

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIO QUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Lactobacilos nativos productores de Exopolisacáridos de  
interés biotecnológico**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Zamudio Malpartida, Karen Lucia

ASESOR

Zavaleta Pesantes, Amparo I.

**Lima – Perú**

**2005**

# ÍNDICE

## RESUMEN

Palabras clave

## SUMMARY

Key words

## ABREVIATURAS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
	1.1. Objetivos.....	3
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
	1.1. Bacterias Ácido Lácticas.....	4
	2.1.1 Clasificación de las BAL.....	4
	1.2. Genero <i>Lactobacillus</i> .....	5
	1.3. Exopolisacáridos biopolímeros de origen microbiano.....	6
	1.4. Exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas.....	7
	2.4.1 clasificación, composición química y estructura.....	7
	2.4.1.1 Clasificación.....	7
	2.4.1.2 Composición Química.....	9
	2.4.1.3 Estructura de los EPS.....	10
	2.5 Exopolisacáridos producidos por lactobacilos.....	15
	2.6 Biosíntesis y genética del EPS.....	15
	2.6.1 Biosíntesis.....	15
	2.6.2. Genética de la producción de EPS.....	17
	2.7 Funciones fisiológicas de los exopolisacáridos.....	17
	2.8.- Identificación de los EPS.....	19

2.9.- Identificación de las BAL productoras de EPS.....	20
2.9.1 Técnicas Convencionales.....	20
2.9.2Técnicas Biomoleculares.....	22
2.9.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
2.9.2.2 Espaciadores Intergénicos.....	
2.10. Optimización de Exopolisacàridos Producidos por Bacterias Ácido Lácticas.....	26

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

1.5. Materiales.....	28
1.5.1. Material Biológico.....	28
1.6. Métodos.....	29
1.6.1. Aislamiento de lactobacilos.....	29
1.6.2. Identificación microbiológica.....	29
3.2.3 Identificación molecular.....	31
3.2.3.1. Extracción de Ácidos Nucleícos.....	31
3.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa.....	31
3.2.4. Aislamiento y purificación de EPS.....	32
3.2.5 Cuantificación de exopolisacàridos.....	33
3.2.6 Ensayo preliminar para la optimización de la producción de EPS.....	33

## **RESULTADOS**

1.7. Identificación bacteriológica y bioquímica.....	35
4.2 Producción de EPS.....	40
4.3 Ensayos preliminares de optimización de la producción.....	41

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b>	
<b>BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
□ <b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>57</b>
□ <b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue obtener lactobacilos nativos productores de exopolisacàridos de interés biotecnològico, que tengan una potencial utilidad en las diferentes industrias como bioespesantes naturales mejorando así las propiedades reológicas de los productos. Para lograr este objetivo se tomaron 30 muestras de alimentos fermentados y de fuentes naturales nativas obteniéndose 15 aislados productores de exopolisacàridos (EPS), luego se selecciono 5 aislados que produjeron la mayor cantidad de EPS. A los aislados seleccionados se les sometió a crecer a diferentes parámetros fisicoquímicos como: temperatura, pH y fuente de carbono, encontrándose que en algunos casos las condiciones óptimas de producción diferían de las de crecimiento. Asimismo los aislados fueron identificados por los métodos fenotípicos y bioquímicos tradicionales y por la prueba molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos para el espaciador intergénico entre los genes ribosómicos 16S y 23S. Del estudio se obtuvo que la cepa Q5-3 identificada como *Lactobacillus plantarum*, produjo 1.535 g/L de EPS y presento la mejor producción de EPS con glucosa a pH 5.5 y 30°C. La obtención de una cepa de *Lactobacillus plantarum* productora de EPS es un aporte valioso ya que le da un valor agregado a las distintas propiedades ya conocidas de este microorganismo tan utilizado en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** *Bacterias Ácido Lácticas, lactobacilos, espaciador intergénico 16S-23S, exopolisacàrido.*

## SUMMARY

The purpose of the present study was to obtain some original lactobacillus from Perú which had be producers of exopolysaccharide of biotechnology importance with a potential utility to industry as natural biothickeners, improving the rheological properties of the products. To achive this purpose, 30 samples were taken from fermented foods and native nature source, obtaining 15 isolated producers of exopolysaccharide (EPS). Then, 5 isolated were selected because they produced the higher quantity of EPS. All isolated selected were grown to several condition such as temperature, pH and source of carbone. It was found that in some cases the optimus condition of production was different from growth. The isolated were identified by biochemistry and phenotypic traditional methods. In addition, molecular tools as PCR (polimerase chain reaction) were also used to identify the isolated. It was found that the Q5-3 strain, identifying as *Lactobacillus plantarum*, produced 1.535 g/L of EPS. This strain had the best production of EPS (with glucose) as pH 5.5 and 30°C. The discovery of the *Lactobacillus plantarum* producer strain of EPS is an important contribution because it provides an addition value to this well-known microorganism.

**Key words;** lactic acid bacteria, lactobacilli, intergenic spacer 16S-23S, exopolysaccharides.

## ABREVIATURAS

- ADN : Acido desoxiribonucleico
- MRS : Man Rogosa Sharp
- EPS : Exopolisacarido
- BAL : Bacteria acido lactica
- EDTA : Etilen diamino tetra acetico
- DNTP : Desoxi nucleotido tri fosfato
- GRAS : Generally recognized as safety ( generalmente reconocidos como seguros)
- PCR : Polymerase chain reaction ( reaccion en cadena de la polimerasa)
- ITS : Internal transcribed spacer (espaciadores intergénicos)
- RFLP : Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción)
- TAE : Tris acetato EDTA
- TBE : Tris borato EDTA
- TSE : Tris cloruro sodico EDTA
- ARNr : RNA robosómico
- CPS : Polisacárido capsular

## I. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de nichos ecológicos, donde los microorganismos compiten con otros por sobrevivir y evolucionar en la única microbiota dominante como en bebidas y alimentos fermentados. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son consideradas microorganismos de grado alimenticio denominándose como GRAS (Generally Recognized As Safe). Las BAL producen sustancias químicas capaces de eliminar la microbiota competente en un ambiente desfavorable, como las bacteriocinas y compuestos orgánicos; algunas elaboran exopolisacáridos (EPS) para proteger a la célula del ataque y efecto letal de agentes químicos y físicos. Los EPS producidos están unidos a la cápsula y otros son liberados al medio, basándose en la composición de glucosa los EPS pueden ser divididos en homopolisacáridos y heteropolisacáridos según presenten uno o varios monosacáridos respectivamente. Los lactobacilos generalmente producen heteropolisacáridos, las propiedades reológicas de los polisacáridos dependen de la composición monomérica, el número de carbonos de la cadena secundaria, el largo de la cadena y el tipo de carga.

Los polisacáridos extracelulares de origen microbiano como los biopolímeros producidos por lactobacilos están desplazando a los obtenidos tradicionalmente de algas y plantas, las razones de tal cambio derivan de la gran diversidad de estructuras de las que se puede disponer, variada no solo en función del microorganismo productor, si no también dentro de un mismo grupo microbiano. El uso de los EPS producidos de forma natural como alternativa de aditivos bioespesantes para mejorar la textura y consistencia de los productos en los que se encuentren presentes está recibiendo una gran atención.



La identificación de lactobacilos por pruebas convencionales bioquímicas y fisiológicas tienen algunas limitaciones debido a que comparten características metabólicas similares. El uso de técnicas alternativas en la identificación rápida de estos microorganismos está en continuo desarrollo, las técnicas de biología molecular basadas en ADN tales como hibridación ADN-ADN, ADN-rARN, perfiles de plásmidos, ribotificación, polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), son utilizadas en paralelo a las convencionales. Los genes ribosómicos 16S, así como sus espacios intergénicos se usan con gran acierto en la identificación de diversos microorganismos. La región comprendida entre los genes ribosómicos 16S y 23S en los lactobacilos, es muy útil para discriminar entre géneros y especies, debido a que esta zona intergénica es altamente conservada en cada especie y polimórfica entre especies del género *Lactobacillus*.

Por todo lo anterior es de gran interés encontrar especies de lactobacilos nativos capaces de producir EPS con iguales o mejores propiedades reológicas que las descritas, contar con la identificación precisa de estas especies, y evaluar las mejores condiciones de producción de EPS de los lactobacilos seleccionados.

## **1.1 OBJETIVOS**

En este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

### ***Objetivo General***

Obtener lactobacilos nativos productores de exopolisacáridos de interés biotecnológico.

### ***Objetivos Específicos***

- 1- Aislar lactobacilos a partir de fuentes naturales nativas.
- 2- Seleccionar lactobacilos productores de EPS.
- 3- Estimar la producción de EPS de los lactobacilos seleccionados, por métodos espectrofotométricos
- 4- Identificar los lactobacilos productores de exopolisacáridos, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando cebadores específicos.
- 5- Optimizar la producción de EPS del aislado que produzca la mayor cantidad del polímero mediante cultivo discontinuo, modificando el pH, temperatura y la fuente de carbono.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Desde el comienzo de la humanidad las bacterias ácido lácticas (BAL) se han utilizado en la fabricación y conservación de los alimentos. Estos microorganismos son muy versátiles y se hallan extensamente distribuidos en la naturaleza siendo aislados de una gran variedad de productos fermentados y no fermentados como bebidas alcohólicas (vinos, sidras, chicha de jora, masato, sake ), productos lácteos (queso, yogur, leche, etc), frutas, jugos de frutas, encurtidos, ensilados, aceitunas, productos cármicos y marinos, etc. (2). Las BAL son capaces de crecer bajo diferentes condiciones ambientales y jugar un rol importante en las fermentaciones de alimentos, mejorar sus características organolépticas, así como mantener la conservación e inocuidad de estos productos por efecto de ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, etanol, y otros compuestos producidos. Además, ejercen efectos beneficiosos en la salud humana y animal, incrementan el valor nutritivo de los alimentos, y presentan actividades como: hipocolesterolemiantes, antitumorales, inmunostimulantes y antibacterianas. (1,3)

#### **2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BAL**

Las BAL fueron propuestas como grupo por Orla-Jensen (1919) estas reúnen varios géneros caracterizados por su capacidad de producir ácido láctico a partir de los glúcidos. La fermentación se denomina homoláctica si el ácido láctico es prácticamente el único formado al final de la reacción, y heteroláctica si se forman ácido láctico y otros

compuestos como: ácido acético, etanol, etc. Según el tipo de fermentación obligatorio o preferencial se habla de bacterias homofermentativas o heterofermentativas al tratarse de un grupo heterogéneo, las BAL están representadas por varios géneros como, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, otros géneros que se incluyen son: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vayococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Allolococcus* (1,4,7).

## **2.2 GENERO *Lactobacillus***

Dentro del grupo de las BAL destacan especialmente las bacterias del género *Lactobacillus* las cuales comparten las siguientes características generales con el grupo al cual pertenecen: Gram positivas, generalmente inmóviles, no esporuladas, catalasa negativas, oxidasa negativas, nitrato reductasa negativas, son anaerobias facultativas y exigentes en sus requerimientos nutricionales (4). Las especies del género *Lactobacillus* se caracterizan por ser células en forma de bastones o bacilos a menudo agrupadas en cadenas, también por su heterogeneidad en la composición de ADN, el porcentaje de GC varía del 32 al 53 %. Actualmente se acepta la subdivisión hecha por Kandler y Weiss, la cual separa a los lactobacilos en tres grupos: grupo I, homofermentativos obligatorios; Grupo II, homofermentativos facultativos como por ejemplo: *Lb plantarum*, *Lb casei*, y *Lb. sake*, *Lb.curvatus-bavaricus*.; grupo III: heterofermentativos obligados, Incluyen especies muy diversas como *Lb. kefir*, *Lb. buchneri*, *Lb reuteri*, *Lb. fermentum*, y *Lb brevis*. (1,5)

## **2.3 EXOPOLISACÁRIDOS, BIOPOLÍMEROS DE ORIGEN MICROBIANO**

Los polímeros de larga cadena y alto peso molecular se disuelven o dispersan en agua para producir características de espesamiento o gelificación indispensables en la formulación de productos alimenticios, tales polímeros también se utilizan en

emulsificación, estabilización, suspensión de partículas, control de la cristalización, inhibición de la sinéresis, encapsulación, y formación de películas. Actualmente la mayoría de los bioespesantes usados en alimentos provienen de plantas (Ej. almidón, pectina, goma Guar) o de algas marinas (carragenano, alginato), también se usan los hidrocoloides proteicos de origen animal como la caseína y la gelatina (6).

Las propiedades funcionales que estos polímeros confieren a los alimentos están determinadas por características estructurales. Sin embargo estos polisacáridos no presentan la calidad necesaria o sus características reológicas no son las exactamente requeridas. Muchos de los carbohidratos provenientes de plantas utilizados son modificados químicamente para mejorar su estructura y características reológicas, por lo tanto su uso se restringe a algunos productos alimenticio (7,8).

