



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS



Producción de un exopolisacárido por la cepa de
Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides BL-UV04
en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante
un sistema en lote y lote alimentado

Tesis

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

I.Q Alejandra Escartin Torres

Director de Tesis:

Dr. Micloth López del Castillo Lozano

Xalapa, Veracruz

Septiembre, 2017



Universidad Veracruzana



La presente tesis titulada

Producción de un exopolisacárido por *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado

Realizada por la

I.Q. ALEJANDRA ESCARTIN TORRES

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 21 de septiembre de 2017.

Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo

Dr. Oscar García Barradas

Dr. Luis Gilberto Bermúdez Humaran

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca 614836/587032

A la Universidad Veracruzana y a la maestría en ciencias alimentarias, así como al cuerpo académico por la formación que nos brinda.

DEDICATORIAS

*A mis padres **Rosa María y Pedro**, por enseñarme que las cosas se logran a base de esfuerzo y dedicación.*

Gracias.

*Al **Dr. Micloth López Del Castillo Lozano** y a la **Dra. Carmen Bulbarela Sampieri** por la dirección de este trabajo de tesis, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible cumplir esta meta. Fue un gran placer trabajar con ustedes, me siento muy satisfecha y agradecida por su paciencia y dedicación hacia mi persona.*

Gracias.

*A la **Dra. Yolanda Cocotle Ronzón** y la **Dra Nieves Del Socorro** por abrirme las puertas para trabajar en el laboratorio 34 de la facultad de ciencias químicas, campus Xalapa, por su ayuda científica y personal, por estar siempre disponibles, por sus tiempos extras para estar trabajando conmigo en esta tesis, por hacer menos complicado realizar esta meta en mi vida, por enseñarme a confiar en mí y en mis capacidades.*

Gracias

*A la **I. en A. Maritza Monserrat, QFB Ana Lilia Tellez Mujica, QFB Hector Emmanuel Pérez Díaz** por ayudarme en todo momento de manera personal, por su compromiso conmigo para transmitirme todos sus conocimientos, lo valoro en gran medida.*

Gracias

A todos Gracias

Alejandra Escartin Torres

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Biopolímeros microbianos	3
2.2 Exopolisacáridos microbianos	3
2.3 Dextrano	5
2.4 Producción de dextrano	6
2.5 Aplicaciones del dextrano	8
2.6 Parámetros que afectan la producción de exopolisacáridos	8
2.6.1 Componentes del medio de cultivo	8
2.6.2 Tiempo de incubación	9
2.6.3 Temperatura	9
2.6.4 pH	10
2.6.5 Disponibilidad de oxígeno	11
2.7 Bacterias ácido lácticas (BAL)	11
2.7.1 Características generales de las BAL	11
2.7.2 Metabolismo de los carbohidratos	13
2.7.3 Clasificación y géneros representativos de las BAL	13
2.7.4 Género <i>Leuconostoc</i>	14

2.8	Generalidades sobre cultivos de bacterias	15
2.8.1	Crecimiento microbiano	15
2.8.2	Medios de cultivo.	15
2.8.3	Cultivo en lote	16
2.8.4	Cultivo en lote alimentado	18
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	20
4.1	Objetivo General	20
4.2	Objetivos Específicos	20
4.3	Hipótesis	20
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1	Composición del medio	21
5.2	Microorganismo	21
5.3	Conservación de Leuconostoc UV-BL4	21
5.4	Condiciones de cultivo en lote	22
5.5	Condiciones de cultivo alimentado	22
5.6	Cinética de crecimiento celular	23
5.7	Determinación del pH	23
5.8	Cuantificación de azúcares reductores	23

5.8.1	Preparación del reactivo DNS	24
5.8.2	Preparación de la curva de calibración	24
5.9	Determinación de la acidez titulable total	24
5.10	Cuantificación del exopolisacárido (EPS) producido	25
5.11	Calculo de parámetros	26
5.11.1	Estimación de la velocidad de crecimiento.	26
5.11.2	Corrección de biomasa por factor de dilución.	26
5.12	Cálculo de rendimientos de producción de exopolisacárido	27
5.13	Análisis estadístico de los resultados	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1	Cinética de cultivo en lote	28
6.1.1	Cinética de crecimiento Celular	28
6.1.2	Cinética de azúcares reductores	29
6.1.2	Cinética de pH y acidez titulable total	31
6.2	Producción de Exopolisacárido	32
6.3	Cinética de cultivo alimentado	34
6.3.1	Cinética de crecimiento celular	34
6.3.2	Cinética de azúcares reductores	36
6.3.3	Cinética de pH y acidez titulable total	38

6.3.4	Producción de exopolisacárido _____	40
6.4	Comparación de pH en un cultivo en lote y cultivo alimentado _____	42
6.5	Comparación de velocidad de crecimiento en un cultivo en lote y cultivo alimentado. _____	43
6.5.1	Comparación de rendimientos de exopolisacárido en cultivo en lote y cultivo alimentado. _____	44
7.	CONCLUSIONES _____	46
8.	RECOMENDACIONES _____	47
9.	BIBLIOGRAFIA _____	48
10.	ANEXOS _____	55
10.1	Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores. _____	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .	Polímero de dextrano producido por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Jeanes, et al., 1954; Shukla, et al., 2011). -----	6
Figura 2	Síntesis del dextrano (Tomado de Quintero, et al., 2004). -----	7
Figura 3	Cinética de crecimiento microbiano. A: fase de adaptación; B: aceleración transitoria; C: fase exponencial; D: fase de aceleración; E: fase estacionaria; F: fase de muerte (Modificado de Crueger, 1989). -----	17
Figura 4	Crecimiento de <i>Leuconostoc</i> BL-UV04 en un cultivo por lote (UFC/mL). Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones. -----	28

Figura 5 Azúcares reductores (g/L) en un cultivo por lote. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones. ----- 30

Figura 6 pH en un cultivo por lote (---■---) y acidez titulable (---●---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.----- 32

Figura 7 Precipitación del exopolisacárido con etanol al 96%.----- 33

Figura 8 Producción de exopolisacárido (g/L) en un cultivo por lote. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.----- 34

Figura 9 Crecimiento de *Leuconostoc spp* (UFC/mL) en un cultivo alimentado A (---▲---) y un cultivo alimentado B (---●---). Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones. ----- 35

Figura 10 Azúcares reductores g/L en un cultivo por lote alimentado A (---■---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.----- 37

Figura 11 Azúcares reductores g/L en un cultivo por lote alimentado B (---■---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.----- 38

Figura 12 pH en un cultivo alimentado A (---■---) y acidez titulable en un cultivo alimentado A (---●---) Los resultados presentados son el promedio de tres repeticiones. ----- 39

Figura 13. Cinética de pH (---■---) y acidez titulable (---●---) en el cultivo alimentado B. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones. ----- 40

Figura 14 Producción de exopolisacárido en un cultivo alimentado A (---●---). Los resultados son el promedio de tres repeticiones. ----- 41

Figura 15 Producción de exopolisacárido g/L en un cultivo alimentado A (---●---) (---■---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones. ----- 42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales géneros representativos de bacterias ácido lácticas -----	14
Tabla 2 Comparación del pH a 36 h de cultivo en lote y cultivo alimentado-----	43
Tabla 3 Velocidad de crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> BL-UV04 en los cultivos por lote y cultivo alimentado -----	44
Tabla 4 Producción y rendimientos de producción de EPS en el cultivo por lote y cultivo alimentado. -----	45

GLOSARIO

- Cinética de reacción: Se le llama a una ecuación que describe la velocidad con la que se lleva a cabo una reacción química.
- Dextrano: Polisacárido que se compone de moléculas de glucosa y que se obtiene a partir de sacarosa. Puede aparecer durante el proceso de producción del azúcar.
- Dextransacarasa: Enzima extracelular encargada de la síntesis de dextrano a partir de sacarosa
- Fermentación: Es el proceso en el cual los microorganismos descomponen compuestos orgánicos mediante la acción de enzimas producidas por los mismos.
- Polímero: Material que se compone de monómeros que se enlazan formando cadenas largas.
- Polímero extracelular: Se le conoce de este modo a los polisacáridos que son sintetizados por la acción de algunas bacterias y que como producto del metabolismo celular es excretado al exterior.
- Polisacárido: Carbohidratos que se componen por muchas moléculas de monosacáridos.
- Sacarosa: Es el principal azúcar en la naturaleza, es un disacárido formado por los azúcares simples glucosa y fructosa.
- Velocidad específica de crecimiento: Se relaciona a la capacidad de los microorganismos de desarrollarse y crecer en el medio de crecimiento. Se ve afectada principalmente por la temperatura.

RESUMEN

En este trabajo se estudió la producción de exopolisacárido producido por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un medio de cultivo suplementado con piloncillo, mediante los sistemas de fermentación por lote y lote alimentado a nivel matraz. En todos los experimentos realizados se mantuvo una temperatura constante de 35 ° C durante 36 h de fermentación y se muestrearon cada 3 h, se cuantificaron las cinéticas de crecimiento microbiano, concentración de sustrato, caída de pH, acidez titulable, producción de exopolisacárido, y donde fuera aplicable se calcularon el rendimiento y la productividad del cultivo.

Para la cinética de cultivo en lote, se prepararon 250 ml de caldo MBP ajustado a un pH 6.78. El medio fue inoculado al 10 % a partir de un preinoculo de 24 h. De lo cual se obtuvo un crecimiento exponencial hasta las 18 horas de fermentación, alcanzando una densidad celular de 9.40 ± 0.0 UFC/ mL con una tasa de crecimiento de $\mu_{\max}=0.0154$ h⁻¹. Posterior a estas 18 horas *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 comenzó a entrar en fase estacionaria, alcanzando una densidad celular de 9.28 ± 1.41 UFC/ mL a las 36 horas de fermentación. La producción del exopolisacárido obtenido durante la cinética de fermentación por lote, fue de un valor 8.60 g/L ± 0.00 y un rendimiento de producción de 30.78 %. En lo que respecta al pH y acidez titulable total, se tiene un pH final de 3.7 y una acidez titulable total de 0.09 % a las 36 h de fermentación.

Para la cinética de cultivo por lote alimentado se realizaron dos ensayos experimentales independientes, el primer ensayo fue denominado cultivo alimentado A y el segundo cultivo alimentado B. Para ambos cultivos se partió de un cultivo por lote, transcurridas 15 h de fermentación se adiciono 100 mL de medio de cultivo fresco ajustado a un pH de 6.78 para el cultivo alimentado A y 100 mL de medio de cultivo fresco ajustado a un pH de 7.0 con solución buffer (PBS) para el cultivo alimentado B

El crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 se mantuvo con un valor 8.68 ± 0.00 UFC/mL con una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.04$ h⁻¹, para ambos ensayos hasta las 12 h de fermentación.

Posterior a este tiempo, cuando se inicio la alimentación de medio de cultivo fresco, se observó un aumento del microorganismo *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 con un valor de crecimiento de 9.63 ± 0.02 UFC/mL y una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.03 \text{ h}^{-1}$ para el cultivo alimentado A y 9.69 ± 0.00 UFC/mL con una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.05 \text{ h}^{-1}$ para el cultivo alimentado B.

Transcurrido el tiempo el cultivo alimentado A, comienza a entrar en fase estacionaria con una producción de exopolisacárido de 16.72 g/L y un rendimiento de producción de 35.78% a las 36 h de fermentación. Sin embargo para el cultivo alimentado B se muestra un crecimiento hasta las 36 horas de fermentación con un valor de 10.09 ± 3.54 UFC/mL y una producción de exopolisacárido de $19.02 \pm 0.00 \text{ g/L}$ y un rendimiento de 52.36% . En lo que compete al pH y acidez titulable total, para el cultivo alimentado A disminuyo a un valor de 3.93 ± 0.00 a las 36 horas de fermentación con una acidez titulable total de $0.08 \pm 0.00 \%$ y para el cultivo alimentado B el pH disminuyo a un valor de 4.35 ± 0.00 con una acidez titulable total de 0.18% a las 36 horas de fermentación.

La producción del EPS está relacionada con el pH del medio, la máxima producción de EPS total se obtiene mediante una fermentación en lote alimentado con control de pH, utilizando sacarosa como fuente de carbono, a una concentración de 150 g/L , con una temperatura de incubación de 35° C y a un pH 6.0 . En estas condiciones, la producción es de 19.06 g/L . El trabajo presentado da pie para la realización de futuros proyectos de investigación que completen el entendimiento del fenómeno de producción de exopolisacáridos producidos por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 como el determinar el perfil de azúcares a lo largo del cultivo mediante HPLC y la caracterización del exopolisacárido.

ABSTRACT

In this work the production of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc UV-BL04* in a culture medium supplemented with piconillo, by the systems of fermentation by batch and lot fed at flask level was studied. In all the experiments a constant temperature of 35 ° C was maintained during 36 h of fermentation and they were sampled every 3 h, microbial growth kinetics, substrate concentration, pH drop, titratable acidity, exopolysaccharide production, and Where applicable yield and productivity of the crop were calculated.

For the kinetics of batch culture, 250 ml of MBP broth adjusted to pH 6.78 were prepared. The medium was inoculated at 10% from a pre-inoculation of 24 h. From that, an exponential growth was obtained up to 18 hours of fermentation, reaching a cell density of 9.40 ± 0.0 UFC / mL with a growth rate of $\mu_{\max} = 0.0154$ h⁻¹. After this 18 hours *Leuconostoc B-UV04* began to enter stationary phase, reaching a cell density of 9.28 ± 1.41 UFC / mL at 36 hours of fermentation. The production of the exopolysaccharide obtained during fermentation kinetics per batch was 8.60 g / L \pm 0.00 and a yield of 30.78%. In terms of pH and total titratable acidity, a final pH of 3.7 and a total titratable acidity of 0.09% are obtained at 36 h of fermentation.

For the kinetics of batch fed culture, two independent experiments were carried out, the first test was called culture fed A and the second culture fed B. For both cultures a batch culture was started, after 15 h of fermentation, 100 mL Of fresh culture medium adjusted to a pH of 6.78 for fed culture A and 100 mL of fresh culture medium adjusted to a pH of 7.0 with buffer solution (PBS) for fed culture B

The growth of *Leuconostoc BL-UV04* was maintained with a value of 8.68 ± 0.00 UFC / mL with a growth rate of $\mu_{\max} = 0.04$ h⁻¹, for both tests until 12 h of fermentation, after this time, when the Feeding of fresh culture medium, an increase of the microorganism *Leuconostoc BL-UV04* with a growth value of 9.63 ± 0.02 CFU / mL was observed and a growth rate of $\mu_{\max} = 0.03$ h⁻¹ for fed culture A and 9.69 ± 0.00 UFC / mL with a growth rate of $\mu_{\max} = 0.05$ h⁻¹ for culture fed B.

After the time the culture fed A, begins to enter stationary phase with an exopolysaccharide production of 16.72 g / L and a yield of 35.78% at 36 h of fermentation. However for the culture fed B a growth up to 36 hours of fermentation with a value of 10.09 ± 3.54 UFC / mL and an exopolysaccharide production of 19.02 ± 0.00 g / L and a yield of 52.36% is shown. As for the pH and total titratable acidity, for the culture fed A decreased to a value of 3.93 ± 0.00 at 36 hours of fermentation with a total titratable acidity of $0.08 \pm 0.00\%$ and for the culture fed B the pH decreased to A value of 4.35 ± 0.00 with a total titratable acidity of 0.18% at 36 hours of fermentation.

