



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS



“Efecto de la temperatura y la fuente de carbono sobre las propiedades fisicoquímicas del yogur elaborado con cepas productoras de exopolisacáridos”

Tesis para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Alimentarias

Presenta:

Q.C Beatriz Baizabal Vargas

Director:

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Xalapa, Veracruz

Enero, 2016



La presente tesis titulada

**“Efecto de la temperatura y la fuente de carbono sobre las propiedades fisicoquímicas del yogurt elaborado con cepas productoras de exopolisacáridos”.**

Realizada por la

**Q. C. BEATRIZ BAIZABAL VARGAS**

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 29 de enero de 2016.



Dr. Micloth López del Castillo Lozano



Dr. Oscar García Barradas



Dra. María Remedios Mendoza López

## DEDICATORIAS

A mis **padres**, por ser mi mayor ejemplo y motor de arranque, cada uno guiándome a su manera. Porque gracias a ustedes soy la persona necia que no descansa hasta conseguir sus sueños.

A mi **papá**, por enseñarme que las cosas que queremos se obtienen con esfuerzo, dedicación y deben costar, porque solo así son valoradas y el éxito sabe mejor.

A mi **mamá**, por ser el impulso infinito y estar siempre en cada situación con la mejor disposición, siempre con el corazón en la boca, por cuidarme y protegerme siempre y al mismo tiempo dejándome ser.

A mis **hermanos Pita, Lety y Daniel** por siempre estar en las buenas y malas, darme su cariño y apoyo único, que es siempre al primero que recurro.

A ustedes por demostrarme están orgullosos de mí y dejarme volar.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por la beca proporcionada.

Al **Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana**, por permitir realizar mis estudios de maestría.

A mi directora de tesis: la **Dra. Maribel Jiménez Fernández**, por su apoyo y paciencia para la terminación de este proyecto, porque no solo me formo académicamente sino como persona, por sus atenciones y ánimos para este proyecto y mi persona. Con mucho cariño y admiración.

A mi asesora de tesis: **Dra. Guiomar Melgar**, por permitirme compartir este proyecto con ella, su apoyo y esfuerzo en la realización de este.

A mi honorable jurado: **Dra. María Remedios Mendoza López, Dr. Oscar García Barradas, Dr. Micloth López del Castillo Lozano**, por sus valiosas aportaciones y tiempo dedicado a este trabajo.

A mis **padres**, por su cariño, confianza y apoyo día a día para la realización de esta meta.

**Israel Meza**, siendo quien vivió mis altas y bajas como tuyas, que facilito esta etapa, estando al pendiente y a la disposición sin importar cual fuese la tarea, me dio ánimos y fuerza para nunca rendirme, al confiar siempre en mi capacidad y día a día hacérmela ver.

A mis **ñoños**, esta fue una meta que vivimos en conjunto, siempre de la mano y dándonos un empujón cuando era necesario hacia el objetivo, por su amistad, horas de estudio y desestrés.

A **Diana** y **Marco** por que más que ser parte de esta meta, fueron mi aliento en muchos aspectos, tanto laborales como personales, facilitando y haciendo más grato este proyecto, fueron como una familia,

A **Dafne** y **Magaly** por su apoyo incondicional en este proyecto, aun tuvieran que explicarme las cosas tres veces. Por abrirme su corazón y dejarme descansar siempre en él, gracias por su amistad y las experiencias vividas a su lado.

A **Anny, Naida, Maricela, Paty, Jacki** y **Liesel** por su disposición para apoyarme en este proyecto, aun siendo deshoras y fines de semana. Y por su valiosa amistad.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	III
ÍNDICE GENERAL .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVI
ÍNDICE DE TABLAS .....	XVIII
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XX
ABREVIATURAS .....	XXI
RESUMEN.....	XXIII
ABSTRACT .....	XVII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Exopolisacáridos (EPS) .....	20
2.2 Producción de Exopolisacáridos microbianos .....	22
2.3 Factores determinantes en la producción de Exopolisacáridos .	22
2.4 Clasificación de los Exopolisacáridos.....	24
2.5 Papel que confiere los Exopolisacáridos a las bacterias .....	26
2.6 Exopolisacáridos en la industria.....	27
2.7 Propiedades fisicoquímicas .....	29
2.8 Exopolisacáridos en productos lácteos fermentados.....	30
2.9 Las bacterias ácido lácticas (BAL).....	32
2.10 Bacterias ácido lácticas del yogur .....	33
2.11 Streptococcus thermophilus (ST) .....	34
2.12 Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus .....	35

2.13	Yogur .....	35
2.14	Características nutricionales del Yogur .....	37
2.15	Situación Actual.....	38
<b>3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>43</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>44</b>
4.1	Objetivo general.....	44
4.2	Objetivos específicos.....	44
4.3	Hipótesis .....	44
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
5.1	Diagrama Experimental.....	45
5.2	Aspectos Generales .....	46
5.3	Diseño Experimental .....	46
5.4	Análisis Estadístico.....	47
5.5	Materiales y Equipo .....	48
5.5.1	Materia Prima .....	48
5.5.2	Reactivos.....	48
5.5.3	Equipo .....	49
5.6	Métodos.....	50
5.6.1	Elección de las cepas ST y LB a partir de la producción de EPS	50
5.6.2	Curvas de crecimiento (estrés) de las cepas ST y LB en caldo MRS modificado con distintas fuentes Y concentraciones de carbono (sacarosa y dextrosa).....	51
5.6.3	Cinéticas de crecimiento en absorbancia de las cepas en caldo MRS .....	52
5.6.4	Cinéticas de pH y acidez titulable de las cepas en caldo MRS ...	53

5.6.5	Cinéticas de pH y acidez titulable de las cepas en leche .....	54
5.6.6	Cinéticas de Solidos solubles totales (Determinación de °Brix) de las cepas en leche.....	54
5.6.7	Elaboración de Yogur .....	55
5.6.8	Color .....	55
5.6.9	Densidad .....	56
5.6.10	Grado de Sinéresis.....	56
5.6.11	Sinéresis de reposo.....	57
5.6.12	Viscosidad aparente .....	57
5.6.13	Análisis de fuerza de compresión.....	57
5.6.14	Obtención de EPS totales.....	58
5.6.15	Prueba de fenol sulfúrico .....	59
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
6.1	Elección de las cepas de ST y LB productoras de EPS .....	62
6.2	Efecto de la concentración de glucosa y sacarosa en el crecimiento de las cepas seleccionadas.....	63
6.3	Cinéticas de las cepas ST2 y LB1 en caldo MRS.....	67
6.3.1	Cinéticas de crecimiento en caldo MRS a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2 y LB1 individuales y en conjunto sin azúcar y con el 10% de glucosa.....	67
6.3.2	Cinéticas de pH y acidez en caldo MRS a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 individuales y en conjunto, sin azúcar y con el 10% de glucosa.....	71
6.4	Cinéticas de las cepas en leche semidescremada comercial.....	77
6.4.1	Cinéticas de pH y acidez en leche a temperatura de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 y en conjunto .....	77



6.4.2	Cinéticas de SST en leche a temperatura de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 individuales y en conjunto .....	82
6.4.3	Cinéticas de pH, acidez y SST en yogur a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C .....	84
<b>6.5</b>	<b>Propiedades fisicoquímicas .....</b>	<b>89</b>
6.5.1	Color .....	89
6.5.2	Grado de sinéresis.....	91
6.5.3	Sinéresis de reposo .....	94
6.5.4	Viscosidad aparente .....	96
6.5.5	Fuerza de compresión .....	99
<b>6.6</b>	<b>Cuantificación de EPS totales .....</b>	<b>103</b>
6.6.1	Obtención de EPS totales en cepas solas y con azúcares.....	103
6.6.2	Cuantificación de carbohidratos (EPS) con la prueba de fenol sulfúrico .....	106
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>111</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXO B .....</b>	<b>121</b>
	<b>ANEXO C .....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO D .....</b>	<b>124</b>
	<b>ANEXO E .....</b>	<b>127</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Los exopolisacáridos se presentan de dos formas: capsulares y extracelulares. .... 24
- Figura 2.** Los alimentos con exopolisacáridos tienen una fluidez cremosa y continua así como una consistencia homogénea. .... 32
- Figura 3.** Las bacterias productoras del yogur trabajan en sinergismo. .... 36
- Figura 4.** Curva de crecimiento y sus fases. .... 53
- Figura 5.** Curva de crecimiento en caldo MRS ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) a diferentes concentraciones de glucosa de las cepas A) *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y B) *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1). .... 65
- Figura 6.** Curva de crecimiento en caldo MRS ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) a diferentes concentraciones de sacarosa de las cepas a) *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y b) *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1). .... 66
- Figura 7.** Cinéticas de crecimiento en caldo MRS ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto sin azúcar y con el 10% de glucosa. .... 69
- Figura 8.** Cinéticas de pH a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C en caldo MRS de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto y con el 10% de glucosa. .... 73
- Figura 9.** Cinéticas de acidez de 24 horas en caldo MRS a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, sin azúcar y con el 10% de glucosa. .... 76
- Figura 10.** Cinéticas de pH de en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp.*

*Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. .... 79

**Figura 11.** Cinéticas de acidez en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. .... 81

**Figura 12.** Cinéticas de SST en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. .... 84

**Figura 13.** Cinéticas de pH a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur. .... 85

**Figura 14.** Cinéticas de acidez a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur. ... 86

**Figura 15.** Cinéticas de SST a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur. .... 87

**Figura 16.** Grafica de grado de sinéresis en la leche y las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, así como con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. .... 93

**Figura 17.** Grafica de viscosidad de la leche y las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, así como con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. .... 98

**Figura 18.** Grafica de fuerza de compresión en leche y las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. .... 102

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales polisacáridos de origen vegetal, y producidos por algas usados en la industria alimentaria (Tsvetoslava <i>et al.</i> , 2014).....	39
<b>Tabla 2.</b> Principales polisacáridos de origen microbiano usados en la industria alimentaria (Tsvetoslava <i>et al.</i> , 2014).....	40
<b>Tabla 3.</b> El mercado nacional de lácteos se compone de diversos segmentos de mercado entre los que destacan. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Tipos de factores y variables de respuesta utilizados en el diseño experimental.....	47
<b>Tabla 5.</b> Curva de calibración con glucosa para la prueba de fenol sulfúrico. ....	60
<b>Tabla 6.</b> Curva de calibración con sacarosa para la prueba de fenol sulfúrico. ....	60
<b>Tabla 7.</b> Producción de EPS en cuatro cepas de <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> y tres cepas de <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> de acuerdo con las pruebas de rojo rutenio y azul alcian.....	62
<b>Tabla 8.</b> Resultado de color de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) solas y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.....	90
<b>Tabla 9.</b> Resultado de grado de sinéresis de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) solas y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.....	92
<b>Tabla 10.</b> Resultado de la sinéresis de reposo de 24 h a 21 días de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. ....	95
<b>Tabla 11.</b> Resultado de viscosidad aparente de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.....	97

<b>Tabla 12.</b> Resultados de la prueba tensión superficial de la leche sola y de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto en leche, sin y con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.....	100
<b>Tabla 13.</b> Peso de los exopolisacáridos extracelulares de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) solas y añadiéndole glucosa y sacarosa a las concentraciones de 5, 10 y 15% p/v. ....	104
<b>Tabla 14.</b> Peso de los exopolisacáridos capsulares de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) solas y añadiéndole glucosa y sacarosa a las concentraciones de 5, 10 y 15% p/v. ....	105
<b>Tabla 15.</b> Cuantificación de los exopolisacáridos extracelulares de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) y de las cepas ST2 con 5, 10 y 15% de glucosa y sacarosa.....	106
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación de los exopolisacáridos capsulares de las cepas <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> ATCC 19258 (ST2) y <i>Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus</i> ATCC 11842D-5 (LB1) y de las cepas ST2 con 5, 10 y 15% de glucosa y sacarosa.....	107

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje de Acidez .....	54
<b>Ecuación 2.</b> Ángulo de matiz .....	56
<b>Ecuación 3.</b> Determinación de cromaticidad.....	56
<b>Ecuación 4.</b> Grado de sinéresis.....	57

## ABREVIATURAS

EPS	Exopolisacáridos
EPSs	Exopolisacáridos extracelulares
EPSc	Exopolisacáridos capsulares
BAL	Bacterias ácido lácticas
ST	Streptococcus thermophilus
LB	Lactobacillus bulgaricus
Lag	Fase de adaptación
HoPS	Homopolisacáridos
HePS	Heteropolisacáridos
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
ATCC	American Type Culture Collection
GRAS	Generally recognized as safe
pH	Potencial de hidrogeno
m.o	Microorganismo
DO	Densidad óptica
Cm	Centímetro.
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico.
Cps	Centipoise.
et al.	Y colaboradores.
G	Gramo.
L	Litro.
Min	Minuto.

L <sup>-1</sup>	Mililitro
mL	Mililitro
H	Horas
Rpm	Revoluciones por minuto.
S	Segundo.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
PM	Peso molecular
A	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
CV	coeficiente de variación
<i>F</i>	test de Fisher
<i>P</i>	Probabilidad
<i>R</i> <sup>2</sup>	Coeficiente de correlación
<i>R</i>	Coeficiente de Pearson
V	Volumen
Nm	Nanómetros
D	Diámetro
°Brix	Grados Brix
P	Densidad
Po	Densidad inicial
TGI	Tracto gastrointestinal



## RESUMEN

Los exopolisacáridos (EPS) disminuyen la sinéresis y aumentan la viscosidad del yogur, favoreciendo la estabilidad de éste de manera natural y segura, siendo una alternativa para sustituir los aditivos comerciales. El objetivo del presente trabajo de investigación consistió primero en seleccionar las cepas con mayor capacidad de producción de EPS (*Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1)) y evaluar el efecto de la adición de concentración de la glucosa así como de la temperatura de incubación (37, 42 y 45 °C) sobre las propiedades fisicoquímicas del yogur. Para ello, se analizaron las cepas de ST y LB a partir de su producción de EPS, se evaluó la obtención y concentración de EPS de las cepas en leche descremada con y sin azúcares (glucosa y fructosa) añadidos, y en el yogur se analizaron las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, °Brix, color, grado de sinéresis, sinéresis de reposo, viscosidad aparente y fuerza de compresión). Resultando que las cepas de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) ATCC 11842D-5 fueron las que tuvieron mayor capacidad de producción de EPS. La mayor obtención de peso de EPS extracelulares en leche semidescremada fue con 10% de glucosa dando 858.05 mg/L<sup>-1</sup> de ATCC 19258 y 370.29 mg/L<sup>-1</sup> de ATCC 11842D-5. El yogur realizado a la temperatura de 37 °C fue el que mostró mejores resultados con un pH de 4.7, acidez de 0.78%, SST de 8.5 °Brix, viscosidad de 2587 Cps, fuerza de compresión de 0.79 N, sinéresis inducida de 48% y sinéresis de reposo de 1ml a los 21 días. Se puede concluir que la producción y contenido de EPS así como las propiedades fisicoquímicas del yogur fue influenciado por del tipo y concentración de la fuente de carbono así como de la temperatura de incubación.

Palabras Clave:

Fuente de carbono, temperatura, bacterias ácido lácticas, textura, viscosidad, sinéresis.

## ABSTRACT

The exopolysaccharides (EPS) decrease syneresis and increase the viscosity of the yogurt, favoring stability it naturally and safely, one alternative to replace the commercial additives. The objective of this research consisted first selecting those with higher production capacity of EPS (*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) and *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1)) and evaluate the effect of the addition of glucose concentration and temperature of incubation (37, 42 and 45 °C) on the physicochemical properties of the yogurt. To this end, ST and LB strains analyzed from its EPS production, procurement and EPS concentration of strains with skim milk without sugar (glucose and fructose) added was evaluated and analyzed in yogurt the physicochemical properties (pH, acidity, Brix, color, degree of syneresis syneresis rest, apparent viscosity and compression force). Resulting strains of *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 and *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) ATCC 11842D-5 were the ones that had higher production capacity of EPS. Most obtaining extracellular weight of EPS in low-fat milk was 10% glucose giving 858.05 mg / L-1 ATCC 19258 and 370.29 mg / L-1 ATCC 11842D-5. Yogurt made at the temperature of 37 °C was the best results showed that at pH 4.7, acidity of 0.78%, 8.5 ° Brix SST, 2587 cps viscosity, compression force of 0.79 N, 48% syneresis induced and syneresis rest of 1ml at 21 days. It can be concluded that the EPS production and content as well as the physicochemical properties of yogurt depended on the type and concentration of the carbon source as well as the incubation temperature.

### Keywords:

Carbon source, temperature, lactic acid bacteria, texture, viscosity, syneresis

## 1. INTRODUCCIÓN

Los Exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos extracelulares que pueden ser encontrados de dos formas ya sea adjunto a la pared de la célula en forma de capsula o extracelular donde es secretado en el entorno de forma mucosa, siendo estos últimos los de nuestro interés para mejorar la viscosidad en el yogur. Los EPS tienen beneficios tanto fisiológicos como tecnológicos; nuestro trabajo está enfocado en los beneficios tecnológicos, los cuales son modificar y mejorar la textura, aspecto y estabilidad al modificarse las propiedades reológicas como la viscosidad en nuestros productos fermentados, previniendo la sinéresis. Estas mejoras dependerán de la cantidad de producción, la ubicación en la pared celular, el engrosamiento y composición del exopolisacárido. Los EPS son dependientes del tipo de microorganismo y de las condiciones ambientales.

El consumidor exige cada vez más alimentos naturales, seguros y sanos, por lo que los EPS de la mezcla de bacterias *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* (ST) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* (LB) son una buena opción, funcionando como agentes de textura en condiciones adecuadas, y actuando como estabilizante, dando la viscosidad esperada que dan los aditivos comerciales, con la cualidad de crear un producto natural (son sintetizados de forma natural), seguro (siendo considerados GRAS) y sano (ya que son considerados nutraceuticos), pero teniendo como principal inconveniente y limitante a su expansión industrial su bajo rendimiento en la producción.

Las bacterias *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* (ST) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* (LB) alcanzan una baja producción de EPS con un total de 100-800 mg/L, no siendo de interés económico para la industria como texturizante en leche fermentada. Pero la suplementación en los medios de crecimiento podrían aumentar la producción, por ejemplo la adicción de azúcares tiene un efecto estimulante así como la temperatura de incubación, un pH constante, la acidificación debido a la producción de lactato promueve mejor

rendimiento de EPS. Existen varios factores que influyen en la producción de exopolisacáridos: como el tipo de microorganismo y el medio de cultivo, principalmente el tipo y cantidad de fuente de carbono, la temperatura de incubación, fuente de nitrógeno, la relación C/N , el pH, el tiempo de incubación, algunas sales, minerales y vitaminas.

