R. T., Ngoddy, P. O. (2002). Structural analysis by ¹³C- nuclear magnetic resonance spectroscopy of glucan extracted from natural palm wine. *Food Chemistry*. 73 (1):225-233.

Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., Montville, T. J. (2012). The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the mexican highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 4 (2): 140–144.

Van Den Berg, D., Robijn, G. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (8): 2840–2844.

Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., de Valdez, G. F., De Vuyst, L. (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *International Journal of Food Microbiology*. 118 (3): 250–8.

Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M. R., Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50 (1): 697–703.

Van Hijum, S. a F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 70 (1): 157–76.

Van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*. 150 (3): 621–630.

Van Hijum, S. A. F. T., Van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (9): 4390–4398.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & Vuyst, L. De. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2): 900–912.

Vasanthakumari, D. S., Harikumar, S., Beena, D. J., Pandey, A., Nampoothiri, K. M. (2015). Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a newly isolated *Weissella cibaria*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176(2): 440–453.

Vasileva, T., Iliev, I., Amari, M., Bivolarski, V., Bounaix, M.-S., Robert, H., Morel, S., Rabier, P., Ivanova, I., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., Gabriel, V. (2012). Characterization of glycosyltransferase activity of wild-type *Leuconostoc mesenteroides* strains from Bulgarian fermented vegetables. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168(3): 718–730.

Veljkovic, V. B., Lazic, M. L., Rutic, D. J., Jovanovic, S. M., Skala, D. U. (1992). Effects of aeration on extracellular dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(8): 665–668.

Ventura, M., Casas, I. a, Morelli, L., Callegari, M. L. (2000). Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Systematic and Applied Microbiology*. 23 (4): 504–509.

Vettori, M. H. P. B., Franchetti, S. M. M., Contiero, J. (2012). Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextransucrase. *Carbohydrate Polymers*. 88(4): 1440–1444.

Von Wright, A., Axelsson, L. (2011). Lactic Acid Bacteria: An introduction. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 1–16.

Welman, A. D., Maddox, I. S., Archer, R. H. (2003). Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*. 95(6): 1200–1206.

Wolfe, B. E., Dutton, R. J. (2015). Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*. 161(1): 49–55.

Xu, J., Zhang, J. (2016) Bacterial glucans: production, properties, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(21): 9023 – 9036.

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(3): 1121–1135.

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*. 54(1): 270–275.

12. Anexos

En la tabla 13 se muestran las fotografías de los fenotipos únicos de colonia viscosa seleccionados de cada grupo del dendrograma del pulque

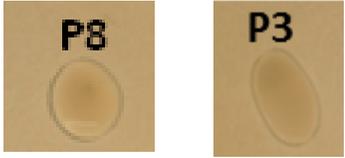
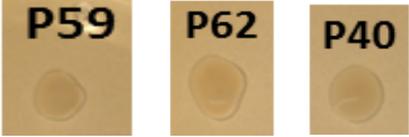
Grupo	Fenotipo
Grupo I	
Grupo II	
Grupo III	
Grupo IV	

Tabla 13.- Fenotipos únicos de colonia viscosa de cada grupo del dendrograma del pulque.

En la tabla 14 se muestran las fotografías de los fenotipos únicos de colonia viscosa seleccionados de cada grupo del dendrograma del aguamiel

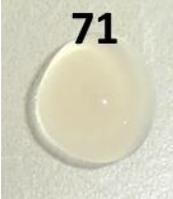
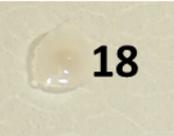
Grupo	Fenotipo
Grupo I	
Grupo II	 
Grupo III	       
Grupo IV	  

Tabla 14.- Fenotipos únicos de colonia viscosa de cada grupo del dendrograma del aguamiel.

Resultados del análisis de secuencia

Tabla 15.- Resultados del análisis con el algoritmo BLAST de las secuencias del ADNr 16S de las cepas BAL-EPS del aguamiel con la base de datos del NCBI.