Una alternativa de bioespesante son los exopolisacáridos microbianos. Los EPS microbianos son polisacáridos extracelulares asociados a la superficie de la célula en forma de cápsula y secretados al ambiente extracelular en forma de limo. Los EPS en su ambiente natural desempeñan un rol importante en la protección de la célula microbiana contra la desecación, fagocitosis, ataque de fagos, antibióticos, compuestos tóxicos (Ejm. iones metálicos, dióxido de sulfuro, éteres, etc) depredación por protozoos, presión osmótica, adherencia a superficies, formación de películas y en el reconocimiento celular pero no son alimento de la misma bacteria productora. En bacterias patógenas como *Streptomyces pneumoneae* y *Streptococcus agalactiae*, el EPS capsular y los lipopolisacáridos del antígeno O están implicados en la inmunorespuesta. Los EPS microbianos importantes en la industria son: dextrano, xantano, gelano, pululano, glucano y el alginato bacteriano (9,10), estos representan solo una pequeña fracción del mercado actual de biopolímeros. Los factores que limitan el uso de EPS microbianos son su baja producción la cual para ser mejorada requiere de un extenso conocimiento de su biosíntesis y de una tecnología

adaptada a los bioprocesos. El Xantano es un EPS aprobado por el sector alimenticio, principalmente por sus características reológicas únicas y su bajo costo de producción, es producida en grandes cantidades por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* que no es aceptada como GRAS (Generally Recognized As Safe). Recientemente el Gelano producido por *Sphingomonas elodea* ha sido introducido en el mercado, en el Japon el Curdlano obtenido de la especie *Agrobacterium* spp. y una cepa modificada de *Alcaligenes* spp. es permitido en el sector alimenticio de este país (10,11).

Dentro de las bacterias reconocidas como GRAS tenemos a los lactobacilos los cuales son una alternativa en la producción de EPS de excelentes propiedades fisicoquímicas. Nuevos biopolímeros microbianos con mejores características de elasticidad, viscosidad y estabilidad se pueden introducir en el mercado de polímeros para reemplazar a los de uso tradicional.

## **2.4 EXOPOLISACÁRIDOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

### **2.4.1 CLASIFICACIÓN, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA**

#### **2.4.1.1 Clasificación**

Los EPS de BAL tienen diferentes composiciones, tamaños y estructuras. El análisis estructural combinado con estudios reológicos muestra una considerable variación entre los diferentes EPS (11).

Los EPS de BAL se pueden subdividir en 2 grupos: (A) homopolisacáridos, clasificados en 4 subtipos (a)  $\alpha$ -D-glucanos, Ej., el dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* sub. *dextranicum*, compuesto principalmente por residuos de glucosa con uniones  $\alpha$ -1-6 variando según la especie y ramificación en la posición 2 ó 4 y el alternano producido por *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*; ambos

compuestos presentan uniones  $\alpha$ -1-3,  $\alpha$ -1-6; (b)  $\beta$ -D-glucanos con residuos  $\beta$ -1,2 producidas por *Pediococcus* spp. y *Streptococcus* spp. (c) fructano compuesto principalmente por uniones 2,6 de moléculas de fructosa, (d) otras como poligalactano compuesto por unidades repetidas y con diferentes acoplamientos glucosídicos y los heteropolisacáridos producidos por especies de lactobacilos mesófilos y otras especies de BAL (*Lactococcus lactis subs. lactis*, *Lc.lactis subs. cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lb. sake*, *Lb. delbrueckii subs bulgaricus*, *Lb. helveticus* y *S. thermophilus*.(12,13).(B) Los heteropolisacáridos reciben mayores expectativas ya que brindan textura y cuerpo a las bebidas fermentadas de leche, por Ej. textura cremosa que es uno de los aspectos de calidad del yogur que puede ser mejorado por la capacidad de las bacterias utilizadas en la fermentación. Además los EPS de lactobacilos tienen un potencial uso en el desarrollo de productos mejorados como el yogur de poca grasa, más cremoso, etc. Por otra parte algunos polisacáridos pueden contribuir a la salud humana debido a su actividad antitumoral, antiulcerosa, inmunomoduladora, hipocolesterolemiante y su uso como prebióticos por lo tanto los EPS de lactobacilos tienen un potencial para el desarrollo y la explotación como ingredientes de los alimentos funcionales en la salud y ventajas económicas.(11,14).

#### **2.4.1.2 Composición Química**

La composición química de los EPS de lactobacilos ha sido largamente discutida. La naturaleza del limo de las BAL fue estudiado primero por Sundmaan y Nelson, y fue encontrada como material unido a proteínas, algunos autores sugieren que la característica viscosa desarrollada en la leche durante la fermentación es debido a la producción de glicoproteínas o al complejo carbohidrato - proteína.(5, 17).

Finalmente ahora se ha acordado que los EPS de lactobacilos son polisacáridos compuestos por unidades repetidas ramificadas conteniendo uniones alfa y beta, varios tipos son

secretados. Sin embargo la composición del monómero esta formado por D-galactosa, D-glucosa y L-ramnosa, las cuales están casi siempre presentes en diferentes proporciones.

Mientras los EPS de *Lb. acidophilus* LMG 9433, *Lb. helveticus* TY1-2, *Lb. helveticus* NCDO 766, *Lb. rhanmosus* C83, *S. thermophilus* SFI20, *S. thermophilus* DTC y *S. thermophilus* 480 carecen de ramnosa, *Lb. paracasei* 34-1, solo contiene galactosa. *S. thermophilus* OR91 contiene galactosa y ramnosa y el EPS de *Lb. sake* 0-1 solo consta de glucosa y ramnosa por el contrario el EPS producido por *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* CRL420 contiene glucosa y fructosa en una proporción de 1:2 y el polímero producido por *S. thermophilus* ME-1C consiste de unidades repetidas octoméricas compuestas de D-galactosa, L-ramnosa y L-fucosa en la proporción de 5:2:1, y otros residuos como Nacetil aminoazúcar, fosfatos y grupos acetilos pueden también estar presentes (15,17,18,19,20).

El aislamiento y escasa purificación, especialmente cuando se utilizan medios complejos, y la posibilidad de que una especie produzca más de un exopolisacárido explican en parte las diferencias observadas en el pasado. Por Ej.: Marshall y col. (16) describe la composición diversa del EPS producido por la misma especie, depende de las condiciones de fermentación, cultivo, y técnicas de aislamiento y purificación aplicadas. Los medios y las condiciones de cultivo pueden ser los factores que influyen en la composición y variación monomérica de los enlaces glucosídicos.

#### **2.4.1.3 Estructura de los EPS**

Los EPS de lactobacilos poseen masas moleculares que oscilan en el rango de  $4 \times 10^4$  a  $6 \times 10^6$  Da, la masa molecular es uno de los factores determinantes de las características funcionales del EPS. (10)

Sin embargo las propiedades físicas y reológicas de un polisacárido en solución se relaciona con su estructura y conformación tridimensional. Además, factores como las asociaciones intermoleculares, pueden ser importantes para una comprensión completa del



comportamiento de la solución, puesto que las cadenas del polisacárido experimentan algunos cambios topológicos al azar que pueden ser favorables a las interacciones y a las asociaciones intermoleculares.

La conformación secundaria y terciaria de un polisacárido es fuertemente dependiente de su estructura química primaria pudiendo tener un enorme efecto en la conformación y las características del polisacárido.

La estructura de las unidades repetidas de heteropolisacáridos de BAL producidos por *S. thermophilus*, fueron determinados primero por Doco y col. (23). Otras estructuras de EPS formado por unidades repetidas ramificadas producidas por BAL se han evidenciado recientemente con la hidrólisis ácida, análisis de metilación, oxidación con periodato, acetolisis, digestión enzimática, degradación de Smith, espectroscopia ID, 2D, RMN H1, etc. Su tamaño puede extenderse de un disacárido a un heptasacárido.

Es de interés entender la relación entre la estructura del EPS y las características de texturización que confiere y de tener los medios de modificar los biopolímeros para influenciar en las características de los polisacáridos nativos. Las enzimas que tienen una acción específica en la estructura del polímero se pueden utilizar para adaptar la estructura química y por lo tanto las características funcionales. Finalmente estos datos conjuntamente con estudios biológicos, bioquímicos y moleculares adicionales de los EPS formaran la base para la ingeniería del biopolímero futuro y del valor comercial en el mercado de los alimentos funcionales.

## **2.5 EXOPOLISÁRIDOS PRODUCIDOS POR LACTOBACILOS**

Muchos de los EPS producidos por variedades de lactobacilos han sido estudiadas a profundidad. Las especies del género *Lactobacillus* han sido aisladas a partir de fermentaciones espontáneas de una gran variedad de alimentos y bebidas alcohólicas como

vinos, sidras, chicha de jora, productos lácteos, frutas, jugos, encurtidos, ensilados, aceitunas, productos cárnicos, marinos, etc. (2,4).

Los EPS de lactobacilos son productos microbianos de gran interés biotecnológico en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica, etc. actuando como viscosantes, emulsificantes, gelificantes y estabilizantes (10). Cada especie de lactobacilo produce cantidades variables del polímero así, las cantidades de EPS producidas en mg/L reportadas son: *Lb. delbrueckii subs. bulgaricus* de 60 a 150 mg/l; *Lc. lactis subs. cremoris* de 25 a 600 mg/l; *Lb. casei* de 50 a 60 mg/l (24) y *Lb. sake* 1350 mg/l (17,19) en condiciones óptimas de producción oscila entre 532 mg/l y 3500 mg/l estas cantidades varían según las condiciones de crecimiento como pH, temperatura, tiempo de incubación y composición del medio de cultivo (25). El uso de los EPS producidos por lactobacilos ofrecen las siguientes ventajas: presentan calidad constante, su producción es independiente de factores climáticos o estacionales, se pueden producir volúmenes programables, se utilizan recursos renovables para su producción y son biodegradables, además del rol fisiológico que presentan.

## **2.6 BIOSÍNTESIS Y GENÉTICA DEL EPS**

### **2.6.1 Biosíntesis**

Un intermediario importante que une a las rutas anabólicas para la producción de EPS y las rutas catabólicas de la degradación del azúcar parece ser la glucosa-6-fosfato en los cuales el flujo de carbono se bifurca entre la formación de fructosa-6-fosfato hacia los productos de la glicólisis, biomasa, formación de ATP y los precursores de EPS. La fosfoglucomutasa (PGM) es la enzima implicada en la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, potencialmente tiene un papel importante en la divergencia del flujo entre las vías catabólicas y anabólicas (15,16). La glucosa-1-fosfato sirve como punto de

partida para la formación de los nucleótidos UDP-glucosa y TDP-glucosa vía la acción de UDP-glucosa-pirofosforilada respectivamente se observa que estos nucleótidos del azúcar son utilizados para formar una variedad de polisacáridos en la célula y por lo tanto las enzimas asociadas a su formación son compartidas. La conversión de galactosa a glucosa-1-fosfato vía galactosa-1-fosfato (por la ruta de Leloir) es posible si el sistema esta presente en la célula. El ensamblaje de unidades repetidas de monosacáridos es alcanzado por varias enzimas EPS-específicas, como se identificó inicialmente en *Streptococcus thermophilus* SF6 (26) y en *Lc. lactis* NIZO B40 (27). Estas unidades de repetición están ensambladas en una molécula transportadora lípido isoprenoide C55 que se une a la membrana citoplasmática de la célula (28). Los azúcares son ligados para formar unidades repetidas por la acción de varios genes que sintetizan las glicosiltransferasas (29). El mecanismo de la polimerización de la unidad de repetición de BAL y la subsiguiente exportación de la célula no esta elucidada. El alto nivel de homología entre los organismos Gram positivos y Gram negativos respecto a la síntesis de las unidades de repetición significa que podría existir mecanismos similares a nivel de la polimerización y exportación del EPS, un modelo simple para esto implica la acción de un mecanismo para mover el lípido unido a las unidades repetidas del citoplasma hacia la región periplasmática (29), usando la misma analogía una polimerasa podría catalizar la unión de las unidades de repetición y otra podría desacoplar el lípido polímero.

### **2.6.2. Genética de la producción de EPS**

Los genes que codifican la síntesis de EPS se pueden encontrar en plasmidos, como en *Lc. lactis* y *Lb. casei* (12). En todas las BAL termófilas (5,30) se identifica el locus genético del EPS similar a la contenida en *S. thermophilus* SF6 revelando la existencia de una región 15.25 Kb que presenta 16 ORF dentro de los cuales una región 14,52 kb codifica 13 genes

del A al M capaces de dirigir la síntesis de EPS. Las proteínas precursoras demostraron de 40 a 68 % de identidad sugiriendo un alto porcentaje de similitud para los genes A,B,C,D y E que codifican el CPS en *S. agalactiae*. Van kranenburg y col.(18), determinaron que toda información necesaria para la biosíntesis del EPS producido por *Lc. lactis* NIZO B40 es codificada en una sola agrupación de genes de 12 kb situada en un solo plásmido de 40 kb (EPS R,X,A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L), conducido por un promotor contracorriente del EPS. Los productos de 11 de los 14 genes son homólogos en secuencias a los productos de los genes implicados en la síntesis de EPS, CPS, LPS, o ácido teicoico de otras bacterias y las funciones supuestas fueron asignadas a estos genes. Un alto nivel de semejanza entre los cluster de genes de *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* revelo una región DNA de 18 kb que consiste de 14 genes (EPS A a EPS N), con una organización genética similar a otras BAL (2). Los genes en los cluster se orientan en una dirección y se transcriben como un RNA policistrónico (30, 31,32). Las secuencias funcionales de este cluster en bacterias Gram positivas que sintetizan el polisacárido en la superficie de la célula parecen seguir una tendencia similar de regulación de las unidades de repetición de la longitud de la cadena, biosíntesis de las unidades de repetición polimerización y exportación (32).