Por lo que el objetivo del presente trabajo de investigación consistió en evaluar el efecto de la temperatura y adición de fuentes de carbono sobre las propiedades fisicoquímicas del yogur elaborado con cepas de *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus bulgaricus* (LB) productoras de exopolisacáridos así como su relación con el aumento en la producción de los mismos con el fin de sustituir los aditivos comerciales utilizados en la producción de yogur para estabilizar y modificar sus características organolépticas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Exopolisacáridos (EPS)

Los polisacáridos son moléculas complejas formadas por repeticiones de azúcares simples (polímeros de monosacáridos), unidas mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a una estructura de cadenas alargadas, lineal o ramificada de masa molecular alta (contienen cadenas ramificadas  $\alpha$  y  $\beta$ ), que puede llegar a estar constituida por miles de unidades formándose al acumularse y excretarse en la capa más externa (peptidoglicano, lipopolisacáridos, ác. teicococos) que rodea a las bacterias (Aznar *et al.*, 2011).

Los EPS son producidos por microorganismos y excretado al medio extracelular, se usan para hacer referencia a “polisacáridos extracelulares”, “exopolisacáridos” o “exopolímeros”, generalmente empleados para describir todas las formas de polisacáridos bacterianos encontrados fuera de la pared celular (Tsvetelava *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2012). Los EPS se consideran prebióticos, es decir, “ingredientes de los alimentos no digeribles que producen efectos benéficos sobre el huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon” (Olivera *et al.*, 2011).

Los EPS pueden ser de dos tipos según su estructura: homopolímeros (HoPSs) que se componen de un tipo de monosacárido, y heteropolímeros (HePSs) que se componen de varios tipos de monosacáridos (pentosas y hexosas) o azúcares aniónicos (hexosas) (Badel *et al.*, 2011). También se clasifican en internos (capsulares) los cuales se encuentran adjuntos a la pared celular y los externos (extracelulares) donde son excretados en el entorno de forma mucosa (Nwodo *et al.*, 2012). Son descritos como “mucoides” dependiendo si son capsulares o excretados. Los producen principalmente los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* (Ciszek-Lenda *et al.*, 2011). Y dependiendo de su ubicación, es su clasificación y función (Nwodo *et al.*, 2012).

La leche es un medio excelente para la producción de EPS debido a que la fermentación de la leche mediante la producción de bacterias ácido lácticas (BAL) generalmente conduce a un cultivo con una textura viscosa, a pesar de que se están produciendo sólo pequeñas cantidades de EPS entre 60 a 400 mg/L (Aznar *et al.*, 2011). El rendimiento de producción de EPS de BAL es bajo, varía según la cepa que los sintetiza; en el caso de la fermentación del yogur los rendimientos son los siguientes: en ST es de 53- 337 mg/L y en LB es de 57 a 424 mg/L. En general el rendimiento de HePS oscila entre 24 y 600 mg/L y únicamente en algunos casos excepcionales de HoPS (tipo dextrano o fructano) el rendimiento de producción de cepas específicas puede llegar a los 10 g/L (Vuyst *et al.*, 1998).

Si se compara la producción de EPS de las cepas *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus bulgaricus* (LB) con el de otros polímeros de origen bacteriano empleados habitualmente como espesantes alimentarios, su producción es escasa ya que los polisacáridos comerciales tienen la ventaja de ser usados y añadidos a las porciones requeridas, incluso mayor de 20 g/L, ejemplo el gallano o el xantano producido por las bacterias gram negativas *Sphingomonas paucimobilis* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente. La diversidad de las rutas metabólicas de las BAL permitirá ampliar el espectro (polímeros con distintas composición química) de compuestos bioactivos prebióticos. Para optimizar la producción de los EPS, la síntesis de los polímeros es un proceso parcialmente asociado al crecimiento bacteriano, comienza en la fase exponencial, alcanzando el máximo durante la fase estacionaria, entre 72 y 120 h de incubación, según el microorganismo (Pailin *et al.*, 2001; Tsvetoslava *et al.*, 2014).

Los EPS de las BAL.

a)  $\alpha$ -glucanos: enlaces  $\alpha$  1,6 y  $\alpha$  1,3 residuos de glucosa.

- Dextranos

- Mutanos

b) Fructanos: enlaces  $\beta$  -2,6 moléculas de fructosa.

- Levano

c) Heteropolisacáridos: producción de ST y LB.

## 2.2 Producción de Exopolisacáridos microbianos

La producción de EPS requiere una fuente de carbono barata, fermentadores esterilizables, aire estéril y un medio de cultivo. El éxito del proceso de fermentación se basa, en gran medida, en el control del entorno. Así, la elección del medio de crecimiento y las condiciones ambientales determinan la calidad del producto y la máxima eficacia de conversión obtenible (gr de polímero x gr de fuente de carbono). Las propiedades reológicas de los cultivos con polímeros se deben al propio producto disuelto en la fase líquida continua. Esto puede conducir a marcadas diferencias en el efecto de la reología sobre la difusión del oxígeno y de los nutrientes en estos tipos de fermentación. A medida que aumenta la concentración del producto durante el crecimiento, la viscosidad del caldo aumenta (Mozzi *et al.*, 2001; Arshad *et al.*, 1993; Tsvetoslava *et al.*, 2014).

## 2.3 Factores determinantes en la producción de Exopolisacáridos

Numerosas condiciones ambientales y nutricionales pueden influir sobre la producción de EPS. La ausencia o deficiencia de nutrientes, así como el equilibrio entre los diferentes sustratos, como por ejemplo, la fuente de nitrógeno y carbono así como su concentración es necesaria para el crecimiento de los microorganismos y para la síntesis y producción de EPS. Estas condiciones,

varían de unas especies microbianas a otras e incluso entre cepas bacterianas de la misma especie. La mayoría de los microorganismos productores de EPS utilizan más frecuentemente como fuente de nitrógeno las sales de amonio o los aminoácidos y rara vez los nitratos; y como fuente de carbono utilizan glucosa y sacarosa siendo los azúcares que permiten una producción de EPS más rentable en la mayoría de los casos.

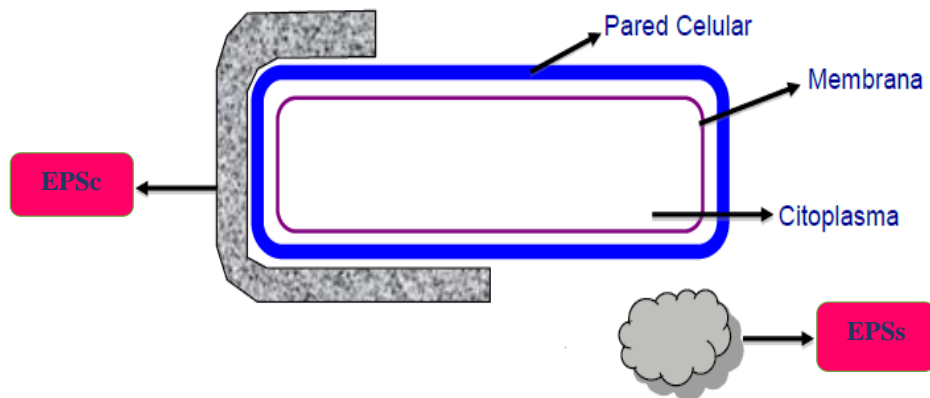
Otras condiciones que influyen son la temperatura de incubación, el pH, la relación carbono/nitrógeno o la limitación de ciertos nutrientes, siendo el extracto de levadura el más rentable; en general, la producción del polímero se favorece con una alta relación C/N; la concentración de trazas de sales (Mg, K, Ca) puede provocar un aumento en la producción; el tiempo de incubación principalmente en la fase exponencial o estacionaria tardía; la temperatura óptima de producción es de 30 a 45 °C; el pH afecta la síntesis de enzimas y al transporte de sustratos implicados en la producción de EPS, el óptimo se da a valores próximos a la neutralización (6.5 a 7.5), en algunos casos se requiere un pH de 5 y 6.1 o menor de 3.5 a 4.5, el cual debe estandarizarse y controlarse desde el inicio del proceso de fermentación; la disponibilidad de oxígeno, juega un papel fundamental en la síntesis de EPS ya que esta ocurre cuando el microorganismo crece aeróbicamente, aunque las BAL producen polímero tanto en presencia de bajas tensiones como en condiciones de anaerobiosis (Cerning., 1990; Novel., 1990; Tsvetoslava *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la leche como medio de crecimiento aumenta la producción de EPS (Cerning., 1990). Estudios realizados por García y Marshall (1999) reportaron que al agregar hidrolizado de caseína a leche descremada las cepas de *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* producen mayor cantidad de exopolímero (Mozzi *et al.*, 2001).



## 2.4 Clasificación de los Exopolisacáridos

Los EPS pueden encontrarse organizados de dos formas: extracelular y capsular. Los EPS capsulares se encuentran de forma compacta formando una capsula mediante uniones muy fuertes a otros componentes de la superficie celular y permanece unida a la misma, como constituyente de los ácidos teicoicos, estas cápsulas polisacáridas se detectan como zonas claras que rodean a la bacteria cuando ésta se visualiza al microscopio óptico mediante tinción negativa (tinta china). Los EPS extracelulares, no tienen una organización tan compacta y se mantienen unidos de forma débil a la superficie celular o son liberados al medio extracelular formando una matriz de EPS, la cual es de grosor variable según la solubilidad en el agua del polímero que la compone (Aznar *et al.*, 2011); en la Figura 1 se muestran las dos formas de EPS tanto capsulares como extracelulares.



**Figura 1.** Los exopolisacáridos se clasifican en capsulares y extracelulares de acuerdo a su estructura.

De acuerdo a su composición y su modo de síntesis se dividen en homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS). Los homopolisacáridos están compuestos por un único tipo de monosacárido y hay una única enzima

implicada en su síntesis, y se subdividen según el tipo de monosacáridos presente, en 4 grupos, clasificación basada en la naturaleza de su unidad monómerica:  $\alpha$ -D-glucanos,  $\beta$ -D-glucanos, fructanos y poligalactano. Los heteropolisacáridos están constituidos por unidades repetidas formadas por distintas combinaciones de monosacáridos, pueden llevar unidos otras moléculas, y en su síntesis y polimerización están implicados varias enzimas, clasificados por sus unidades repetidas: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurónico, y de forma menos abundante, fucosa y manosa (encargados de dar rigidez o flexibilidad). La diferencia entre estos dos grupos es su naturaleza química, sus enzimas sintetizadoras y sitio de síntesis (Nwodo *et al.*, 2012). Estas unidades repetidas se caracterizan por tener una estructura monosacáridica central de la que pueden salir cadenas laterales, presentándose múltiples combinaciones (en función del tipo de enlace  $\alpha$  o  $\beta$  y posición del carbono del enlace principal, así como de la posición que ocupa el carbono del enlace de la cadena lateral. Y son sintetizados por un sustrato específico como sacarosa. (Aznar *et al.*, 2011).

Los EPS de las BAL se pueden subdividir en tres grupos: (1)  $\alpha$ -glucanos, compuestos principalmente de enlaces  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,3 residuos de glucosa, llamados dextranos (*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* y *Leuc. mesenteroides subsp. dextranicum*) y mutanos (*Streptococcus mutans* and *Strep. sobrinus*); (2) fructanos, compuesto principalmente de enlaces  $\beta$ -2,6 moléculas de fructosa, tales como levano (*Strep. salivarius*); (3) heteropolisacáridos producidos por mesofilos (*Lactococcus lactis subsp. lactis* y *L. lactis subsp. Cremoris*) y termofilos (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lact. helveticus* y *Strep. thermophilus*) según Cerning en 1990 (Vuyst *et al.*, 1998).

Femming clasifico a los exopolisacáridos en 7 categorías: (1) estructural (incluyen neutros; facilitando retención de agua, y protección), (2) de absorción (de moléculas que participan en interacciones de la superficie celular), (3) de

superficie activa, (4) exopolisacáridos tensioactivos (dando variabilidad estructural química, propiedades de superficie, formación de biopelículas, poder antibacterial y antifúngica), (5) informativos, (6) redox-activos, (7) nutritivos (Nwodo *et al.*, 2012).

## 2.5 Papel que confiere los Exopolisacáridos a las bacterias

Los EPS presentan funciones y aplicaciones diferentes y únicas de su taxonomía, debido a que difieren de su composición química, peso molecular y estructura. Y su aplicación abarca diversos campos (Ciszek-Lenda., 2011). A los EPS se les atribuye diferentes roles fisiológicos como adhesivos para la interacción con otras superficies bacterianas o sustrato, unión de enzimas, unión entre célula-célula, agente protector contra el medio ambiente, protección de depredadores protozoos y patógenos, agentes antimicrobianos comunales, ocultar al microorganismo al estar envuelto con la capa de EPS, estructura de biopelículas (biopolímeros, biofilm), como moléculas de señalización, migración, agregación, absorción (retención de agua), cohesión, exportación e importación de componentes, fuentes de nutrientes (C, N, P), funcionan como reserva (contienen abundantes azúcares) y pueden convertirse en hidratos de carbono para el metabolismo (Nwodo *et al.*, 2012; Badel *et al.*, 2011).

También tienen la función de prolongar la supervivencia de las BAL durante la transición gastrointestinal del huésped (Nwodo., 2012) por la secreción de este, de fimbrias pili, sirven como biofilms, ayudan a la resistencia a antibióticos, a la protección contra desecación ya que hidrata, facilita la agregación celular, crioprotección, protege contra fagos debido a su alta viscosidad, previene expansión viral, funciona como potencial inmunomodulador (Badel *et al.*, 2011), ayuda a las bacterias a sobrevivir en condiciones perjudiciales protegiendo contra estrés ambiental, como es la baja o alta temperatura, el pH; ya que sobrevive al ácido gástrico y a las sales biliares (Ciszek-Lenda., 2011). La síntesis de EPS podría por lo tanto ser un rasgo que fue trasladado en la evolución de los

organismos proporcionando una ventaja selectiva de sobrevivencia (Stinguele *et al.*, 2014; Purwandari *et al.*, 2007).

Por otro lado se sabe que la masa molecular es uno de los factores determinantes de las propiedades funcionales de los EPS ya que tiene una influencia directa sobre su comportamiento reológico y especialmente sobre su viscosidad; de ahí que sea una de las propiedades más importantes para decidir la comercialización de un determinado polímero. Los valores de la masa molecular están comprendidos entre  $1 \times 10^3$  y  $5 \times 10^7$  Da. La masa molecular puede variar en función de la cepa bacteriana, las condiciones de cultivo y la purificación del polímero (Vuyst *et al.*, 1998; Tsvetoslava *et al.*, 2014).

## 2.6 Exopolisacáridos en la industria

Las aplicaciones de los EPS han sido extensos en áreas como la farmacología, nutracéuticos, alimentos funcionales, cosmeceúticos, herbicidas e insecticidas, entre otros, mientras que las perspectivas terapéuticas incluyen usos como anticoagulante, antitrombótico, inmunomodulación, contra el cáncer y como biofloculantes (Ismail *et al.*, 2010).

En la industria alimentaria, muchos polisacáridos se utilizan como espesantes o agentes de viscosidad, estabilizadores o emulsionantes, gelificantes y agentes fijadores de agua o texturizantes. La mayoría de estos aditivos son de origen vegetal, por ejemplo almidón, goma de algarroba, goma guar y alginato. La xantana es el único polisacárido microbiano aprobado, el cual es producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*, aunque es considerada una bacteria no GRAS. La mayoría de los carbohidratos de las plantas utilizados son químicamente modificados para mejorar sus propiedades reológicas por lo que su uso es fuertemente restringido, especialmente en la Unión Europea.

Muchos microorganismos “de calidad alimentaria” producen EPS, en particular las BAL, propionibacterias y bifidobacterias, sin embargo actualmente no

son explotados por los fabricantes de alimentos, aun sabiendo que su uso podría resultar en un producto final seguro y natural que puede tener un importante impacto en el desarrollo de nuevos productos, especialmente productos alimenticios con propiedades reológicas y estabilidad mejoradas (Vuyst *et al.*, 1998; Rauzón *et al.*, 2003).

El interés de la investigación y caracterización de los numerosos EPS descritos hasta la actualidad en las BAL se debe a su relación con la modificación, bien sea positiva o negativa, de las propiedades fisicoquímicas (principalmente viscosidad, textura y estructura) de los alimentos fermentados lácteos y no lácteos en los que se encuentran estas bacterias productoras de EPS (Aznar *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2010). Este interés se ha incrementado en la última década en la industria alimentaria, y varios EPS estructuras se han dilucidado (Stinguele *et al.*, 2014). Debido a que se les atribuyen posibles efectos beneficiosos para la salud, es por ello que se ha ampliado el ámbito de búsqueda de cepas productoras de EPS a otros ecosistemas, distintos de los alimentos, como el tracto gastrointestinal (TGI), los EPS están también presentes en la superficie de cepas probióticas, por lo que estos podrían estar relacionados con la capacidad de algunos probióticos para interactuar con nuestro organismo una vez que son ingeridos, a través de la producción de metabolitos benéficos para la salud, mejorando la adhesión al tracto gastrointestinal (Badel *et al.*, 2011; Nagai *et al.*, 2011).

Aunque, hasta el momento, las evidencias científicas de los EPS en relación directa con la salud son escasas y la mayoría de ellas han sido obtenidas mediante estudios *in vitro*, es un campo de estudio muy activo y con proyección futura (Aznar *et al.*, 2011).

## 2.7 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas como la masa molecular, polidispersidad, composición de monosacáridos, sus grupos funcionales presentes en la molécula polisacáridica y grado de sustitución son importantes para la estabilidad y apariencia de un producto. Las características reológicas de sus soluciones determinan muchas de las aplicaciones de estos biopolímeros, generalmente usados a nivel industrial gracias a su poder viscosante y gelificante. La mayoría de ellos se caracterizan por originar soluciones de elevada viscosidad, dado el tamaño de sus moléculas así como las interacciones existentes entre las mismas. Siendo la propiedad más importante a modificar: la viscosidad (propiedad de un material para resistir la deformación), en el contexto de lácteos fermentados, este atributo se puede describir como viscoso y fluido. Y la elasticidad es la propiedad de un material de recuperar su conformación inicial después de una deformación ocurrida. Estos atributos corresponden a un cuerpo firme y gomoso en productos lácteos fermentados, ambas propiedades son importantes para la calidad organoléptica del producto, por su aspecto atractivo y agradable (Raedke-Mitchell *et al.*, 1986; Patel *et al.*, 2010).