Secuencia	Alineamiento en BLAST	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	No. Acceso
<i>Leuconostoc kimchii</i> A1	<i>L. kimchii</i> cepa GJ2	2614	2614	98%	0.0	99%	FJ040198.2
<i>Leuconostoc citreum</i> A51	<i>L. citreum</i> cepa gz-71	2619	2619	99%	0.0	99%	HF562952.1
<i>Leuconostoc citreum</i> A80	<i>L. citreum</i> cepa JCM9698	2673	2673	98%	0.0	99%	LC096222.1
<i>L. mesenteroides</i> A78	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2481	2481	97%	0.0	98%	KY233187.1
<i>L. mesenteroides</i> A71	<i>L. mesenteroides</i> cepa M-17	2545	2545	99%	0.0	99%	JQ517278.1
<i>L. mesenteroides</i> A68	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2471	2471	97%	0.0	99%	KY233187.1
<i>L. mesenteroides</i> A58	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2483	2483	99%	0.0	98%	KY233187.1
<i>L. mesenteroides</i> A57	<i>L. mesenteroides</i> cepa M-17	2481	2481	98%	0.0	98%	JQ517278.1
<i>L. mesenteroides</i> A38	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2464	2464	97%	0.0	98%	KY233187.1
<i>L. mesenteroides</i> A18	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2516	2516	96%	0.0	98%	KY233.187.1
<i>L. mesenteroides subsp. dextranicum</i> A64	<i>L. mesenteroides subsp. dextranicum</i> cepa JCM 9700	2459	2459	97%	0.0	98%	LC096223.1
<i>L. mesenteroides subsp. dextranicum</i> A63	<i>L. mesenteroides subsp. dextranicum</i> cepa JCM 9700	2483	2483	96%	0.0	98%	LC096223.1

<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A60	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> cepa JCM 9700	2514	2514	98%	0.0	98%	LC096223.1
<i>L. mesenteroides</i> A53	<i>L. mesenteroides</i> cepa HL2	2590	2590	98%	0.0	99%	KY233187.1

Tabla 16.- Resultados del análisis con el algoritmo BLAST de las secuencias del ADNr 16S de las cepas BAL-EPS del pulque con la base de datos del NCBI.

Secuencia	Alineamiento en BLAST	Max score	Total score	Query cover	E value	Identidad	No. Acceso
<i>L. mesenteroides</i> P8	<i>L. mesenteroides</i> cepa MPL24	1962	1962	99%	0.0	99%	KF697619.1
<i>Lactobacillus brevis</i> P30	<i>Lactobacillus brevis</i> cepa gp105	2691	2691	99%	0.0	99%	KM495930.1
<i>Lactobacillus plantarum</i> P29	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa gp87	2693	2693	99%	0.0	99%	KM495890.1
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> P59	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> cepa CCMMB1134	2625	2625	98%	0.0	99%	KF879176.1
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> P62	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> cepa CCMMB1134	2675	2675	98%	0.0	99%	KF879176.1
<i>L. mesenteroides</i> P3	<i>L. mesenteroides</i> cepa LOCK 0986	2418	2418	100%	0.0	98%	KP773468.1
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> P40	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> cepa CCMMB1134	2543	2543	99%	0.0	99%	KF879176.1

Hidrólisis ácida de los polímeros

Se realizó una hidrólisis ácida de las dextranas utilizando gradiente de concentración de ácido clorhídrico para determinar las condiciones óptimas para conseguir una hidrólisis total del polímero de dextrana. El ensayo se realizó con dos polímeros, el de *L. citreum* A51 (Figura A) y el de *L. mesenteroides* P8 (Figura 20). La hidrólisis se desarrolló a una temperatura de 121 °C por 35 min empleando diferentes concentraciones de HCl.