The production of EPS is related to the pH of the medium, the maximum production of total EPS is obtained by a batch fermentation fed with pH control, using sucrose as carbon source, at a concentration of 150 g / L, with a temperature Incubation at 35 ° C and at pH 6.0. Under these conditions, the production is 19.06 g / L. The present work gives rise to the realization of future research projects that complete the understanding of the phenomenon of production of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc BL-UV04* as the determination of the profile of sugars throughout the culture by HPLC and the characterization of the exopolysaccharide.

1. INTRODUCCIÓN

En la elaboración de alimentos a nivel industrial es una práctica ya habitual el adicionar exopolisacáridos (EPS) de origen vegetal, animal o microbiano. Estos EPS están conformados por estructuras complejas formadas por unidades repetitivas de azúcares, unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a estructuras lineales o ramificadas.

Por su alto peso molecular los EPS se pueden dispersar y disolver en agua cambiando estructuralmente el producto, ya que tienen propiedades gelificantes y espesantes, por lo cual pueden ser utilizados como retenedores de agua, estabilizantes, inhibidores de la sinéresis, controladores de la cristalización, emulsificantes y como texturizantes para la encapsulación.

El dextrano es un EPS de alto peso molecular, producido por bacterias ácido lácticas (BAL) como *Streptococcus*, *Acetobacter* y *Leuconostoc mesenteroides*. Se trata de microorganismos seguros o GRAS (generally recognized as safe), lo que implica que pueden ser utilizados para la elaboración de productos alimentarios (De Vuyst & Degeest, 1999).

Sin embargo, existen problemas, para la utilización de los EPS producidos por BAL en la industria alimentaria es la optimización de su producción y los bajos niveles de producción en comparación con polisacáridos producidos por otras fuentes. Esto es un problema ya reconocido y una de las razones por las cuales los EPS producidos por BAL no han sido tan explotados hasta ahora (Bergmaier *et al.*, 2005).

La producción de EPS por BAL está muy influenciada por la composición del medio (fuentes de carbono y nitrógeno, factores de crecimiento, etc.) y las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, oxígeno o tiempo de incubación). La aplicación de determinadas condiciones afecta a la velocidad de crecimiento celular,

lo que dependiendo del tipo de microorganismo influye en la producción de EPS (Degeest *et al.*, 2001).

Por lo que las investigaciones de este polímero se han realizado internacionalmente. Tsuchiya, en 1952, evaluó el efecto de la concentración de la fuente de carbono (sacarosa), del pH del medio y de la temperatura sobre la producción de dextrano producido por una cepa de *Leuconostoc mesenteroides*, NRRL B-512. En dicho trabajo se concluyó que la concentración de sacarosa para una máxima producción de dextrano era del 2%, El pH también fue evaluado siendo el óptimo de 6.7. La temperatura es un parámetro muy importante en la producción de este polímero como lo demostraron Hehre y Sugg en 1942, ya que encontraron que la producción de dextrano es considerablemente más baja a 35°C comparada con la producción a 23°C. La fuente de obtención de la sacarosa también influye en el rendimiento del dextrano.

El aislamiento e identificación de nuevas cepas de microorganismos productores de exopolisacáridos abre la puerta a la búsqueda de nuevos compuestos con características fisicoquímicas y reológicas que puedan aplicarse en la industria de alimentos. Así, en la Universidad Veracruzana, Montiel en 2014 investigó la obtención de EPS a partir de bacterias ácido lácticas, *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04, en medios enriquecidos con piloncillo, se aislaron microorganismos nativos de la región, con fuerte potencial de uso, en el cual se producen exopolisacáridos en un medio suplementado con piloncillo como fuente de carbono.

En el presente trabajo se evalúa a nivel matraz la producción del exopolisacárido producido por la cepa *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 aislada en nuestro laboratorio, en un sistema de cultivo por lote y lote alimentado utilizando como sustrato el piloncillo (principal fuente de carbohidratos en el cultivo) considerando como factor de control el pH.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biopolímeros microbianos

Los biopolímeros son macromoléculas sintetizadas por diversos procesos biológicos, entre este grupo de moléculas las más importantes son las proteínas, el ADN y los polisacáridos (Macossay, 1995; Murray y col., 1994).

Entre los diferentes biopolímeros que se pueden producir, se encuentran los de origen microbiano, los cuales tienen la ventaja de que su producción a nivel industrial no depende de condiciones climáticas ni de recolección y sí en la factibilidad de usar materias primas simples y de alta accesibilidad para su producción. También de esta forma el biopolímero cuenta con mayor uniformidad en sus propiedades, pureza y características intrínsecas debido a que su biosíntesis es muy específica. (Steinbuchel, 2001; Martínez y col., 1996; Parada y col., 2006).

2.2 Exopolisacáridos microbianos

Diversos géneros de microorganismos, que incluyen a bacterias, levaduras, hongos y arqueobacterias, son capaces de producir biopolímeros del tipo exopolisacáridos (EPS). Los EPS microbianos son biopolímeros constituidos principalmente de unidades glucídicas, localizados en el exterior de la célula microbiana, formando parte de las cubiertas microbianas más externas del glicocálix y en ocasiones incluso separados de la célula. La presencia de EPS microbianos se pone de manifiesto por la mucosidad de las colonias y la viscosidad en medios líquidos (Macossay, 1995).

Los EPS pueden clasificarse de acuerdo a diversos criterios, por ejemplo según el microorganismo productor (bacterias, hongos, levaduras, arqueas), el grado de asociación con la membrana (polisacáridos capsulares y libres), o por su estructura y composición en heteropolisacáridos y homopolisacáridos.

En cuanto a los microorganismos productores de exopolisacáridos, estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo tanto especies de vida libre saprofitas como patógenos de animales y vegetales (Kang y Cottrell, 1979).

La clasificación según su grado de asociación a la membrana, no define en la mayoría de los casos a distintos tipos de polímeros. Los polímeros capsulares se disponen como una capa cohesiva adherida firmemente mediante enlaces covalentes constituyendo la entidad morfológica denominada capsula. En otros casos, se encuentran ligeramente unidos o desligados completamente de la célula formando una capa mucilaginosa libre. La distinción entre ambos tipos es difícil, ya que frecuentemente la organización polimérica de la superficie celular sufre cambios drásticos por multitud de causas, incluyendo factores ambientales y manipulación. Por otro lado manipulaciones y procesos como la centrifugación que se ha empleado para diferenciar ambos tipos de polisacáridos conducen a la liberación del material capsular a la periferia (Kang y Cottrell, 1979).

Por otro lado, los polisacáridos se pueden también dividir en homopolisacáridos y heteropolisacáridos, adoptando estructuras lineales o ramificadas, diferenciándose entre sí por el tipo de uniones dadas entre las unidades glucídicas (enlaces *O*-glucosídico y *N*-glucosídico). Los heteropolisacáridos, están compuestos por diferentes tipos de unidades glucídicas. Generalmente presentan ácidos urónicos, como *D*-glucorónico, sus esqueletos pueden estar ramificados (Sutherland, 1990; Lindberg, 1990). Y son mayormente polianiónicos. Esta diversidad de composición origina una gran variedad de estructuras y de propiedades físicas, debido en gran parte a los distintos tipos de enlaces α - β que se pueden establecer y también por la naturaleza y conformación de los distintos azúcares (formas piranósicas y furanósicas).

Los homopolisacáridos a su vez están formados por un único tipo de unidades glucídicas, la mayoría son neutros, aunque en pequeño número debido a

la presencia de grupos acilo les confiere un carácter polianiónico. Los homopolisacáridos se subdividen en fructanos (compuestos por fructuosa) y glucanos (compuestos por glucosa). Según el tipo de enlace α o β y la posición que ocupa el carbono del enlace principal.

2.3 Dextrano

El dextrano $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un homopolisacárido de alto peso molecular (10^6 – 10^9 Da) formado por unidades de *D*-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1-6) en las principales cadenas y α (1-2), α (1-3) y α (1-4), el grado de ramificación en las cadenas varía según el origen de la dextransacarasa, la enzima que sintetiza al dextrano (Patel *et al.*, 2012).

Este glucano se produce generalmente en cultivos de bacterias ácido lácticas como *Streptococcus*, *Acetobacter* o *Leuconostoc*, en medios que contienen sacarosa (Monsan, *et al.*, 2001; Sankpal, *et al.*, 2001; Naessens, *et al.*, 2005; Rodríguez y Hanssen, 2007; Lakshmi y Nisha, 2010; Vega, *et al.*, 2012).

En la Figura 1, se presenta la estructura del polímero de dextrano, la cual, al igual que su peso molecular y su grado de ramificación depende en gran medida de la cepa del microorganismo utilizado, así como de las condiciones de cultivo. Las propiedades físicas como solubilidad, viscosidad, rotación específica, contenido de nitrógeno, contenido de fósforo y cenizas, dependen del género del microorganismo productor. Naessens, *et al.*, 2005; De Belder, 2003).

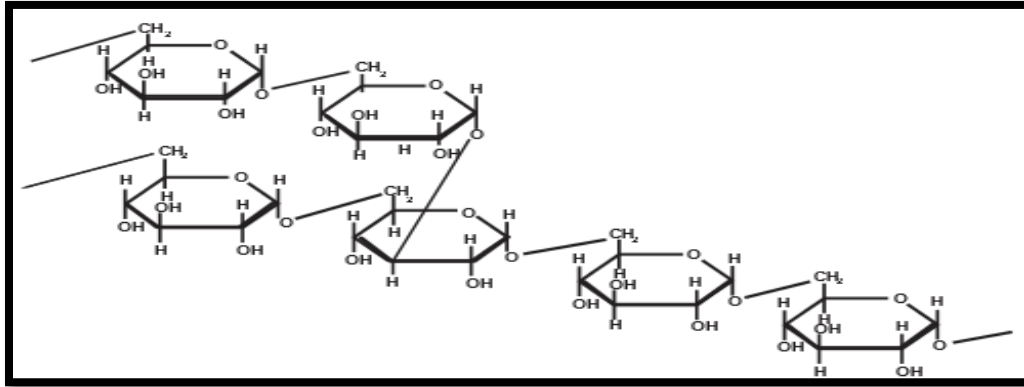


Figura 1 . Polímero de dextrano producido por *Leuconostoc mesenteroides* (Jeanes, *et al.*, 1954; Shukla, *et al.*, 2011).

Las soluciones de dextrano muestran un comportamiento newtoniano y su viscosidad puede ser influenciada por la concentración del polímero, la temperatura y el peso molecular. La viscosidad del dextrano en solución (hasta 2%) no se ve afectada por la adición de solventes, la concentración de sales o por cambios en el pH (Lakshmi y Nisha, 2010; Caligur, 2008). No es fácilmente permeable en tejidos y mantiene un ambiente osmóticamente neutro. Puede formar complejos con iones metálicos, y es compatible con sales, ácidos y bases en un amplio intervalo de temperaturas (Kaplan, 1998).

2.4 Producción de dextrano

El dextrano se puede obtener a partir del cultivo de BAL en medios que contienen sacarosa como principal componente. Las células al crecer secretan una enzima extracelular llamada dextransacarasa. La cual hidroliza la sacarosa convirtiéndola en dextrano y al mismo tiempo se libera fructosa al medio de cultivo. La producción de este polisacárido está influenciada por diversos factores y se ha demostrado que ciertas cepas bacterianas producen dextranos con diferentes estructuras, lo cual se atribuye a la excreción de diferentes dextransasas o dextransacarasa.

Aunque generalmente se produce en reactores por lotes con células libres, también se puede hacer en reactores continuos y utilizando enzimas purificadas inmovilizadas o llevar a cabo fermentaciones en presencia de aceptores (De Belder, 2003).

El mecanismo de reacción de la dextranasacarasa, ha sido descrito por Robyt (1986) que postula la presencia de intermediarios enzima-glucosa y enzima-dextrano. Cada nueva glucosa incorporada a la molécula creciente de dextrano, se agrega como complejo enzima-dextrano mediante un ataque nucleofílico del oxígeno del C1 del dextrano, para formar un enlace $\alpha 1 \rightarrow 6$. Esta nueva unidad de glucosa, proveniente del complejo enzima-glucosa, se agrega al complejo enzima-dextrano, justamente en el punto de unión, al mismo tiempo que una nueva molécula de sacarosa es hidrolizada para dar lugar al complejo enzima-glucosa. La cadena de dextrano crece así, en principio indefinidamente.

Sin embargo sólo la presencia de aceptores detiene el crecimiento; en el medio de síntesis por lo general sólo existe la fructosa como aceptor débil (Figura 2). Cuando la fructosa actúa sobre el complejo enzima-dextrano se libera el polímero, mientras que cuando actúa sobre el complejo enzima-glucosa, se produce un disacárido conocido como leucrosa.

Es importante mencionar que la maltosa es el aceptor conocido de mayor potencia, por lo que si se adiciona al principio de la reacción, se obtiene como producto una mezcla de oligodextranos.

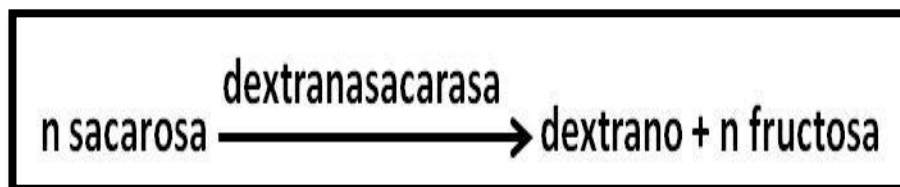


Figura 2 Síntesis del dextrano (Tomado de Quintero, et al., 2004).

2.5 Aplicaciones del dextrano

En la industria de alimentos se utiliza el dextrano por su propiedad de formar soluciones altamente viscosas como agente espesante o gelificante, texturizante y estabilizante en emulsiones como el helado, jarabes, mermeladas, jugos etc. En panadería la adición de 2% de dextrano mejora la suavidad, textura, volumen y absorción de agua en la harina aproximadamente del 12% (Bhavani A., Nisha J., 2010). En confitería: suele ocuparse como estabilizante, al evitar la cristalización, mejorar la retención de humedad, aumenta la viscosidad y la duración del sabor (Bhavani A., Nisha J., 2010). En helados se ha demostrado que en mezclas que contienen 2–4% de dextrano, confiere una alta viscosidad, la cual es una característica fundamental en el producto. Alimentos congelados y secos: otorga un recubrimiento en forma de película, que protege a los alimentos de oxidaciones y cambios químicos, ayuda a preservar textura y sabor, potencia aroma. Debido a la demanda creciente de comida rápida y productos congelados el dextrano podría utilizarse como conservador (Shukla *et al.*, 2011).

2.6 Parámetros que afectan la producción de exopolisacáridos

El rendimiento total de EPS producidos por microorganismos depende de las condiciones del medio de cultivo (fuentes de carbono y de nitrógeno) y las condiciones en las que crecen los microorganismos (tiempo de incubación o fermentación, temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno, entre otros).

2.6.1 Componentes del medio de cultivo

La mayoría de los microorganismos productores de EPS utilizan los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía. Muchos de estos carbohidratos se pueden convertir directamente en polisacáridos, pero lo más frecuente es que en la biosíntesis, los microorganismos utilicen metabolitos derivados de ellos (Sutherland, 2001).