## **2.7 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS**

Desde el inicio del siglo 20 se le ha atribuido a las lactobacilos efectos beneficiosos a la salud humana y animal. Ahora con el desarrollo de los alimentos funcionales conteniendo bacterias probióticas que es un mercado expansivo con promisorios beneficios económicos.

Los probióticos son definidos como microbios vivos que forman parte de los ingredientes de ciertos alimentos (11). Las bacterias probióticas actualmente usadas son

predominantemente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, algunos de los cuales producen EPS los cuales ejercen efectos promotores de la salud, estas especies están relacionadas a la actividad biológica de estos biopolímeros. Los EPS contribuyen a la salud actuando como probióticos, antitumorales, antiulcerosos, inmunomoduladores, hipocolesterolemiantes (5). Varios estudios han sugerido que las BAL en los alimentos lácteos y fermentados tienen actividad anticancerígena, Kitazawa y col.(33) realizaron un ensayo basado en la aplicación de una inyección intraperitoneal del liofilizado de *L. lactis* subs *cremoris* KV520 resultando en la inhibición del crecimiento del tumor Sarcoma 180 en ratones, pero las BAL no exhiben citotoxicidad en estudios "in vitro" en contra de las células del tumor S180, esto sugiere que la eficacia del efecto de esta especie en la prevención de la proliferación del tumor son medidas a través de la actividad inmune estos autores postulan que el material mucoide producido por *Lc. lactis* subs. *cremoris* KVS0 podrían ser el principal componente en el efecto antitumoral. Un largo estudio dirigido por Kitazawa y col. (11) muestran un significativo incremento en las células B dependientes mitogénicas que inducen la actividad por el material del limo producido por *Lc. lactis* subs. *cremoris* KVS20 también Nakajima y col.(34) encontraron que el EPS de *Lc. lactis* subs. *cremoris* SBI0495 administrado intraperitonealmente aumenta la producción de anticuerpos específicos en ratones indicando que este EPS podría actuar como adyuvante en el tratamiento del cáncer. El iniciador de yogur *Lb. delbrueeckii* subs. *bulgaricus* OLL 1073R-L el cual produce un EPS ha sido reportado por ser utilizado como mediador de la actividad antitumoral (14,35). El EPS KGF-C extraído de kéfir tiene la propiedad de retardar el crecimiento tumoral cuando se administra oralmente, y esto a través de la inducción de células T y no a través de la participación de células B (36). Los EPS también pueden ser utilizados como prebióticos siendo definido como aquel ingrediente alimenticio no digerible que ejerce efectos beneficioso al consumidor estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias en el colon (37).

## 2.8.- IDENTIFICACIÓN DE LOS EPS

Antes de que un polisacárido sea considerado totalmente caracterizado es necesario obtener cierta información acerca de la masa molecular, la composición de monómeros, su configuración y el tipo de unión de estos monómeros. Numerosos métodos para la determinación de la masa molecular de polisacáridos son utilizados históricamente, como el tiempo de retención, determinado por cromatografía de exclusión usando detección por índice de refracción. Un gran número de métodos son utilizados para determinar la composición de monómeros de las muestras de EPS. Las muestras tratadas por metanolisis y pertrimetilsilitación son analizadas por cromatografía gas líquido. Un método simple requiere una hidrólisis ácida seguida de una detección de monómeros usando cromatografía de intercambio aniónico de alta presión con detección amperométrica.

La unión de los monómeros es determinada usando una combinación de análisis de metilación y espectroscopía de NMR. Estos han sido mencionados en un gran número de revisiones, Duus y col. (38), publicaron revisiones del uso de este método en la identificación de EPS desde 1992 hasta 1999. Leeftang y col. (39). Describieron la aplicación de 2D-NMR en la determinación de la estructura primaria de EPS bacteriano.

La combinación de NMR del 1D- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son las más utilizadas para la identificación estructural, este espectro se analiza en una muestra tratada a 70 °C para así reducir la viscosidad facilitando la resolución de la resonancia. En el espectro de protón el campo-bajo reportado para la región incluye resonancia del carbono anomérico y el átomo rodeado fuera de la mayor parte de la región como una consecuencia de la glicosilación. Este es también un campo reportado para la región que incluye la resonancia de los sustituyentes encerrados tales como acil, alquil, y acetal, y los sustituyentes rodeados tales como N-acetilamino y H6-D-deoxiazúcar. El espectro homonuclear 2D y  $^{13}\text{C}$ -H, son

usados para asignar carbonos y obtener la cadena de información.

Numerosas técnicas están siendo aplicadas recientemente en la investigación de carbohidratos mas no en el análisis de rutina, Vincent y col. (40) reportaron el uso de un “Spin” de difusión para proveer información relacionada de la cadena, la cual requiere en forma de pulsos, es complementario a los experimentos heteronucleares NBC. Navarini y col. (41) reportaron el uso de inducción por deuterio como isótopo diferencial en la determinación del tipo de cadena. Un método exigido para determinar la cadena es el análisis por inspección directa de NMR de los oligosacáridos cuando estos han sido tratados previamente por peracetilación usando  $^{13}\text{C}(\text{CO})$ - y anhídrido acético ha sido reportado por Bendiak (42). Hasta el 2001 se han reportado como productores de heteropolisacáridos 6 *Lactococcus*, 21 *Streptococcus* y 19 *Lactobacillus*.

## **2.9.- IDENTIFICACIÓN DE LAS BAL PRODUCTORAS DE EPS**

### **2.9.1 Técnicas Convencionales**

Aun se utilizan las pruebas fenotípicas para la identificación de BAL, sobre todo en unidades de microbiología industrial o aplicada, los métodos incluyen la caracterización morfológica y fisiológica, y el perfil de fermentación de carbohidratos y de proteínas. González y col. (43) identificaron 249 BAL aisladas de pescado de agua dulce mediante 44 pruebas morfológicas y fisiológicas. El 90 % de los aislados fueron identificados a nivel de género, siendo la resolución taxonómica baja con gastos excesivos de tiempo y materiales. En la mayoría de los casos, estas pruebas fisiológicas son combinadas con la determinación del perfil de fermentación de carbohidratos. Corsetti y col. (44) analizaron 317 BAL aisladas como presuntas levaduras, utilizando características morfológicas y fisiológicas mediante el sistema de identificación comercial API50CHL (BioMerieux, Francia). Este sistema permitió la identificación del 38 % de los aislados a nivel de especie. Muyanja y

col. (45), en un estudio similar identificaron 113 BAL aisladas de una bebida fermentada tradicional de Uganda los resultados sólo permitieron una identificación a nivel de género. Estos estudios demuestran que los métodos fenotípicos tienen sus limitaciones debido a su reproducibilidad relativamente pobre y una baja resolución taxonómica que a menudo sólo permite la diferenciación a nivel de género. La popularidad de estos métodos se debe al hecho de que no se requieren de equipos especializados para realizarlo, y la disponibilidad de una base de datos de identificación.

En comparación, la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) utilizada para el análisis de proteínas en células enteras ha resultado ser un método más confiable en la identificación de BAL. El análisis de proteínas ha sido satisfactoriamente usado por Leisner y col. (46) para identificar a nivel de especie 64 BAL aisladas de un condimento muy usado en Malasia.

Sin embargo este método requiere de mucha mano de obra, además de carecer de poder discriminatorio sobre el nivel de sub-especie para el grupo de *Lactobacillus acidophilus* que incluye a *Lb. crispatus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. Johnsonii* y *Lb. Gasseri*, el grupo de *Lb. plantarum* que incluye además a *Lb. pentosus* y *Lb. paraplantarum*, Torriani, y col. (48). Para la diferenciación de especies dentro de estos grupos de *Lactobacillus* por lo general se realizan técnicas genotípicas, como RAPD, Otras técnicas fenotípicas que han sido usadas para la identificación de BAL, pero con éxito limitado, incluyen a la cromatografía de capa fina de ácidos orgánicos, (49). Para obtener una identificación confiable de BAL a nivel de especie, es necesario utilizar múltiples técnicas fenotípicas a menudo son combinados, de este modo, los rasgos fuertes de un método puede compensar los defectos de otro.



## **2.9.2 Técnicas Biomoleculares**

Las técnicas biomoleculares nacieron en la década de los sesenta este conjunto de metodologías nos permiten el manejo del ADN, y algunas de estas fueron cruciales para sentar las bases de un nuevo grupo de conocimientos e iniciar la genética moderna. El hallazgo de enzimas que cortan el ADN en secuencias específicas, denominadas enzimas de restricción, la caracterización e identificación de moléculas de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y las técnicas de secuenciación son probablemente las más relevantes.

### ***2.9.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica útil que ha revolucionado el modo en que los investigadores pueden amplificar, detectar, manipular y clonar fragmentos de ADN procedentes de una amplia variedad de fuentes. Las aplicaciones de la PCR van desde mejoras en los métodos de biología molecular básica por Ej. la generación de sondas, secuenciación del ADN, mutagénesis dirigida, tipificación bacteriana, detección de los factores genéticos responsables de la virulencia y en la elucidación de los mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos. Hasta aplicaciones clínicas en el diagnóstico y detección de mutaciones genéticas, infecciones virales, o huellas genéticas aplicadas a la medicina forense.

La PCR se basa en la premisa de que las moléculas de ADN de doble hélice colocadas en los extremos opuestos de una región particular, pueden servir como cebadores (primers) de una reacción de síntesis de ADN mediada por la enzima ADN polimerasa, que da lugar a la formación de una porción de ADN de doble cadena definida por estos dos oligonucleótidos. La repetición de ciclos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos cebadores, y extensión con la ADN polimerasa produce cantidades crecientes de producto, resultando en una amplificación exponencial de la secuencia

designada originalmente; Así pues, 30 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de veces aproximadamente, por lo tanto solo se requiere una cantidad muy pequeña de ADN que sirve como diana o molde para obtener cantidades significativamente grandes tras la reacción de PCR. La disponibilidad de una ADN polimerasa termoresistente purificada procedente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (denominada *Taq* polimerasa) facilita la catálisis enzimática de la amplificación del ADN, debido a su habilidad para resistir los repetidos ciclos de altas temperaturas necesarios para desnaturalizar el ADN. Se han creado por ingeniería genética nuevas ADN polimerasas termoestables que proporcionan una fidelidad de amplificación mucho mayor que la presenta *Taq* polimerasa. Asimismo la automatización del PCR con el desarrollo de aparatos termocicladores muy rápidos ha proporcionado un medio adecuado para que estas reacciones puedan tener lugar. Son muchos los factores que influyen sobre la fidelidad y eficacia del proceso de PCR. La concentración de numerosos componentes que constituyen un PCR típico es un factor determinante en el éxito o el fracaso de la amplificación, entre ellos se incluye la concentración de *Taq* polimerasa, de los desoxinucleótidos trifosfato cebadores. Además la temperatura y duración de cada uno de los segmentos del ciclo y el número total de ciclos pueden afectar dramáticamente el rendimiento y la especificidad del producto. La regla general consiste en emplear cebadores de unas 20 bases de longitud, conteniendo al menos 50 % de nucleótido guanina y citosina para maximizar la hibridación a una determinada secuencia molde (50).

### **2.9.2.2 Espaciadores Intergénicos**

Varias técnicas han sido utilizadas en la caracterización de BAL estas técnicas incluyen análisis de las proteínas celulares, análisis de la composición de la pared celular y morfología fisiológica así como análisis bioquímicos, el uso combinado de estas técnicas es invaluable para la identificación de BAL pero estos métodos no son lo suficientemente

discriminatorios para diferenciar entre subespecies además de ser consumidores de tiempo y dinero.

Las técnicas basadas en ADN tales como el análisis de hibridación ADN-ADN, análisis de homología rARN, análisis de plásmidos, ribotipificación, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y ADN amplificado al azar también han sido utilizadas para la identificación de lactobacilos (51).

En procariones el rARN contiene un loci genético para las tres especies de rARN 16S, 23S y 5S. Estos genes están separados por regiones espaciadoras las cuales exhiben un alto grado de variación en longitud y secuencias en los diferentes géneros y especies, por lo que podrá ser utilizado como un cronómetro molecular para la identificación de BAL entre ellas los lactobacilos y entre las diferentes especies de procariones. También se ha utilizado el polimorfismo de la región espaciadora intergénica con gran efectividad para identificación de varias especies de hongos (52). Estos espaciadores intergénicos (ITS) se utilizan con frecuencia como huella dactilar en PCR para discriminar cepas bacterianas en géneros, especies e intraespecies. Esta zona intergénica es altamente conservada para cada especie del género *Lactobacillus*, a su vez muy polimórfica en secuencia y longitud entre las especies del mismo género. Estas características han permitido diseñar cebadores específicos para identificar y caracterizar diferentes géneros y especies bacterianas (53,54).