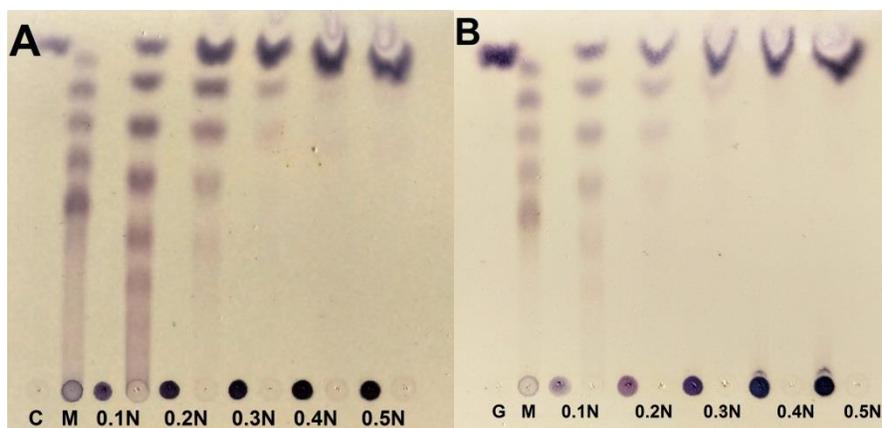


Figura 20.- Hidrólisis ácida de las dextranas sintetizadas por *L. citreum* A51 (A) y *L. mesenteroides* P8 (B). G. Glucosa; M. Maltodextrina. Diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (0.1 N, 0.2 N, 0.30 N, 0.4 N, 0.5 N)

En ambos polímeros se observa que al aumentar la concentración del catalizador, se lleva a cabo una hidrólisis completa del polímero. Esto se observa en ambas placas al ya no presentar polímero en el punto de aplicación y no tener subproductos de otro peso molecular.

Espectros de 2 dimensiones HSQC de las dextranas.

A continuación, se presenta los espectros de dos dimensiones (HSQC) de las dextranas de *L. kimchii* A1, *L. mesenteroides* P8, *L. mesenteroides* A63, *L. citreum* A51.