Las fuentes de nitrógeno más frecuentemente utilizadas son las sales de amonio o los aminoácidos y rara vez los nitratos. Algunas especies emplean los aminoácidos como fuente de carbono y de nitrógeno simultáneamente. Determinadas bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de producir EPS y su crecimiento es más elevado si el nitrógeno procede de una fuente de sales de amonio (Ahmad y McLaughlin, 1985).

2.6.2 Tiempo de incubación

La síntesis de los EPS puede estar asociada al crecimiento o no. Cuando existe esa asociación, generalmente comienza la síntesis del EPS al iniciarse el crecimiento exponencial, con un máximo al final de la fase activa de crecimiento. En esta cinética, el exopolisacárido es considerado un metabolito primario (Abbad Andaloussi, *et al.*, 1995; De Vuyst, *et al.*, 1998).

La asociación del proceso de producción de EPS y el crecimiento bacteriano se ha descrito en BAL termófilas, de modo que la producción de polímero tiene lugar bajo las condiciones óptimas de crecimiento (De Vuyst *et al.*, 1998), a diferencia de lo que ocurre en BAL mesófilas (De Vuyst y Degeest, 1999).

Existen muchos casos en los que el crecimiento celular y producción de polisacárido tienen requerimientos nutricionales diferentes (Petronella y Hugenholtz, 1999; Cheirsilp, *et al.*, 2001; Davey y Amos, 2001). Por otra parte, algunos EPS son sintetizados a lo largo de todas las etapas de crecimiento, y no sólo durante la fase exponencial o estacionaria tardía (Sutherland, 2001).

2.6.3 Temperatura

La gran mayoría de polímeros microbianos presentan óptimos de producción a una temperatura de 30 °C, siendo ésta la temperatura de elección en el xantano (Leela y Sharma, 2000), gelano (Giavasis, 2000) y celulosa (Son, *et al.*, 2001), entre otros. Los alginatos presentan una temperatura óptima de producción ligeramente

superior (34-35 °C) (Clementi, 1997). Recientemente se ha descrito que *Pseudoalteromonas* CAM025, microorganismo aislado en el Antártico, produce su EPS con un rendimiento 30 veces superior a -2 °C y 10 °C que a 20 °C (Mancuso-Nichols, *et al.*, 2005).

Varios autores coinciden en afirmar que la producción de exopolisacáridos se induce a estas temperaturas debido a que el crecimiento bacteriano se enlentece. Ello determina una síntesis menor de los constituyentes de la pared celular y por consiguiente, una mayor disponibilidad de transportadores para los compuestos intermediarios y precursores del EPS (Whitfield, 1988). Este hecho argumenta, de igual forma, la mayor producción de exopolisacárido en la fase estacionaria de crecimiento de algunas bacterias (Petry, *et al.*, 2000; Sutherland, 2001).

2.6.4 pH

El óptimo de producción para la mayoría de EPS se da a valores de pH próximos a la neutralidad (6.5-7.5). Sin embargo, existen algunas excepciones en las que en condiciones de neutralidad la síntesis de polímero no se favorece, como en el caso del pululano, que requiere un pH entre 5 y 6.1 para su máxima producción (Lacroix, *et al.*, 1985) o el del escleroglucano, cuyo pH óptimo está comprendido entre 3.5-4.5 (Wang y McNeil, 1995). Incluso a pH extremadamente ácido, se estimula el proceso de producción de determinados EPS como el de la levadura *Rhodotorula acheniorum* que requiere un pH entre 1.7 y 2 (Grigorova, *et al.*, 1999).

En algunos microorganismos, el valor del pH en el medio de cultivo se incrementa transitoriamente al final de la fase exponencial del crecimiento y principio de la fase estacionaria, variación que coincide con el aumento en el contenido en grupos acilo y en la viscosidad (Tait, *et al.*, 1986).

En la mayoría de los casos, no sólo es esencial proporcionar el pH óptimo al inicio del proceso de fermentación, sino que la producción de polímero es mayor bajo condiciones de pH controlado, por ello determinados medios llevan adicionada

una sustancia tamponante como las sales de fosfato, empleadas en el medio de producción del alginato (Clementi, *et al.*, 1995). En este sentido, la utilización del fermentador es enormemente ventajosa pues el control de pH se encuentra monitorizado y su ajuste es permanente mediante la adición de ácido o alcalino.

2.6.5 Disponibilidad de oxígeno

La mayor parte de los microorganismos productores de EPS son aerobios o anaerobios facultativos, aunque en estos últimos la síntesis de polímero ocurre cuando el microorganismo crece aerobiamente. Por ello la aireación del medio de cultivo juega un papel fundamental en la síntesis de los EPS (Sutherland, 1990).

Para el resto de los microorganismos aerobios, uno de los mayores problemas asociados en el proceso de fermentación es el aumento de viscosidad de los cultivos que afecta enormemente a la biodisponibilidad del oxígeno y nutrientes, cuya disminución repercute directamente en la producción del EPS (Becker *et al.*, 1998; Amanullah, *et al.*, 1997; Flores, *et al.*, 1994)

2.7 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Desde el comienzo de la humanidad las BAL han sido empleadas para la fabricación y conservación de alimentos. Algunas BAL tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares EPS. Estas forman parte de la microbiota natural de muchos alimentos y no existe ninguna indicación de que representen un riesgo para la salud del consumidor, por lo tanto las BAL como alguno de sus metabolitos son considerados como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Hugas, 1988).

2.7.1 Características generales de las BAL

Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido,

la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal, tolerancia a la alcalinidad y acidez (Axelsson, 2004).

En la actualidad, el grupo de las BAL está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, carecen de sistemas de transporte de electrones funcionales ligados al heme o de citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel del sustrato a la vez que oxidan carbohidratos; no tienen un ciclo de Krebs funcional. Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, al contrario que las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (Madigan y *et al.*, 2004)

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5 °C y otras a 45 °C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5) por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Jay, 2000).

La catalasa es un enzima que degrada el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para realizar esta función las BAL necesitan de un grupo porfirínico (citocromos), el cual las BAL son incapaces de sintetizar y, por tanto, este tipo de bacterias no posee dicha enzima, lo que permite la identificación del grupo catalasa negativa. En ciertas condiciones, algunas bacterias son capaces de tomar grupos hemo externos para formar una enzima denominada pseudocatalasa.

Una característica física debido a la ausencia de citocromos en las BAL es la formación de colonias color blanco lechoso (Prescott y *et al.*, 1999).

Tienen posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuyen a reducir el rendimiento de su cultivo y crecimiento formando colonias muy pequeñas. En preparaciones para el microscopio aparecen aisladas o formando cadenas (Walker, 2000).

Las BAL Son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácido, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las BAL obtienen energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionado fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Leveau y Bouix, 2000; Madigan y col., 2004).

2.7.2 Metabolismo de los carbohidratos

Una diferencia destacada entre subgrupos de las BAL es la naturaleza de sus productos finales, formados durante la fermentación de los azúcares (Madigan y col., 2004).

Las BAL pueden ser consideradas como homofermentativas o heterofermentativas, dependiendo de cómo fermenten los azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento no limitadas. Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultandos el ácido láctico como producto final.

Las BAL heterofermentativas usan la via 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂) y etanol (o ácido acético) como productos principales.

2.7.3 Clasificación y géneros representativos de las BAL

El grupo de las BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros, de los cuales 12 géneros son los más representativos de este grupo (Tabla 1). Aunque

el grupo está definido con poca exactitud, todos los representantes comparten las propiedades de producir ácido láctico a partir de las hexosas (Davidson y col., 1995; Jay, 2000; Axelsson, 2004).

Tabla 1 Principales géneros representativos de bacterias ácido lácticas

Carnobacterium	Oenococcus
Enterobacterium	Pediococcus
Lactococcus	Streptococcus
Lactobacillus	Tetragenococcus
Lactosphaera	Vagococcus
Leuconostoc	Weissella

2.7.4 Género *Leuconostoc*

El género *Leuconostoc spp*, son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, pueden ser alargados o elípticos y dispuestos en parejas o cadenas, heterofermentativos, temperatura óptima de crecimiento de 20 a 30 °C. Pueden aislarse de plantas, ensilados y leche. Muy utilizados en la industria láctea (en la manufactura del suero de la leche, mantequilla y queso) como cultivos iniciadores, ya que producen compuestos responsables del sabor como diacetilo o acetona (productos de la ruptura metabólica del citrato), en la fermentación de verduras como las coles (chucrut) y pepinillos en vinagre.

Los *Leuconostoc* están implicados en el deterioro de los alimentos y toleran concentraciones elevadas de azúcar, lo que facilita su multiplicación en el jarabe, constituyendo un importante problema en las refinerías de azúcar (Prescott y col., 1999; Jay, 2000; Madigan y col., 2004). Las principales características metabólicas del género *Leuconostoc* son:

- Producir diacetilo y otras sustancias aromáticas.
- Su capacidad de iniciar la fermentación en productos vegetales con más rapidez que otras bacterias lácticas u otros organismos y de producir suficiente ácido como para inhibir el crecimiento de las bacterias no lácticas.

- La gran tolerancia de *Leuconostoc. mesenteroides* para concentraciones azucaradas de hasta 55 a 60%, lo que permite crecer en jarabes, caramelo líquido, crema de helados, etc.
- Producción de cantidades considerables de dióxido de carbono a partir de los azúcares, produciendo ojos en ciertos quesos, la alteración de alimentos de gran contenido azucarado (jarabes, cremas, etc.) y la fermentación de algunas clases de pan.
- Producción de gran cantidad de EPS en medios que contienen sacarosa, lo que es deseable en la producción de dextrano.

2.8 Generalidades sobre cultivos de bacterias

2.8.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento es el incremento ordenado de todos los constituyentes celulares que conduce a un aumento de masa y finalmente a un aumento de número de células. Para que el crecimiento bacteriano tenga lugar es necesario un aporte adecuado de nutrientes: todos los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y diversos minerales para crecer. Los microorganismos captan estos nutrientes mediante diversos mecanismos de transporte a través de la membrana.

2.8.2 Medios de cultivo.

Los microorganismos en general pueden vivir y multiplicarse sobre substratos nutritivos preparados en el laboratorio, denominados medios de cultivo. Los medios de cultivo son preparados estériles que contienen sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

En la preparación y diseño de un medio de cultivo, se busca proporcionar una mezcla adecuada de nutrientes agua, carbono, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo y hierro como elementos vitales. Los microorganismos exigentes requieren además factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias

que no son capaces de sintetizar, todos estos nutrientes deben ir a una concentración que optimice su crecimiento. Muchos nutrientes pueden ser inhibitorios o tóxicos cuando su concentración es demasiado alta, por ello se busca mantener un balance de nutrientes, para evitar los excesos que puedan llegar a subestimar o inhibir el crecimiento de los microorganismos (Merck, 2004).

Los medios de cultivo pueden clasificarse según su consistencia en medios líquidos sólidos y semisólidos. Los medios líquidos: son los que se presentan en este estado, denominándose por esta razón caldos. El medio líquido más utilizado es el llamado caldo nutritivo, compuesto principalmente de extracto de carne, peptona y agua. Se utiliza fundamentalmente cuando se pretende la obtención de una suspensión bacteriana de una determinada concentración mediante un sistema de cultivo líquido.

Regularmente, la producción de biomasa en un medio de cultivo líquido se realiza en un contenedor denominado biorreactor. El biorreactor más simple es el matraz Erlenmeyer (Hernandez, 2003; Ruiz, *et al.*, 2007). Según el tipo de alimentación, los biorreactores se pueden operar en continuo, discontinuo o por lote, y en lote alimentado.

2.8.3 Cultivo en lote

Según Aleksic (2009) el cultivo batch o cultivo por lote o cultivo discontinuo, es un sistema de cultivo cerrado, excepto para la aireación en el caso de que el cultivo la requiera, que contiene una cantidad inicial y limitada de nutrientes. El cultivo celular inoculado en un sistema batch pasará a través de una serie de fases como se ilustra en la Figura 3.

Los microorganismo inoculados dentro del volumen de medio fijo van consumiendo los nutrientes a medida que se va dando el crecimiento y se acumulan los productos (biomasa y metabolitos). El entorno de nutrientes cambia continuamente, lo que a su vez impone cambios en el metabolismo celular.

Eventualmente, la multiplicación cesa debido a que los nutrientes se vuelven limitante o se agotan y debido también a la acumulación de producto tóxico excretados. Según Smith (2008) se pueden distinguir seis fases en el cultivo.

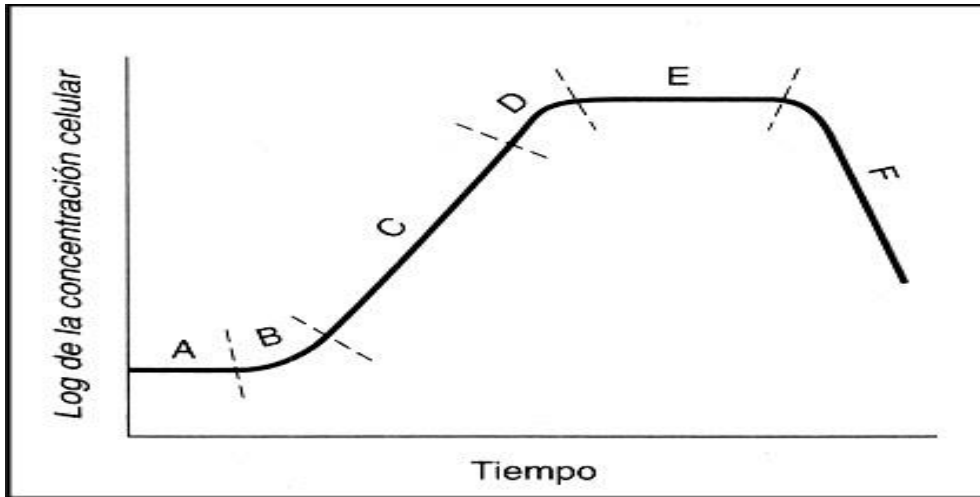


Figura 3 Cinética de crecimiento microbiano. A: fase de adaptación; B: aceleración transitoria; C: fase exponencial; D: fase de aceleración; E: fase estacionaria; F: fase de muerte (Modificado de Crueger, 1989).

1. Fase logarítmica: también llamada fase de retardo, en esta el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha a su maquinaria metabólica para poder crecer activamente. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo, es un proceso comercial la longitud de la fase de retardo debe reducirse tanto como sea posible y eso se puede lograr mediante el uso de un inóculo adecuado.
2. Fase de aceleración transitoria: es la etapa en que el microorganismo comienza a crecer de forma apreciable pero sin alcanzar todavía un crecimiento exponencial.
3. Fase exponencial: el crecimiento microbiano procede a la máxima velocidad posible para ese organismo en presencia de nutrientes en exceso, parámetros medioambientales ideales y ausencia de inhibidores de crecimiento. En los cultivos batch el crecimiento exponencial es de duración limitada.