El método mas rápido, directo y confiable para visualizar el carácter polimórfico del espaciador intergénico *rrn* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar dichas regiones usando cebadores de estas secuencias flancos. El polimorfismo presente en el producto de PCR ha sido utilizado para identificar lactobacilos presentes en alimentos así como cepas probióticas (51), para confirmar la identidad de las cepas ensayadas se digiere el producto de PCR con enzimas de restricción obteniendo perfiles de restricción

característicos para cada especie o subespecie y luego se separan los fragmentos obtenidos electroforéticamente Jensen y col. (52) diseñaron cebadores universales, denominados así ya que pueden ser utilizados para la identificación de diferentes géneros y especies, estos cebadores fueron ensayados con 500 cepas de diferentes especies como *Listeria*, *Salmonella*, *Bacillus*, etc demostrando la efectividad de utilizar esta región como un cronómetro molecular incluso en algunas especies resulto ser mas efectiva que el 16S el cual es la región blanco utilizada de preferencia en las diferentes técnicas moleculares, para los lactobacilos ya se ha demostrado que esta región íntergénica presenta una especificad en base a los espaciadores intergénicos específicos para la mayoría de lactobacilos (55).

Los genes ribosómicos, por cumplir funciones vitales para los organismos, están organizados en operones (grupo de genes cuya expresión está controlada por un único operador). Se han encontrado diferentes números de copias de operones según la especie, por ej.: 2 en *Helicobacter pylori*, *Ureaplasma urealyticum*, *Treponema pallidum*, *Xylella fastidiosa*, *Synechocystis* PCC6803, 3 en *Campylobacter jejuni*; 4 en *Neisseria meningitidis*; 7 en *Escherichia coli*; 8 en *Vibrio cholerae*, 6 en *Lactobacillus plantarum* y 10 en *Bacillus subtilis* el número de operones para las diferentes especies depende del rango de crecimiento y varia de 1 al 11(32).

La necesidad para la síntesis de nuevas proteínas son mayores en etapas en las cuales las células están más activas fisiológicamente como en la división celular los genes encargados de esta síntesis se encuentran generalmente en el origen de replicación aunque para muchas especies la localización en el genoma aun no es conocida.

Esto significa que entre los genes 16S, 23S y 5S las regiones espaciadoras intergénicas son polimórficas. El tamaño del espacio podría variar considerablemente para las diferentes especies e incluso entre los diferentes operones dentro de una misma célula en el caso de

que contenga múltiples operones. En especies Gram positivas el tamaño de ITS encontrado rara vez supera los 500 pb (52).

La variación en longitud es debida principalmente a la presencia de varias unidades funcionales tales como genes tARN y presencia en la mayoría de microorganismos estudiados en número de 1 ó 2 por espaciador. Otra unidad funcional comprende secuencias para el reconocimiento de enzimas tales como la ribonucleasa III involucrada en el proceso de “splicing”, requerido para la producción del ribosoma maduro. El espaciador íntergénico es más polimórfico entre especies que los genes 16S convirtiéndose en una gran alternativa como blanco para la identificación de microorganismos. El uso del ITS por tamaño y secuencia particularmente para la diferenciación de organismos estrechamente relacionados es un método relativamente nuevo en comparación al tradicional estudio del 16S rARN (56,54).

### **3.3. OPTIMIZACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las condiciones óptimas de temperatura, pH, tiempo de incubación y fuente de carbohidratos mejoran la producción de EPS varios reportes muestran que temperaturas bajas inducen a la producción de EPS, este efecto ha sido explicado basado en la información de EPS producido por bacterias Gram negativas, en los lactobacilos se han reportado diferentes resultados para algunos la temperatura óptima de producción de EPS, coincide con la temperatura óptima de crecimiento, a diferencia de otras en las cuales difiere pudiendo ser esta mas alta o mas baja a la temperatura en la cual se obtiene mayor cantidad de biomasa dependiendo esto generalmente de la cantidad del lípido isoprenoide el cual esta implicado en la formación de los polisacáridos bacterianos. En cuanto al pH el valor óptimo en el cual se ha obtenido una mayor producción es de 6.0, un estudio

realizado por Van den Berg y col. (57) reportan que la conversión de azúcar a EPS es mas eficiente a pH 5.8, pero que la conversión de azúcar a biomasa es mas eficiente a 6.2. Mozzi y col. (58) estudiaron el efecto del pH sobre el crecimiento y la producción de EPS en *Lactobacillus casei*. Gassen y col. (59) sugieren que el mantenimiento de una pH alto aumenta la producción de EPS durante la fase exponencial. Aunque un alto pH también resulta en una larga fase estacionaria la cual disminuye la formación de peptidoglicano y ácido teicoico lo cual favorece la síntesis de EPS, la fuente de carbono también tiene un rol importante en la cantidad de EPS sintetizado por los lactobacilos algunos van a tener mayor afinidad por determinado azúcar produciendo por lo tanto mayor cantidad de EPS como en el estudio realizado por Grobber y col. (60) en el cual se obtuvo una mayor cantidad del biopolímero utilizando como fuente de carbono a la glucosa.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1. Material biológico

Se utilizaron cepas nativas aisladas de diferentes fuentes naturales de nuestro país así como cepas de colección para ser utilizadas como patrones de comparación en las pruebas de identificación. Tabla N° 1.

Tabla 1. CE PAS de Lactobacilos utilizadas.

Especie	Código de identificación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	CECT 286
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 362
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CECT 402
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 285
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 925

\*CECT, Colección Española de Cultivos

## **3.2 MÉTODOS**

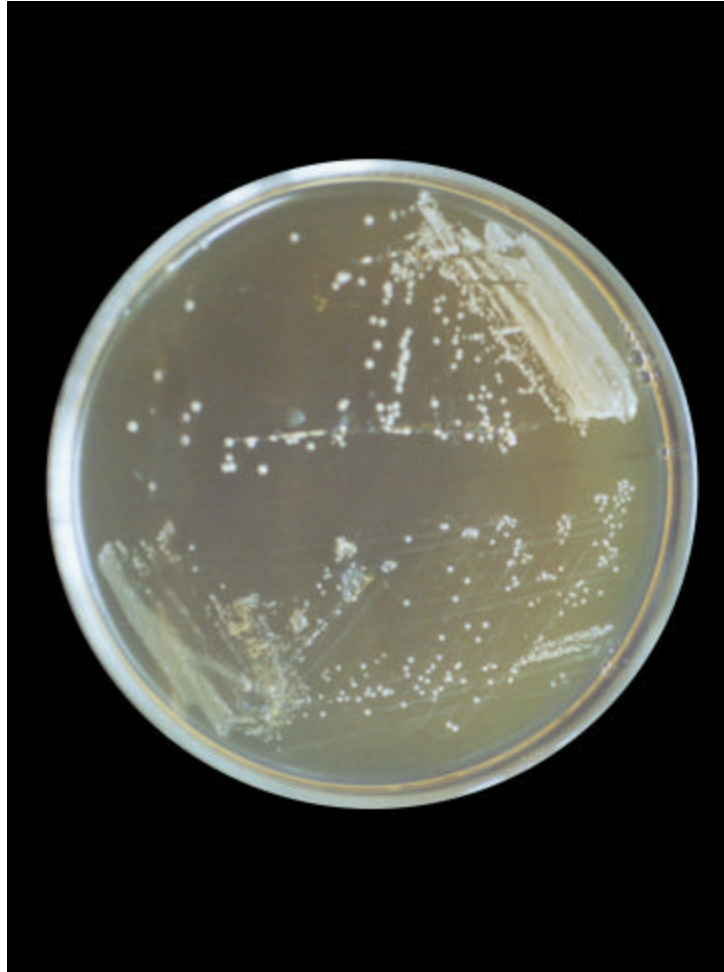
### **3.2.1 Aislamiento de lactobacilos**

Se aislaron los lactobacilos de 30 muestras diferentes correspondientes a bebidas y alimentos fermentados como chicha de jora, mazato, vinos, aceitunas, quesos, yogur, jugo de frutas natural. Se tomó 0.5 ml de cada muestra líquida o 0.5 g de cada muestra sólida estas se preenriquecieron en 4.5 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), el caldo contenía previamente 0.01% de cicloheximida y ajustado a pH 4.5, seguidamente se incubó a 28 °C por 48 horas en microanaerobiosis utilizando el modelo jarra-vela. Luego se sembraron por estrías en agar MRS, incubándolo por 48 a 72 horas en condiciones similares. Se seleccionaron 5 colonias por muestra y estas fueron cultivadas independientemente en 1 ml de caldo MRS incubándolas por 24 horas a 28 °C. Se realizaron subcultivos en agar MRS y un pasaje posterior a caldo MRS, luego fueron guardados en 20 % glicerol a -20°C.

### **3.2.2 Identificación microbiológica**

Los aislados fueron identificados utilizando pruebas macroscópicas y microscópicas de las colonias así como pruebas bioquímicas, basándonos en las recomendaciones del Manual de bacteriología sistemática de Bergey (4), utilizando como pruebas iniciales; morfología de colonias, tinción Gram., catalasa, pruebas tradicionales y de uso común. Se utilizaron también otras pruebas convencionales como las descritas a continuación (61):





**Fig. 1. Lactobacilos en medio MRS.**

Hidrólisis de Esculina: Se utilizó caldo MRS al cual se le adiciono esculina al 0.5 %, en este se sembró 0.5 ml de cultivo fresco y se incubó por 48 horas a 28°C en microanaerobiosis, la reacción es positiva si produce un ennegrecimiento del medio, esto de debe a la formación del complejo esculetina-Fe<sup>+3</sup>.

Hidrólisis de Arginina: Se utilizo caldo MRS al cual se le adiciono arginina al 0.5 %, en 5 ml de este medio se inoculó 0.5 ml de un cultivo de 48 horas de cada aislado estudiado, luego se incubo por 48 horas a 28° C en microanaerobiosis; la reacción positiva

(producción de NH<sub>3</sub>) se observa con la aparición del color naranja fuerte por la adición de 1 gota del reactivo de Nessler.

Fermentación de carbohidratos: Se utilizó caldo MRS modificado adicionando rojo de clorofenol al 0.004 % y un carbohidrato (fructosa, manitol, xilosa, maltosa, sorbitol, sacarosa, manosa) al 0.05 %, incubándolos por 48 horas a 28° C en microanaerobiosis observándose la reacción positiva por el cambio de color de rojo a amarillo.

### **3.2.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR:**

#### **3.2.3.1. Extracción de Ácidos Nucleicos**

Se cultivaron los aislados de posibles *Lactobacillus* en caldo MRS durante 48 horas a 28°C en microanaerobiosis. Se colectaron las células por centrifugación en una microcentrífuga (HETTICH Zentrifugen modelo MIKRO 12-24) a 12 000 rpm por 5 min. El pellet se resuspendió en 600 µL de solución TSE se le agregó 20 µL de lisozima y se incubó por 4 horas a 37°C y luego se añadió 40 µL de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) 20% (w/v) y 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubó a 55 °C toda la noche. En la purificación se utilizaron volúmenes iguales de fenol y cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo un décimo de volumen de acetato de sodio 3M e igual volumen de isopropanol. El precipitado se lavó con etanol al 70%, luego se resuspendió con TE.

#### **3.2.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Se empleó un volumen de reacción final de 25 µL, que contenía: Tris -HCl 10 mM (pH: 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 mM, cebadores 0,2 mM, *Taq* ADN-polimerasa 1,25 U y ADN 100 ng. Se utilizaron los cebadores específicos que se presentan en la Tabla 2. Según condiciones de amplificación: se utilizó un Termociclador Perkin

Elmer modelo 2400, donde se realizó una primera desnaturalización a 95 °C por 3 min. y luego 35 ciclos con las siguientes etapas: Desnaturalización: 94 °C por 0:30 min.; Hibridación: 55 °C por 1 min ; Extensión: 72 °C por 45 segundos, Finalmente una extensión de 72 °C por 7 min. El producto amplificado fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV.

#### **3.2.4 Aislamiento y purificación de EPS**

Los aislados fueron seleccionados por presentar colonias mucoides, y se determinó que eran productoras de polisacáridos por la reacción positiva al reactivo rojo de congo. Las bacterias se cultivaron en MRS a 30° C a un pH inicial de 6 en microanaerobiosis, el crecimiento fue evaluado por densidad óptica cada 6 horas durante 48 horas a 600 nm. (Para las 5 cepas seleccionadas previamente). Para la extracción se tomó un cultivo de 48 horas al cual se le adiciono ácido tricloroacético a una concentración final de 4%, esto fue llevado a agitación por 2 horas, luego se centrifugó a 27 000g por un tiempo de 30 minutos para sedimentar las células y las proteínas precipitadas. Seguidamente se separó el sobrenadante al cual se le agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío, se procedió a separar el precipitado por centrifugación a 12 000 g por 15 minutos, el EPS precipitado fue disuelto en 1/10 del volumen de agua. Se repitió el último paso para asegurar la separación del EPS. Finalmente el EPS disuelto en agua se llevo a diálisis por 24 horas a 4 °C en contra de agua, con la finalidad de eliminar las sales propias del medio de cultivo. Luego se purificaron por cromatografía de filtración en gel y liofilización según la metodología descrita por Van Den Berg y col. (57).