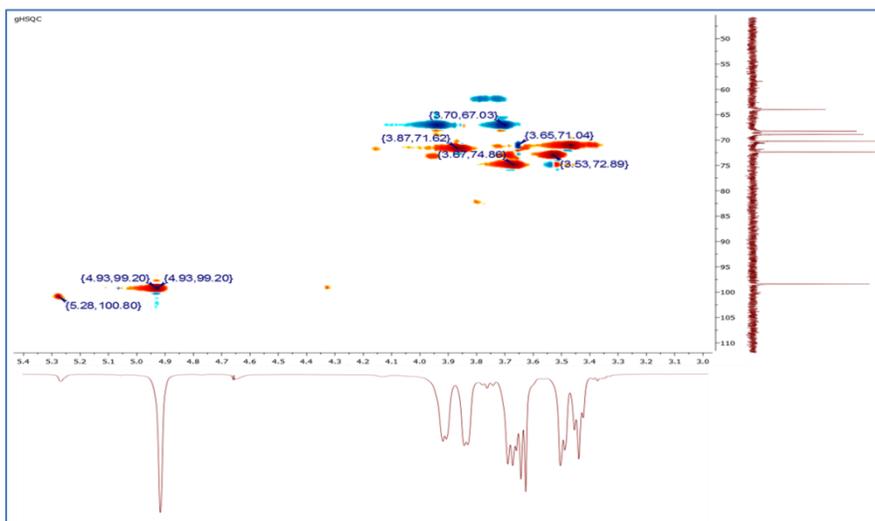


Figura 21.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. kimchii* A1

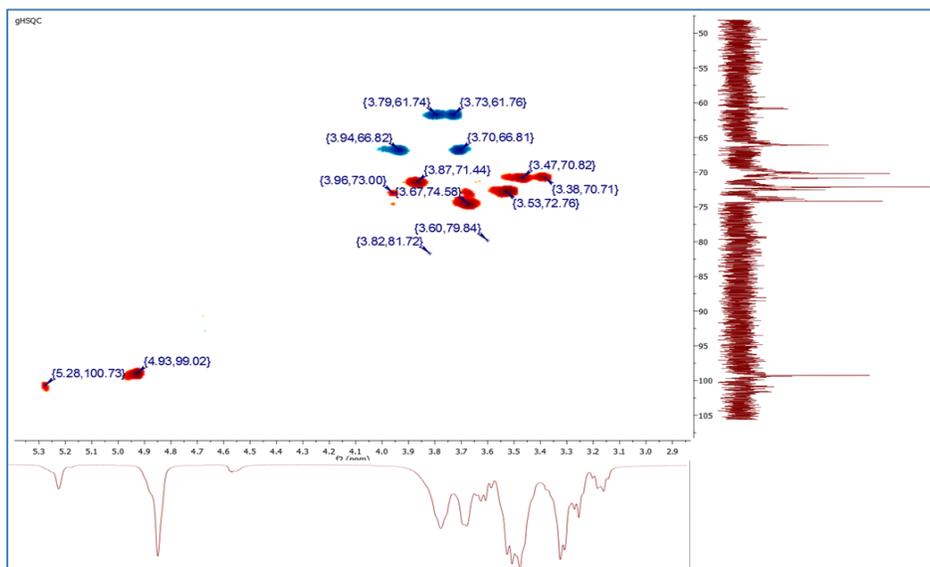


Figura 22.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. citreum* A51 fracción asociada a la célula.

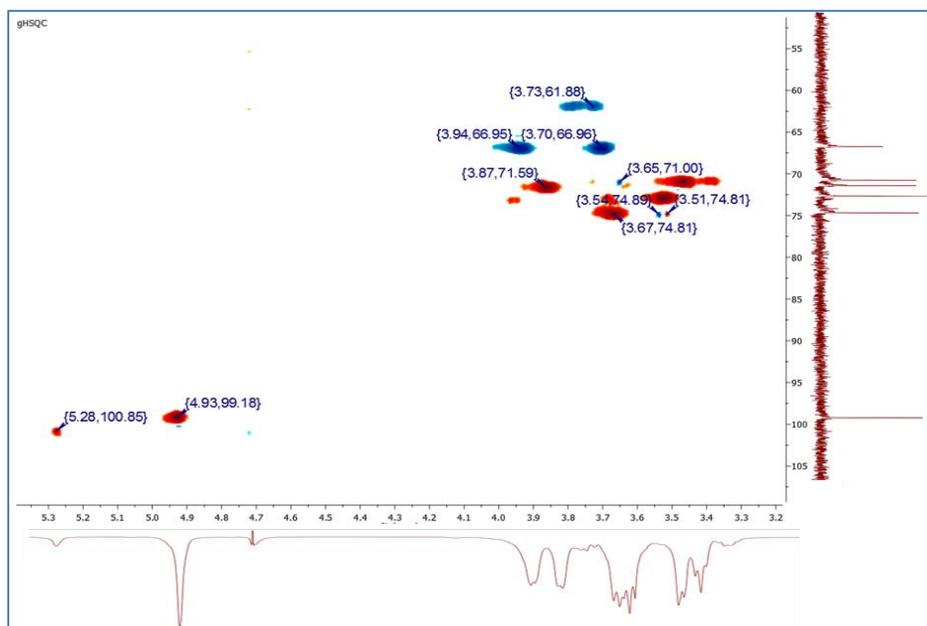


Figura 23.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. citreum* A51 fracción sobrenadante.