4. Fase de aceleración: a medida que las condiciones del medio de cultivo cambian se pierden las condiciones óptimas y se observa una disminución en el índice de crecimiento.
5. Fase estacionaria: es esta fase no hay aumento neto de microorganismos, lo que no significa que no se dividan algunos, sino que la aparición de nuevos individuos se compensa por la muerte de otros.
6. Fase de muerte: el número de microorganismo vivo disminuye de forma exponencial con una constante que depende de diferentes circunstancias como el agotamiento de sustrato o la presencia de desechos tóxicos en el medio.

2.8.4 Cultivo en lote alimentado

Cuando la generación de productos y subproductos provoca efectos negativos sobre la formación de los productos de interés, o bien el sistema de producción es susceptible a la represión por la concentración del sustrato, una alternativa es el empleo del cultivo alimentado. En este, uno o varios de los nutrientes limitantes se suministran a lo largo del cultivo. La alimentación de los sustratos puede hacerse por pulsos o de manera continua.

En este último caso el volumen se incrementa de manera lineal o exponencial. A pesar del cambio en el volumen de operación, el valor de ciertas variables clave, como las concentraciones del sustrato y biomasa pueden controlarse en valores relativamente constantes. Mediante el desarrollo de cultivo alimentado se puede controlar la velocidad de crecimiento dentro de los intervalos que favorezcan una función objetivo particular (Ramirez Reivich, 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria alimentaria se enfrenta con frecuencia ante la necesidad de desarrollar nuevos productos con características organolépticas adecuadas para el consumidor. Esto incluye los aspectos relacionados con la modificación de propiedades sensoriales viscosidad, textura y estructura.

Por lo cual se buscan fórmulas alternativas que permitan obtener productos con estas características. Una de ellas ha sido recurrir a la utilización de EPS producidos por microorganismos de grado alimentario, como las bacterias ácido lácticas.

El uso controlado de EPS procedentes de BAL como aditivos naturales permite obtener productos seguros y naturales con propiedades reológicas y texturas mejoradas, y una estabilidad y capacidad de retención de agua mayor. Debido a que el uso de BAL es históricamente seguro, la producción implica que no es necesaria la realización de ensayos toxicológicos, con lo que los productos pueden llegar al mercado rápidamente.

Un aspecto relevante para la utilización de los EPS producidos por BAL en la industria alimentaria es la optimización de su producción, los bajos niveles de producción de EPS en BAL en comparación con polisacáridos producidos por otros microorganismos, son un problema reconocido y la razón por la que hasta ahora, los EPS de BAL no es tan explotado.

Por ello, es necesario maximizar los rendimientos de producción en la obtención de EPS y esto es posible determinando las condiciones óptimas de fermentación y empleando técnicas de cultivo discontinuo en función a la disponibilidad de sus nutrientes ya sea en un sistema de fermentación por lote o lote alimentado.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo General

Evaluar la producción de EPS por *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un sistema por lote y lote alimentado.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar la cinética de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un cultivo por lote y lote alimentado.
- Determinar los parámetros de producción de EPS en un cultivo por lote y lote alimentado.
- Estimar los parámetros cinéticos de crecimiento celular y la producción en un cultivo por lote y lote alimentado.

4.3 Hipótesis

Existen diferencias en el rendimiento de producción de EPS por *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un cultivo por lote y lote alimentado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Composición del medio

Las cinéticas de crecimiento y producción de EPS por *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 mediante fermentación por lote y lote alimentado se realizó en un medio base modificado de Onilude y col., (2013) adicionado con piloncillo (150 g/L), definido como MBP. Este medio fue suplementado además con: 10 g/L de extracto de carne, 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de K_2HPO_4 , 0.01 g/L de $MnCl_2$, 0.01 g/L de NaCl, 0.05 g/L de $CaCl_2$, 0.01 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ajustado a un pH de 6.78 con soluciones de NaOH o H_2SO_4 0.1 N. Una vez preparado, el medio fue centrifugado por 20 min a 3250 rpm en una centrifuga (Eppendorf 5804 R), para eliminar residuos sólidos provenientes del piloncillo. Posteriormente, se esterilizó a 121 °C y 1.5 psi durante 15 min. Cuando fue requerido al MBP se agregó 2% de agar para tener un medio sólido.

5.2 Microorganismo

El microorganismo utilizado en el presente trabajo se ha denominado *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 (Tellez, 2017). La cual es una bacteria ácido láctica aislada e identificada a partir de muestreos de *frutas* obtenidas de mercados de la Ciudad de Xalapa y Guadalupe Victoria, Puebla (Montiel, 2014).

5.3 Conservación de *Leuconostoc BL-UV04*

Para la conservación de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en congelación, se utilizó caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) marca (DIFCO) adicionado con 10% de glicerol y 10% de leche en polvo, el medio se esterilizó a 121 °C y 1.5 psi por 15 min. Para el mantenimiento de las células en fresco y para la medición del crecimiento celular se utilizó medio base adicionado con glucosa y 2% de agar.

5.4 Condiciones de cultivo en lote

Para la cinética de un cultivo en lote, se prepararon 250 ml de caldo MBP en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 500 mL ajustado a un pH 6.78. El medio de cultivo fue inoculado al 10% a partir de un preinoculo de 24 h.

Se mantuvo una temperatura constante de 35 °C durante 36 h de fermentación. Se realizaron muestreos cada 3 h, a los cuales se les determino azucares reductores, pH, determinación de UFC/mL, acidez titulable y cuantificación de EPS, mediante las técnicas descritas más adelante.

5.5 Condiciones de cultivo alimentado

Para la cinética de un cultivo alimentado, se realizaron dos ensayos experimentales independientes, el primer ensayo fue denominado cultivo alimentado A y para el segundo ensayo se le denomino cultivo alimentado B.

Para ambos ensayos se partió de un cultivo por lote desarrollado en un volumen de 250 ml de caldo MBP en un matraz Erlenmeyer con una capacidad de 500 mL ajustado a un pH 6.78. El medio de cultivo fue inoculado al 10% a partir de un preinoculo de 24 h.

Cuando se llegó a la máxima concentración de biomasa, (parámetros cinéticos conocidos de un cultivo en lote), se comenzó la adición de medio de cultivo fresco estéril sin la eliminación del cultivo crecido. 100 mL de caldo MBP ajustado a un pH de 6.78 para el cultivo alimentado A y 100 mL de caldo MBP preparado con solución buffer PBS a un pH de 7.0 para el cultivo alimentado B.

Se realizaron muestreos cada 3 h. para la determinación de azucares reductores, pH, UFC/mL, acidez titulable y cuantificación de EPS, como se describe más adelante

5.6 Cinética de crecimiento celular

Se siguió la cinética de crecimiento celular mediante el muestreo del medio de cultivo cada 3h. Para obtener las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ mL) se realizó mediante el método de diluciones seriadas, tomando 1 mL del cultivo en cada muestreo. Las diluciones se realizaron con solución salina isotónica (0.9 M). El sembrado en cajas Petri se realizó colocando 1 mL de la dilución correspondiente y vaciando agar MRS. Una vez solidificado el agar con la muestra, se colocó en la estufa a una temperatura constante de 30 °C. Este procedimiento se hizo por duplicado.

5.7 Determinación del pH

El pH fue medido con un potenciómetro (Hanna pH-meter) provisto de un electrodo de vidrio, para lo cual previamente se calibró el equipo con buffer pH 7. Para la medición de las muestras se tomaron 5 mL de cada muestra, las cuales primeramente se dejaron enfriar de 30 °C a 20 ± 1 °C y posteriormente se insertó el electrodo en la muestra, dejando 2-3 min hasta que la lectura permaneció constante. Al sacar el electrodo de la muestra se enjuagó primero con agua destilada, después con una solución de benzaldehído al 4% para eliminar los microorganismos residuales que se quedaban adheridos al electrodo y por último con agua destilada para eliminar restos del desinfectante. Este análisis se hizo por duplicado.

5.8 Cuantificación de azúcares reductores

El método de Miller se basa en la determinación de azúcares mediante el reactivo DNS, el cual tiene la capacidad de oxidar azúcares reductores dando resultados colorimétricos que pueden medirse a longitud de onda de 540 nm.

Para la medición del consumo o aparición de azúcares reductores durante la cinética de crecimiento y producción del EPS, primeramente se tomó 1 mL del medio fermentado a cada tiempo de muestreo y se precipitó el EPS con 1 mL de etanol

frío al 96% y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm. A partir del sobrenadante se tomaron 100 μ L y se diluyeron 1:20 con agua destilada. Posteriormente se tomaron 0.5 mL de la muestra diluida que se mezcló con 0.5 mL de reactivo de DNS. Las muestras se llevaron a baño de agua hirviendo por 15 min, se dejaron enfriar durante 15 min y finalmente se le agregó agua destilada para leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

5.8.1 Preparación del reactivo DNS

Solución A: diluir por calentamiento 150 g de tartrato de sodio y potasio en 250 mL de agua destilada

Solución B: preparar una solución de NaOH 2N, agregar posteriormente 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y diluir mediante calor constante. Mezclar las soluciones A y B y aforar a 500 mL con agua destilada.

5.8.2 Preparación de la curva de calibración

Se preparó una curva de calibración con fructosa. Por lo cual se prepararon soluciones de 0.0019, 0.0017, 0.0015, 0.0013, 0.0011, 0.0009, 0.0007, 0.0005 y 0.0003 mg/mL por dilución, de un stock de fructosa en solución de 1.9 g/L, usando agua destilada y frascos volumétricos de 100 mL. Se graficó [azúcares reductores] contra absorbancia (Anexo I).

5.9 Determinación de la acidez titulable total

La determinación de acidez titulable se realizó por duplicado por el método AOAC-939, 05 (AOAC, 2000), expresándose como porcentaje de ácido láctico.

La acidez se realizó con la muestra diluida 1:1 del medio de cultivo y agua destilada. La determinación se hizo por titulación con una solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N.

Se tomaron 5 mL de muestra del medio de cultivo y se mezcló con 5 mL de agua destilada, se adicionaron 3 gotas de solución de fenolftaleína. Posteriormente se tituló la muestra hasta que se mantuvo el vire color rosa por 1 minuto. La acidez titulable es expresada como porcentaje de ácido láctico y es calculada por medio de:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{(V)(N)(\text{meq}_{\text{ácido láctico}})(100)}{V}$$

Dónde: V = volumen del NaOH usado para la titulación, N = normalidad del NaOH, meq = mili equivalentes del ácido. Los valores equivalentes de base a ácido para el ácido láctico es: 0.09.

5.10 Cuantificación del exopolisacárido (EPS) producido

Para determinar la producción del EPS durante la cinética de crecimiento se tomaron muestras de 5 mL del medio de cultivo, los cuales primeramente fueron centrifugados a 3250 rpm durante 20 min a 4 °C (Eppendorf centrifuge 5804 R), para eliminar las células en suspensión. Posteriormente se agregaron 5 mL de etanol al 96% a 4 °C y se agito por inversión suave durante 3 min, para lograr la precipitación del EPS. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3250 rpm durante 15 min a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y al precipitado resultante se le agregaron 5 mL de agua destilada, se agito mediante un agitador (Yellow Line) de 5 a 10 min hasta lograr la re suspensión y disolución del EPS y se dejaron en reposo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se añadió 10 mL de etanol al 96% a 4 °C, se agito y se centrifugo a 8000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se dejó secar en una estufa (BINDER) a 40 °C durante 24 h, para finalmente pesar el precipitado obtenido.

5.11 Cálculo de parámetros

Los parámetros evaluados fueron: velocidad de crecimiento (μ); rendimiento de producción de PES ($Y_{p/s}$); los cuales fueron corregidos por factor de dilución en función a la cantidad de medio de cultivo adicionado en los ensayos en cultivo alimentado.

5.11.1 Estimación de la velocidad de crecimiento.

Para los ensayos en cultivo en lote y lote alimentado se calculó la velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) (h^{-1}) se determinó de forma experimental en toda la cinética del cultivo en lote y lote alimentado mediante la ecuación:

$$\mu_{\max} = \text{Ln}(X_1/X_0)/(t_1-t_0)$$

Donde X_0 y X_1 son el número de viables al inicio y final de la fase exponencial y t_0 y t_1 el tiempo inicial y final, respectivamente.

5.11.2 Corrección de biomasa por factor de dilución.

La concentración de biomasa, azúcar consumida y productos obtenidos en el cultivo alimentado fueron corregidos en función al volumen adicionado a cada tiempo mediante un factor de dilución (FD).

Al tiempo (t) en que se toma la muestra, se mide el volumen adicionado (V_b) al cultivo y se suma al volumen inicial del cultivo (V_i), con estos datos se calcula el factor de corrección (FD) de la siguiente forma:

$$FD \frac{V_i + V_b}{V_i}$$

A partir del valor de obtenidos para cada tiempo, los datos fueron corregidos de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa} = \text{Biomasa (g / L) a Tx} * \text{FD a Tx}$$

$$\text{Concentración de azúcar} = \text{Azúcar (g / L) a Tx} * \text{FD a Tx}$$

$$\text{Producto} = \text{Producto (g /L) aTx} * \text{FDaTx}$$

5.12 Cálculo de rendimientos de producción de exopolisacárido

El rendimiento de producción del EPS en los tres ensayos $Y_{P/S}$, durante la cinética fue calculado de la siguiente manera:

$$Y_{p/s} = \frac{g \text{ de producto}}{g \text{ de azúcar consumida}}$$

5.13 Análisis estadístico de los resultados

Los efectos provocados por cada tratamiento experimental se compararon mediante la prueba estadística de t student. En todos los casos, la diferencia significativa entre medias se representa mediante el parámetro (p), con el uso del programa estadístico JMP (Statistical Discovery From SAS.) versión 2016, utilizando un intervalo de confianza del 5%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética de cultivo en lote

6.1.1 Cinética de crecimiento Celular

En la Figura 4 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento celular de *L. mesenteroides* BL-UV04 contra tiempo, para un medio de cultivo por lote. La metodología empleada para esta serie experimental se describe detalladamente en la sección 5.5 DE MATERIALES Y METODOS.