A su vez, la viscosidad de un exopolisacárido en solución se ve influenciada por una multitud de factores tales como la concentración de polímero, temperatura, pH así como la fuerza iónica. Existen numerosos polímeros con excelentes propiedades pseudoplásticas, como los EPS de bacterias ácido lácticas. La pseudoplasticidad determina que muchos biopolímeros bacterianos puedan ser empleados eficazmente en la industria alimentaria al contribuir a una textura y propiedades sensoriales del producto adecuadas, usando los EPS como viscosante de productos lácteos, ya que en reposo el producto ha de mantener una consistencia que impida que haya sedimentación de algunas partículas (sinéresis) y en el momento del consumo se requiere una disminución de la viscosidad para favorecer una textura cremosa (Tsvetoslava *et al.*, 2014).

Las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los yogures elaborados a partir de cultivos comerciales con características viscosas y no viscosas al ser comparadas, los resultados sugieren que puede que se deba a la cantidad de EPS o a el tipo de EPS que producen las cepas y, en consecuencia la interacción del polímero con las proteínas de la leche durante la fermentación. Los datos también sugieren que la interacción y cooperación de crecimiento que se produce en cultivos mixtos también influye en el rendimiento de la producción de EPS en la fermentación, así como la combinación de dos cepas viscosas no siempre conduce a un aumento de polisacárido total, aunque la viscosidad puede ser mejorada como lo muestran las mediciones de la textura y de la viscosidad correlacionados con la evaluación sensorial (Beal *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 1999).

## 2.8 Exopolisacáridos en productos lácteos fermentados

La posible aplicación tecnológica de los EPS en la elaboración de productos lácteos es debido a su capacidad para conferir efectos benéficos para la salud, se han seleccionado para su uso como “cultivos funcionales” para la elaboración de leches fermentadas como el yogur, kéfir, quesos, y ciertas leches fermentadas escandinavas. En la industria se utilizan como aditivos, al ofrecer una mejor calidad, alto nivel de pureza, ser considerado GRAS; debido a esto su fácil utilización del punto de vista jurídico, sin embargo es poco factible teniendo como desventaja su bajo rendimiento de producción de EPS por parte de la mayoría de las especies BAL (Badel *et al.*, 2011; Aznar *et al.*, 2011).

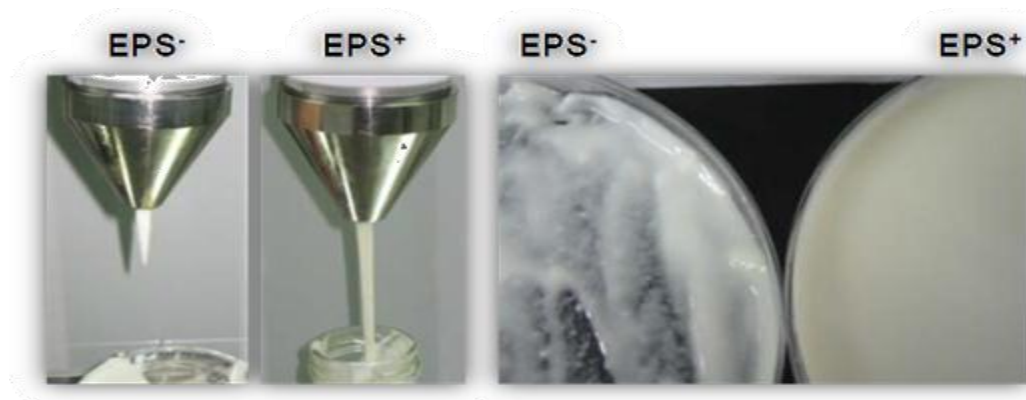
Los EPS sintetizados por las BAL juegan un papel importante en la fabricación de productos lácteos fermentados como el yogur, yogur para beber, quesos, natas fermentadas, postres a base de leche. Y existe una gran variabilidad en la producción de EPS por BAL en términos de cantidad, composición química, tamaño molecular, carga, presencia de cadenas laterales, y de la rigidez de las moléculas. Uno de los principales atributos sensoriales

importantes para la preferencia de los consumidores de productos lácteos es la firmeza y la cremosidad, siendo que los EPS pueden actuar tanto como texturizantes y estabilizadores, en primer lugar dando el aumento de la viscosidad de un producto final, y en segundo lugar por hidratación, en la unión e interacción con los otros constituyentes de la leche, tales como proteínas y micelas, para reforzar la rigidez de la red de caseína. Como consecuencia los EPS pueden disminuir la sinéresis y mejorar la estabilidad del producto. Una mejor comprensión de la relación estructura-función de EPS en una matriz de alimentos lácteos sigue siendo un reto para mejorar aún más las aplicaciones de EPS para satisfacer mejor la demanda del consumidor de productos atractivos, sabrosos e incluso más saludables (Duboc *et al.*, 2001; Stinguele *et al.*, 2014; Vuyst *et al.*, 1998).

Las cepas de BAL productoras de EPS son tipo HePS y se han aislado de numerosos productos lácteos fermentados naturales. Estas cepas productoras contienen el fenotipo “ropy” o pegajoso, el cual es detectado por la formación de un largo filamento, son las que confieren estas mejoras en las propiedades fisicoquímicas del yogur. Aunque no todos los EPS por BAL son capaces de incrementar la viscosidad o de mejorar la textura y estructura de los productos lácteos fermentados en los que se encuentran, esta capacidad depende de las características fisicoquímicas del EPS (composición química, estructura y tamaño) (Aznar *et al.*, 2011).

En la Figura 2 se muestra la diferencia de fluidos lácteos con y sin presencia de EPS, mostrando que los EPS aumentan la viscosidad, dan una fluidez continua, homogénea, cremosa, suave y una textura lisa.





**Figura 2.** Los alimentos con exopolisacáridos tienen una fluidez cremosa y continua así como una consistencia homogénea.

Por lo que algunos fabricantes de yogur están interesados en la producción *in situ* de HePS por ST y LB para evitar el uso de agentes estabilizantes y texturizantes (como almidones modificados, carragenina y gelatina), por su alta productividad de EPS (Parra *et al.*, 2012).

### 2.9 Las bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL están constituidas principalmente por los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Werning *et al.*, 2010). Son Gram positivas, son de forma bacilar o cocos, no formadoras de esporas, catalasa negativa, desprovistos de los citocromos y son anaerobios facultativos pudiendo crecer en condiciones de microaerobiosis y aerobiosis, ya que son aerotolerantes, son estrictamente fermentativas. Con respecto a su temperatura óptima de crecimiento son mesófilos (25-30 °C) y/o termófilas (40-44 °C), son capaces de crecer en el rango de pH entre 4,0 y 8,0 y de vivir en nichos muy diversos como el tracto gastrointestinal (TGI), en la superficie de las frutas y verduras, la leche y numerosos alimentos fermentados (Anal., 2007). Son microorganismos auxótrofos, por lo que requieren de un medio enriquecido para su crecimiento (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales y derivados de ácidos

nucleicos, vitamina B, bases púricas y pirimídicas) por ello crecen en leche y la mayoría son capaces de crecer en un amplio intervalo de temperatura, concentración osmótica y pH. Estos organismos viven en un hábitat rico y nutritivo en el que la ventaja selectiva para producir EPS es evidente.

Estructuralmente presentan una única capa de grosor variable de pared celular compuesta por peptidoglicano (un polímero de carbohidratos unidos mediante cadenas de péptidos) de la cual pueden sobresalir otras estructuras, por ejemplo, polisacáridos tipo ácidos teicoicos o proteínas tipo “pili”, en el exterior de dicha capa se encuentra constituida por polímeros de monosacáridos o polisacáridos; son los polisacáridos exocelulares o exopolisacáridos (Aznar., 2011). Las BAL son capaces de producir una amplia matriz de polisacáridos extracelulares que son secretadas en el medio extracelular, incrementando la viscosidad. Además de los homopolisacáridos producidos comúnmente conocidos del tipo de dextrano, las BAL producen un grupo muy heterogéneo de heteropolisacáridos extracelulares denominado exopolisacáridos (Stinguele *et al.*, 2014).

#### 2.10 Bacterias ácido lácticas del yogur

Las BAL del yogur son capaces de producir diferentes metabolitos como péptidos, exopolisacáridos y enzimas con diversas propiedades funcionales y tecnológicas, dichos compuestos contribuyen a las características sensoriales únicas de sabor, aroma y textura en los alimentos fermentados. Así como también dando seguridad microbiológica a causa del bajo pH, presencia de bacteriocinas (utilizadas como bioconservantes) y otros productos con actividad antimicrobiana, ejemplo peróxido de hidrógeno, resultante del metabolismo, lo que permite prolongar la vida útil del producto. Y así evitando el agregado de sustancias químicas para su conservación y teniendo un gran valor en la industria de alimentos (; Pailin *et al.*, 2001; Amatayakul *et al.*, 2006; Olivera *et al.*, 2011).

### 2.11 *Streptococcus thermophilus* (ST)

*Streptococcus thermophilus* (antiguamente *salivarius* subsp. *thermophilus*), perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, es una de las bacterias más importantes comercialmente y se aisló originalmente para la producción de yogur, es una BAL con forma de coco, los cuales forman cadenas, con un tamaño de 0.7-0.9  $\mu$  de diámetro; son gram positivos y anaerobias facultativas, no forman esporas y no se mueve por sí solas, es un organismo citocromo, oxidasa y catalasa negativo, inmóvil, con cápsula, su tasa de crecimiento óptimo se da en la parte inferior del espectro termófilo alrededor de 37 a 45 °C, con temperatura de crecimiento óptima es 42 °C, su atmosfera de crecimiento es con 5% CO<sub>2</sub>, consumo de O<sub>2</sub>, pH de 5.5, también se sabe descompone el piruvato en ácido láctico y acetaldehído, se considera un homofermentativo, capaz de generar L-ácido láctico, no suele ser una bacteria probiótica, y es considerada GRAS, ya que ha perdido o se han inactivado los genes característicos de las especies patógenas (Cerning *et al.*, 1988; Purwandari *et al.*, 2007; Delorme *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2011)

Se halla en productos fermentados lácticos, fundamentalmente en la producción del yogur, desarrollándose en simbiosis con LB, ya que degrada la urea en la leche y por consiguiente excreta CO<sub>2</sub> para de esta manera estimular el crecimiento del LB a través de la formación de ácido fórmico, que es la limitación de paso en la biosíntesis de purinas. Contiene los genes responsables de la biosíntesis del ácido p-aminobenzóico (PABA) y puede suministrar al LB con PABA el cual es necesario para la producción de folato, iniciando la fermentación láctica. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles (ác. fórmico), que produce crea las condiciones ideales para que se desarrolle LB, siendo este el que produce más ácido láctico (Radke *et al.*, 1986; Stingle *et al.*, 1996; Rawson *et al.*, 1997; Ben-Yahia *et al.*, 2012).

## 2.12 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue conocida hasta 1984 como *Lactobacillus bulgaricus*, perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, utilizada en alimentos fermentados, sobre todo en la elaboración del yogur. Es una BAL, de forma bacilar, cuyo tamaño varía entre 0,5 a 1,2  $\mu\text{m}$  por 1,0 a 10,0  $\mu\text{m}$ , son bacterias gram positivas, sin motilidad y no forma esporas, homofermentativa, acidifílica, sus condiciones de crecimiento son: pH alrededor de 5.4 a 4.6, temperatura de crecimiento 37 °C, atmosfera 5% CO<sub>2</sub>, fermentadoras de lactosa, estas consumen lactosa para producir ácido láctico como metabolito, pueden generar L-ácido láctico, D- ácido láctico o una mezcla de ambos isómeros (Radke *et al.*, 1986; Rawson *et al.*, 1997; Kimmel *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 2011)

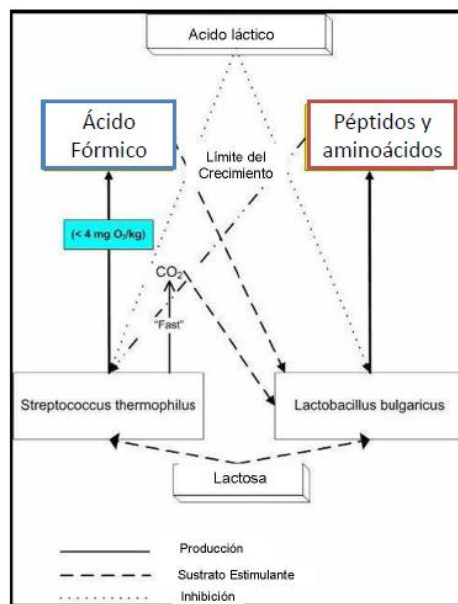
Se desarrolla en simbiosis con ST, en proto cooperación y esto a menudo resulta en tasas de acidificación más altas, un pH final más bajo, estimulación de compuestos aromáticos y mejora de la estabilidad del producto final, en comparación cuando se utilizan monocultivos. Aportándole nutrientes esenciales a ST como los aminoácidos valina, leucina, isoleucina, histidina, para su crecimiento, por poseer una pared extracelular obliga a la proteasa a suministrar péptidos y aminoácidos a ST (Rodríguez., 2009; Ávila *et al.*, 2010; Olivera *et al.*, 2011; Nagai *et al.*, 2011).

## 2.13 Yogur

El yogur es definido por la WHO y la FAO (1975) como una leche fermentada por dos BAL, por cultivos iniciadores específicos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* que tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento de cada uno; donde LB está encargado de darle la acidez favorable para coagulación de caseínas (las micelas de caseína se aglomeran formando una red tridimensional) y ST encargado de dar sabor y

aroma, usándose en una relación cualitativa 1:1, con un recuento bacteriano de al menos  $10^7$  UFC/mL, y un pH  $\leq 4,6$  (Condony *et al.*, 1998; Beal *et al.*, 1999; Amatayakul *et al.*, 2006).

Su actividad se describe como sinérgica donde LB produce metabolitos como péptidos y aminoácidos (valina, ác. glutámico, triptófano, metionina) necesarios para que su actividad proteolítica estimule el crecimiento de ST para que este libere ác. fórmico y el CO<sub>2</sub>, dando inicio a la fermentación láctica y se desarrolla muy intensamente a un pH de 5.5, a su vez estimulando el crecimiento de LB, desarrollan aparte una actividad lipolítica, por lo que se liberan ácidos grasos y producen además acetaldehído, para la mejora de olor, la textura y su disminución de sinéresis. En la Figura 3 se muestra un esquema del sinergismo de las bacterias ST y LB en la producción de ácido láctico a partir de lactosa (Dave *et al.*, 1997; Folkenberg *et al.*, 2006).



Adaptado de Angelov y col., 2009

**Figura 3.** Las bacterias productoras del yogur trabajan en sinergismo.

Por último cabe mencionar los parámetros más importantes del yogur como es el pH que oscila entre 4,6 a 4,8, los °Brix que van de 10 a 15% y el porcentaje de acidez entre 0.80 a 1.5% de ác. láctico. Y la producción de EPS en ambas bacterias, siendo que ST tiene una producción de EPS entre 30 y 890 mg/L y para LB de 60 a 150 mg/L (Walstra *et al.*, 1999; Badel *et al.*, 2011; Olivera *et al.*, 2011).

#### 2.14 Características nutricionales del Yogur

El yogur es popular debido a que hace a la leche más digestiva, ya que la caseína es parcialmente hidrolizada en el proceso de la fermentación. La lactosa (Glucosa  $\beta$  (1,4) galactosa), que es el azúcar de la leche es transformado hasta ácido láctico, favoreciendo el desarrollo de una microbiota intestinal benéfica y teniendo la función de regenerarla, así como destruir los componentes de la putrefacción presentes al interior del intestino humano. También es considerado fuente de vitaminas, en especial las vitaminas del complejo B. Y la presencia de ácido láctico aumenta la disponibilidad de micro elementos, por lo que es una fuente de minerales como el calcio, magnesio y fósforo importantes para el desarrollo de nuestros huesos, por cada 100 g de yogur obtenemos 180 mg de calcio, 17 mg de magnesio, 240 mg de potasio y 7140 mg de fósforo. Así como la característica de disminuir la proporción de colesterol que contiene la leche antes de la fermentación (Qin *et al.*, 2011).

Las BAL utilizadas para la fermentación de yogur son capaces de disminuir los síntomas de intolerancia a la lactosa, el colesterol sérico, prevenir la diarrea, aumentar las respuestas inmunes, contra actividades cancerígenas y aliviar las alergias. Atenuando la gravedad de colitis y siendo un agente protector en la terapia inflamatoria intestinal. Este efecto se debe a la diversidad de exopolisacáridos producidos y los péptidos bioactivos (Ciszek-Lenda., 2011; Nagai *et al.*, 2011).

Grandes cantidades de yogur son consumidas por algunos grupos de población-lactasa deficiente. La ingestión de 18 g de lactosa en el yogur resulta un

tercio de la excreción de hidrógeno tanto como una carga similar de la lactosa en leche o agua, lo que indica una mejor absorción de la lactosa en el yogur. La ingestión de yogur también resulta en un menor número de informes de diarrea o flatulencia (Kolars *et al.*, 1984).

### 2.15 Situación Actual

El interés actual de la investigación y caracterización de los numerosos EPS descritos hasta la actualidad en las BAL se debe a su relación con la modificación, bien sea positiva o negativa, de las propiedades fisicoquímicas (principalmente viscosidad, textura y estructura) de los alimentos fermentados en los que se encuentran estas bacterias productoras de EPS. Más recientemente, se ha suscitado un renovado interés en el estudio de estos biopolímeros puesto que se les atribuyen posibles efectos beneficiosos para la salud, es un campo de estudio muy activo y con proyección futura (Aznar *et al.*, 2011).

Los polisacáridos y exopolisacáridos utilizados en la industria alimentaria son de origen vegetal, de algas marinas y de microorganismos, siendo estos últimos una alternativa a los polímeros de plantas o algas usados tradicionalmente como agentes “viscozantes” en la industria. En la Tabla 1 se muestran los principales polisacáridos de origen vegetal utilizados en la industria alimentaria. Ello se ha intentado suplir mediante la modificación química de estas moléculas para mejorar su estructura y propiedades reológicas; sin embargo el uso de estos compuestos modificados se encuentra muy restringido, de ahí el creciente interés por los biopolímeros producidos por microorganismos. Sin embargo, sólo una pequeña parte de los EPS microbianos conocidos son explotados en el ámbito industrial.

Los tres polímeros microbianos más utilizados como aditivos alimentarios son Xantana (*Xanthomonas sbsp*) como viscosante, Gelano y Curdlano (*Agrobacterium sbsp* y *Rhizobium meliloti*) como gelificante. El xantano siendo el EPS mas estudiado desde el punto de vista reológico dadas sus propiedades y la

cantidad de producción, es por ello que constituye un modelo o referencia para el estudio de las propiedades reológicas de otros muchos polímeros (Tsvetelava *et al.*, 2014).