### **3.2.5 Cuantificación de EPS**

El total de carbohidratos contenidos en el EPS aislado se determinó por el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois y col. (62). Se utilizaron 0.5ml de una solución acuosa de la muestra a ensayar se le añadió 0.5 ml fenol al 5% y 2.5 ml de ácido sulfúrico al 98% se homogenizó durante 5 minutos y se incubó en agua hirviendo por 15 minutos, luego se enfrió en agua-hielo rápidamente y se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 490 nm (el color fue estable por 24 horas). La curva de calibración fue elaborada con Dextrano como estándar según el límite del método (0-50 mg/ml) y un blanco conteniendo los reactivos especificados para la prueba en agua destilada.

### **3.2.6 Ensayo preliminar para la optimización de la producción de EPS:**

Se diferenció la concentración de EPS producidos por las cepas seleccionadas; *Lactobacillus acidophilus* Lb-2, *Lactobacillus plantarum* Q5-3, *Lactobacillus delbrueckii* J5-2, *Lactobacillus casei* Y-1 y *Lactobacillus plantarum* Mz-4, ensayadas para determinar las mejores condiciones fisicoquímicas de crecimiento para incrementar la concentración de EPS. Para este efecto se utilizaron diferentes azúcares como: sacarosa, galactosa, lactosa, maltosa y melobiosa al 2%, evaluando la producción en cada caso, se probaron 6 temperaturas distintas: 15,20,25,30,35 y 40 °C. Utilizando como fuente de carbono: glucosa se probó adicionalmente el efecto del pH sobre la producción de EPS inicial del medio utilizando 3 parámetros diferentes: 5.0, 5.5 y 6.0. (63,64)

Tabla 2.- Oligonucleótidos específicos para identificar las especies de *Lactobacillus* por PCR.

Características/ oligonucleótido	Nombre	Secuencia ( 5' →3' )*	Tm (°C)	Producto de PCR (pb)
Especie				
<i>Lactobacillus casei</i>	PrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG	55	500
	CasII	GCGATGCGAATTTCTTTTTC		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	450
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTCAC	62	520
	16SH	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lprf	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	420
	FermII	CTGATCGTAGATCAGTCAAG		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	IDL03R	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	51	184
	IDL31F	CCACCTTCCTCCGGTTTGCA		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lac-2	CCTCTTCGCTCGCCGCTACT	62	300
	LU-1P	ATTGTAGAGCGACCGAGAAG		

\*, Información obtenida de Walter y col. (2000)

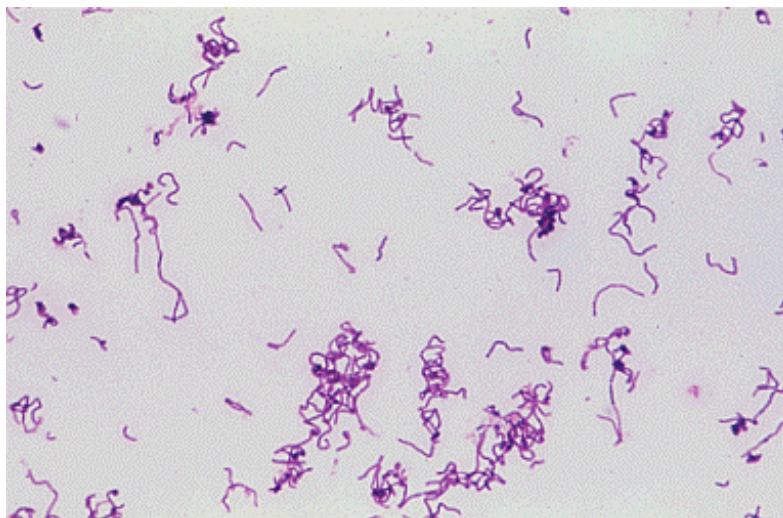
## IV. RESULTADOS

### 4.1. IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA

De las 30 muestras de alimentos se obtuvieron 65 aislados de bacterias ácido lácticas (BAL). Los lactobacilos productores de EPS fueron seleccionados por tinción Gram y rasgo mucoso de la colonia, se obtuvieron 30 aislados con características típicas de este género como: Gram positivo, catalasa negativa, no esporulada, microaerófila y fermentadoras de azúcares además de su morfología celular de bacilos. Según estas pruebas bacteriológicas se establece una identificación preliminar de las especies de lactobacilos encontradas (Tabla 4). A los 30 aislados seleccionados se les identificó inicialmente mediante pruebas tradicionales y fermentación de carbohidratos. En la lectura e interpretación de los perfiles bioquímicos correspondientes a las especies de *Lactobacillus* se utilizó las tablas descritas en el manual Bergey, así como los mostrados por las cepas de colección: *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, y *Lb. acidophilus*, obteniéndose cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. Acidophilus*, *Lactobacillus* sp, en la proporción de 5, 4, 6, 4, 3, 5, 3, respectivamente.

La capacidad de degradación de los azúcares por los diferentes aislados se presenta en la Tabla 3, en esta se puede observar que cada lactobacilo muestra un perfil metabólico característico que no permite una identificación precisa al compararlo con los descritos en el Manual Bergey, ejemplo de estos casos se presenta con los aislados Y-4, Q9-2, Q7-3 y 2P-1.

La prueba molecular fue aplicada a aquellos aislados que presentaron una mayor producción de EPS lo cual se determinó con una evaluación preliminar de la cantidad del polímero sintetizado, de esta evaluación se seleccionaron 15 lactobacilos, los cuales fueron sometidos a la prueba de PCR utilizando cebadores específicos a partir de las zonas conservadas de las regiones intergénicas de los genes ribosómicos 16S-23S, lo que permitió una identificación más precisa de los 15 lactobacilos. En la tabla 2 se presenta las características de los cebadores utilizados y los tamaños de los productos amplificados. Los cebadores dan origen a productos de PCR de diferentes tamaños, siendo estos de 520, 500, 450, 420, 300 y 184 pb. Para las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. Fermentum*, *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* respectivamente.



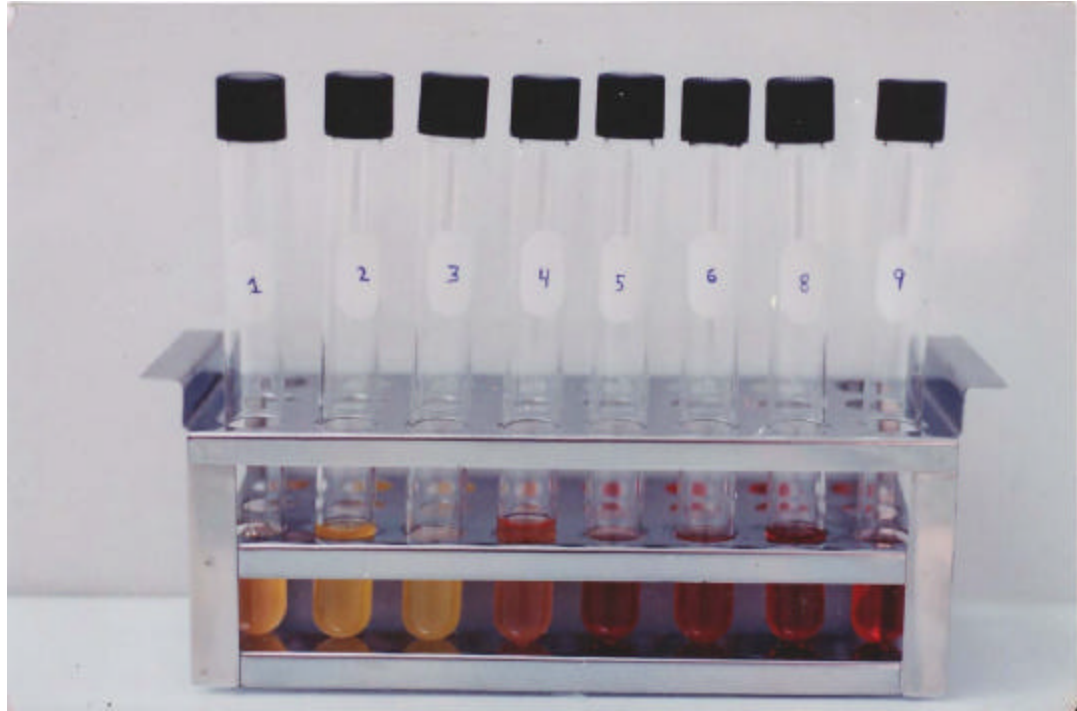
**Fig.2. vista microscópica de Lactobacilos según tinción Gram**

Tabla 3.- Fermentación de carbohidratos de los lactobacilos aislados de diferentes fuentes naturales.

Pruebas aislados	Crecim. a 15 °C	Crecim. a 45 °C	Arabinosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Manitol	Melobiosa	Ramnosa	Sorbitol	Sucrosa	Trehalosa	Xilosa
MZ-4	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Q7-3	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
LAB-6	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Q9-2	+	-	+	+	-	<b>d</b>	+	+	-	+	+	-	-
2P-1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
4P-1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
LB-2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Y-5	-	+	-	+	-	-	-	<b>d</b>	-	<b>d</b>	-	-	-
J5-2	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Y-4	-	+	-	+	-	+	<b>d</b>	+	-	-	+	-	-
J-1	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<b>d</b>	-
LB-9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Q6-2	+	-	-	+	<b>d</b>	+	+	+	-	-	+	+	-
MZ-2	-	+	<b>D</b>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Q5-3	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-

(-), no fermenta; (+), fermenta; (d), no determinada.





**Fig. 3. Fermentación de carbohidratos.** Por la cepa Q-5-3: 1; arabinosa, 2; galactosa, 3; manitol, 4; maltosa, 5; melobiosa, 6; trehalosa, 8; xilosa, 9; ramnosa.

Tabla 4: Aislados preseleccionados de *Lactobacillus*, según su procedencia y resultado de identificación, tradicional y molecular.

Aislado	Fuente de procedencia	Prueba microbiológica	Prueba molecular
Lab 2	Vino artesanal	<i>Lb.fermentum</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
Lab 6	Vino artesanal	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i>
Lab9	Vino artesanal	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Lb. plantarum</i>
2p1	Tracto GI de pollo	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
4p1	Tracto GI de pollo	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
J-1	Jugo de fruta	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>
J5-2	Jugo de fruta	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>
Y-1	Yogur natural	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lb. casei</i>
Y-5	Yogur natural	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>
Q5-3	Queso artesanal	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Q6-2	Queso artesanal	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fermentum</i>
Q9-2	Queso artesanal	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lb.casei</i>
Mz-2	Mazato	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. helveticus</i>
Mz-4	Mazato	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lb. plantarum</i>

## 4.2 PRODUCCIÓN DE EPS

En condiciones normales los lactobacilos produjeron EPS en concentraciones de 0.097 g/L a 1.535 g/L, estos valores se encuentran dentro de los descritos para tales especies de lactobacilos. Estas bajas concentraciones de EPS no son las necesarias para ser consideradas como aditivo alimentario para la cual la producción debería ser entre 10-15 g/L como lo hace *Xanthomonas*, sin embargo los EPS producidos por lactobacilos presentan mejores cualidades además de otros valores agregados como ser microorganismos de grado alimentario y contribuir positivamente a la salud del hospedero lo que hace importante y justifica su estudio.

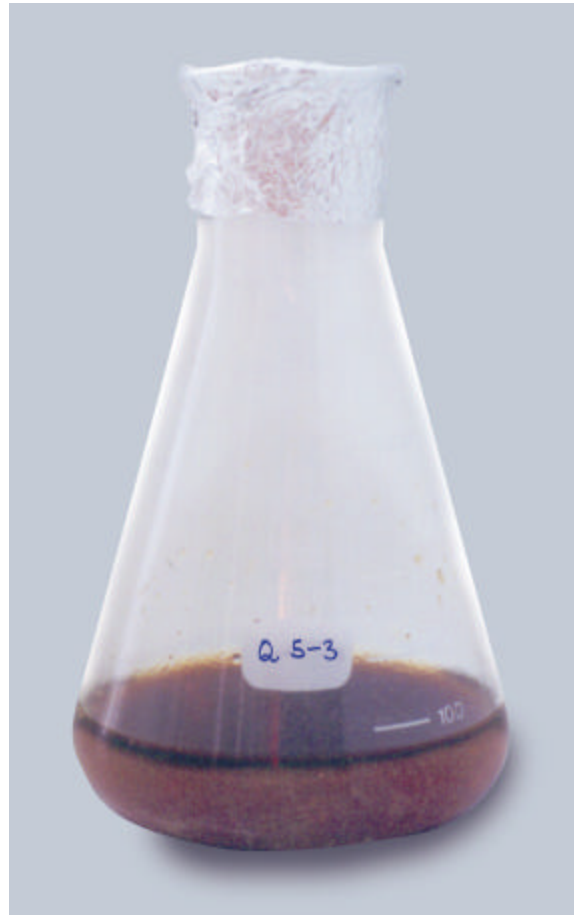


Fig. 4. Caldo MRS conteniendo el exopolisacárido producido por el aislado Q5-3, En caldo MRS.