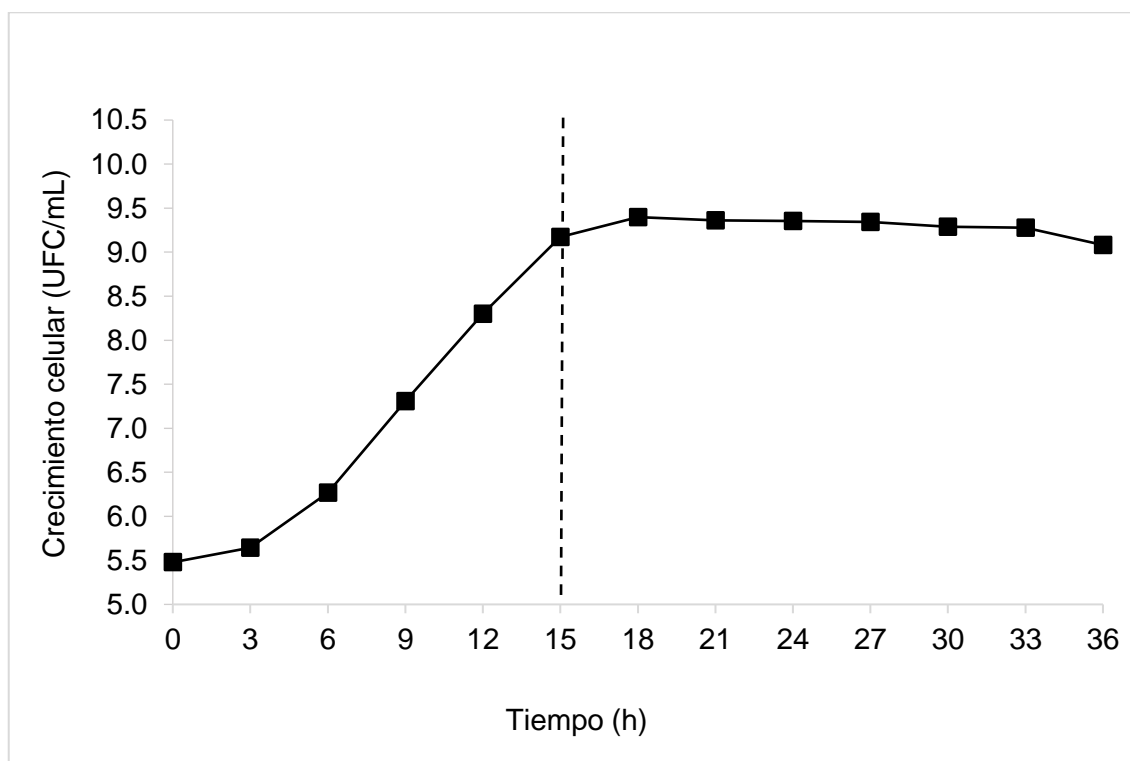


Figura 4 Crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 en un cultivo por lote (UFC/mL). Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

Se observó una fase de adaptación de aproximadamente 3 horas con una densidad celular de 5.64 ± 0.0 UFC/mL este resultado es comparable con los descritos en los trabajos de Tsuchiya *et al.*, 1952 y Lopretti 2002, quienes

encontraron un crecimiento similar utilizando un tiempo de residencia de 24 horas, donde la fase de adaptación fue de 3-6 horas en sustratos como piña y naranja.

Transcurrida las 3 horas de adaptación, se inició un crecimiento exponencial de la hora 3 hasta las 18 horas alcanzando una concentración máxima de biomasa de 9.40 ± 0.0 UFC/ mL con una tasa de crecimiento de ($\mu_{\max}=0.0154 \text{ h}^{-1}$).

Posterior a estas 18 horas *L. mesenteroides* UV-BL04 comenzó a entrar en fase estacionaria, alcanzando un valor de 9.28 ± 1.41 UFC/ mL a las 36 horas de fermentación. En un estudios realizados con anterioridad, se ha demostrado que el crecimiento de *Leuconstoc mesenteroides* llega a su máxima concentración exponencial a partir de las 15-18 horas de fermentación, transcurrida estas horas se inicia la fase estacionaria del microorganismo.

Romero (2014) encontró un crecimiento exponencial similar de *Leuconostoc spp.* Utilizando como sustrato piloncillo, donde la fase exponencial máxima se alcanzó a las 15 horas de incubación con una densidad celular de 9.0 UFC/ mL.

6.1.2 Cinética de azúcares reductores

Para medir la cinética de producción de azúcares reductores, se realizó la determinación por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico

En la Figura 5 se muestra la concentración de azúcares reductores en un cultivo por lote. A las 3 horas de fermentación se tiene una concentración de azúcares reductores de 0.41 ± 0.002 g/ L, al ser la sacarosa un azúcar no reductor y el principal componente del piloncillo, al principio de la fermentación no existe una concentración importante de azúcares reductores. Sin embargo, conforme transcurre el tiempo, se comienza a cuantificar los azúcares alcanzado un valor máximo de 0.55 ± 0.002 g/ L a las 21 horas (indicado por la línea punteada), esto nos indica que la sacarosa estaba siendo hidrolizada, apareciendo en el medio

fructuosa y glucosa, posteriormente se observa un descenso alcanzando con un valor de 0.24 ± 0.014 g/ L a las 36 horas.

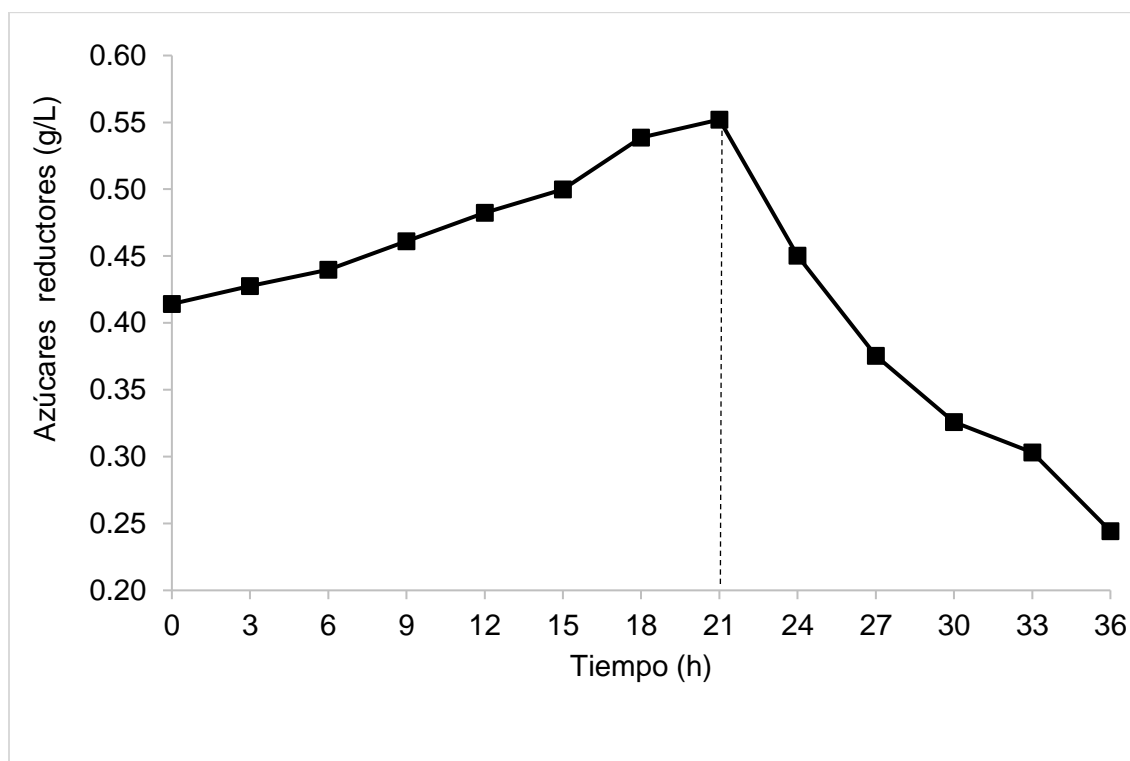


Figura 5 Azúcares reductores (g/L) en un cultivo por lote. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

Forsyth y Webley en 1950, observaron que cuando *L. mesenteroides* produjo dextrano a partir de sacarosa se originaron grandes concentraciones de azúcares reductores al inicio de la fermentación, principalmente se obtuvo más fructosa que glucosa. Estas concentraciones disminuían conforme la fermentación avanzaba aumentando la cantidad de dextrano, el cual se producía únicamente a partir de glucosa y no a partir de otros monosacáridos. Rodríguez y Hanssen (2007), hicieron una comparación similar, donde examinaron residuos agroindustriales (cascaras de piña, naranja y cachaza de caña) por medio de análisis fisicoquímicos arrojaron un porcentaje de consumo de 63.57. La cinética de consumo de sacarosa presentó dos zonas bien definidas desde la hora 0 hasta la hora 10, que mostro un descenso en

la concentración, y se observó un pico y una segunda fase desde la hora 10 hasta la hora 18, cuando el consumo de la sacarosa se hizo más acentuado debido al consumo doble entre el microorganismo y la enzima libre que polimeriza en el medio.

Lappan y Floger en 1994, observaron que en un medio de cultivo suplementado con sacarosa y glucosa, las células consumen casi toda la sacarosa antes de empezar a consumir la glucosa, y la concentración de glucosa aumenta y aparece fructosa en el medio de cultivo, esto como resultado del metabolismo de la sacarosa para el crecimiento del microorganismo y la producción de EPS.

6.1.2 Cinética de pH y acidez titulable total

Para la cinética de pH en un cultivo por lote se comenzó con un pH de 6.78 como se muestra en la figura 6. Sin embargo, conforme la fermentación avanzaba se presentaron cambios en este parámetro, el pH fue disminuyendo, hasta alcanzar un valor de 3.7 ± 0.00 a las 36 horas de fermentación.

El pH va disminuyendo a medida que el microorganismo va creciendo a lo largo del tiempo, el pH disminuye debido a que el microorganismo al utilizar los carbohidratos del medio de cultivo como fuente de energía este, no solo forma EPS, también llega a formar ácidos orgánicos, es por ello que se observa en esta misma figura 9, el aumento de la acidez a lo largo del tiempo, debido a la acumulación de ácidos orgánicos alcanzando un valor máximo de 0.09%

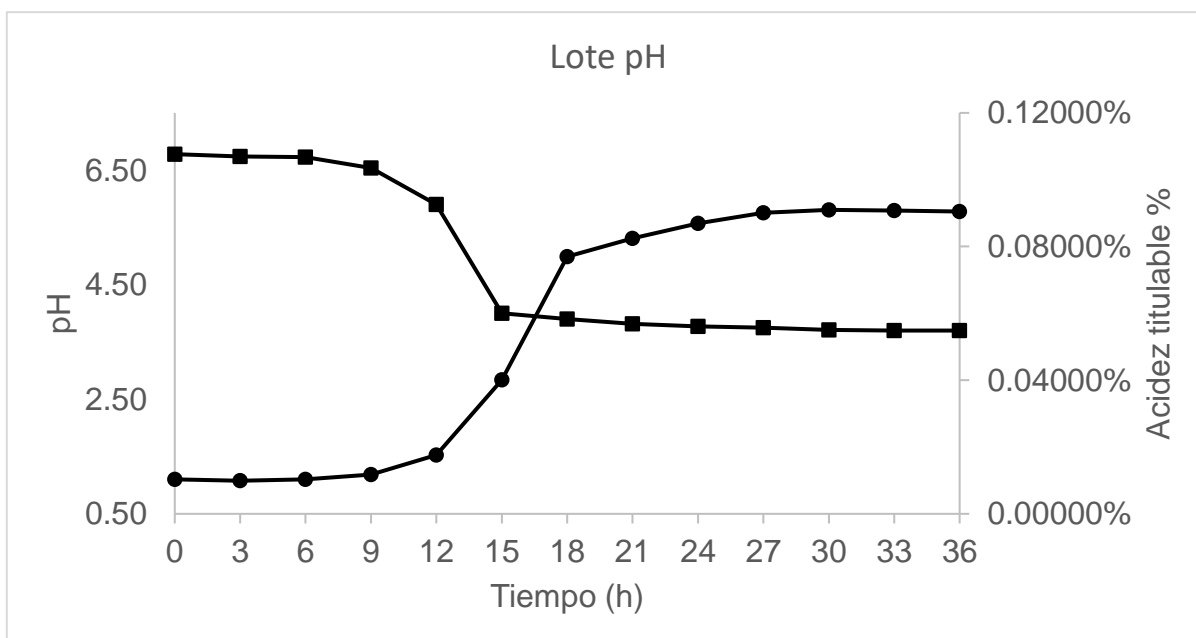


Figura 6 pH en un cultivo por lote (---■---) y acidez titulable (---●---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

Estudios sugieren que manteniendo un pH óptimo del medio se puede obtener una mayor producción de EPS y una mayor estabilidad de la red debido a que se sabe que manteniendo un pH predominante entre 5.2 y 5.8, este confiere una identidad iónica específica a las moléculas.

Según Avtonomova *et al.*, (2006) la acidificación observada del medio de cultivo en BAL, puede ser debido a la acumulación de ácidos orgánicos. Ensayos realizados por estos autores, demostraron que los valores finales de pH inferiores a 4.0 pueden ser estresantes para los cultivos líquidos con BAL. El efecto perjudicial de los bajos valores de pH pueden ser mitigados ya sea aumentando el pH inicial del medio, mediante la adición de una sal de buffer.

6.2 Producción de Exopolisacárido

El exopolisacárido obtenido a partir de una cepa de *L. mesenteroides* BL-UV04 durante la cinética de fermentación por lote se extrajo con etanol al 96% y

posteriormente este fue cuantificado por el método gravimétrico por diferencia de peso seco, en donde las concentraciones están dadas en g/L. El EPS inmediatamente después de la precipitación con etanol se distingue fácilmente de la solución ya que tiene una apariencia viscosa de color blanco como se observa en la Figura 7

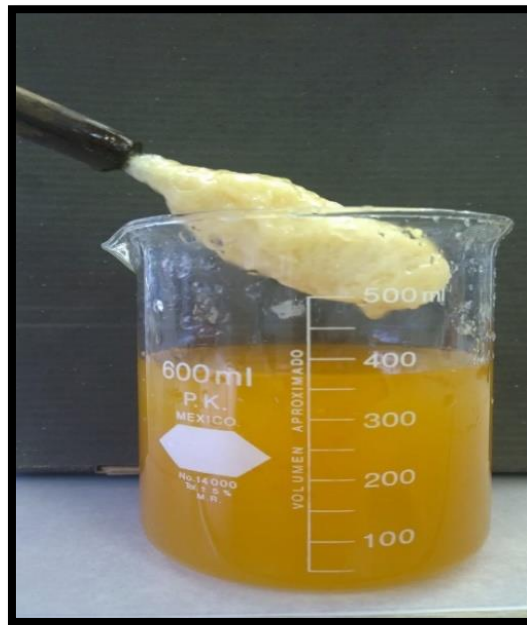


Figura 7 Precipitación del EPS con etanol al 96%.

En la Figura 8 se muestra la cuantificación de la producción del EPS, donde se observa que en las primeras tres horas de fermentación no existe una producción significativa como tal de este polímero, pero a partir de la hora 6 se comienza a cuantificar este producto con un valor de $1.52 \text{ g/L} \pm 0.00$ alcanzando valores en aumento hasta las 36 horas de fermentación con un valor de $8.60 \text{ g/L} \pm 0.00$ y un rendimiento de producción de 30.78%. Cuando se comenzó a producir EPS se empezó a observar grandes cantidades de azúcares esto indica que la sacarosa del piloncillo es hidrolizada para utilizar la glucosa para la producción de EPS y estas concentraciones disminuían conforme la fermentación avanzaba.