Aunque las aplicaciones de EPS bacterianos tiene un amplio campo, abarca a través de áreas como la industria (textil, lácteos, cosméticos, etc), la salud (medicina y productos farmacéuticos) y medio ambiente (remediación, floculación, etc) (Nwodo *et al.*, 2012). En la Tabla 2 se muestran los principales polisacáridos de origen microbiano utilizados en la industria alimentaria.

**Tabla 1.** Principales polisacáridos de origen vegetal, y producidos por algas usados en la industria alimentaria (Tsvetelava *et al.*, 2014).

<b>Origen</b>	<b>Polímero</b>	<b>Especie</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Extracto de semilla</b>	<b>Goma guar</b>	<b>Cyamopsis tetragonoloba</b>	<b>Espesante</b>
<b>Extracto de semilla</b>	<b>Goma arábica</b>	<b>Acacia sp.</b>	<b>Estabilizante</b>
<b>Exudados de plantas</b>	<b>Celulosa</b>		<b>Espesante</b>
<b>Extracto de subproductos vegetales</b>	<b>Pectinas</b>		<b>Estabilizante</b>
<b>Algas rojas</b>	<b>Agar</b>	<b>Rhodophyceae</b>	<b>Espesante</b>
<b>Algas rojas</b>	<b>Carragenina</b>	<b>Gigartina, Eucheuma, Chondrus e Iridaea.</b>	<b>Espesante</b>
<b>Extracto de vegetales, frutas, semillas</b>	<b>Almidón</b>		<b>Espesante</b>
<b>Extracto de subproductos animales</b>	<b>Gelatina</b>		<b>Espesante</b>



**Tabla 2.** Principales polisacáridos de origen microbiano usados en la industria alimentaria (Tsveteslava *et al.*, 2014).

<b>Polisacárido</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Curdano</b>	<b>Agrobacterium spp.</b>	<b>Espesante</b>
<b>Dextrano</b>	<b>Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus spp., Streptococcus spp.</b>	
<b>Levano</b>	<b>Bacillus polymixa, Erwinia herbicola, Streptococcus salivarius</b>	<b>Espesante</b>
<b>Xantano</b>	<b>Xanthomonas campestris</b>	<b>Espesante</b>
<b>Gelano</b>	<b>Sphingomonas paucimobilis</b>	<b>Espesante</b>

La limitación de las aplicaciones de algunos de estos polisacáridos bacterianos ha sido en gran parte debido a costo de producción en relación con su valor comercial ,sin embargo el enfoque empleado generalmente a abordar este problema incluye; usando sustratos baratos, mejorar el rendimiento del producto mediante la optimización condiciones de fermentación, o el desarrollo de cepas de mayor rendimiento a través de mutagénesis, y/o genética y manipulaciones metabólicas ,y optimización de procesos.

Por otro lado la demanda de leche y derivados viene incorporando un cambio en los hábitos de consumo hacia productos que contribuyan a mejorar las condiciones de salud de la población, no sólo con productos lácteos reducidos en grasa o azúcar, sino con la disponibilidad en la ingesta de componentes con vitaminas, probióticos y fibra, representan una opción funcional para mejorar la dieta de los consumidores, no sólo por lo que aporta la leche como alimento, sino lo que obtiene en la industrialización y transformación en quesos, yogures y en leches industrializadas.

Durante los últimos años, la Unión Europea ha sido la región productora de leche de bovino por excelencia a nivel mundial. Las exportaciones las generan principalmente tres regiones (Unión Europea, Oceanía y E.U.A). En el contexto nacional de la producción de leche, la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos, y depende de la disponibilidad de la leche nacional su crecimiento.

Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante el período 2003 a 2011 la producción nacional de leche bovina ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3% y con una nacional de 9,784 a 10,677 millones de litros al año . En México, la producción lechera se desarrolla en todo su territorio, pero durante el periodo 2005 a 2010 se concentró en cuatro estados, los que contribuyeron conjuntamente con el 45% de la producción nacional en este período (destacándose Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua).

Cabe señalar, que los estados de Coahuila y Durango ocupan el primer lugar en producción a nivel nacional. El estado de Veracruz se encuentra en el quinto lugar de producción nacional (SAGARPA y LICOMSA., 2010). En la Tabla 3 se muestran las empresas líderes con respecto a la producción de leche y yogur a nivel nacional.

**Tabla 3.** El mercado nacional de lácteos se compone de diversos segmentos de mercado entre los que destacan.

<b>Producto</b>	<b>Empresas líderes</b>	<b>Mercado (%)</b>
<b>Leches pasteurizadas y ultra pasteurizadas</b>	<b>Grupo Lala y Ganaderos Productores de Leche Pura (Alpura)</b>	<b>superior al 50%</b>
<b>Yogur</b>	<b>Nestlé de México, Lechera Guadalajara, Grupo Zaragoza</b>	<b>inferior al 50%</b>
<b>Yogur</b>	<b>Danone de México y Sigma Alimentos con su marca Yoplait</b>	<b>superior al 60%</b>
<b>Yogur</b>	<b>Lala, Alpura y Nestlé de México</b>	<b>15%</b>

Entre 2005 y 2011 con base al INEGI, destacan la producción de yogur, con una tasa de crecimiento promedio de 7.3, el mercado del yogur registra el mayor dinamismo, la producción de los bebibles y licuados registran mayores porcentajes de crecimiento, seguidos de los elaboración con frutas, en último lugar se ubica la producción de yogur natural (Secretaría de Economía., 2012).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, el procesamiento del yogur comercial consumido en México, se lleva a cabo con aditivos comerciales químicamente modificados, entre las más utilizadas tenemos la carragenina, goma xantana, pectina, agar-agar, almidones modificados los cuales son diferentes polímeros comerciales o la combinación de estos, utilizados para modificar sus propiedades organolépticas y reológicas; aumentando viscosidad, mejorando textura, creando así una mejora a la presentación del producto.

El consumidor actual, prefiere consumir productos naturales, saludables y seguros. Por lo que a nivel industrial, está aumentado el interés por reducir el número de estos aditivos sin menoscabo de las propiedades sensoriales y fisicoquímicas del yogur y sin que se vea disminuida la vida de anaquel del producto final. Esto se puede lograr con el empleo de exopolisacáridos de origen microbiano, de dos formas: ya sea por adición directa en el yogur de estos polisacáridos o bien mediante el empleo de cepas productoras de EPS.

Los EPS se utilizan fundamentalmente para reducir la sinéresis e incrementar la viscosidad mejorándose así la textura del yogur. Creando un producto estable y aceptable por el consumidor, sin la necesidad de añadir aditivos.

## 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura y la fuente de carbono sobre las propiedades fisicoquímicas del yogur elaborado con cepas productoras de exopolisacáridos.

### 4.2 Objetivos específicos

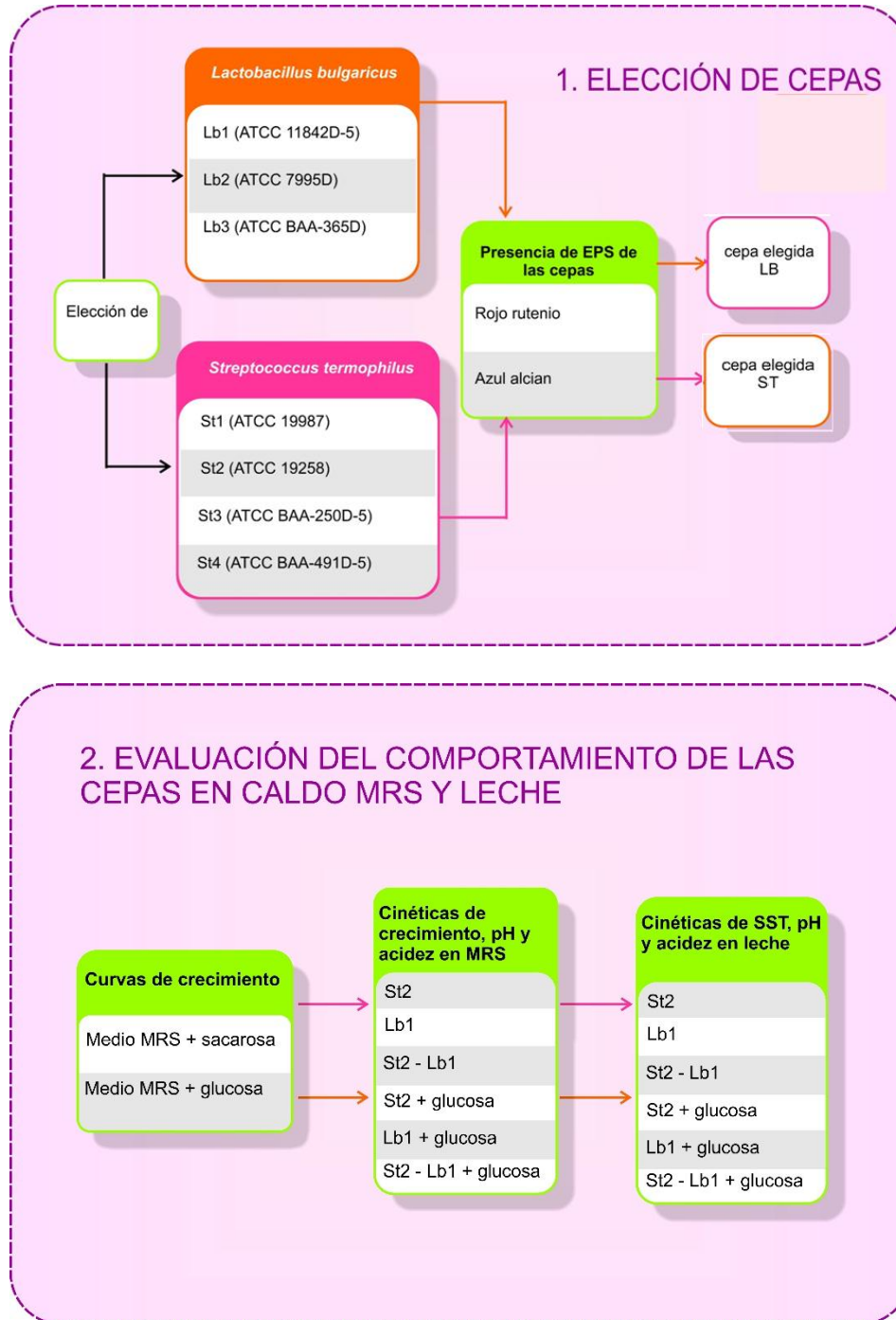
- Seleccionar una cepa de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y otra de *Lactobacillus delbruekii sbsp. bulgaricus* a partir de su producción de exopolisacáridos extracelulares.
- Obtener las cinéticas de crecimiento de las cepas elegidas a distintas temperaturas y fuentes de carbono en caldo MRS y leche descremada.
- Elaborar yogur descremado con la mezcla de cepas elegida a distintas temperaturas y utilizando diversas fuentes de carbono.
- Determinar las características fisicoquímicas de los yogures elaborados a las distintas condiciones.

### 4.3 Hipótesis

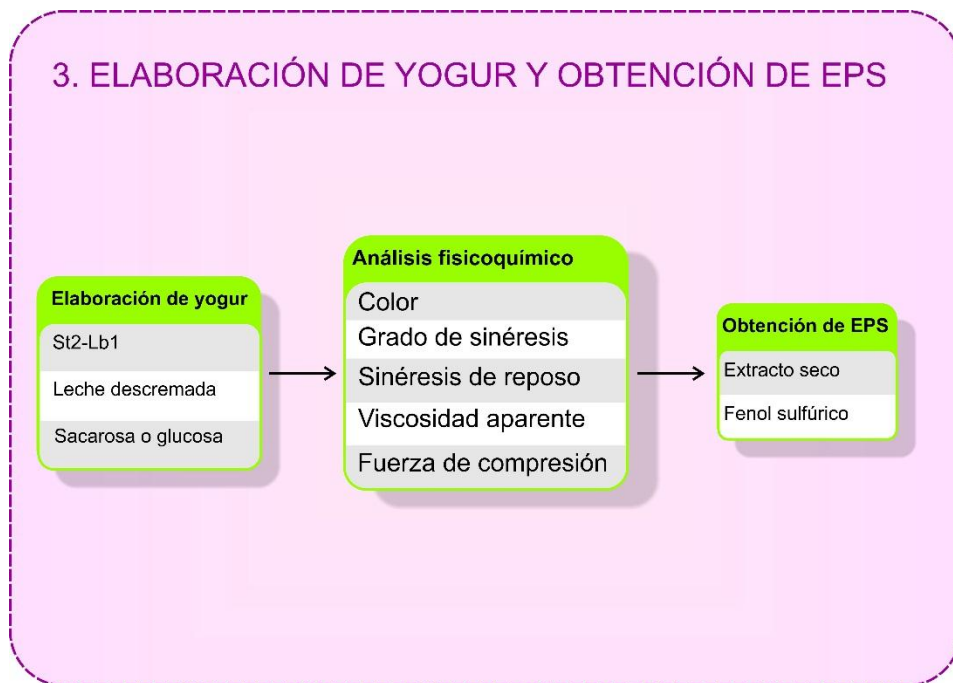
La temperatura de fermentación y la adición de fuentes de carbono influyen en la velocidad de fermentación y en las propiedades fisicoquímicas como textura, viscosidad y sinéresis en la elaboración de yogur con cepas productoras de EPS.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Diagrama Experimental



### 3. ELABORACIÓN DE YOGUR Y OBTENCIÓN DE EPS



#### 5.2 Aspectos Generales

El presente trabajo, se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Maestría en Ciencias Alimentarias del Instituto de Ciencias Básicas, perteneciente a la Universidad Veracruzana con dirección Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, C.P. 91190 en Xalapa, Veracruz, México en el periodo agosto de 2013 a agosto de 2015.

#### 5.3 Diseño Experimental

El diseño de experimentos se planteó en una etapa, teniendo tres tipos de tratamiento: 1) tipo de cepa 2) tipo de temperatura y, 3) tipo de azúcar, con tres niveles cada uno como se muestra en el Tabla 3.

**Tabla 4.** Tipos de factores y variables de respuesta utilizados en el diseño experimental.

<b>Factor</b>	
Tipo de cepa	- St2
	- Lb1
	- St2-Lb1
Tipo de Temperatura	- 37 °C
	- 42 °C
	- 45 °C
Tipo de azúcar	- Sin azúcar
	- Dextrosa
	- Sacarosa
<b>Variables de Respuesta</b>	
Propiedades Fisicoquímicas	
- Color	- Viscosidad aparente
- Grado de sinéresis	- Fuerza de compresión

#### 5.4 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó, utilizando un Análisis de Varianza de una vía. Los resultados se expresaron como valores medios y desviación estándar (SD) y fueron comparados con el método de Tukey con una  $p \leq 0.05$ , para ver el efecto de los diferentes factores en las propiedades fisicoquímicas (variables de respuesta del diseño experimental). Y se realizó un análisis de Regresión Múltiple para ver la interacción entre las variables dependientes e independientes. Los cálculos se realizaron en el paquete estadístico Minitab Graph 15 y las gráficas se realizaron en el paquete estadístico de Sigma Plot 10,0.



## 5.5 Materiales y Equipo

### 5.5.1. Materia Prima

✓ Cepas género *Lactobacillus* y subespecies:

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen) Weiss et al. (ATCC 11842D-5) (Lb1).
- *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC 7995D) (Lb2).
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen) Weiss et al. (ATCC BAA-365D) (Lb3).

✓ Cepas género *Streptococcus* y subespecies:

- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla- Jensen) Farrow and Collins (ATCC 19987) (ST1).
- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC 19258) (ST2).
- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC BAA-250D-5) (ST3).
- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC BAA-491D-5) (ST4).

- ✓ Leche en polvo semidescremada marca Alpura®.
- ✓ Sacarosa comercial marca Chedraui®.
- ✓ Dextrosa en polvo marca ZAVE tecnología Alimentaria®.
- ✓ Proteasa de *Bacillus licheniformis* marca SIGMA-ALDRICH™.

### 5.5.2 Reactivos

- ✓ Solución ácido acético al 3.0%.
- ✓ Azul alcian al 1%.

- ✓ Caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) marca BD Difco™.
- ✓ Agar MRS marca BD Difco™.
- ✓ Colorante Rojo Rutenio.
- ✓ Soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10.
- ✓ Hidróxido de Sodio al 0.1 N.
- ✓ Fenolftaleína al 1%.
- ✓ Solución Salina al 0.9%.
- ✓ Fenol al 0.5%.
- ✓ Agua Destilada.
- ✓ Ácido Sulfúrico concentrado.
- ✓ Etanol frío al 96%.
- ✓ Fenol al 85%.

### **5.5.3 Equipo**

- ✓ Autoclave, Vactech, India.
- ✓ Balanza Analítica, AND modelo GF-200, Japón.
- ✓ Baño Oakton, modelo 12501-00, Vernon Hills, E.U.A.
- ✓ Campana de siembra CBS Scientific, modelo P-030-202-55, E.U.A.
- ✓ Centrifuga refrigerada Hettich Universal 32R, modelo D-78532, Alemania.
- ✓ Colorímetro, ColorFlex, Hunter Lab, modelo CX115 45/0, E.U.A.
- ✓ Congelador Biomédico Sanyo, modelo MDF-U5411, Japón.
- ✓ Espectrofotómetro UV-Visible Jasco, modelo SSE-343 V530, Japón.
- ✓ Estufa de vacío SL ShellLab, modelo 1414, E.U.A.
- ✓ Incubadora con agitación MIDSCI, modelo Incu-Shaker Mini, E.U.A.
- ✓ Parrilla eléctrica de agitación con calentamiento, MIDSCI, SH-1500, E.U.A.
- ✓ Potenciómetro Hanna, modelo pH211, E.U.A.
- ✓ Refractómetro Abbe, E.U.A.
- ✓ Texturómetro Texture Analyzer TA-XT2, Alemania.
- ✓ Viscosímetro Analógico Brookfield modelo RVT, E.U.A.

- ✓ Vortex Genie 2, Scientific Industries modelo G560, E.U.A.
- ✓ Densímetro para Leche Quevenne 15-42, LUDWIG SCHNEIDER.

## 5.6 Métodos

### **5.6.1 Elección de las cepas ST y LB a partir de la producción de EPS**

Las cepas fueron elegidas por su capacidad de producción de EPS mediante una prueba microscópica y otra bioquímica.

#### **a) Prueba de azul alcian**

Se comprobó la presencia de EPS realizando la prueba de tinción con azul alcian que se observó por microscopía óptica tiñendo mucosustancias ácidas. Para la tinción se utilizó una solución de ácido acético al 3.0% y azul alcian al 1% (Vicente García *et al.*, 2004). Para la tinción de azul Alcian se utilizó 1g de azul Alcian 8 GX en 100 mL de ácido acético al 3.0%, este colorante forma complejos con gliconjugados aniónicos como proteoglicanos y glicosaminoglicanos tiñéndolos de forma permanente. El azul Alcian resulta un colorante más sensible para la detección de polianiones y decidió utilizarse como una tinción confirmatoria de la presencia de ácidos mucopolisacáridos en la pared celular (EPS) (Mowry., 1963).