### 4.3 ENSAYOS PRELIMINARES DE OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Con el fin de obtener una mayor producción de EPS se modificaron las condiciones de crecimiento en base a estudios previos los cuales demuestran que la síntesis del polímero depende mucho de factores fisicoquímicos, que no necesariamente están relacionados con sus condiciones óptimas de crecimiento. Para lo cual se hicieron pruebas modificando la temperaturas, pH inicial y la fuente de carbono del medio de cultivo, estas pruebas preliminares de optimización se realizaron en cinco cepas bajo el criterio de mayor producción, se ensayaron condiciones diferentes para cada parámetro establecido, manteniendo constantes los otros. (Tablas 5 , 6 y 7)

El pH y temperatura óptima para cada cepa se observa en letra negrita en las tablas 5,6 y7, estas pruebas fueron realizadas utilizando los medios MRS y MRS modificado a los cuales solo se les añadió glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa y galactosa, encontrando que la mejor fuente de carbono es glucosa para la cepa Q5-3 en caldo MRS modificado a una temperatura de 30° C y a pH inicial de 5.5 produjo 1.535 g/L de EPS.

Las cepas Mz-4 y Q5-3 identificadas como *Lactobacillus plantarum* reportaron una temperatura óptima de 30°C para la mayor producción de EPS muy diferente a la temperatura usual de crecimiento de su especie, sin embargo la cantidad de EPS producido varía notablemente. Las temperaturas óptimas de crecimiento y producción para la cepa y-1 correspondiente a la especie *Lactobacillus casei* fueron similares siendo esta de 30°C, mientras que para la cepa Lb-2 ambas temperaturas difirieron en 5°C al igual que la concentración de EPS producida siendo de 1.02 g. El pH óptimo para las cepas Mz-4 , Y-1 y J5-2 fue de 6.0, mientras que para Q5-3 y Lb-2 fue 5.0.

En el ensayo a diferentes fuentes de carbono se obtuvo que la cepa *Lactobacillus plantarum* Q5-3 mostró una mayor producción de EPS utilizando glucosa como fuente de carbono a 20g/l lo cual representa un conversión del 7.68 % del sustrato.

Tabla 5: Producción de \*EPS por lactobacilos seleccionados a diferentes temperaturas.

Temperatura en °C Cepas	15	20	25	30	35	40
Lb-2	0.126	0.310	0.324	0.945	<b>1.096</b>	0.642
Q5-3	1.232	<b>1.535</b>	1.051	0.754	0.734	0.322
J5-2	0.412	0.820	<b>0.846</b>	0.513	0.124	0.104
y-1	0.132	0.210	0.456	<b>0.495</b>	0.101	0.055
Mz-4	0.213	<b>0.804</b>	0.445	0.265	0.213	0.0571

\*Cantidades de EPS expresadas en g/l,

Tabla 6: Producción de \*EPS por lactobacilos seleccionados a diferentes pH iniciales.

pH Cepas	5.5	6.0	6.5
Lb-2	<b>1.231</b>	1.025	0.456
Q5-3	<b>1.426</b>	0.945	0.845
J5-2	0.156	<b>0.575</b>	0.048
y-1	0.489	<b>0.516</b>	0.175
Mz-4	0.125g	<b>0.642</b>	0.462

\*Cantidades de EPS expresadas en g/l.

Tabla 7: Producción de \*EPS por lactobacilos utilizando diferentes fuentes de carbono.

CH Cepas	glucosa	sacarosa	lactosa	maltosa	galactosa
Lb-2	0.236	<b>0.270</b>	0.189	0.047	0.126
Q5-3	<b>1.479</b>	0.456	0.125	0.456	0.097
J5-2	0.456	<b>0.812</b>	0.146	0.287	0.145
y-1	0.234	0.1970	0.321	<b>0.549</b>	0.123
Mz-4	0.213	<b>0.754</b>	0.098	0.178	0.203

\*Cantidades de EPS expresadas en g/L.

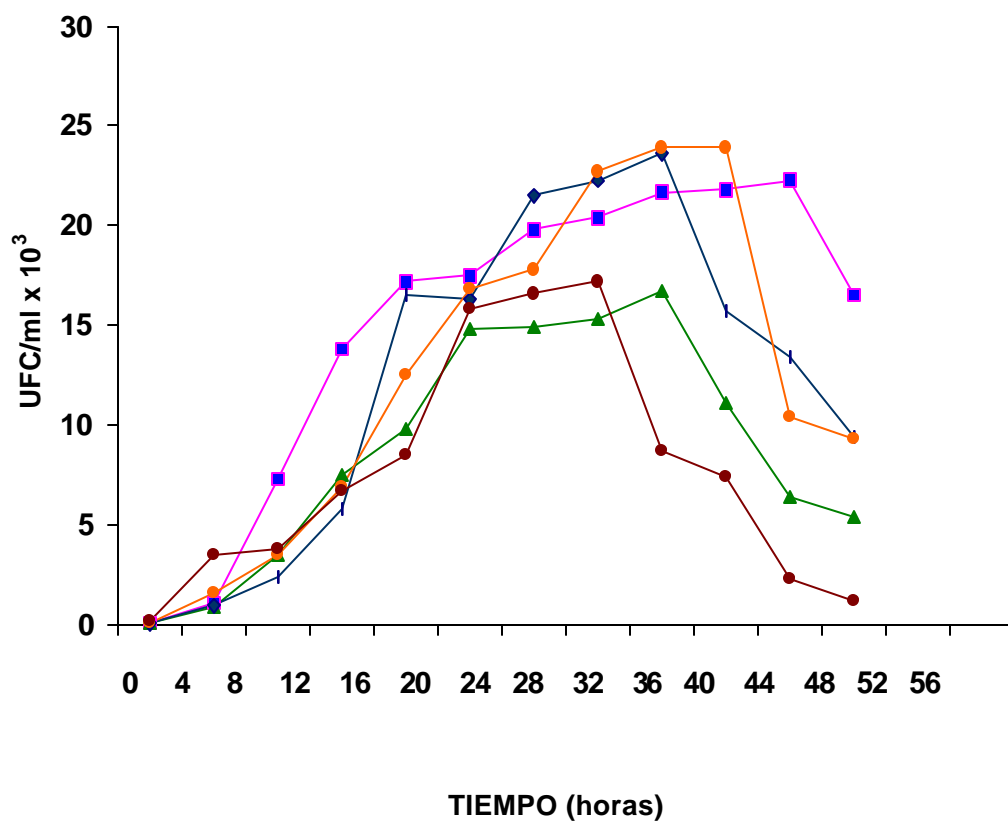


Figura 5.- Curva de crecimiento de los lactobacilos. --- Q5-3, ●--- Lb-2,  
 ◆--- J5-2, ▲--- Y-1, ●--- Mz-4

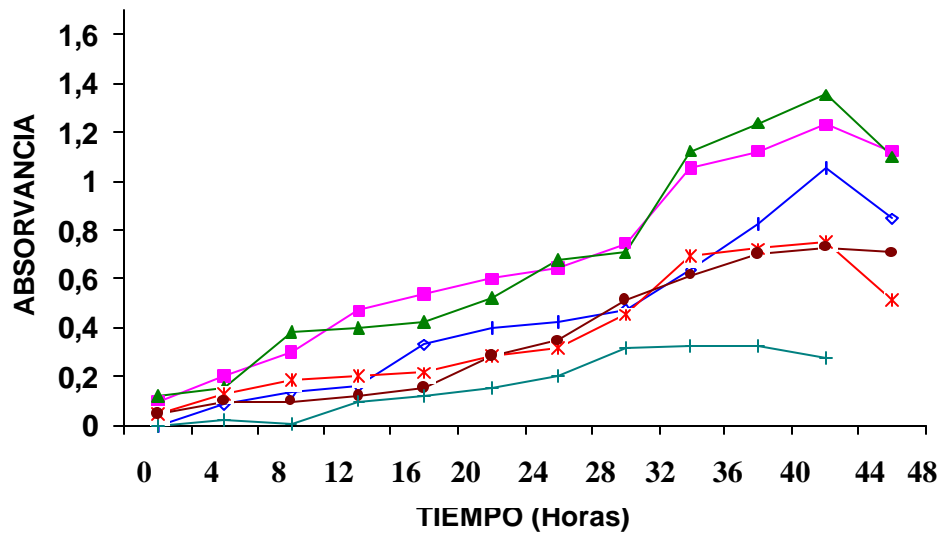


Figura 6.- Producción de EPS de la cepa Q5-3 a distintas temperaturas. ---15°C, ▲--- 20°C, ◆---- 25°C, ●--- 30°C, ●--- 35°C, +--+ 40°C.



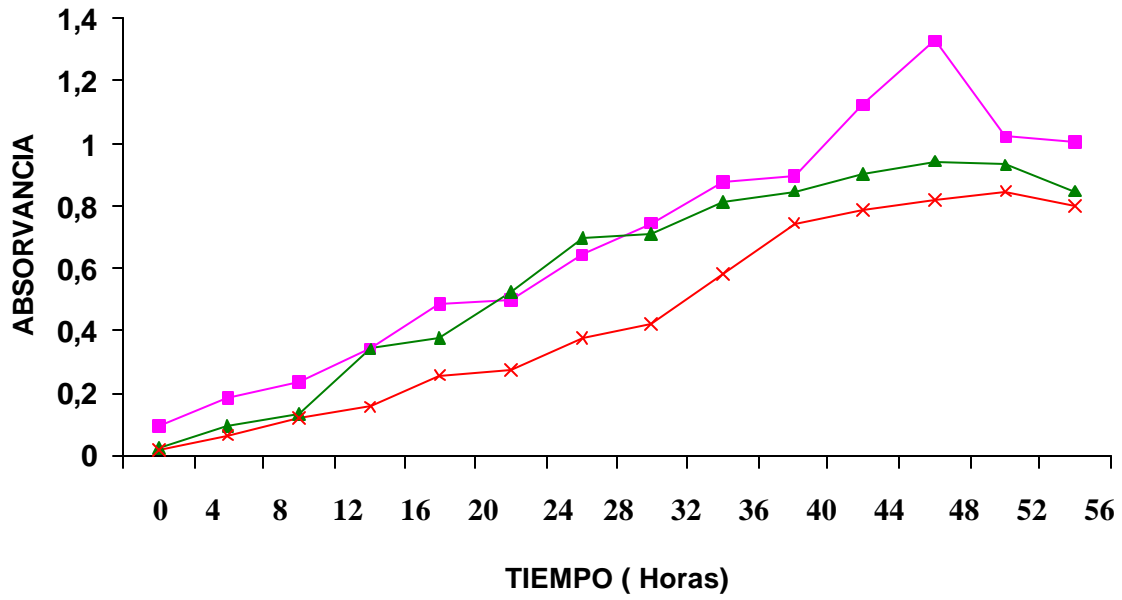


Fig. 7.- Producción de EPS de la cepa Q5-3 a distintos pH. --- pH 5.5 , ▲-- pH6,

● --- Ph6.5

## V. DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Lactobacillus* denominados como seguros o GRAS (Generally Recognized as Safe) son microorganismos Gram positivos, catalasa negativo, no esporulados, inmóviles y fermentadores, éstas características permitieron seleccionar 30 lactobacilos de diferentes orígenes descritos en trabajos previos (1, 2,4).

Los lactobacilos seleccionados comparten muchas características metabólicas, que no permiten identificar con certeza a la especie que pertenece. Así, los aislados Q5-3 y Mz-4 tienen diferentes perfiles de fermentación para galactosa, lactosa, maltosa y sorbitol (tabla 3) al comparar su lectura con las del manual Bergey indicaría que son especies distintas si solo se consideran estas pruebas metabólicas. Sin embargo, cuando se utilizaron las pruebas biomoleculares, los dos aislados pertenecen a una misma especie, estas diferencias indican que las características fenotípicas generalmente no se relacionan con la genotípicas (51).

La zona intergénica entre los genes ribosómicos 16S y 23S es altamente conservada para cada especie del género *Lactobacillus*, a su vez muy polimórfica en secuencia y tamaño entre las especies del mismo género. Estas características han permitido el diseño de cebadores universales para identificar y caracterizar diferentes especies y cepas bacterianas (52,53). El uso de cebadores específicos para los espaciadores intergénicos 16S-23S y genes ribosómicos 16S (Tabla 2) en la técnica de la PCR permitieron determinar la especie de los lactobacilos aislados de diferentes orígenes. Para la identificación de especies BAL que sobreviven al pasaje gastrointestinal se ha utilizado la técnica de PCR del espaciador intergénico 16S-23S para una selección primaria de las

cepas y un análisis con enzimas de restricción combinado con “pulsed- field gel electroforesis” (PFGE) (56). En los últimos años existen numerosos reportes que describen métodos rápidos, simples y discriminatorios en la identificación de BAL. Los genes ribosómicos 16S amplificados por PCR son continuamente utilizados en la identificación bacteriana, sin embargo, se ha determinado que también la región intergénica 16S–23S puede tener las mismas características de tener secuencias específicas para cada especie (65).

La región intergénica entre los genes 16S-23S permitió diferenciar entre *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri* y *Lb. salivarius* demostrando que este método es mucho mas discriminatorio que utilizar el sistema Api CHL50 que se basa en la fermentación de azúcares (65, 56,54).