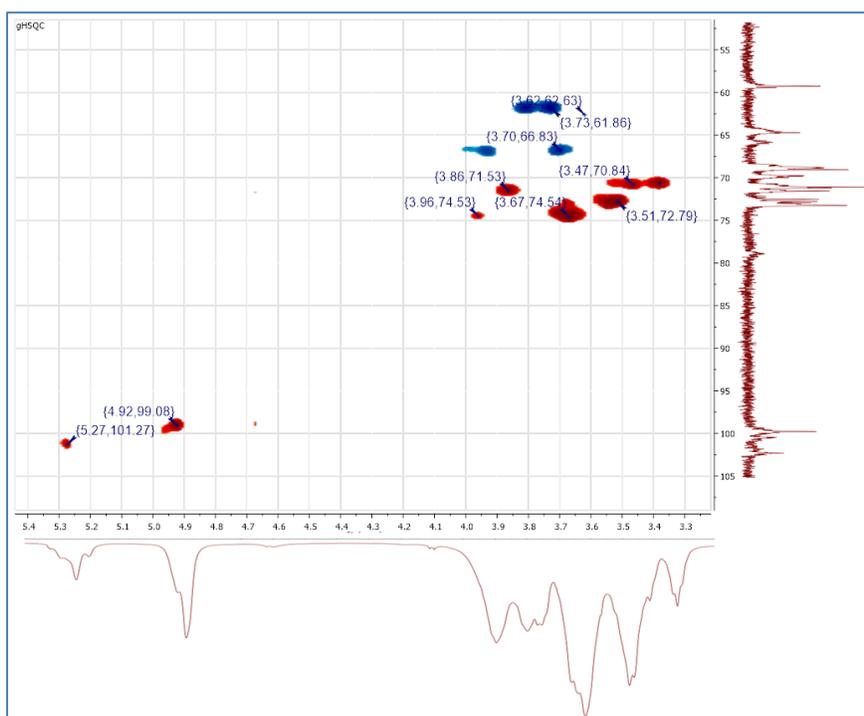


Figura 24.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. mesenteroides* A63 fracción celular.

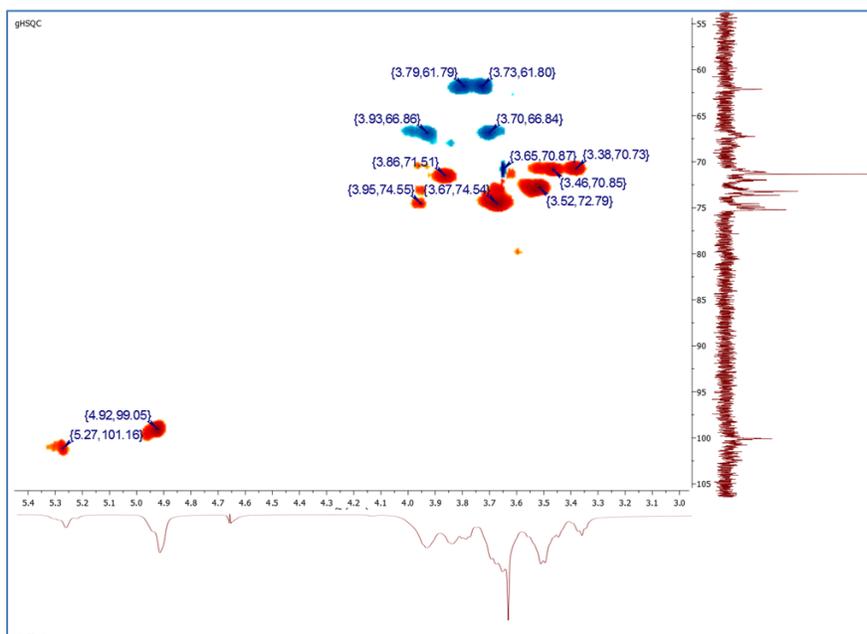


Figura 25.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. mesenteroides* A63 fracción sobrenadante.