#### **b) Prueba de Rojo Rutenio**

El método de agar Rojo Rutenio se realizó utilizando una siembra con asa bacteriológica en agar MRS suplementado con rojo Rutenio (RR) a una concentración de 0.08 g/L. Las placas se incubarán a 37 °C durante 24 h. Las colonias productoras de EPS se detectaron en función de su apariencia gelatinosa tocándolas con un asa estéril y su resistencia a la penetración del colorante rojo Rutenio, con la aparición de colonias blancas (en cepas con EPS) o rojas (cepas sin EPS) alrededor de la placa de agar MRS-RR (Hongpattarakere *et al.*, 2012).

### **5.6.2 Curvas de crecimiento (estrés) de las cepas ST y LB en caldo MRS modificado con distintas fuentes Y concentraciones de carbono (sacarosa y dextrosa)**

Para la curva de crecimiento primero se preparó el inóculo un día antes de la siguiente manera; en 25 mL de caldo MRS comercial estéril se puso 1 mL de inóculo del microorganismo a utilizar, crecido en caldo MRS y se dejó incubando a 37 °C por 24 h. Al cumplirse las 24 h, se prepararon 250 mL de caldo MRS estéril a partir de cada uno de sus ingredientes excepto la dextrosa, de estos 20 mL se pasaron a 24 tubos de ensayo 4.5 mL en cada uno, en los que se vertieron la fuente de carbono en estudio a las siguientes concentraciones 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% y 0.5%, haciendo de cada uno su duplicado y un blanco.

Además de las mencionadas concentraciones, se prepararon 3 tubos donde la dextrosa fue suplida por la fuente de carbono a la concentración que se utiliza la dextrosa en el medio MRS comercial, se prepararon 3 tubos con caldo MRS comercial incluyendo la dextrosa y se prepararon otros 3 tubos del medio MRS sin dextrosa o fuente de carbono, es decir un medio sin fuente directa de azúcares. Se preparó el medio MRS el mismo día que se inoculó con el microorganismo homogeneizando perfectamente antes de distribuirse en los tubos de ensayo, se esterilizaron en autoclave a 120 °C por 15 min, cuando estaban a temperatura ambiente se inocularon en los tubos 1 y su duplicado 0.5 mL del microorganismo crecido en los 25 mL de MRS, y se incubaron a 37 °C por 24 h.

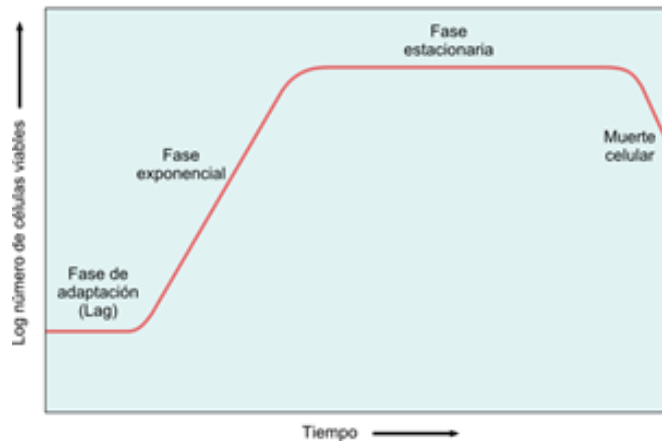
Los blancos por su parte se guardaron en refrigeración 24 h, por último se leyó cada tubo a una absorbancia de 560 nm (UV/VIS Espectrophotometer modelo VE 5100 UV serie AE009004, Japón) de longitud de onda, utilizando cada uno de los blancos de acuerdo a la concentración que se leyó. Por último se realizaron las curvas graficando absorbancia contra concentración. Nota: el medio y el azúcar se prepararon por separado para evitar Rx. De Maillard.

## **Cinéticas de las cepas (ST2, LB1, ST2-LB1 y con 10% dextrosa) en caldo MRS a diferentes temperaturas (37, 42 y 45 °C)**

### **5.6.3 Cinéticas de crecimiento en absorbancia de las cepas en caldo MRS**

La cinética de crecimiento se determinó por medición de absorbancia (turbidimetría) contra tiempo y por la cantidad de unidad de colonias formadoras (UCF) por ml en placa Petri, considerando las células viables capaces de formar colonias en caldo MRS, con lo cual es posible predecir su dinámica dentro del tiempo estudiado. El crecimiento se evaluó haciendo mediciones sucesivas en tiempos determinados de las cepas, en cada momento se evaluó cual es la población en ese instante. Se obtuvo un inóculo inicial de cada cepa, se añadió 5% del inóculo del cultivo a matraces que contienen 250 mL de caldo MRS.

El cultivo se realizó en agitación constante a 150 rpm y a la temperatura requerida, se evaluó alícuotas de 4,5 mL de cada cultivo, a tiempo cero y cada 120 min midiéndose absorbancia a 560 nm. Por último se moduló las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente, para obtener las UFC en los valores de Absorbancia obtenidos y conocer las fases de crecimiento del microorganismo aplicando el modelo de Gompertz (Rodriguez-Gonzalez., 2009). Como resultado de este proceso, se obtuvieron los parámetros necesarios para calcular la fase de adaptación, tasa de crecimiento exponencial y el tiempo de generación (Tg) o comienzo de la fase estacionaria (Valbuena-Barreiro *et al.*, 2005). En la Figura 4 se observa la curva de crecimiento y sus fases de un microorganismo.



**Figura 4.** Curva de crecimiento y sus fases

#### **5.6.4 Cinéticas de pH y acidez titulable de las cepas en caldo MRS**

Las cinéticas de pH se realizaron desde tiempo cero y cada 120 min en un intervalo de tiempo. Esta prueba es realizada por potenciometría, para lo cual se calibró el potenciómetro (Hanna modelo H18424 serie 502409 (2003) Portugal) con soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10, se vaciaron 15 mL de yogur previamente agitado (homogenizado) en vasos de Erlenmeyer de 50 mL para realizar la medición, entre cada muestra de yogur se enjuagó el electrodo con agua destilada y secó (Díaz., 2004).

Las cinéticas de acidez se realizaron desde tiempo cero y cada 120 min en un intervalo de tiempo y se realizó la técnica de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010. La determinación de acidez en productos lácteos fermentados y acidificados, se realizó por el método de titulación alcalimétrica con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) al 1% como indicador. Posteriormente se midió 9 ml de yogur y se les adicionó 0.5 ml de indicador de fenolftaleína (3 gotas) y se tituló con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 s. Los cálculos de porcentaje de acidez se

cuantificaron empleando la Ecuación 1, y el resultado se expresó como porcentaje de ácido láctico (Rajiv *et al.*, 1997).

$$\% \text{ Ácidoz} = \frac{(V \times N \times 90)}{M} \quad \text{Ecuación 1 . Porcentaje de Acidez}$$

Donde V= mL de NaOH 0.1 N gastados en la titulación, N= normalidad de la solución de NaOH, M= volumen o peso de la muestra, 90= es el peso molecular del ácido que predomina en el producto.

### **Cinéticas de las cepas (ST2, LB1, ST2-LB1 y con 10% dextrosa) en leche semidescremada Alpura a diferentes temperaturas (37, 42 y 45 °C)**

#### **5.6.5 Cinéticas de pH y acidez titulable de las cepas en leche**

Las cinéticas de pH se realizaron como se indica anteriormente, desde tiempo cero y cada 120 min en un intervalo de tiempo hasta que la muestra alcanzo un pH de 4,5 a 4,8 y se llevó a cabo mediante la técnica de Díaz en el 2004.

Las cinéticas de acidez se realizaron como se indica anteriormente, desde tiempo cero y cada 120 min en un intervalo de tiempo hasta que la muestra alcanzo un pH de 4,5 a 4,8 y se realizó la técnica de acuerdo a la técnica de Rajiv y colaboradores en 1997.

#### **5.6.6 Cinéticas de Solidos solubles totales (Determinación de °Brix) de las cepas en leche**

Las cinéticas de SST se realizaron desde tiempo cero y cada 120 min en un intervalo de tiempo hasta que la muestra alcanzo un pH de 4,5 a 4,8. En este proceso se utilizó el refractómetro portátil (Atago modelo NAR-1T- (1990) serie 900402 Japón).

Los sólidos totales nos ayudan a determinar la concentración de sacarosa por 100 mL de una solución, los sólidos solubles totales se determinaron con el índice de refracción, el cual se expresó con los °Brix a una temperatura standard de 20 °C donde no varían, para poder medirlos primero se calculó la temperatura de las placas, después se vertió una gota de la solución sobre una de las placas, cerrarlas y apuntar hacia la luz, allí se observó una escala donde hay una transición de claro a oscuro, en el lugar exacto de esa transición es donde se encuentra la escala de °Brix (Vargas., 2009).

### **5.6.7 Elaboración de Yogur**

El proceso de elaboración fue para la obtención de un yogur tradicional o natural, elaborado exclusivamente a base de leche descremada y fermentos lácticos, el cual se llevó en condiciones asépticas, y utensilios previamente esterilizados en autoclave a 115 °C durante 15 min.

Se inició sembrando las cepas por separado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (mayor productoras de EPS) en tubos de ensaye a los que se le añadió leche descremada comercial (leche homogenizada y pasteurizada), se incubaron a 37 °C durante 12 h; posteriormente se esterilizaron frascos, en los cuales se vertió leche descremada comercial e inculo de las cepas 3:1 y se incubaron a 42 °C hasta alcanzar un pH de 4,6 a 4,8. (Llevándose a cabo la fermentación) posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4 °C (Condony *et al.*, 1988, Qin., 2011).

### **Análisis fisicoquímico**

#### **5.6.8 Color**

Se realizó un análisis de colorimetría de acuerdo a la AOAC, 2005 con la ayuda de un colorímetro (Color Flex Hunter Lab modelo 45/0 serie CX1115 (1998) USA). Se colocaron 10 g de muestra en un recipiente de cuarzo transparente que permite el paso de la luz, obteniendo los parámetros daylight, colorimeter (L, a\*,



b\*) color y tristimulus value (X, Y, Z), posteriormente se calculó Hue y croma con las Ecuaciones 2 y 3 (Peña *et al.*, 2006).

$$Hue = \tan^{-1} \left( \frac{b}{a} \right)$$

**Ecuación 2.** Ángulo de matiz

$$croma = \sqrt{a^2 + b^2}$$

**Ecuación 3.** Determinación de cromaticidad

### 5.6.9 Densidad

Se realizó de acuerdo a la técnica de la AOAC, 1990 determinada con densímetro, a la temperatura de 15 °C, se vertió la muestra de leche en un recipiente cilíndrico, evitando la formación de espuma e incorporación de aire. Se introdujo el densímetro de modo que ocupe la parte central del líquido, se esperó a que alcance el nivel correspondiente y luego se leyó la densidad cuidando que el visual enrase con la superficie libre de la leche y leer la temperatura.

El instrumento está calibrado a 15 °C, por lo tanto, el número leído representa la densidad de la leche. A temperaturas diferentes, debe recurrirse a tablas especiales de corrección. Cuando la discrepancia con respecto a los 15 °C no es mucha (no más de  $\pm 5$  °C), se puede obtener la corrección sumando o restando 0,0002 a la densidad hallada, o bien 0,2 a los grados leídos en el densímetro por cada grado de temperatura respectivamente superior o inferior a 15 °C.

### 5.6.10 Grado de Sinéresis

La sinéresis es expresada como el volumen de suero desprendido durante el almacenamiento la cual se determinó por el método descrito por Mora (1994) y utilizado por Carvajal 1999. Se midió en muestras de yogur de 50 g pesadas en una balanza analítica (AND modelo GF-200 serie 14620742 (2003) Japón) y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min a 10 °C, en una

centrifuga (Hettich modelo 1610-01 serie 0003614-01-00 (2003) Alemania). El volumen de suero desprendido se filtró, pesó y determinó trasvasándolo a una probeta de 25 mL, se cuantificó el grado de sinéresis con la Ecuación 4 (Díaz., 2004).

$$\text{Sinéresis} = \frac{\text{volumen separado}}{\text{volumen total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4. Grado de sinéresis}$$

#### **5.6.11 Sinéresis de reposo**

Se sembraron las cepas (ST2, LB1, ST2-LB1) e incubaron a 37 °C las horas requeridas, se utilizaron 50 mL de muestra y usando como control leche. Se colocaron las muestras en probetas de 50 mL en refrigeración durante 24 h, 7, 12 y 21 días y se midió la sinéresis a estos intervalos de tiempo. Se midieron los mL de suero formado y eso se reportó (Díaz., 2004).

#### **5.6.12 Viscosidad aparente**

Se determinó la viscosidad del yogur, según las características del gel obtenidas (Pineda., 2004). Con el viscosímetro (TA Instruments modelo AR 2000 ex rheometer UK) usando 400 mL de muestra utilizando el husillo no. 3 y a una velocidad de 5 rpm. La temperatura de las muestras será de 4 °C, que corresponde con la temperatura de almacenamiento. Los resultados se expresaron en centipoise (cps) (Rojas-Castro., 2007).

#### **5.6.13 Análisis de fuerza de compresión**

Se realizó un análisis por compresión con un texturómetro (TAXT-2i, Stable Microsystems, Alemania) midiendo la fuerza necesaria y el trabajo para comprimir el yogur. En el cual se realizó la medida de fuerza por compresión de 20 mL de muestra usando un cuerpo cilíndrico (anillo de 35 mm) de 4.5 cm de diámetro, y descendiendo a una velocidad de 1.0 mm/s llegando a una distancia de

profundidad del 50% (10 mL), la muestra debe estar en frío (5-10 °C). El resultado nos da una idea de la firmeza y consistencia de la muestra (Díaz., 2004; Benitez., 2011; Guía Yogur., 2007).

## **Cuantificación de los EPS**

### **5.6.14 Obtención de EPS totales**

Las cepas BAL se prepararon en matraz Erlenmeyer de 250 mL inoculando la cepa con asa bacteriológica en 50 mL de caldo MRS al 5% dejándolas crecer a 24, 48 y 72 h a 37 °C y se leyó absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro (UV/VIS Spectrophotometer modelo VE 5100 UV serie AE009004, Japón). En paralelo se realizó un blanco (caldo MRS sin inocular). Una vez incubados los matraces el tiempo elegido, se añadió proteasa de *Bacillus licheniformis* (SIGMA-ALDRICH, 2012) a una concentración de 1 µg/mL, se agitó ligeramente y se dejó durante 60 min en la incubadora a 37 °C.

Posteriormente se colocó a baño de agua 75 °C por 15 min para inactivar la enzima. Una vez inactivada se enfrió rápidamente en baño de hielo, los cultivos se pasaron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 11,500 rpm por 15 min. El sobrenadante (EPSs) se transfirió a tubos falcon y se precipitaron con etanol al 96% a una dilución 1:3; se dejaron la noche en refrigeración a 4 °C para disolver los EPS. Al tapón (con los restos celulares) de los tubos eppendorf se les realizó dos lavados con sol. Salina estéril al 0.9% y se le añadió 800 µl de fenol 0.5% para eliminar los restos celulares, se agitaron y dejaron toda la noche a temperatura ambiente para disolver los EPS.

Al día siguiente se centrifugaron los tubos falcon con los EPS a 2,500 rpm por 20 min y se disolvió el pellet obtenido en un volumen conocido de agua destilada, y se estimaron los EPS por fenol sulfúrico. Posteriormente se vació el sobrenadante de los eppendorf en frasco falcon y se añadió el doble de volumen de etanol frío al 96% y se guardaron en refrigeración a 4 °C al día siguiente se

realizó la prueba de fenol sulfúrico. Al sobrenadante se le añadió etanol al 96% (1:3) y se dejó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se trataron como en el caso de los EPSs (Ismail., 2010).

#### **5.6.15 Prueba de fenol sulfúrico**

Mediante el uso de la reacción de fenol-ácido sulfúrico, se realizó el método para la microdeterminación colorimétrica cuantitativa de hidratos de carbono y sus derivados metílicos al reducirse los oligosacáridos y polisacáridos. Este método es simple, rápido y sensible, dando resultados reproducibles. El reactivo es barato y una solución dada sólo requiere una curva estándar para cada azúcar. La coloración amarilla-naranja producida es permanente y no es necesario prestar especial atención al control de las condiciones (Dubois *et al.*, 1956).

La fracción de la luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada es proporcional al grosor de la capa absorbente y a la concentración de la especie absorbente. El coeficiente de absorbancia depende del compuesto y longitud a la cual es determinado, se determinó con una recta patrón, la cual se hizo con diluciones de concentraciones conocidas de la sustancia a valorar. Se midió absorbancia y se graficó. La concentración de la disolución problema se interpola directamente de la gráfica, debe estar dentro del rango de alguna concentración de la recta patrón (Ismail., 2010).

Se realizó la curva de calibración/patrón por triplicado con diferentes concentraciones de sol. Patrón de Glucosa (1mg/1mL), fenol 85%, ácido sulfúrico concentrado y agua destilada. En el procedimiento se enumeraron 6 tubos (perfectamente secos) vertiéndoles primero agua y fenol se agitaron y dejaron reposar 15 min, se añadió el ác. Sulfúrico y se agitó dejando reposar 30 min para leer absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro (UV/VIS Spectrophotometer modelo VE 5100 UV serie AE009004, Japón).

Los reactivos se vertieron en el siguiente orden (ver Tabla 4 donde se observa la preparación para la curva de calibración con glucosa y en la Tabla 5 observamos la preparación para la curva de calibración con sacarosa).

**Tabla 5.** Curva de calibración con glucosa para la prueba de fenol sulfúrico.

<b>Tubo</b>	<b>Agua Destilada (µl)</b>	<b>Glucosa (mg/mL)</b>	<b>Glucosa (mg)</b>	<b>Fenol 85% (µl)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>
0	1000	0	0	50	5
1	800	200	20	50	5
2	600	400	40	50	5
3	400	600	60	50	5
4	200	800	80	50	5
5	0	1000	100	50	5

Se usó sacarosa refinada comercial a las siguientes concentraciones para validar la robustez de la curva.

**Tabla 6.** Curva de calibración con sacarosa para la prueba de fenol sulfúrico.

<b>Tubo</b>	<b>Agua (µl)</b>	<b>Sacarosa (mg/mL)</b>	<b>Sacarosa (mg)</b>	<b>Fenol (µl)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>
0	1000	0	0	50	5
1	800	200	20	50	5
2	600	400	40	50	5
3	400	600	60	50	5
4	200	800	80	50	5
5	0	1000	100	50	5

En este método los *LB* y *ST* se crecen a 37 °C por 24 h en caldo MRS.