La zona íntergénica entre los genes 16S-23S son biomarcadores específicos en la identificación de lactobacilos ya que permitieron diferenciar entre cepas como Lb-9 y Q9-2, las cuales en la pruebas bacteriológicas presentaron perfiles de fermentación de carbohidratos similares indicándonos que se trataban de la misma especie, todo lo contrario a las técnicas moleculares. Asimismo, algunas cepas como Mz-4 y Q5-3 presentaron el metabolismo de carbohidratos diferentes, sin embargo son de la misma especie. El análisis de la fermentación de carbohidratos no es muy específico para la identificación de lactobacilos como se ha observado en el caso de *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* y *Lb. casei*, por lo que, se sugiere utilizar técnicas con mayor grado de especificidad como las moleculares.

La optimización del medio de crecimiento es importante para lograr una producción máxima de EPS en organismos tales como *Xhantomonas*, *Pseudomonas* y *Rhizobium spp* y BAL, por lo que se han publicado estudios de optimización para la producción de EPS por BAL estos estudios incluyen la evaluación de efectos del medio frente a condiciones como temperatura, pH, fuente de carbono, nivel de oxígeno, concentración de nitrógeno,

composición del medio de cultivo. Siendo las más significativas el efecto de la temperatura, pH y fuente de carbono. El total de EPS producido por las diferentes especies bacterianas depende los parámetros mencionados (64, 63, 66,67), por lo que se utilizaron para optimizar la producción de EPS. La cepa de mayor producción fue Q5-3 la cual fue identificada como *Lactobacillus plantarum*, esta especie ha sido poco descrita como productora de EPS, pero es de gran interés para los investigadores del mundo ya que posee un gran número de atributos debido a los compuestos secundarios que produce como resultado de su metabolismo que son de utilidad en las diferentes industrias, además de contar con una cepa de *Lb. plantarum* productora de EPS, es muy valioso desde el punto de vista biotecnológico e industrial (10,11). La cantidad de EPS producido por cada cepa depende del tipo de carbohidrato utilizado como fuente de carbono, ya que en estudios como el dirigido para *Lb. casei* C611 se demostró que la producción de EPS depende de glucosa siendo la lactosa el medio menos eficiente (63 ), similar resultado se obtuvo con la cepa Q5-3. Bryan y col.(64) reportaron que los contenidos de ramnosa en el EPS producido por *Klebsiella sp* variedad K32 y *Acinetobacter calcoetides* dependen de la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento por lo cual es necesario hacer una identificación estructural del EPS para elegir otras fuentes de carbono. Mozzi y col. (58), examinaron el efecto de la temperatura sobre varias cepas de *Lb. delbrueckii* productoras de biopolímero, encontrando la cepa NCFB2772 produjo mayor concentración de EPS al ser cultivada a 48°C la cual es una temperatura superior a la temperatura óptima de crecimiento ( 37-42 °C).Estos estudios muestran que no hay una correlación entre la temperatura óptima de crecimiento y la temperatura a la cual se obtiene la máxima producción del polisacárido, también se ha reportado una alta producción del EPS por la cepa RR por debajo de su temperatura optima de crecimiento (68). Las temperaturas óptimas para la síntesis de EPS se han determinado para un número de BAL encontrando que para la especie *Lactococcus lactis* 25 °C, para *Streptococcus thermophilus* 37°C, *Lb*

*ramnosus* entre 20 y 25 °C, Gamar y col. (69). Por ejemplo la temperatura óptima de producción de EPS de *Lactobacillus delbrueckii* Lb-2 fue de 25°C siendo esta diferente a la temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 30-37 °C. Vanden Berg y col (57) realizaron un estudio para evaluar los efectos de temperatura y pH en la producción de EPS por *Lb. sake* ellos encontraron las condiciones óptimas de producción a 20 °C y pH 5.8. Mozzi y col.(58) encontraron que la síntesis máxima del polímero para *Lb. casei* CRL 870 es de 488 mg/l a 30°C a pH 6.

Varios autores han reportado que las bajas temperaturas inducen a la formación del limo o rasgo mucoso esto se demuestra observando el comportamiento de bacterias Gram negativo ya que éstas crecen lentamente sintetizando mas moléculas del transportador lípido isoprenopide clave en la síntesis de EPS; sin embargo otros estudios describen que a temperaturas mayores que la óptima favorecen la producción de EPS, para el caso de lactobacilos mesófilos la temperatura óptima de producción del polisacárido no coincide con la de crecimiento.

Se han hecho varias revisiones sobre la influencia del pH y la composición del medio en la producción de EPS (70, 71). Los valores de pH varían de una especie a otra siendo el pH óptimo específico para cada microorganismo. Las condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo de incubación mejoran la producción del polisacárido (5). Las condiciones de pH óptimas generalmente están cercanas a 6 para lactobacilos. Un pH mayor causa una fase estacionaria larga y disminuye la síntesis de peptidoglicanos, ácido teicoico y podría dar lugar a la producción creciente de EPS. El mantenimiento de un pH alto podría resultar en el incremento de la producción de EPS. En las cepas Mz-4, J5-2 y Y-1 se observaron una mayor producción a un pH 6.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 65 lactobacilos a partir de 30 muestras aleatorias y de fuente nativas diferentes de las cuales se seleccionaron 15 de ellos productores de EPS.
2. Las concentraciones de EPS producidos por los lactobacilos seleccionados estuvieron en los rangos de 0.097mg a 1.535 mg, siendo el aislado Q5-3 el que presentó mayor producción del polímero.
3. De los 15 lactobacilos se identificaron mediante la PCR las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*. correspondientes en numero de cepas a 3, 2, 3, 3, 3, 1, respectivamente
4. Las condiciones de cultivo que permitieron la mayor producción de EPS por la cepa Q5-3 fueron 30°C, pH 5.5 y glucosa a una concentración de 20g/L.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1.- Identificación estructural del EPS.
- 2.- Evaluación de las propiedades reológicas del EPS.
- 3.- Mejoramiento genético de la cepa Q5-3.

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ADAMS M.R. and MOSS M.O.(1997). Microbiología de los Alimentos. ZARAGOZA Ed. Acribia, pg. 321-329 .
- 2.- ZAMUDIO KL and ZAVALETA AI(2001). Identificación molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de vinos tintos. Libro de Resúmenes del II Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería ( Lambayeque-Perú). pg.92
- 3.- LAWS A, GU Y and MARSHALL V (2001). Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 19: 597-625.
- 4.- SNERTH PI, MAIR NS, SHARPE ME and HOLT JE (1986). *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilking, Baltimore .
- 5.- DE VUYST L and DEGEEST B (1999 ). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- 6.- CERNING J (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionil bacteria. *Lait.* 75: 463-472.
- 7.- STILES ME and HOLZAPFEL WM (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.
- 8.- SUTHERLAND LW (1994). Structure–function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotech. Adv.* 12: 393-448.
- 9.- SUTHERLAND LW (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16: 41-46.
- 10.- WELMAN AD and MEDDOX LS (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *TRENDS Biotech.* 21: 269-274
- 11.- DUBOC P and MOLLET B (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* 11: 759-768



- 12.- CERNING J, BOUILLANNE C, DESMAZEAUD MJ and LANDON M (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Lett. 8, 625–628.
- 13.- DUEÑAS-CHASCO MT, RODRIGUEZ-CARBAJAL MA, TEJERO-MATEO P, ESPARTERO JL, IRASTORZA-IRIBAS A and GIL-SERRANO AM (1997). Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. Carbohydr. Res.307: 125-133.
- 14.- RUAS-MADIEDO P, HUGENHOLTZ L and ZOON P (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 12: 163-171.
- 15.- FABER EJ, VAN DEN HAAK M, KAMERLING JP, and VLIEGENTHART JF (2001). Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. Carbohydr. Res. 310, 269-276
- 16.- MARSHALL VM, DUNN H, ELVIN M, McLAY N, GU Y and LAWS AP(2001). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EDU20. Carbohydr. Res. 331, 413-422.
- 17.- ROBIJN GW, VAN DEN BERG DJC, HAAS H, KARNERLING JP and VLIEGENTHART JFG (1995). Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. Carbohydr. Res. 276: 117–136.
- 18.- GARCIA-GARIBAY M and MARSHALL VME (1991). Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Appl.Bacteriol. 70: 325-328
- 19.- SMITINONT T, TANSAKUL C, TANASUPAWAT S, KEERATIPIBUL S NAVARINI L, BASCO M and CESCUTTI P (1999). Exopolysaccharide-producing lactic

acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 105-111.

20.- STAAF M, YANG Z, HUTTUNEN E and WIDMALM G (2000) Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* MGI363. *Carbohyd. Res.* 326: 113-119

21.- VANHAVERBEKE C, BOSSO C, COLIN-MOREL P, GEY C, GAMAR-NOURANI L, BLONDEAU K, SIMONET JM and HEYRAUD A (1998). Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Carbohyd. Res.* 314: 211-220

22.- YANG A, STAAF M, HUTTUNEN E and WIDMALM G (2000). Structure of a viscous exopolysaccharides produced by *Lactobacillus helveticus* K16. *Carbohyd. Res.* 329: 465-469

23.- DOCO T, CARCANO D, RAMOS P, LOONES A and FOURNET B (1991). Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *J. Dairy Res.* 58: 147– 150.

24.- BOUZAR F, CERNING J and DESMAZEAUD M (1996). Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ1187 and by two colonial variants. *J. Dairy Sci.* 79: 205-211

25.- KIMMEL SA, ROBERTS RF and ZIEGLER GR (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 659-664.

26.- GROBBEN GJ, SMITH MR, SIKKEMA J and DE BONT JAM (1996) Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes

involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 279–284

27.- GRUTER M, LEEFLANG BR, KUIPER J, KAMERLING JP and VLIEGENTHART JFG (1993). Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrückii* subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk. Carbohydr. Res. 239: 209–226.

28.- DEGEEST B and DE VUYST L (2000). Correlation of activities of the enzymes  $\alpha$ -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3519-3527

29.- DE VUYST L (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int dairy J. 11: 687-707

30.- VAN KRANENBURG R (1999). Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 498-504

31.- VAN KRANENBURG R (1997). Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gne cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 24: 387-397

32.- JOLLY L and STINGELE F (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene cluster in lactic acid bacteria. Int. dairy J. 11: 733-745.

33.- KITAZAWA H, YAMAGUCHI T, MIURA M, SAITO T and ITOH H (1993). B-Cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from rOPY sour milk, viili. J. Dairy Sci. 76: 1514-1519

34.- NAKAJIMA H, TOBA T and TOYODA S (1995) Enhancement of antigen specific antibody production by extracellular slime products from slime-forming *Lactococcus*

- lactis* subsp. *Cremoris* SBT 0495 in mice. *Inter. J. Food Microbiol.* 25: 153-158.
- 35.- LOOIJESTEIJN PJ, TRAPET L, DE VRIES E, ABEE T and HUGENHOLTZ J (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Inter. J. Food microbiol.* 64: 71-80
- 36.- ZUBILLAGA M, WEILL R, POSTAIRE E, GOLDMAN C, CARO R and BOCCIO J (2001). Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res.* 21: 569-579
- 37.- GIBSON GR and ROBERFROID MB (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 124: 1401-1412
- 38.- DUUS JO, GOTFREDSEN CH and BOCK K (2000). Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chem Rev.* 100: 4589-4614
- 39.- LEEFLANG BR, FABER EJ, ERBEL P and Vliegентаhrt JFG (2000). Structure elucidation of glycoprotein glycans and of polysaccharides by NMR spectroscopy. *J. Biotechnol.* 77: 115-122
- 40.- VINCENT SJF and ZWAHLEN C (2000). Dipole-dipole cross-correlation at  $^{13}\text{C}$  natural abundance: a structural tool for polysaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 8307-8308
- 41.- NAVARINI L, ABATANGELO A, BERTOCCHI C, CONTI E, BOSCO M and PICOTTI F (2001). Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFI20. *Int. J. Biol. Macromol.* 28: 219-226
- 42.- BENDIAK B (1999). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of peracetylated oligosaccharides having  $^{13}\text{C}$ -labeled carbonyl groups in lieu of permethylation analysis for establishing linkage substituins of sugars. *Carbohydr. Res.* 315:206-21

- 43.- GONZALEZ CJ, ENCINAS JP, GARCIA-LOPEZ ML and OTERO A (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater. *Food Microbiol.* 17: 383–391.
- 44.- CORSETTI A, LAVERMICOCCA P, MOREA M, BARUZZI F, TOSTI N and GOBBETTI M (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from Microbiology wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food.* 64: 95–104.
- 45.- MUYANJA C, NARVHUS J A, TREIMO J and LANGSRUD T (2003). Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 201–210.
- 46.- LEISNER J J, VANCANNEYT M, RUSUL G, POT B, LEFEBVRE K, FRESI A and TEE L K (2001). Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* 63: 149–157.
- 47.- TEMMERMAN R, MASCO L, VANHOUTTE T, HUYS G and SWINGS J (2003). Development and validation of a nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6380–6385.
- 48.- TORRIANI S, CLEMENTI F, VANCANNEYT M, HOSTE B, DELLAGLIO F and KERSTERS K (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Sys. Appl. Microbiol.* 24: 554–560.
- 49.- LEE K.-Y, SO J.-S and HEO T.-R (2001). Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *J. Microbiol. Methods.* 45: 1–6.
- 50.- NAGPAL L, FOX KF and FOX A (1998). Utility of 16S-23S rRNA spacer region interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms. *J.*

Microbiol. Methods. 33:211-219

51.- YEUNG PS, SANDERS ME, KITTS CL, CANO R and TONG PS (2002). Species-specific identification of commercial probiotics strains. J. Dairy Sci. 85: 1039-1051

52.- JENSEN MA, WEBSTER JA and STRAUS N (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 945-952.