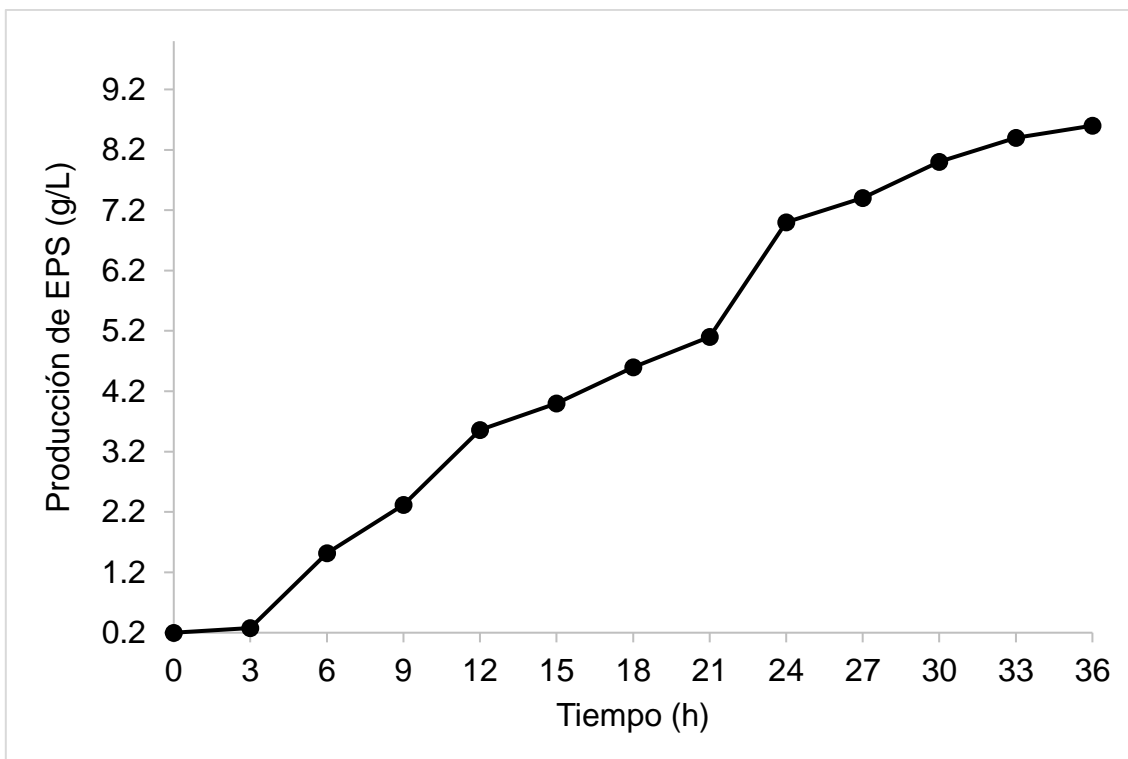


Figura 8 Producción de EPS (g/L) en un cultivo por lote. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones

Vega, *et. al.* (2012) obtuvieron dextrano de alto peso molecular a partir residuos de piña utilizando una cepa de *Leuconostoc mesenteroides*. El tiempo de fermentación fue de 18 horas a una temperatura de 29°C, una concentración de 15 g/ L de sacarosa y pH de 5.5, sin agitación. El rendimiento de polímero fue de 6.3 g/ L

6.3 Cinética de cultivo alimentado

6.3.1 Cinética de crecimiento celular

Para el desarrollo de un cultivo alimentado, se partió del establecimiento de un cultivo en lote. Cuando el cultivo llego a fase exponencial, parámetro conocido en la cinética de fermentación por lote desarrollada con anterioridad, se inició la alimentación de medio de cultivo fresco sin la eliminación del cultivo crecido.

Se realizaron dos ensayos de cultivo alimentado independientes, cultivo alimentado A y cultivo alimentado B La metodología empleada para esta serie

experimental se describe detalladamente en la sección 5.6 DE MATERIALES Y METODOS.

En la Figura 9 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 contra tiempo para el cultivo alimentado A y cultivo alimentado B. Como se puede observar la concentración de biomasa en la fase I la cual comprende de la hora 0 hasta las 15 horas el crecimiento *L. mesenteroides* BL-UV04 se mantuvo con un valor 8.68 ± 0.00 UFC/mL con una tasa de crecimiento de ($\mu_{\max} = 0.04 \text{ h}^{-1}$), para ambos ensayos, esto se debe a que el cultivo alimentado A y el cultivo alimentado B iniciaron con las mismas condiciones de fermentación de un cultivo en lote.

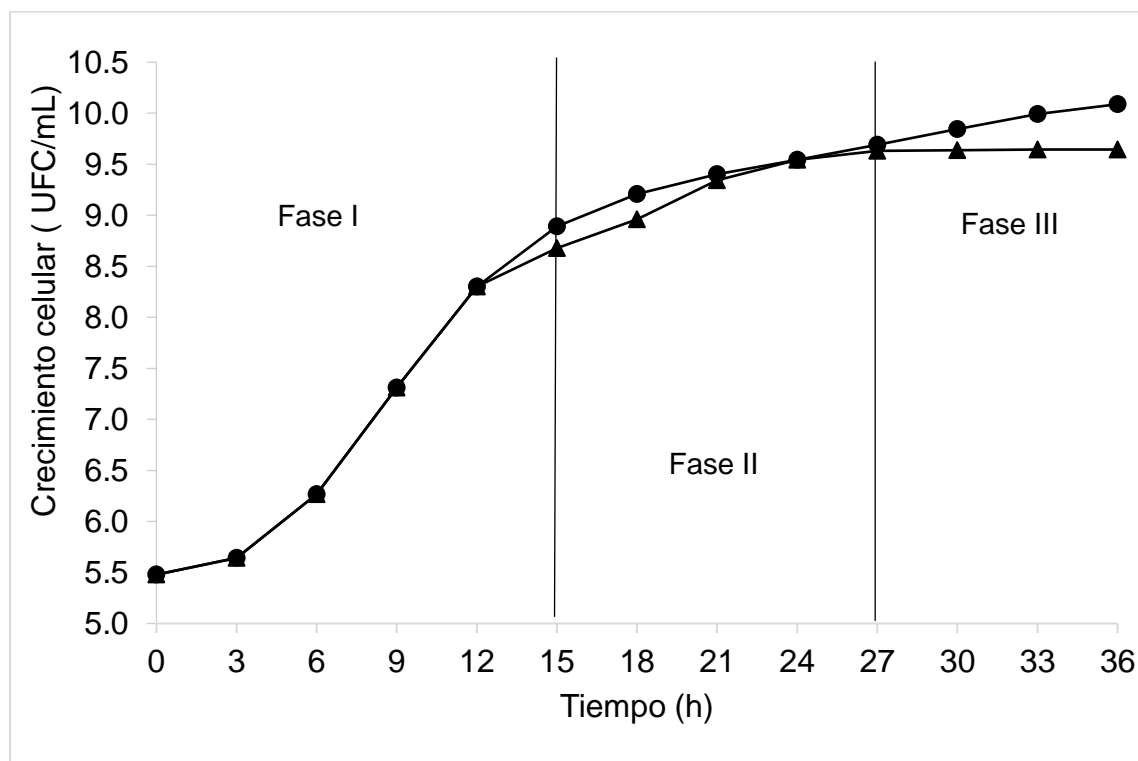


Figura 9 Crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 (UFC/mL) en un cultivo alimentado A (---▲---) y un cultivo alimentado B (---●--). Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

En lo que refiere a la fase II a partir de las 15 horas se comenzó la alimentación de medio de cultivo fresco como se describe detalladamente en la

sección 5.6 DE MATERIALES Y METODOS. Se observa un aumento en el microorganismo de las 15 hasta las 27 horas para ambos ensayos con un valor máximo de crecimiento *L. mesenteroides* BL-UV04 de 9.63 ± 0.02 UFC/mL y una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.03 \text{ h}^{-1}$ para el cultivo alimentado A y 9.69 ± 0.00 UFC/mL con una tasa de crecimiento de $\mu_{\max} = 0.05 \text{ h}^{-1}$ para el cultivo alimentado B.

En la fase III que comprende de la 27 a las 36 horas. El cultivo alimentado A comenzó entrar a fase estacionaria, se asume que el cultivo está en estado estacionario cuando han transcurrido a menos tres tiempos de residencia (tr)- el mantenimiento de valores constantes en el conteo de células viables indica que el cultivo se encuentra en estado estacionario. Sin embargo, en el cultivo alimentado B muestra un crecimiento exponencial hasta las 36 horas de fermentación con un valor de 10.09 ± 3.54 UFC/mL.

6.3.2 Cinética de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores en un cultivo alimentado A se muestra en la figura 10 donde se puede observar que de las 0 horas a las 12 horas de fermentación se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 0.48 ± 0.00 g/ L indicado por la línea punteada.

Transcurridas 15 horas de fermentación, se inició una alimentación medio de cultivo fresco, sin la eliminación del cultivo crecido (indicado con una línea recta en la figura 10) donde la concentración de azúcares reductores disminuyó a un valor de 0.43 ± 0.00 g/ L pero inmediatamente este valor aumentó obteniendo un valor máximo 0.80 ± 0.00 g/ L en concentración de azúcares reductores, a las 21 horas de fermentación. Se observó una disminución aparente en la cuantificación de azúcares de las 24 a las 36 horas con un valor de 0.54 ± 0.02 g/ L (se dice que es aparente, porque en comparación con el valor obtenido a las 12 horas de fermentación, este sigue siendo mayor).

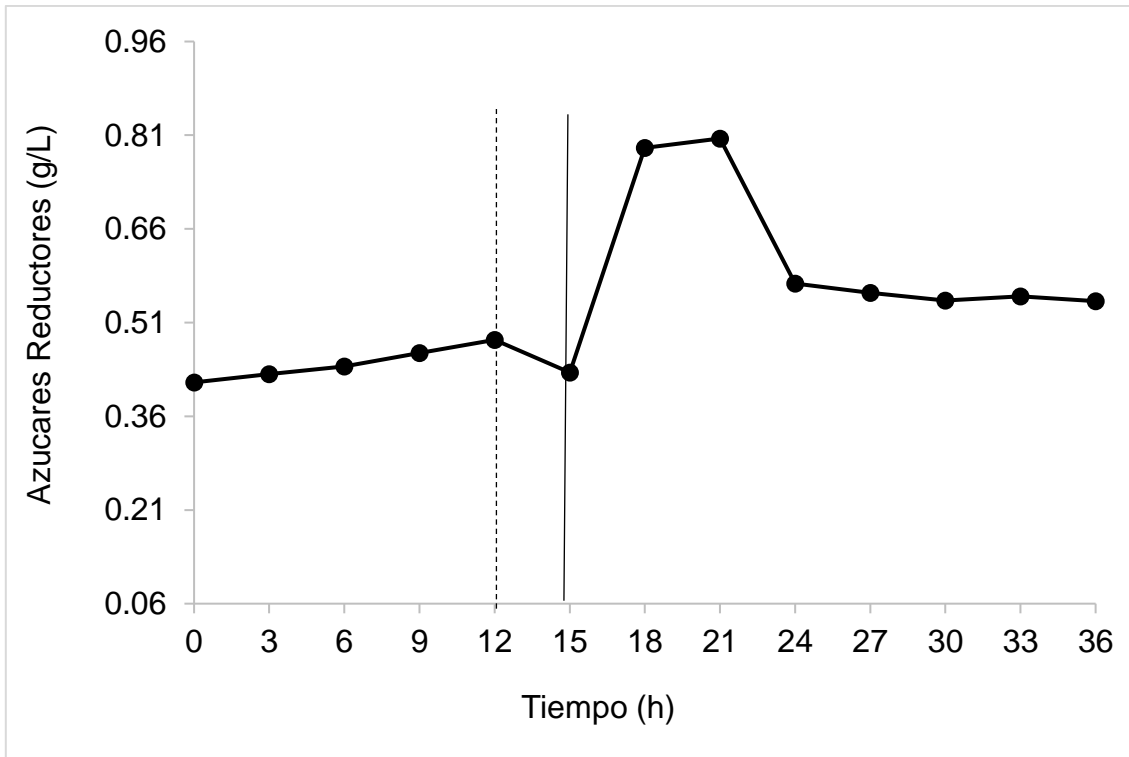


Figura 10 Azúcares reductores g/L en un cultivo por lote alimentado A (---■---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones

En la Figura 11 se muestra la concentración de azúcares reductores en el cultivo alimentado B. La concentración de azúcares reductores de las 0 a las 12 horas fue de 0.48 ± 0.00 g/L valor similar al cultivo alimentado A (indicado con la línea punteada), esto es porque en ambos ensayos se partió de un cultivo en lote con las mismas condiciones.

A las 15 horas de fermentación se inició la alimentación de medio de cultivo fresco, sin la eliminación del cultivo crecido (indicado en la figura 8 con una línea recta) donde la concentración de azúcares reductores aumento a un valor máximo de 0.814 ± 0.00 g/ L en las siguientes horas de incubación la cuantificación de azúcares reductores muestra una disminución aparente, pues en comparación con los ensayos por lote y lote alimentado A, la concentración de azúcares continua siendo mayor. Manteniéndose en aumento hasta las 24 horas con un valor de 0.62 ± 0.00 g/ L esta concentración disminuyó después de las 24 horas con un valor constante de 0.36 ± 0.00 g/ L. hasta el final de la fermentación.

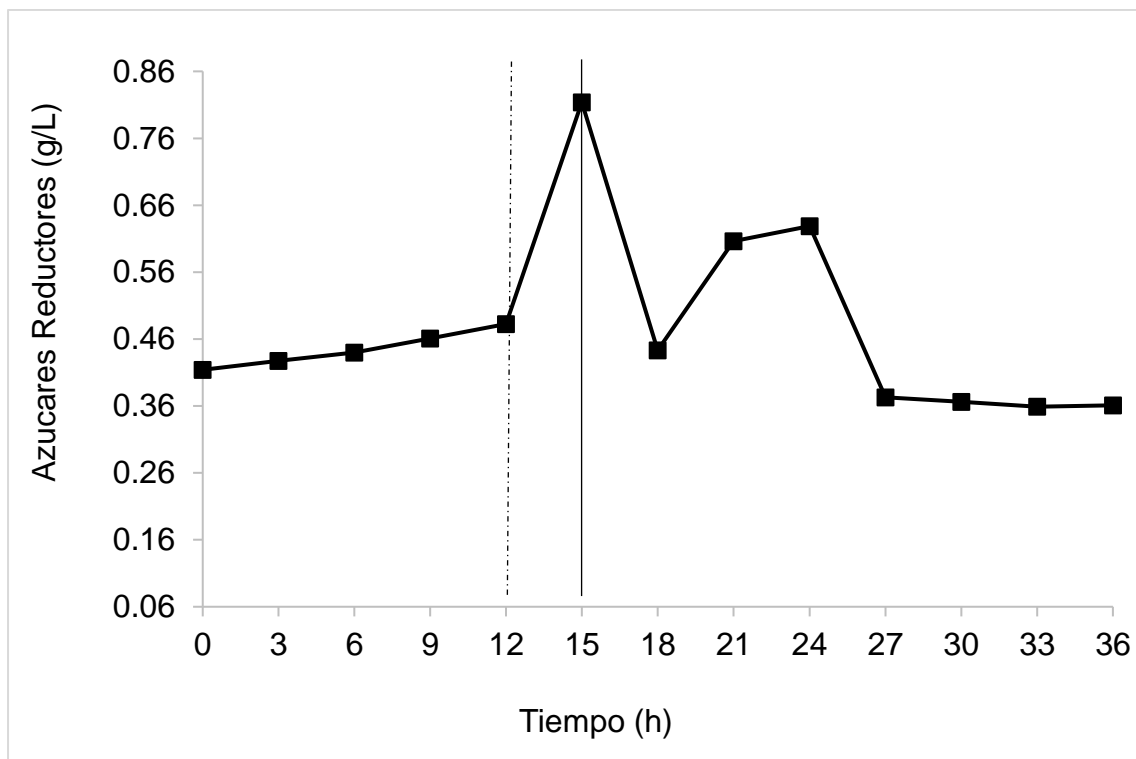


Figura 11 Azúcares reductores g/L en un cultivo por lote alimentado B (---■---) Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

6.3.3 Cinética de pH y acidez titulable total

El pH del cultivo es uno de los factores más importantes en un sistema de fermentación, influyendo directamente en la tasa de crecimiento celular, así como en la producción de EPS.