Posteriormente se realizó la prueba en la muestra problema, creando un blanco (1 mL de agua destilada, 50 µl de fenol, 5 mL de ác. sulfúrico. Del pellet (capsulares EPS) se pasó 1 mL en un tubo de ensayo, agregando 50 µl de fenol se agitó y se añadieron 5 mL de ác. Sulfúrico (esperamos que se enfrié), se leyó absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro, esto se realizó por duplicado (Yang., 2010; Wang., 2008).

Los resultados se informaron como miligramos de carbohidratos por litro. Los valores de la muestra para EPS se calcularon restando la cantidad de interferencia del fondo en medio no inoculado (aproximadamente 44 mg de hidrato de carbono / litro) a partir de la cantidad en caldo fermentado (Yang., 2010).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Elección de las cepas de ST y LB productoras de EPS

En la primera fase se llevó a cabo la elección de las cepas con base a su producción de EPS, en la cual se analizaron cuatro cepas del género *Streptococcus* y tres cepas del género *Lactobacillus*, con la prueba bioquímica de rojo rutenio (Anexo A) y la prueba microscópica colorimétrica azul alcian (Anexo B). Mostrándose positivas a la prueba de rojo rutenio las cepas ST1, ST2, LB1, LB3 en comparación con ST3, LB2 las cuales fueron negativas, y para la prueba de azul alcian todas las cepas fueron positivas, presentando mayor tinción las cepas ST2 y LB1, siguiendo en orden consecutivo ST1, LB2, LB3, ST3, ST4 (ver Tabla 7).

**Tabla 7.** Producción de EPS en cuatro cepas de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* y tres cepas de *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* de acuerdo con las pruebas de rojo rutenio y azul alcian.

Cepas	Rojo Rutenio	Azul Alcian
ST1	POS (+)	(+++)
ST2	POS (+)	(++++)
ST3	NEG (-)	(+)
ST4	NEG (-)	(+)
LB1	POS (+)	(++++)
LB2	NEG (-)	(++)
LB3	POS (+)	(++)

Los valores (+) representan positivo y (-) representa negativo para la prueba de rojo rutenio. Las (+) representan la cantidad de bacterias teñidas en la prueba azul alcian.

Los EPS pueden ser visualizados por microscopía óptica cuando se usan tinciones con colorantes apropiados, como tinta china o colorantes catiónicos tales como rojo rutenio y azul alcian, esto debido a la naturaleza aniónica de muchos EPS (Paulo *et al.*, 2012). En la técnica de azul alcian se tiñe de color azul permanente el grupo carboxilo de los mucopolisacáridos ácidos, por lo que nos ayuda a determinar los EPS capsulares principalmente (Vicente-García *et al.*, 2004) y en la técnica de rojo rutenio se detectan las colonias productoras de EPS en función de su apariencia gelatinosa, y su resistencia a la penetración del colorante RR, apareciendo colonias rosas o blancas (Hongpattarakere *et al.*, 2012).

Bouzar y col. (1996) analizaron una cepa de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNRZ 1187) y dos variantes coloniales estables, las cuales fueron seleccionadas con rojo rutenio, observando que las colonias mostraron una buena relación entre los rendimientos de exopolisacáridos y la viscosidad. Resultando que las colonias de color rosa produjeron la cantidad más alta de EPS (130 mg/L) y las colonias blancas la cantidad más baja de EPS (70 mg/L).

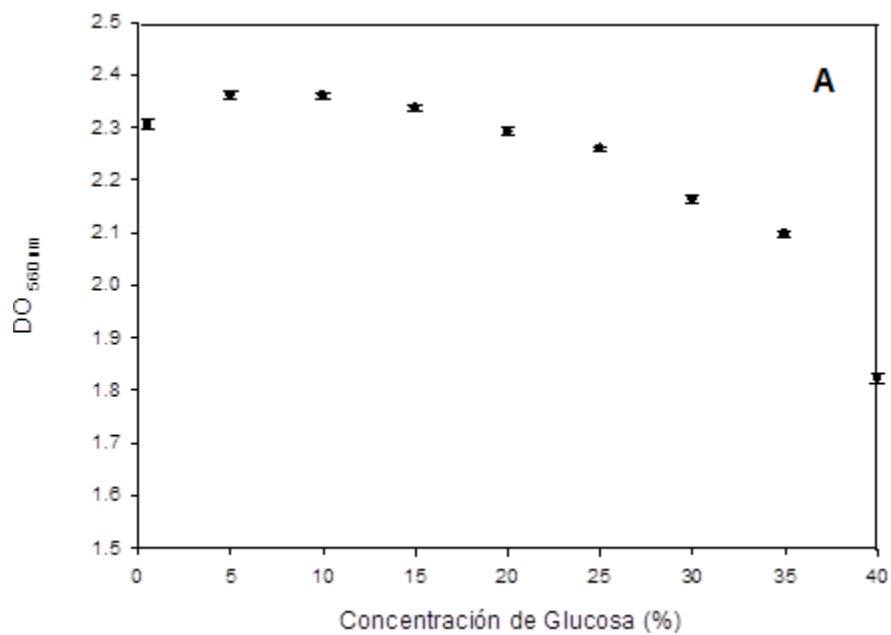
De acuerdo a nuestros resultados y lo descrito anteriormente se eligieron las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) para los siguientes estudios, debido a su producción de EPS, ya que fueron positivas a la prueba rojo rutenio al presentar colonias de color rosa, y al mostrar mayor tinción de mucopolisacáridos ácidos en la prueba con azul alcian.

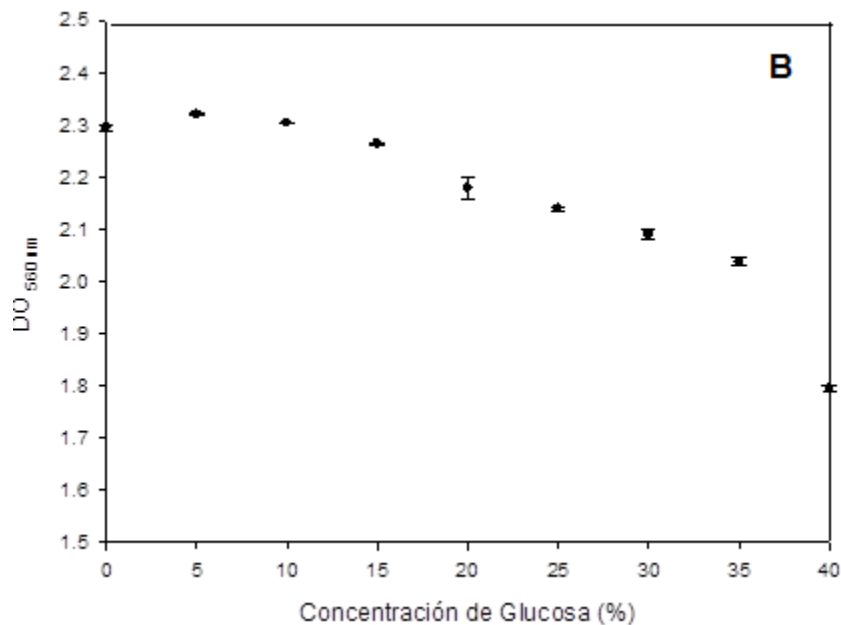
6.2 Efecto de la concentración de glucosa y sacarosa en el crecimiento de las cepas seleccionadas.

Posteriormente se realizaron curvas a diferentes concentraciones (0.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 y 40.0%) de glucosa de las cepas elegidas: *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) (ver Figura 5 A) y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) (ver Figura 5



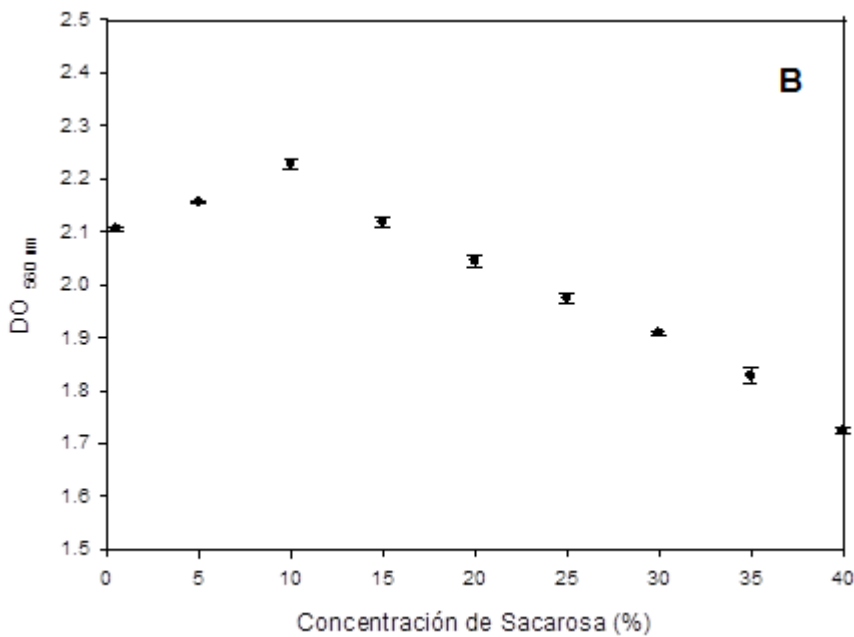
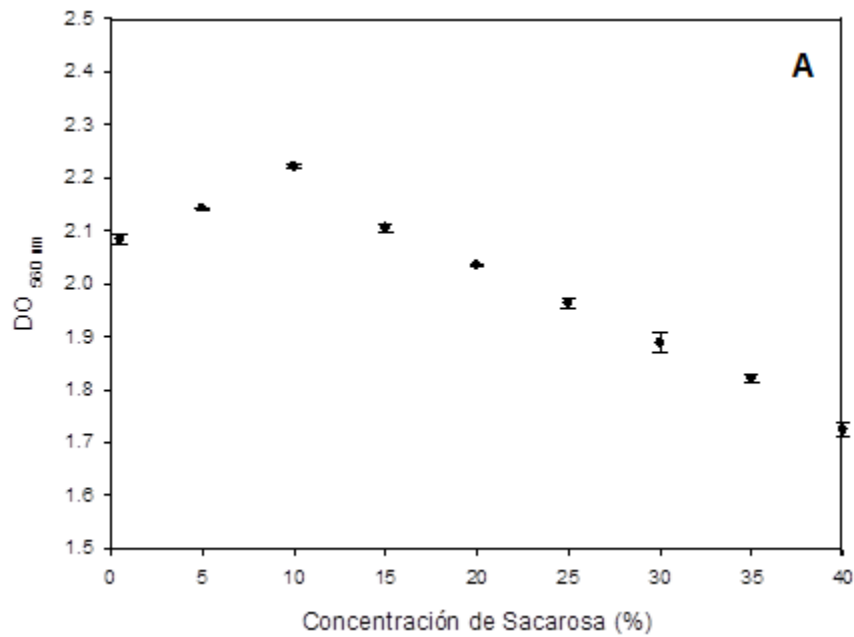
B), donde ambas cepas presentaron mayor crecimiento bacteriano a las concentraciones de 5.0, 10.0 y 15.0% p/v de glucosa. Obteniendo una Ab de 2.361 a la concentración de 5.0% de glucosa para la cepa ST2, una Ab de 2.359 a la concentración de 10.0% de glucosa y una Ab de 2.336 a la concentración de 15.0% de glucosa y la cepa LB1 obtuvo una Ab de 2.321 a la concentración de 5.0% de glucosa, una Ab de 2.317 a la concentración de 10.0% de glucosa y una Ab de 2.264 a la concentración de 15.0% de glucosa.





**Figura 5.** Curva de crecimiento en caldo MRS ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) a diferentes concentraciones de glucosa de las cepas A) *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y B) *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1). Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

De igual manera se realizaron cinéticas de crecimiento en sacarosa de las cepas elegidas a las mismas concentraciones y condiciones que las curvas de crecimiento en glucosa mencionadas anteriormente, en la Figura 6 A se observa la curva de la cepa *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y en la Figura 6 B se observa la curva de la cepa *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1), las cuales presentaron mayor crecimiento bacteriano a las concentraciones de 5.0, 10.0 y 15.0% p/v de sacarosa. Donde la cepa ST2 obtuvo una Ab de 2.156 a la concentración de 5.0% de sacarosa, una Ab de 2.227 a la concentración de 10.0% de sacarosa y una Ab de 2.118 a la concentración de 15.0% de sacarosa y la cepa LB1 obtuvo una Ab de 2.141 a la concentración de 5.0% de sacarosa, una Ab de 2.220 a la concentración de 10.0% de sacarosa y una Ab de 2.105 a la concentración de 15.0% de sacarosa.



**Figura 6.** Curva de crecimiento en caldo MRS (DO<sub>560 nm</sub>) a diferentes concentraciones de sacarosa de las cepas a) *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y b) *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1). Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

Resultados similares fueron reportados por Tsvetoslava y col. (2014) quienes encontraron que la mayor producción de EPS de bacterias halófilas tiene lugar a un porcentaje del 5.0% p/v de glucosa, y conforme la concentración de azúcar se incremento en el medio, dicha producción se va haciendo progresivamente menor, incluso con las mayores cantidades de glucosa, el crecimiento bacteriano se veía totalmente inhibido. Esto se debe a que en condiciones de exceso de glucosa en el medio, se induce la activación de una ruta metabólica alternativa consistente en la oxidación directa de la glucosa a gluconato (Lessie *et al.*, 1984), bajo estas condiciones es de esperar una disminución de los niveles y con ello menor disponibilidad de glucosa-6-fosfato, la cual es necesaria para la producción de EPS (Lettisse *et al.*, 2001).

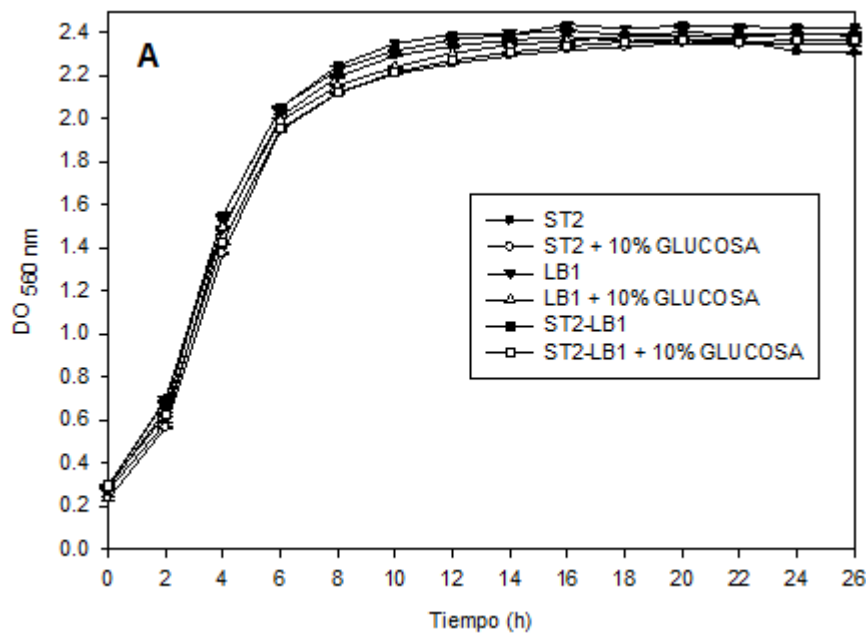
Se conoce existe una relación entre el crecimiento bacteriano y la producción de EPS (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Por lo que se obtuvo la concentración de azúcar requerida en la cual las cepas presentan un mayor crecimiento bacteriano en caldo MRS, mostrando que con ambos azúcares tanto glucosa como sacarosa, a la concentración de 10.0% p/v las cepas obtuvieron un mayor crecimiento bacteriano, por lo cual esta concentración fue la elegida para los futuros análisis.

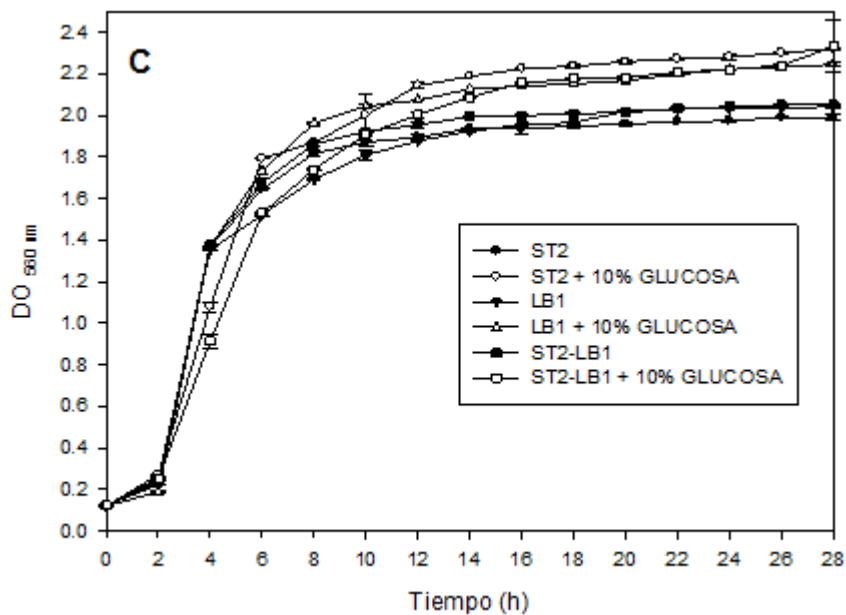
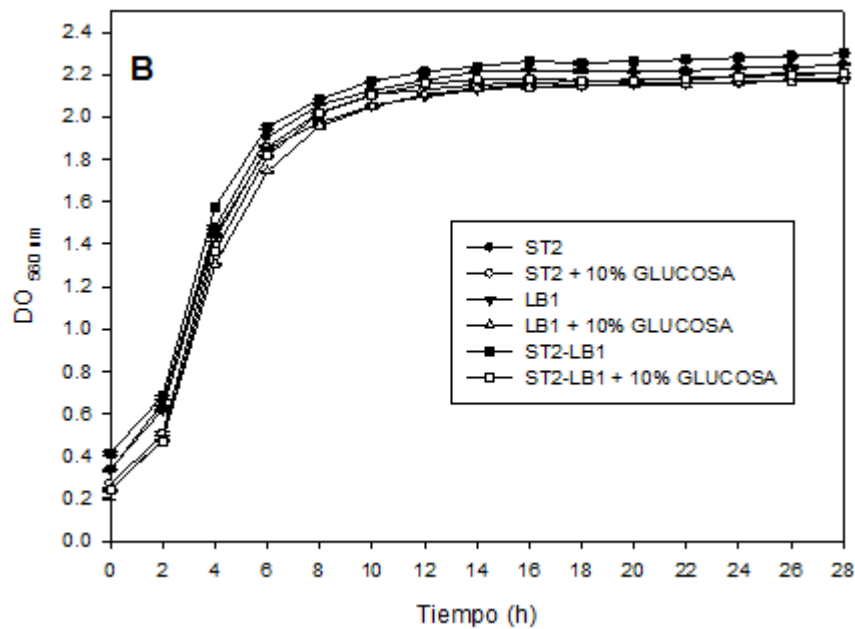
### 6.3 Cinéticas de las cepas ST2 y LB1 en caldo MRS

#### **6.3.1 Cinéticas de crecimiento en caldo MRS a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2 y LB1 individuales y en conjunto sin azúcar y con el 10% de glucosa**

Posteriormente se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 7 A), 42 °C (ver Figura 7 B) y 45 °C (ver Figura 7 C) en caldo MRS sin azúcar y con el 10% de glucosa. Donde se pueden identificar las etapas de crecimiento: fase lag, fase exponencial y fase

estacionaria. Se observa que el inicio de la fase estacionaria a las temperaturas de 37 y 42 °C se localiza aproximadamente entre las 8 y 10 h de incubación, con una  $DO_{560\text{ nm}}$  promedio de 2.2 a la temperatura de 37 °C en caldo MRS y con una  $DO_{560\text{ nm}}$  promedio de 2.1 a la temperatura de 42 °C en caldo MRS, siendo un poco más lento el crecimiento a la temperatura de 45 °C, localizándose aproximadamente entre las 8 y 10 h de incubación, con una  $DO_{560\text{ nm}}$  promedio de 2.0 en caldo MRS. Por lo que a este tiempo se prepararon los inóculos de cada tratamiento experimental.