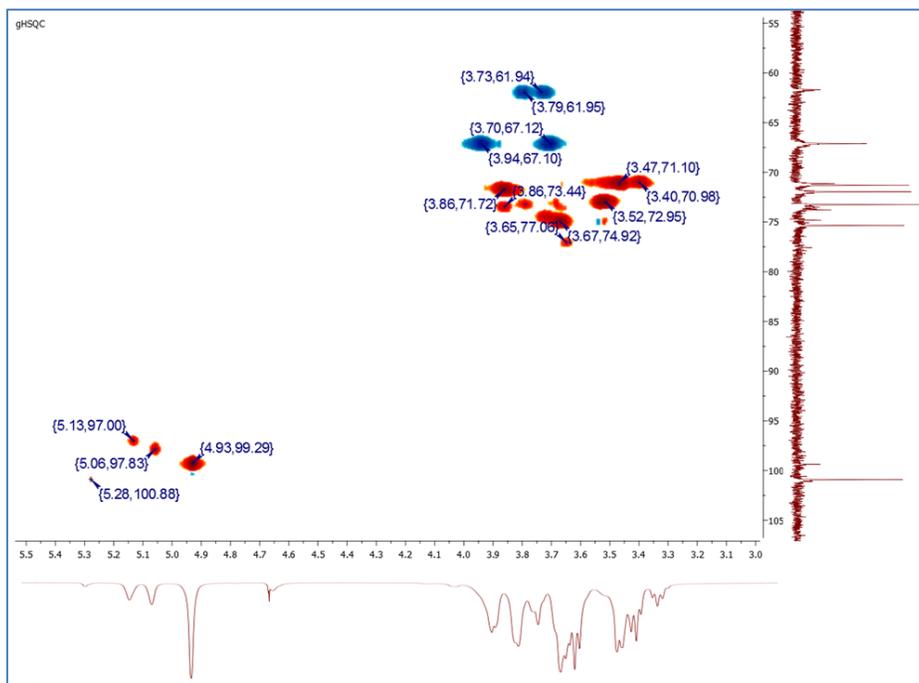


Figura 26.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. mesenteroides* P8 fracción asociada a la célula.

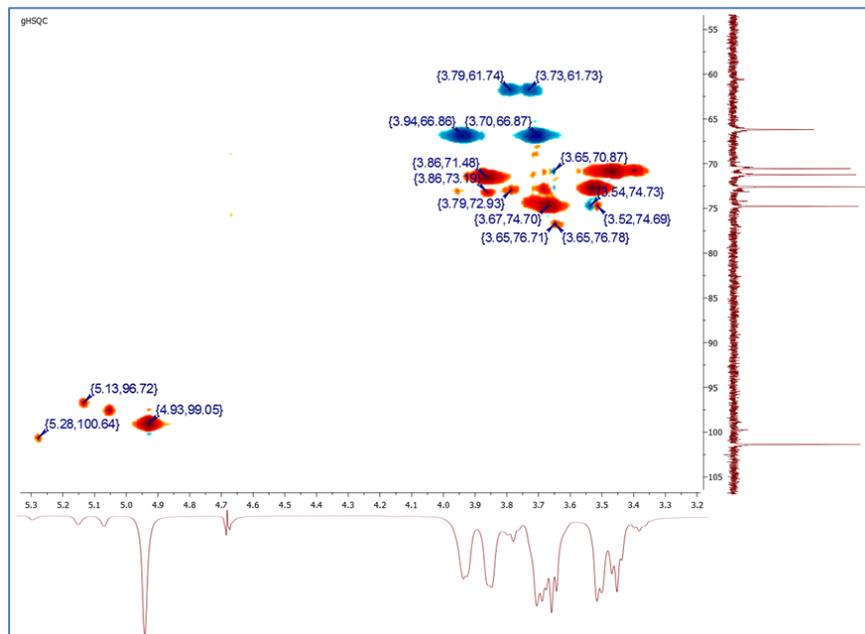


Figura 27.- Espectros de 2 dimensiones HSQC para la dextrana de *L. mesenteroides* P8 fracción sobrenadante.