Lee y *et al.* (2001) estudiaron un pH óptimo para la producción discontinua de curdlano en fermentador con *Agrobacterium*. El crecimiento celular fue óptimo a un pH de 7.0, mientras que la producción de EPS fue máxima a un pH 5.5. Esta variación en el cambio del pH ofrece una buena estrategia para la optimización en la producción.

En nuestro caso, el principal objetivo fue demostrar que controlando el pH, se puede lograr una mayor producción de EPS.

En la Figura 12 se observa el comportamiento de pH y acidez titulable a lo largo del cultivo alimentado A en el cual se inició con un pH de 6.78 ± 0.00 una vez transcurrido un tiempo 15 horas de fermentación, se comenzó la alimentación de medio de cultivo fresco (indicado por la línea punteada), observando un ligero aumento de pH a un valor de 5.90 ± 0.00 , el pH del cultivo alimentado A se mantuvo en un pH óptimo para la producción de EPS de 4.40 ± 0.00 hasta las 21 horas de fermentación este pH disminuyó hasta un valor de 3.93 ± 0.00 a las 36 horas de fermentación con una acidez titulable total de $0.08 \pm 0.00\%$

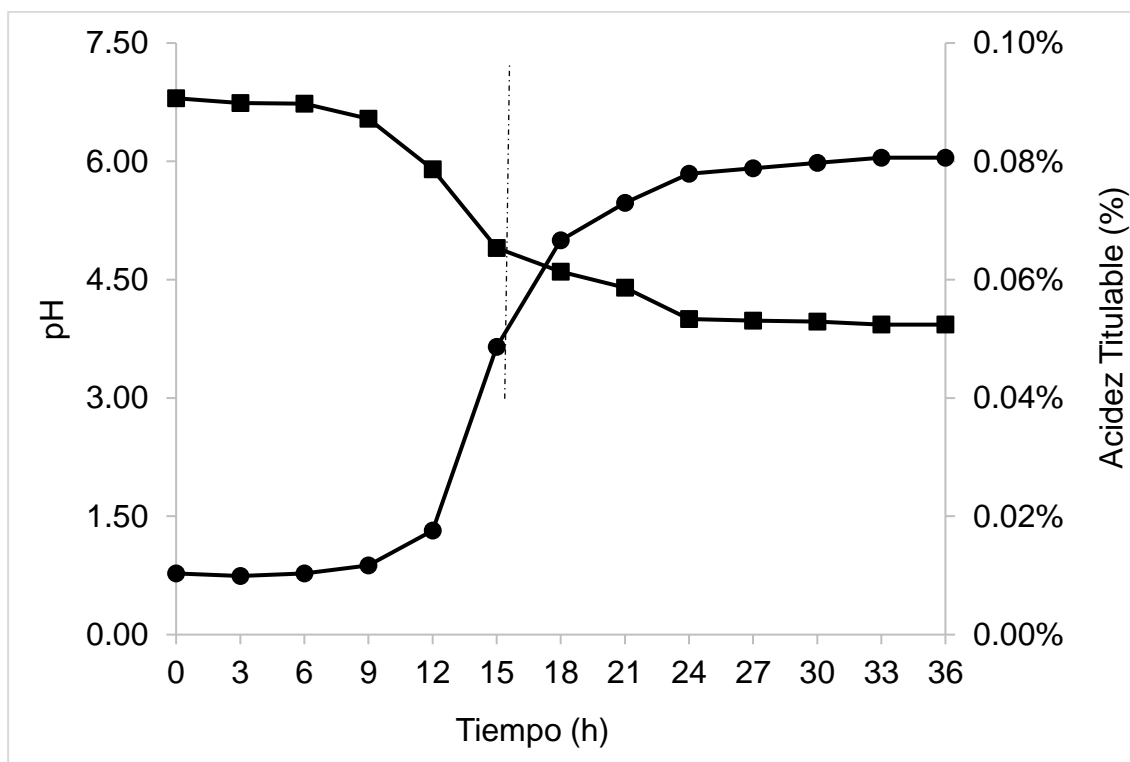


Figura 12 pH en un cultivo alimentado A (---■---) y acidez titulable en un cultivo alimentado A (---●---) Los resultados presentados son el promedio de tres repeticiones.

En la Figura 13 se muestra el ensayo del sistema de cultivo alimentado B para pH y acidez titulable en el cual se inició con un pH de 6.78 ± 0.00 , conforme la fermentación avanzó este pH comenzó a disminuir hasta un valor de 5.90 ± 0.00 dato similar al cultivo alimentado A, esto es porque en ambos ensayos se inició con un sistema de fermentación por lote, a las 15 horas se inició una alimentación de

medio de cultivo fresco con sal buffer a pH 7.0 (indicado con la línea punteada), inmediatamente el pH aumento a un valor de 6.50, pH óptimo para continuar con el crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04, este pH se mantuvo en un pH optimo hasta las 27 horas de incubación, posterior a estas 27 horas, comenzó la disminución de pH con un valor de 4.35 ± 0.00 . En lo que respecta a la acidez titulable este alcanzo un valor de 0.18% a las 36 horas de fermentación.

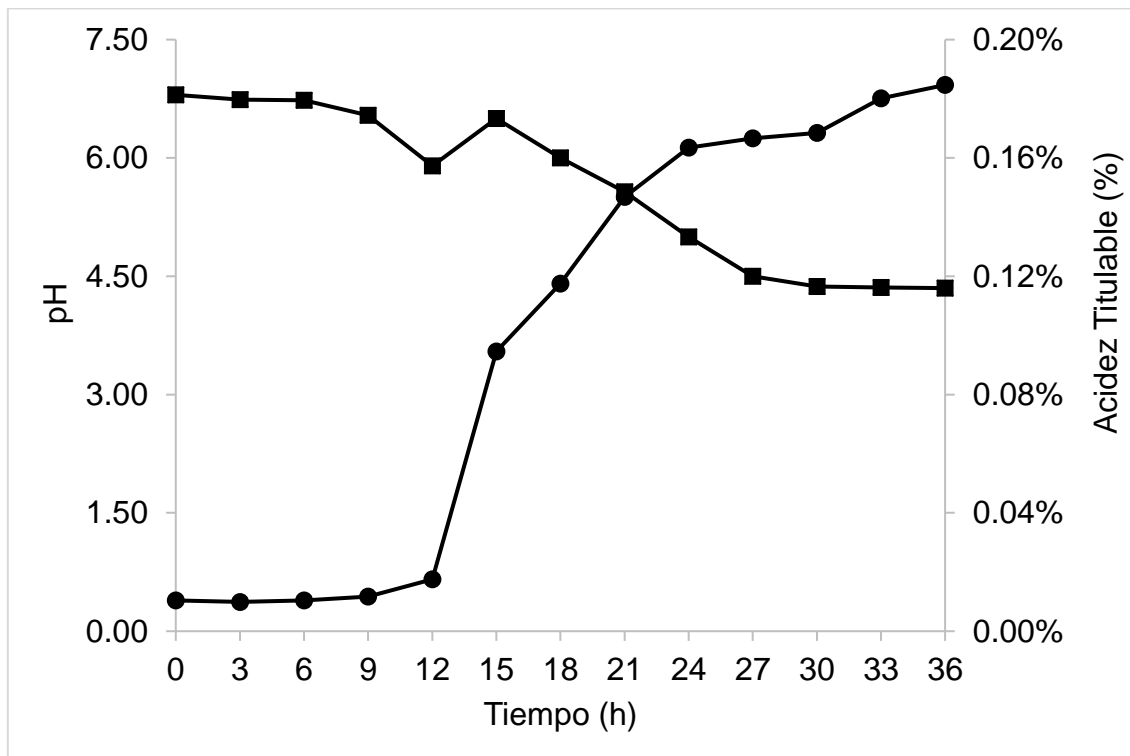


Figura 13. Cinética de pH (---■---) y acidez titulable (---●---) en el cultivo alimentado B. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

Numerosos estudios han demostrado que el control del pH aumenta la producción de EPS en comparación con cultivos a pH libre (Mozzi et al., 1996; Grobber et al., 1998; De Vuyst et al., 1998).

6.3.4 Producción de exopolisacárido

En la figura 14 se muestra la cuantificación de la producción del exopolisacárido en un medio de cultivo alimentado A, donde se observa que en las

primeras tres horas de fermentación no existe una producción significativa como tal de este polímero, pero a partir de la hora 6 se comienza a cuantificar este producto con un valor de $1.52 \text{ g/L} \pm 0.00$ alcanzando valores en aumento hasta las 36 horas de fermentación con un valor de 16.72 g/L y con un rendimiento de producción de 35.78%.

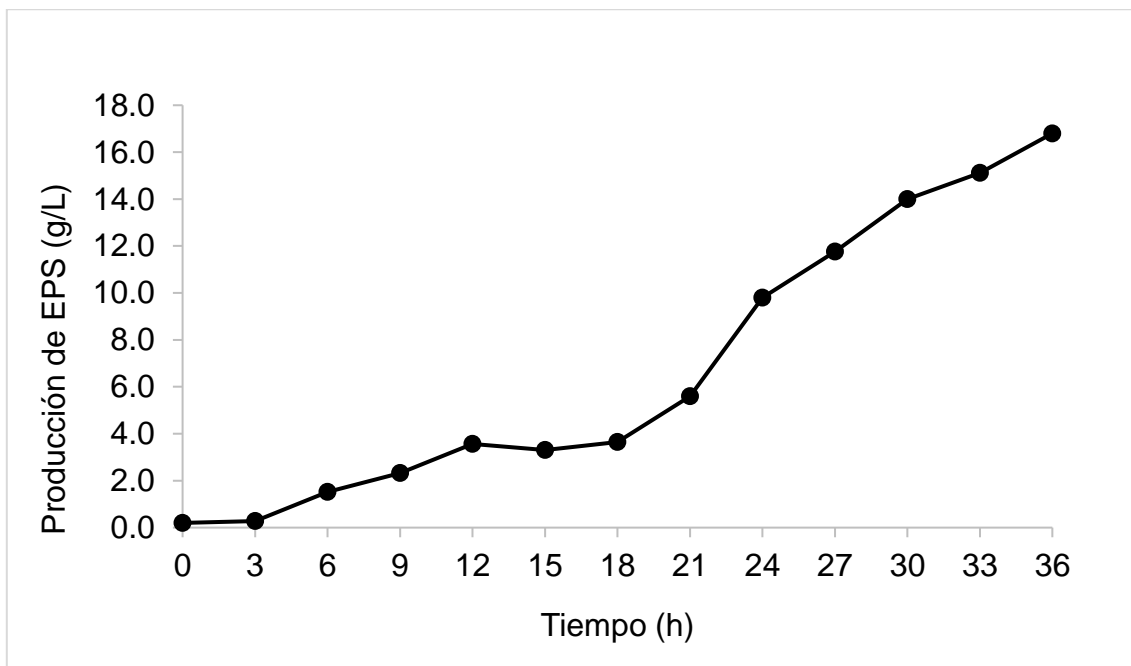


Figura 14 Producción de exopolisacárido en un cultivo alimentado A (---●---). Los resultados son el promedio de tres repeticiones.

En lo que respecta a la producción de exopolisacárido en el cultivo alimentado B se obtuvo una producción de EPS de 19.02 ± 0.00 con un rendimiento de 52.36% como se muestra en la Figura 15.

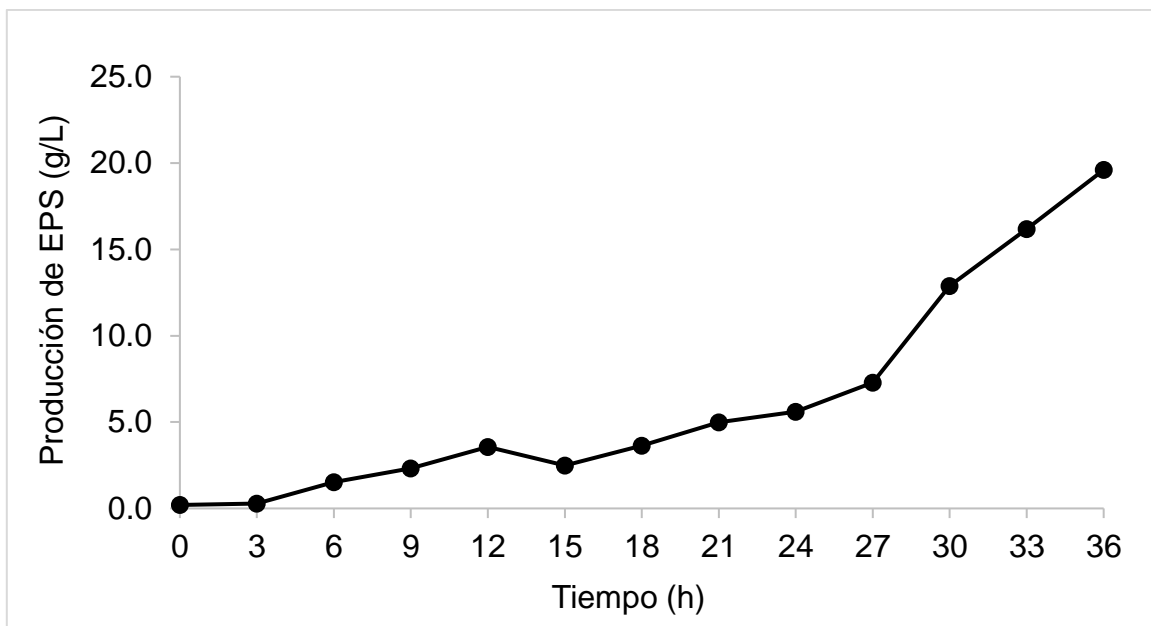


Figura 15 Producción de EPSg/L en un cultivo alimentado A (---●---) (---■---)
Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones

6.4 Comparación de pH en un cultivo en lote y cultivo alimentado

El control del pH en la producción de EPS por *L. mesenteroides* BL-UV04, desempeña un importante papel. Se ha demostrado en estudios anteriores que cuando la fermentación se desarrolla sin control de pH, se obtienen rendimientos significativamente menores en la producción de exopolisacáridos con respecto al proceso de fermentación bajo condiciones de pH controlado mediante la adición de una sal buffer.

En la tabla 3 se puede observar una comparación de pH y acidez titulable en los tres ensayos experimentales, como se puede observar en la tabla 3 se muestra que el cultivo en lote y el cultivo alimentado A no presentaron diferencias significativas de pH y acidez titulable total, sin embargo el cultivo alimentado B sí presentó diferencias significativas respecto a estos dos, siendo el cultivo alimentado B el que mantuvo un pH óptimo de 4.35 para la producción de EPS a las 36 horas de fermentación.

Tabla 2 Comparación del pH a 36 h de cultivo en lote y cultivo alimentado

Cultivo	pH 36 hrs.	Acidez (%)
Lote	3.73 ± 0.0 ^a	0.09 % ^a
Alimentado A	3.93 ± 0.0 ^a	0.09 % ^a
Alimentado B	4.35 ± 0.0 ^b	0.18% ^b

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0.05).