**Figura 7.** Cinéticas de crecimiento en caldo MRS ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto sin azúcar y con el 10% de glucosa. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

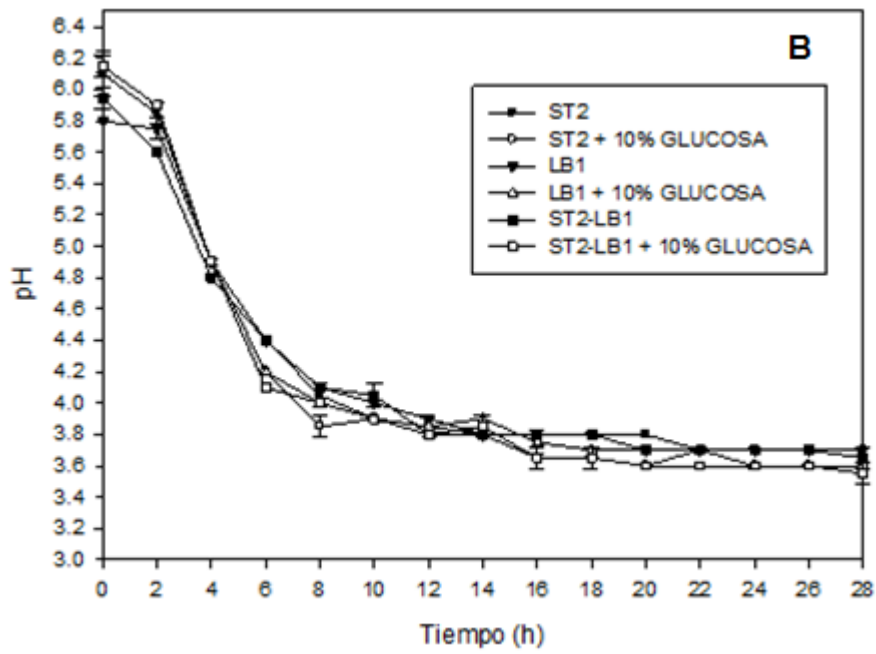
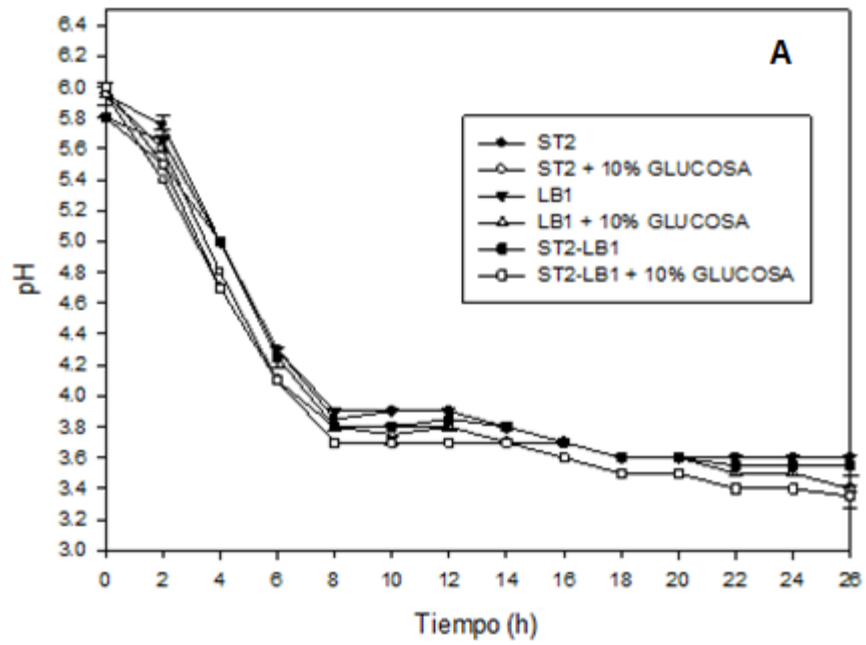
Cabe destacar que la mayor parte del consumo del sustrato está dirigido al crecimiento celular consecuentemente con la producción de ácido láctico; sin embargo, tanto *Streptococcus thermophilus* como *Lactobacillus delbrueckii*, utilizan la fuente de carbono para sintetizar otro tipo de productos como exopolisacáridos durante la fase estacionaria y de crecimiento, los cuales contribuyen a la viscosidad, textura y propiedades reológicas deseables de la leche fermentada. Existe la generación de otro tipo de productos por parte de *Streptococcus thermophilus*, tales como ácido fórmico y dióxido de carbono, los cuales estimulan posteriormente a *Lactobacillus delbrueckii*, al que se le asocia de igual forma la producción de acetaldehído. Otro producto asociado al crecimiento celular es la generación de enzimas, específicamente las BAL del yogurt producen altas cantidades b-galactosidasas las cuales hidrolizan la lactosa (Delorme *et al.*, 2008; Agudelo *et al.*, 2010).

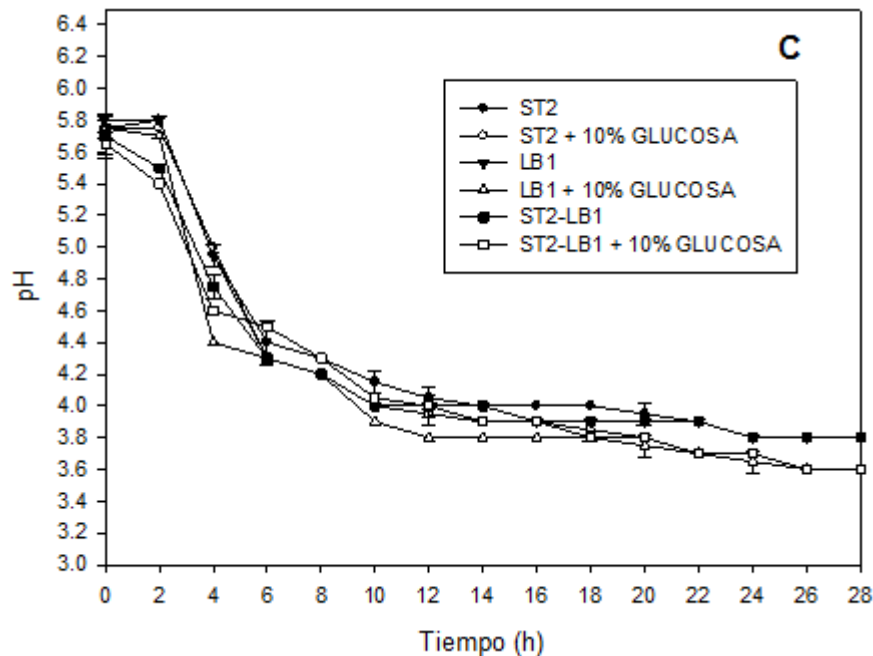
Se reportaron resultados similares por Saarela y Morgensen (2000) los cuales indican que el incremento de los nutrientes en las BAL se obtiene a las temperaturas entre 36 a 38 °C. Siendo la temperatura a la cual se logra la máxima producción de biopolímero para todas las cepas es también la temperatura a la cual se presenta su óptimo crecimiento, de ahí que se obtenga el máximo de producción de biomasa celular. Aunque muchos autores concuerdan, en que la producción máxima de EPS se produce a temperaturas por debajo del óptimo para el crecimiento celular, ya que a temperaturas subóptimas la división celular está menos favorecida, y se encuentran mayor número de precursores activados, disponibles para la síntesis de EPS. Esto ocurre con muchas BAL o diversos microorganismos aislados del Antártico (Kimmel *et al.*, 1998; Mancuso-Nichols *et al.*, 2005).

### **6.3.2 Cinéticas de pH y acidez en caldo MRS a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 individuales y en conjunto, sin azúcar y con el 10% de glucosa**

A la par que se realizaron las cinéticas de crecimiento se analizaron pH y acidez. A continuación se observan las cinéticas de pH a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 8 A), 42 °C (ver Figura 8 B) y 45 °C (ver Figura 8 C) en caldo MRS sin azúcar y con el 10% de glucosa, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto incubadas en caldo MRS. Los valores de pH que alcanzan las cepas a las 24 h a la temperatura de 37 °C son las siguientes: 3.6 para ST2, 3.5 para ST2 con 10% de glucosa, 3.6 para LB1, 3.5 para LB1 con 10% de glucosa, 3.5 para ST2-LB1 y 3.4 para ST2-LB1 con 10% de glucosa. Los valores de pH a la temperatura de 42 °C son los siguientes: 3.7 para ST2, 3.6 para ST2 con 10% de glucosa, 3.7 para LB1, 3.6 para LB1 con 10% de glucosa, 3.7 para ST2-LB1 y 3.6 para ST2-LB1 con 10% de glucosa. Y los valores de pH a la temperatura de 45 °C son los siguientes: 3.8 para ST2, 3.7 para ST2 con 10% de glucosa, 3.8 para LB1, 3.6 para LB1 con 10% de glucosa, 3.8 para ST2-LB1 y 3.7 para ST2-LB1 con 10% de glucosa.







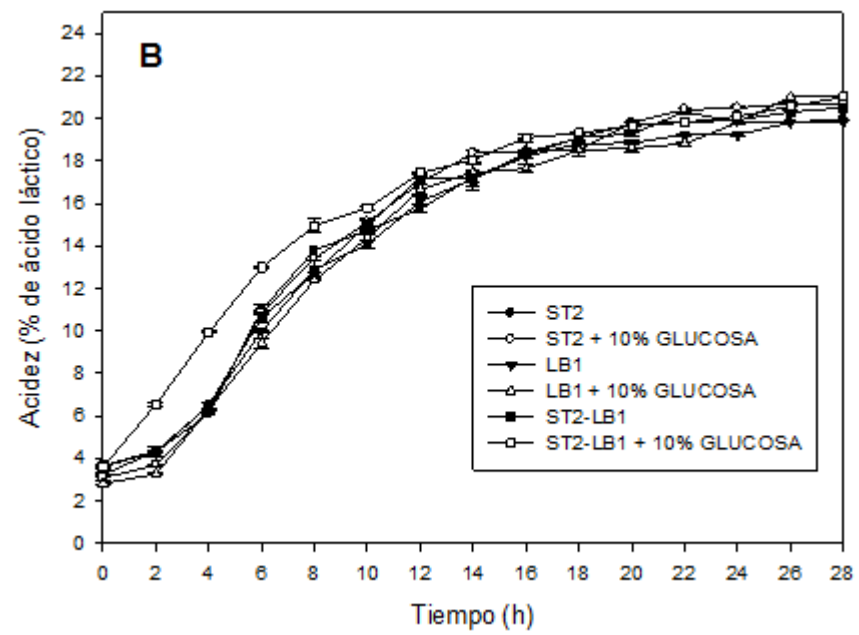
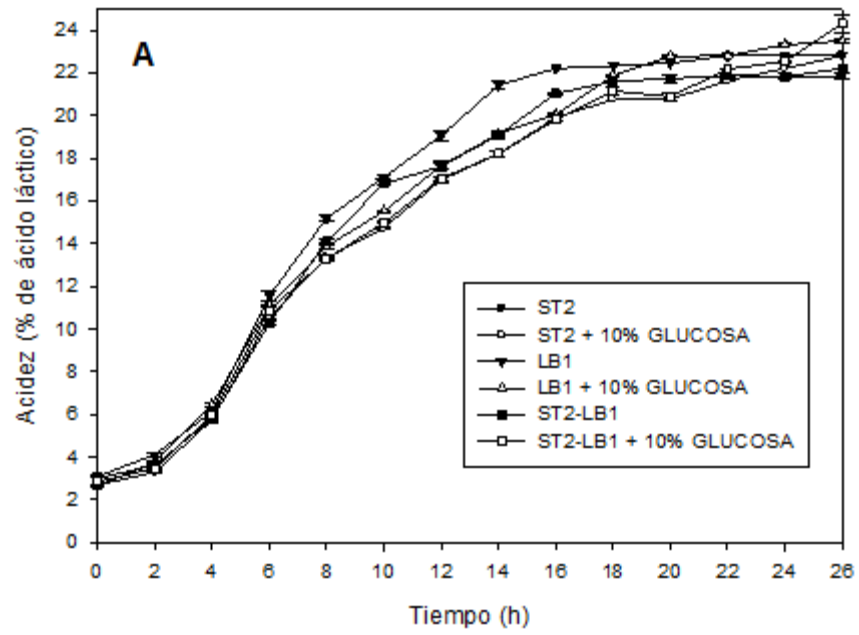
**Figura 8.** Cinéticas de pH a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C en caldo MRS de las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto y con el 10% de glucosa. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

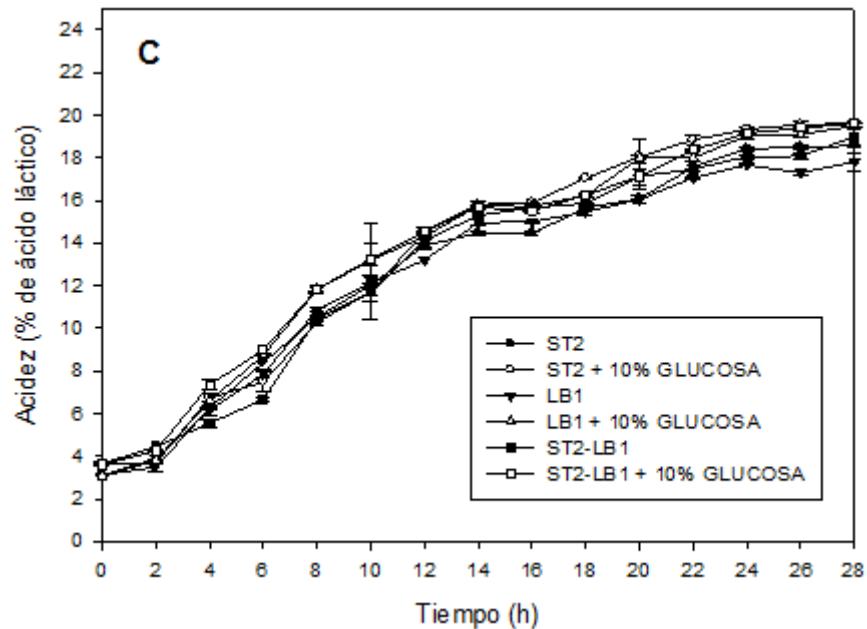
La fermentación homoláctica de las BAL es el producto de la producción de ácido láctico por la ruta de Embden-Meyerhof de la lactosa, la cual es utilizada como fuente de energía. Las condiciones óptimas de acidificación se dan a los porcentajes de azúcar más bajos y concentraciones de inóculo más altas en *Lactobacillus* (Rodríguez., 2009). El tiempo de fermentación varía constantemente ya que el metabolismo de las BAL depende de las características fisicoquímicas de la leche. El objetivo de la fermentación es la formación de un gel, sabor ácido, consistencia, formación de productos del aroma (Cabeza., 2006).

Se observa que los valores de pH son influenciados por la agregación de azúcar, ya que las bacterias en medio con 10% de glucosa presentan un pH menor de las que no lo contienen. Y de las tres temperaturas, la de 37 °C fue la

que mostró un pH menor (3.4) a las 24 h, seguido del pH a las temperatura de 42 °C (3.6), y por último el pH a 45 °C (3.7).

Con respecto a las cinéticas de acidez las cuales se realizaron a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 9 A), 42 °C (ver Figura 9 B) y 45 °C (ver Figura 9 C) de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, sin azúcar y con el 10% de glucosa incubadas en caldo MRS. Los resultados de acidez a las 24 horas de las cepas a la temperatura de 37 °C son los siguientes: 21.8% de ácido láctico para ST2, 22.2% de ácido láctico para ST2 con 10% de glucosa, 22.8% de ácido láctico para LB1, 23.3% de ácido láctico para LB1 con 10% de glucosa, 22.2% de ácido láctico para ST2-LB1 y 23.5% de ácido láctico para ST2-LB1 con 10% de glucosa. Los resultados de las cinéticas de acidez a la temperatura de 42 °C de las cepas son los siguientes: 19.8% de ácido láctico para ST2, 20.5% de ácido láctico para ST2 con 10% de glucosa, 19.2% de ácido láctico para LB1, 19.8% de ácido láctico para LB1 con 10% de glucosa, 19.9% de ácido láctico para ST2-LB1 y 20.1% de ácido láctico para ST2-LB1 con 10% de glucosa. Y los resultados de las cinéticas de acidez a la temperatura de 45 °C de las cepas son los siguientes: 18.4% de ácido láctico para ST2, 19.3% de ácido láctico para ST2 con 10% de glucosa, 17.6% de ácido láctico para LB1, 19.0% de ácido láctico para LB1 con 10% de glucosa, 18.1% de ácido láctico para ST2-LB1 y 19.2% de ácido láctico para ST2-LB1 con 10% de glucosa.