53.- ZAVALETA AI, MARTINEZ-MURCIA AJ and RODRIGUEZ-VALERA F (1996). 16S-23DNA Intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically and homogenous. Microbiology 142:2105-2114

54.- FISHER MN and TRIPLETT EW (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and ITS application to fishwater bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4630-4636

55.- GARCIA MARTINEZ J, ACINAS SG, ANTÓN AI and RODRÍGUEZ-VALERA F (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Methods. 36:55-64

56.- WALTER J, TANNOCK W, TILSALA-TAMISJARVI A, RODTONG S, LOACH SM, MUNRO K and ALOTOSSV A (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 66:297-303.

57.- VAN DEN BERG DJE, ROBIJN GW, JANSSEN AC, GIUSEPPIN MLF, VREEKER R, KAFKLERLING LP, VLEGENTHART FG, LEDEBOER AM and VERRIPS TC (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.

58.- MOZZI F, SAVOY DE GIORI G, OLIVER G and FONT De VALDEZ G (1994) Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by

*Lactobacillus casei*. Milchwissenschaft 49: 667–670.

59.- GASSEM MA, SCHMIDT KA and FRANK JF (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Food Sci. 62:(207) 171–173.

60.- GROBBEN GJ, CHIN-JOE I, KITZEN VA, BOELS IC, BOER F, SIKKEMA J, SMITH MR and DE BONT JAM (1998). Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1333–1337.

61.- KUNENE NF, GEORNADA SI, von HOLY A. and HASTING JW (2000) Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from sorghum- based fermented weaning food by analysis of soluble protein and amplified fragment length polymorphism finger printing. Appl. Environ. Microbiol. 66:1084-1092.

62.- DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON L.K, REBERS PA.and SMITH F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

63.- CERNING J, RENARD CMGC, THIBAUT JF, BOUILLANNE C, LANDON M. DESMAZEAUD M and TOPOSIROVIC L (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3914-3919

64.- BRYAN BA, LENHARDT RJ and DANIELS L (1986). Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. Strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Appl. Environ. Microbiol. 51:1304-1308

65.- CHAGNAUD P, MACHINI SK., COUTTE LA, MARECAT A and MERCENIER A (2001) Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six

common *Lactobacillus* species. J. Microbiol. Methods. 49: 134-148.

66.- LOOIJESTEIJN PJ, VAN CASTEREN WHM, TUINIER R. and HUGENHOLTZ J (2000). Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subs. *Cremoris* by continuous cultures. J. Appl. Microbiol. 89:116-122

67.- MACEDO MG (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. Int. Dairy J. 12, 419-426

68.- VAN GEL -SCHUTTEN GH, FLESCHE F, TEN BRINK B, SMITH MR and DISKINIZEN L (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:697-703

69.- GAMAR L, BLONDEAU K and SIMONET J M (1997). Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 83, 281-287.

70.- RICCIARDI A. and CLEMENTI F (2000). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structure, production and technological applications. Italian J. Food sci. 1:23-45.

71.- CERNING J and MARSHALL VME (1999). Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. Recent. Results. and Microbiol. 3:195-209



## ANEXO 1

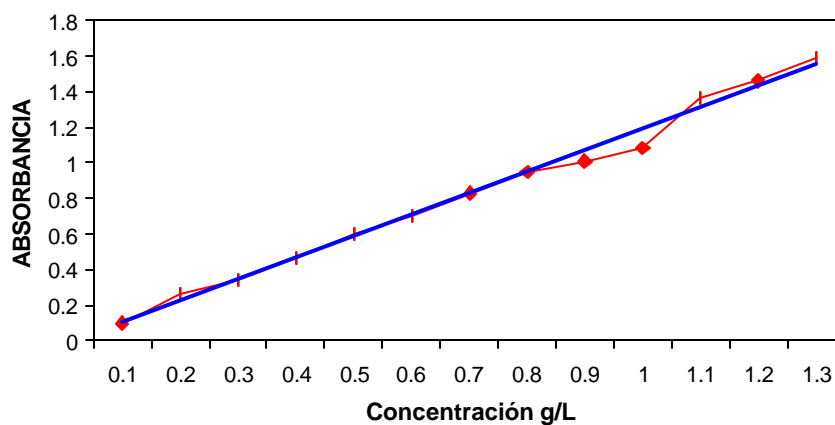


Fig. 8. Curva de calibración del estándar Dextrano.

**Tabla 8. Densidades ópticas del estandar Dextrano**

DENSIDAD OPTICA(Abs. 490 nm)	CONCENTRACION DE EPS g/L
0.26	0.2
0.34	0.3
0.47	0.4
0.6	0.5
0.7	0.6
0.83	0.7
0.95	0.8
1.01	0.9
1.08	1
1.36	1.1
1.46	1.2
1.59	1.3

## ANEXO 2

Tabla 9. Densidad ópticas obtenidas para determinar las curvas de crecimiento de los 5 aislados productores de EPS.

aislados					
Tiempo (horas)	Q5-3	Lb-2	J5-2	Y-1	MZ-4
4	0.1	0.1	0.05	0.1	0.2
8	1.1	0.9	0.95	1.6	3.5
12	7.3	3.5	2.4	3.5	3.8
16	13.8	7.5	5.8	6.9	6.7
20	17.2	9.8	16.5	12.5	8.5
24	17.5	14.8	16.3	16.8	15.8
28	19.8	14.9	21.5	17.8	16.6
32	20.4	15.3	22.3	22.7	17.2
36	21.7	16.7	23.6	23.9	8.7
40	21.8	11.1	15.7	23.9	7.4
44	22.3	6.4	13.4	10.4	2.3
48	16.5	5.4	9.4	9.3	1.2

\*Abs.(600 nm )  $\times 10^{-1}$

### ANEXO 3

Tabla 10. Concentraciones (g/L) de la producción de EPS por la cepa Q5-3 a diferentes temperaturas y tiempo.

TEMPERATURA (C°)						
TIEMPO (horas)	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>
0	0.098	0.12	0.0012	0.05	0.048	0.0023
4	0.2	0.156	0.081	0.13	0.098	0.023
8	0.298	0.387	0.14	0.186	0.099	0.0059
12	0.468	0.403	0.16	0.197	0.123	0.098
16	0.542	0.421	0.33	0.213	0.156	0.123
20	0.6	0.524	0.4	0.287	0.284	0.156
24	0.645	0.675	0.42	0.312	0.345	0.201
28	0.745	0.71	0.48	0.456	0.512	0.315
32	1.054	1.123	0.64	0.69	0.6158	0.32
36	1.123	1.24	0.82	0.721	0.698	0.322
40	1.232	1.352	1.051	0.754	0.734	0.278
44	1.123	1.102	0.85	0.512	0.71	0.2456
48	0.987	0.912	0.81	0.498	0.645	0.2156
52	0.974	0.847	0.745	0.4023	0.5124	0.2018

## ANEXO 4

Tabla 11. Concentraciones (g/L) de la producción de EPS por la cepa Q5-3 a diferentes tiempos y pH.

<b>pH</b>	<b>5.5</b>	<b>6.0</b>	<b>6.5</b>
<b>TIEMPO ( horas)</b>			
0	0.098	0.025	0.019
4	0.189	0.098	0.064
8	0.235	0.135	0.123
12	0.3448	0.345	0.154
16	0.485	0.378	0.259
20	0.498	0.524	0.2789
24	0.645	0.698	0.378
28	0.745	0.71	0.4213
32	0.875	0.8102	0.58
36	0.895	0.845	0.745
40	1.123	0.9	0.79
44	1.326	0.945	0.82
48	1.024	0.93	0.845
52	1.005	0.845	0.801

## ANEXO 5

### MEDIOS DE CULTIVO

#### MRS ( Man Rogosa Sharpe)

Peptona de caseína.....	10 g
Extracto de carne .....	1 g
Extracto de levadura.....	5 g
Glucosa .....	15 g
Difosfato ácido de potasio .....	g
Citrato de amonio .....	2g
sulfato de magnesio heptahidratado.....	0.5g
sulfato de manganeso tetrahidratado.....	0.2g
Tween 80.....	1.0 ml
Agar-agar.....	.18 g
Agua destilada pH 6.5 c.s.p. ....	1000 mL

Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 15'.

#### MRS-Modificado (Man Rogosa Sharpe)

Peptona de caseína.....	10 g
Extracto de carne .....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Carbohidrato.....	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g
Citrato de amonio.....	2 g

Acetato de sodio.....	5 g
Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	5 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0.2g
Mg+2.....	10 mg
Agua destilada pH 7.0 c.s.p. ....	1000 mL

Se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 PSI por 15 minutos. Luego a 45°C se le adicionó el carbohidrato a ensayar .

## ANEXO 6

### SOLUCIONES

Se utilizaron las soluciones STE y TE para la extracción de ácidos nucleicos, mientras que para la electroforesis en gel de agarosa se utilizaron las soluciones Gel loading buffer y los buffer de corrida TAE y TBE, estas dos últimas fueron preparadas como soluciones concentradas.

#### **Sodio – Tris – EDTA (STE)**

Cloruro de sodio	.....	100 mM
Tris	.....	50 mM
EDTA	.....	10 mM

Se ajustó el pH a 8,0 y se repartió en alícuotas de 10 mL.

#### **Tris – EDTA (TE)**

Tris	.....	10 mM
EDTA	.....	1 mM

Se ajustó el pH a 8,0 y se repartió en alícuotas de 1mL.

#### **Buffer de cargado o “Gel loading buffer”**

Azul de bromofenol al 10%	.....	0.25%
---------------------------	-------	-------

Xileno cianol	..... 0.25%
Glicerol esteril	..... 50% en agua bidestilada.

Se repartió en alícuotas de 1 mL y se conservó a – 20 °C.

**Buffer de corrida TAE (solución stock 50X)**

Tris base	..... 242 g
Ácido acético	..... 57.1 mL
0,5 M EDTA (pH 8.0)	..... 100 mL

Se ajustó a pH: 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 15'. Se conservó a temperatura ambiente.

**Buffer de corrida TBE (solución stock 5X)**

Tris base	.....54 g
Ácido bórico	.....27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	.....20 mL

Se ajustó a pH: 8,4; se adicionó agua bidestilada c.s.p. 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 PSI por 15'. Se conservó a temperatura ambiente.



## INDICE DE FIGURAS

- **Fig. 1.** Lactobacilos en medio MRS.
- **Fig.2.** vista microscópica de Lactobacilos según tinción Gram.
- **Fig. 3.** Fermentación de carbohidratos.
- **Fig. 4.** Caldo MRS conteniendo el exopolisacárido producido por el aislado Q5-3, en caldo MRS.
- **Fig. 5.** Curva de crecimiento de los lactobacilos.
- **Fig. 6.** Producción de EPS de la cepa Q5-3 a distintas temperaturas.
- **Fig. 7.** Producción de EPS de la cepa Q5-3 a distintos pH.
- **Fig. 8.** Curva de calibración del estándar Dextrano.

## INDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Cepas de Lactobacilos utilizadas.
- **Tabla 2.** Oligonucleótidos específicos para identificar las especies de *Lactobacillus* por PCR.
- **Tabla 3.** Fermentación de carbohidratos de los lactobacilos aislados de diferentes fuentes naturales.
- **Tabla 4.** Aislados preseleccionados de *Lactobacillus*, según su procedencia y resultado de su identificación, tradicional y molecular.
- **Tabla 5.** Producción de EPS por lactobacilos seleccionados a diferentes temperaturas.
- **Tabla 6.** Producción de EPS por lactobacilos seleccionados a diferentes pH iniciales.
- **Tabla 7.** Producción de EPS por lactobacilos utilizando diferentes fuentes de carbono.
- **Tabla 8.** Densidades ópticas del estándar Dextrano
- **Tabla 9.** Densidad ópticas obtenidas para determinar las curvas de crecimiento de los 5 aislados productores de EPS.
- **Tabla 10.** Concentraciones (g/L) de la producción de EPS por la cepa Q5-3 a diferentes temperaturas y tiempo.
- **Tabla 11.** Concentraciones (g/L) de la producción de EPS por la cepa Q5-3 a diferentes tiempos y pH.

## INDICE DE ANEXOS

**ANEXO 1** CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DEXTRANO.

**ANEXO 2** DENSIDADES OPTICAS OBTENIDAS PARA DETERMINAR LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LOS 5 AISLADOS PRODUCTORES DE EPS.

**ANEXO 3** CONCENTRACIONES DE LA PRODUCCIÓN DE EPS POR LA CEPA Q5-3 A DIFERENTES RTEMPERATURA Y TIEMPO.

**ANEXO 4** CONCENTRACIONES DE LA PRODUCCIÓN DE EPS POR LA CEPA Q5-3 ADIFERENTES TIEMPOS Y pH.

**ANEXO 5** MEDIOS DE CULTIVO.

**ANEXO 6** SOLUCIONES.