En condiciones incontroladas del pH se tiene una producción de EPS de 8.66 ± 0.0 g/L para el cultivo en lote y 16.72 ± 0.0 g/ L para el cultivo alimentado A, sin embargo para el cultivo alimentado B con control de pH se tiene una producción de EPS de 19.06 ± 0.0 g/ L.

El pH del cultivo debe mantenerse por encima de 4.5 y 5 empleándose la adición de un tampón en el medio de cultivo como solución buffer PBS. Favoreciendo así la cantidad de biomasa y reduciendo el tiempo de fermentación alcanzando así mayores rendimientos de producción de EPS posibles

6.5 Comparación de velocidad de crecimiento en un cultivo en lote y cultivo alimentado.

En la tabla 4 se muestra un resumen de las velocidades de crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 en los tres diferentes ensayos. Como se puede observar los tres sistemas de fermentación presentaron diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento, siendo el cultivo alimentado B el que presento una velocidad mayor, con un valor de 0.0562 ± 0.01 h⁻¹ y una densidad celular de 10.09 ± 3.54 UFC/mL a las 36 horas de fermentación.

Tabla 3 Velocidad de crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 en los cultivos por lote y cultivo alimentado

Cultivo	μ_{max} (h ⁻¹)	Biomasa UFC/MI
Lote	0.0153 ± 0.00 ^a	9.40 ± 0.00
Alimentado A	0.0302 ± 0.00 ^c	9.64 ± 0.00
Alimentado B	0.0562 ± 0.01 ^b	10.09 ± 0.00

Media ± desviación estándar.

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0.05).

Soto (2000) encontró que *Leuconostoc spp* es un microorganismo que a óptimas condiciones puede llegar a alcanzar una velocidad específica de 0.02 h⁻¹ la velocidad de crecimiento de los microorganismos depende de la concentración de nutrientes, a altas concentraciones la velocidad específica alcanza valores máximos dependiendo de variables como la temperatura, pH, y de la concentración del sustrato y del producto.

Lettsisse *et al.*, 2001 explican que se puede lograr que las bacterias ácido lácticas toleren altas concentraciones de azúcar, incorporando de forma gradual concentraciones crecientes de la misma al medio en el que crece el microorganismo cada cierto intervalo de tiempo.

6.5.1 Comparación de rendimientos de exopolisacárido en cultivo en lote y cultivo alimentado.

En la tabla 5 se muestra un resumen de los rendimientos y la producción de EPS total, determinados al final del periodo de incubación en los tres ensayos experimentales (cultivo en lote, cultivo alimentado A y cultivo alimentado B).

Donde no existen diferencias significativas en el cultivo en lote y alimentado A, pero si en el cultivo alimentado B. donde se obtuvo la mayor producción de EPS

con un valor 19.06 g/ L un rendimiento de 52.36% en presencia de 150 g/ L de glucosa, a 35° C de temperatura y pH 4.36. Estos niveles de producción fueron superiores a los ensayos en cultivo en lote y cultivo alimentado A de (8.60 g/ L y 16.72 g/L respectivamente).

Tabla 4 Producción y rendimientos de producción de EPS en el cultivo por lote y cultivo alimentado.

Cultivo	Producción EPS g/L	Yp/s
Lote	8.60 ± 0.00 ^a	30.72 % ^a
Alimentado A	16.72 ± 0.00 ^a	35.78 % ^a
Alimentado B	19.06 ± 0.00 ^b	52.36% ^b

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p<0.05).

Behravan *et. al.*, 2003 estudiaron la producción de dextrano a partir de melaza de remolacha azucarera y extracto de salvado de trigo, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y el mayor rendimiento de dextrano fue de 9.44g/ L a una temperatura de 25°C con un pH inicial de 7.5 después de 48 h de fermentación.

7. CONCLUSIONES

- El crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 en un cultivo discontinuo (por lote), alcanza su máxima concentración celular a las 18 horas de fermentación.
- La velocidad de crecimiento de *L. mesenteroides* BL-UV04 es menor en un cultivo por lote (0.0153 ± 0.00), mientras que en un cultivo alimentado es mayor (0.0562 ± 0.01).
- Se estudió la producción a nivel laboratorio de EPS producido por *L. mesenteroides* BL-UV04, del cual se obtuvo un EPS que se encuentra en el medio de cultivo y que precipita con etanol y al secarlo tiene una apariencia de goma.
- La producción del EPS está relacionada con el pH del medio, produciéndose en mayor proporción a condiciones controlables y siendo el cultivo alimentado B el que favoreció la producción de EPS (35.78% vs 52.36%).
- La máxima producción de EPS total se obtiene mediante una fermentación en lote alimentado con control de pH, utilizando sacarosa como fuente de carbono, a una concentración de 150 g/ L, con una temperatura de incubación de 35° C y a un pH 6.0. En estas condiciones, la producción es de 19.06 g/ L
- El sustrato seleccionado, para obtener mejores rendimientos de producción, según bibliografía, fue la sacarosa, el cual se trabajó en concentraciones más altas de las propuestas por otros autores, alcanzando una mayor producción de polisacárido en un cultivo alimentado con control de pH comparada con la reportada en otros trabajos, No se trató de una situación de sustrato limitante al final de la fermentación.

8. RECOMENDACIONES

El trabajo presentado da pie para la realización de proyectos de investigación que completen el entendimiento del fenómeno de producción de exopolisacáridos producidos por *L. mesenteroides* BL-UV04

- Determinar el perfil de azúcares a lo largo del cultivo mediante HPLC.
- Ya que la bibliografía reporta la importancia de variables como la agitación y la aireación en el proceso, se recomienda realizar estudios en un reactor de mayor volumen, encaminados a determinar la influencia de estas variables en la producción de EPS.
- Se recomienda hacer una caracterización, como pruebas analíticas, reológicas y calorimétricas, que permitan la caracterización del biopolímero producido.

9. BIBLIOGRAFIA

AOAC, 2000. Official methods of Analysis. 16 th Edition. Association of official Analytical Chemists. Washington D.C; USA.

Abbad-Andaloussi S., H. Talbaoui., R. Marzack., R. Bonaly. 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. Appl. Microbiol. Biot. 43: 995-1000.

Aleksic S. 2009. Butanol from Biomass, (Master of science in Engineering), Youngstown State University, Ohio link Electronic Theses y Dissertations Center. Retrieved from.

Amanullah A., B. Tuttiett., A.W Nienow. 1997. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. Biotechnol. Bioeng. 57: 198-210.

Avtonomova, A. V.; Krasnopol'skaya, L. M.; Maksimov, V. N. optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* (curt.: fr.) p. karst. en: microbiology, vol. 75, no. 2 (2006). pp. 148 – 153

Axelsson L.T. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. En Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A, (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects 3rd rev. And exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1- 66.

Behravan, J., Fazly Bazzaz, B., Salimi, Z. (2003). Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. Biotechnol. Appl. Biochem. 38, 267-269.

Bergmaier D., C. Champagne P., C. Lacroix, C. 2005. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Journal of Applied Microbiology 98, 272-284.

Bhavani A. L., J. Nisha. 2010. Dextran - the polysaccharide with versatile uses. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 1, 569 – 573.

- Caligur V. 2008.** Dextran and related polysaccharides. *Biofiles*. 3, 10-
- Clementi F., P. Fantozzi., F. Mancini., M. Moresi. 1995.** Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Tech.* 17: 983-988.
- Davey K.R. 2001.** Study on the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* 90: 788-796
- Davidson B.E., R.M Llanos., M.R. Cancilla., N.CRedman., A.J Hillier. 1995.** Current research on the genetics of latic acid production in latic acid bacteria. *Int Dairy Journal*. 5:763-784.
- De Vuyst L and Degeest B. 1999.** Heteropolysaccharides from lactic acidbacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- De Vuyst. L., F. Vanderveken., S. Van de Ven., B. Degeest. 1998.** Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk médium and evidence for their growth associated biosynthesis. *J. Appl. microbial.* 84: 1059-68
- Degeest, B., De Vuyst, L. 1999.** Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 28632870.
- Flores F., L. Torres G., E. Galindo. 1994.** Effect of the dissolved oxygen tension during the cultivation of *X. campestris* on the production and quality of Xanthan gum. *J. Biotechnol.* 34: 165-173.
- Giavasis, I., L. Harvey M., B. McNeil. 2000.** Gellan gum. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20(3): 177-211.

Grigorova D.P., K Panchev, I. 1999. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. Appl. Biochem. Biotech. 3: 181-191

Grobben g.j., chin-joe i., kitzen v.a., boels i.c., boer f., sikkema, j., smith m.r., and bont, j.a.m., 1998 enhancement of expolysaccharide production by lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ncfb 2772 with a simplified defined medium, appl. environ. microbiol. 64(4): 1333-1337.

Hernández P.A. 2003. Microbiología industrial. Editorial EUNED. Chile. pp. 3661.

Hugas M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the bioreservation of meat and meat products. MEAT Sci. 49:139-150

Jay J.M. 2000. Microbiologia moderna de los alimentos. 4 Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 19-27, 106-108, 441-475.

Jeanes A., W. Haynes. 1954. Characterization and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. Journal American Chemical Society. 76, 5041-5052.

Kang K.S., I.W. Cottell. 1979. Polysaccharides. Microbial Technology. Pepler H.J y Perlman D. 2nd ed. Academic Press. London. 1: 471-481

Kaplan D.L.1998. Biopolymers from Renewable Resources. Editorial Springer. Nueva York. 12-16

Lacroix C., A. LeDuy., G. Noel., L. Choplin. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnol. Bioeng. 27: 202-207.

Lakshmi A., J. Nisha. 2010. Dextran, The polysaccharide with versatile uses. International Journal of pharma and biosciences. 1, (4). 569-573.

Leela J.K., G. Sharma. 2000. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. Bioprocess Eng. 23: 687-689

Letisse, ., 2001 Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. *Applied Microbiology Biotechnology*. 55 417-422.

Levau J.Y., M. Boiux. 2000. *Microbiologia industrial: los microorganismos de interes industrial*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp.167-187, 2006,227-242

Lindberg B. 1990. Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 48:279-318.

Lopretti, Mary. Producción simultánea de dextrano y fructosa a partir de desechos agroindustriales en Iberoamérica. Aspectos científicos, técnicos y económicos. Cytel, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo: Buenos Aires, junio 2002.

Macossay T.J. 1995. Synthesis and characterization of water soluble chitosan derivates. Tesis doctoral. Louisiana State University.

Mancuso N.C., L. Garon S., J. Bowman P., P. Nichols D., J.A.E Gibson., J. Guézennec. 2005. b. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol.* 49: 578-589.

Mandingan M.T., J.M Martinko., J. Parker. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Prentice Hall. Madrid, España. Pp. 122, 352, 400-402,991.

Martinez-Checa F., C. Calvo., M. Caba., M. Ferrer.,V. Bejar., E. Quesada. 1996. Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscosidad y capacidad emulgente del biopolimero V2-7 de *Volcaniella eurihalina*. *Microbiologia*. 12(1):55-60

Merck. 2004. Manual de medios de cultivo

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

Mozzi F., De Glori G., Oliver G. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnology Letters*. 18(4): 435-439

Murray R., D. Granner., P. Mayes., V. Rodwell. 1994. *Bioquímica de Harper*. Edición 13. Editorial manual moderno. 162-168.

Naessens M., A. Cerdobbel., W. Soetaert., E. Vandamme. 2005. *Leuconostoc dextranase* and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80, 845860.

Onilude, A.A., O. Olaoye., I.F.Fadahunsi., A. Owoseni., E.O. Garuba., T.Atoyebi. 2013. Effects on cultural conditions on dextran production by *Leuconostoc spp.* *IFRJ* 20(4), 1645-1651

Parada J. L., J. Chanona., D. Téllez., G. Gutiérrez y M. García. 2006. Aislamiento de exopolisacárido de *Lactobacillus bulgaricus*, su caracterización morfoestructural usando análisis fractal. *Libros Visión alimentos*, tomo III, IPN. 331-335

Patel S., A. Majumder., A. Goyal. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian J Microbiol*. 52(1), 3–12

Petronella, J.L., J. Hugenholtz. 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J. Biosci. Bioeng*. 88: 178-182

Petry S., S. Furlan., M.J. Crepeau., J. Cerning., M. Desmazeaud. 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microb*. 66: 3427-3431.

Prescott L.M., J.P Harley., D.A. Klein. 1999. *Microbiología*. 4 ed., McGraw-Hill Interamericana Zaragoza, España. Pp 515-518.

Robyt, J.F. 1986. "Dextran", *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, vol.4, 2a. ed., John Wiley y Sons, Nueva York, pp. 752-767, 1986.

Rodriguez O.H. 2007. Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. Revista EIA, 159-172.

Ruiz L.H.A., J. Rodríguez R.M., H. Rodríguez R., E.J.C. Contreras.,C. Aguilar N. 2007. “Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido”. Revista mexicana de ingeniería química. 6(1), 33-40

Sankpal N., A. Joshi., S. Sainkar., B. Kulkarni. 2001. Production of dextran by *Rhizopus* sp. Immobilized on porous cellulose support. Process Biochemistry. 37, 395-403

Shukla R., S. Shukla., V. Bivolarski., et al. 2011. Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* with Maltose, Food Technol. Biotechnol. 49 (3) 291–296

Smith J. E. 2009. Biotechnology (C.u. Press Ed. 5TH Ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press

Son H.J., M. Heo S.,Y. Kim G., S-J. Lee. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. Biotechnol. Appl. Bioc. 33: 1-5.

Steinbüchel A. 2001. Perspectives for Biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromol. Biosci. (1)1: 124.

Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 147: 3-9.

Sutherland I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides En: J. Baddieley, N.H. Carey, I.J Higgins and W. G. Pitter (Eds). Cambridge studies in Biotechnology. 9.

Sutherland I.W. 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides En: J. Baddieley, N.H. Carey, I.J. Higgins and W.G. Pitter (Eds). Cambridge studies in Biotechnology. Vol. 9. Cambridge University Press, Cambridge

Tait M.I., I. Sutherland W., A.J. Clarke-Sturman.1986. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris exopolysaccharide*. J. Gen. Microbiol. 132: 1483-92

Tsuchiya, H. M.; Koepsell, H. J.; Corman, J.; Bryant, G.; Bogard, M. O.; Feger, V H. and Jackson, R. W. 1952. The effect of certain cultural factors on the production of dextransucrases by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 64:521-527.

Vega, J., M. Sibaja., M. Lopretti. 2012. Biosíntesis de dextranos de alto peso molecular mediante la inoculación con *Leuconostoc mesenteroides*, var. Mesenteroides (ATCC 10830) de jugos residuales de la agroindustria de la piña: síntesis y caracterización de hierro-dextranos. Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay, 55-58.

Walker S.T. 2000. Microbiología. 1 Ed. McGraw-Hill Interamericana. Mexico D.F.pp 301-302

Wang Y. and McNeil B. 1995. Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium gluconicum* in an airlift reactor with an external loop. Journal of Chemical Technology AND Biotechnology, 63(3), pp.215-222.

Whitfield C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. Can. J. Microbiol. 34: 415-419.

10. ANEXOS

10.1 Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores.