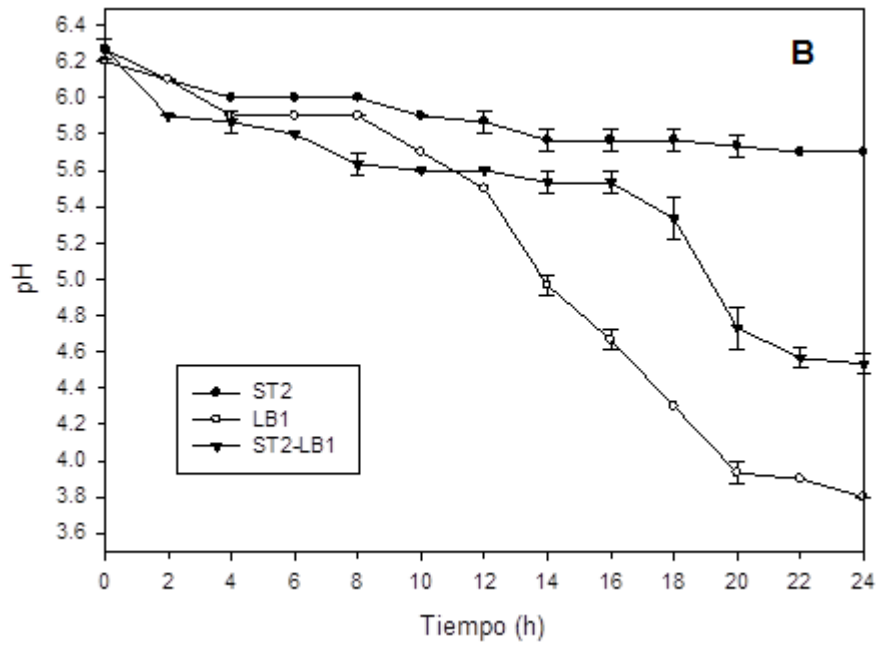
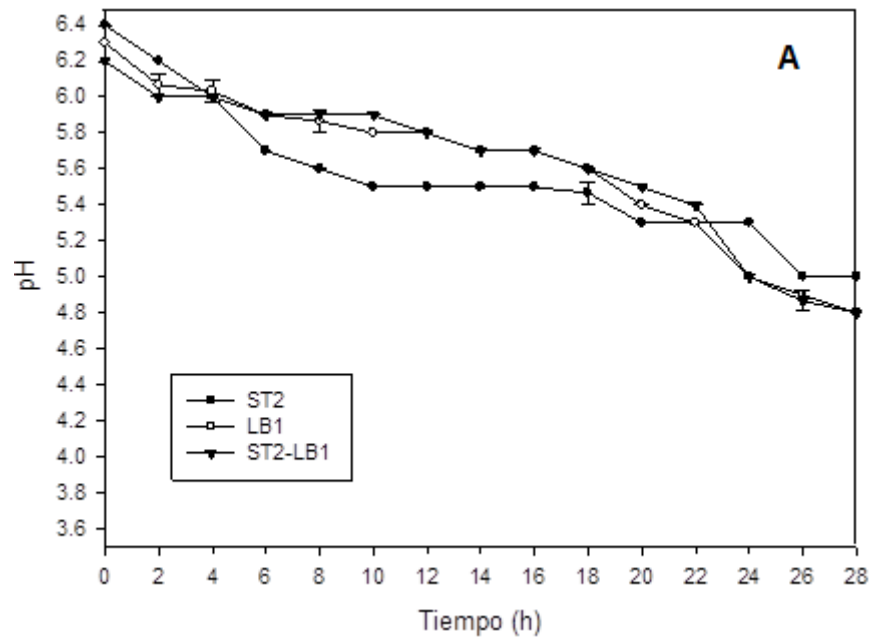
**Figura 9.** Cinéticas de acidez de 24 horas en caldo MRS a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C de las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, sin azúcar y con el 10% de glucosa. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

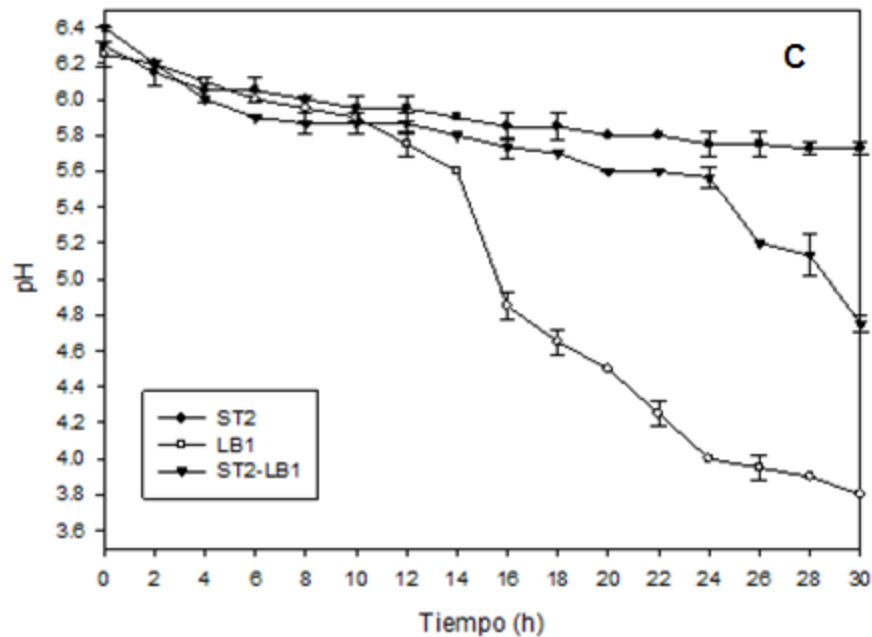
A su vez la acidez mostró un comportamiento o tendencia similar al pH, se observa que los valores de acidez son influenciados por la agregación de azúcar, ya que las bacterias en medio con 10% de glucosa presentan una mayor producción de ácido láctico de las que no lo contienen. La temperatura de 45 °C fue la que presentó un valor mayor siendo de 3.7%, siguiéndole la temperatura de 37 °C con un porcentaje de acidez de 2.3% y por último la temperatura de 42 °C la cual presento 2.0% de acidez. Estas variaciones en la acidez pueden deberse a que cuando las bacterias crecen sobre, lactato, piruvato, acetato u otro compuesto, se desarrollan rutas adicionales o rutas anapleróticas para mantener funcionando el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y proveer moléculas intermediarias para la síntesis de los azúcares (Agudelo *et al.*, 2010).

## 6.4 Cinéticas de las cepas en leche semidescremada comercial

### 6.4.1 Cinéticas de pH y acidez en leche a temperatura de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 y en conjunto

Después de ver el comportamiento de nuestras cepas en un medio específico para su crecimiento (caldo MRS) se realizaron cinéticas en leche la cual es un medio ideal de crecimiento para bacterias BAL y para la formación de yogur. Los resultados de las cinéticas de pH se observan a continuación, a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 10 A), 42 °C (ver Figura 10 B) y 45 °C (ver Figura 10 C), de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, incubadas en leche semidescremada. Siendo los resultados de pH a las 28 h de las cepas a la temperatura de 37 °C los siguientes: la cepa ST2 mostró un pH de 5.0, la cepa LB1 mostró un pH de 4.8 y las cepas en conjunto mostraron un pH de 4.8. Los resultados de pH a las 20 h de las cepas a la temperatura de 42 °C son los siguientes: la cepa ST2 mostró un pH de 5.7, la cepa LB1 mostró un pH de 3.9 y las cepas en conjunto mostraron un pH de 4.7. Y los resultados de pH a las 30 h de las cepas a la temperatura de 45 °C son los siguientes: la cepa ST2 mostró un pH de 5.7, la cepa LB1 mostró un pH de 3.8 y las cepas en conjunto mostraron un pH de 4.7.





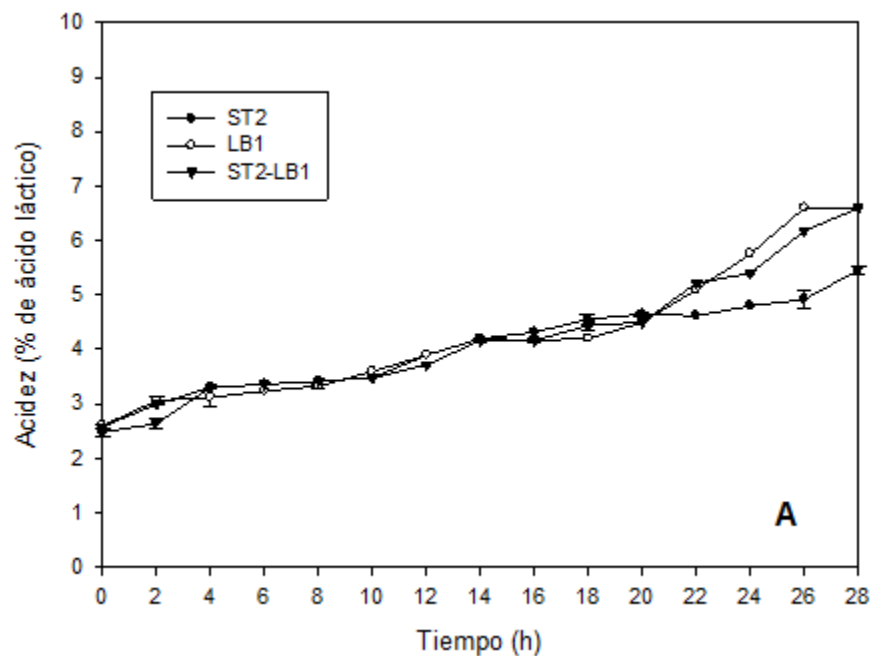
**Figura 10.** Cinéticas de pH de en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

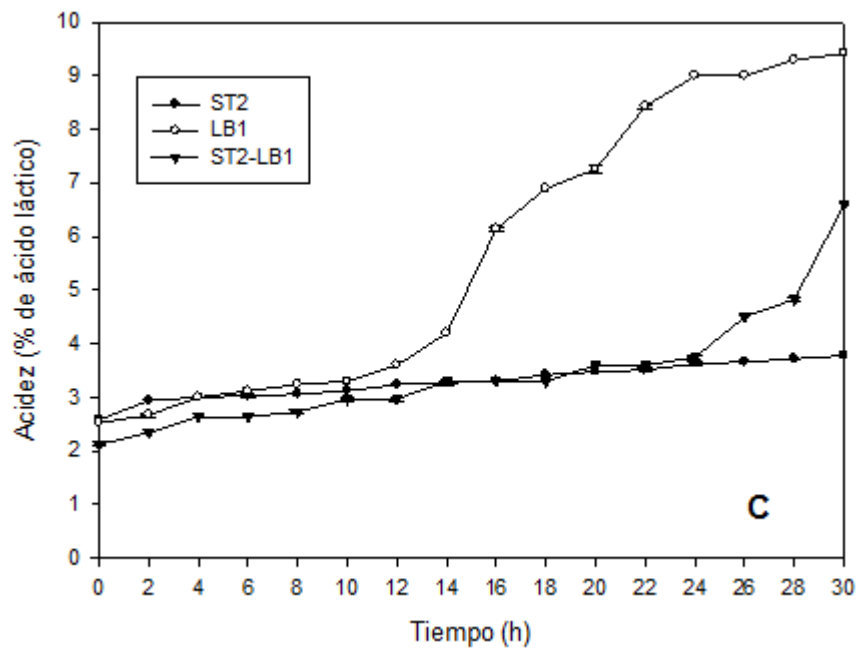
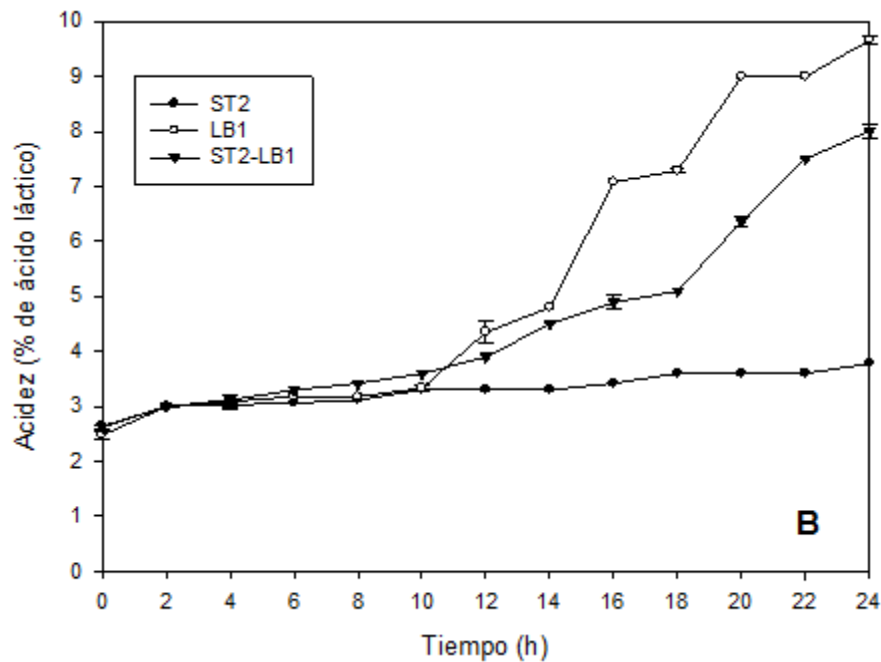
Se observa que no hubo diferencias significativas a las temperaturas de 37 y 42 °C de acuerdo a la disminución de pH sin embargo si hubo diferencias con la temperatura de 45 °C, ya que esta tarda más horas para obtener un pH de 4.8. Y de las tres temperaturas, la de 42 °C es la que en menor tiempo presenta un pH de 4.8 siendo a las 20 h, siguiéndole la temperatura de 37 °C a las 28 h y por último a la temperatura de 45 °C a las 30 h. El pH en la cepa ST2 se ve influenciado por la temperatura, conforme aumenta la temperatura de incubación aumenta el pH, y por el contrario para la cepa LB1 donde fue disminuyendo el pH conforme la temperatura de incubación iba aumentando.

A la par que se realizaron las cinéticas de pH se realizaron las cinéticas de acidez a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 11 A), 42 °C (ver Figura 11 B) y 45 °C (ver Figura 11 C) de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*



ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, incubadas en leche semidescremada. Los resultados de acidez a las 28 h de las cepas a la temperatura de 37 °C son los siguientes: la cepa ST2 mostró un porcentaje de acidez de 0.54%, la cepa LB1 mostró un porcentaje de acidez de 0.66%, y las cepas en conjunto mostraron un porcentaje de acidez de 0.66%. Los resultados de acidez a las 20 h de las cepas a la temperatura de 42 °C son los siguientes: la cepa ST2 mostró un porcentaje de acidez de 0.36%, la cepa LB1 mostró un porcentaje de acidez de 0.90%, y las cepas en conjunto mostraron un porcentaje de acidez de 0.64%. Y los resultados de acidez a las 30 h a la temperatura de 45 °C son los siguientes: la cepa ST2 mostró un porcentaje de acidez de 0.37%, la cepa LB1 mostró un porcentaje de acidez de 0.94%, y las cepas en conjunto mostraron un porcentaje de acidez de 0.66%.





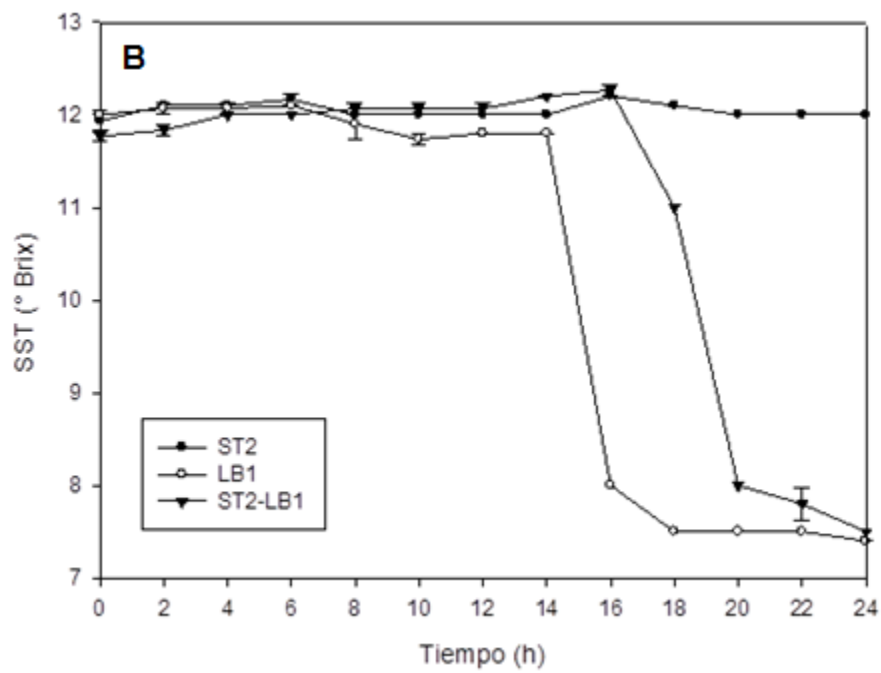
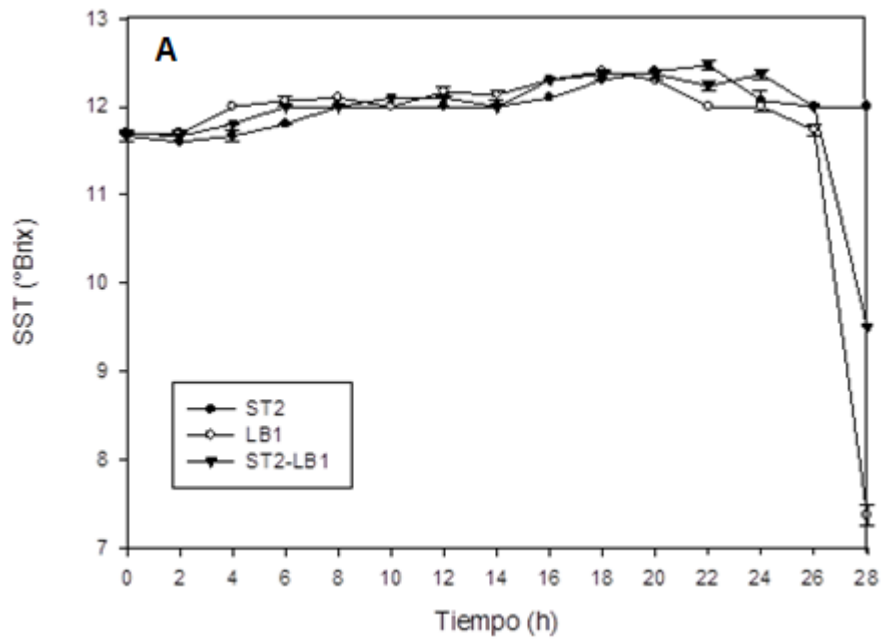
**Figura 11.** Cinéticas de acidez en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

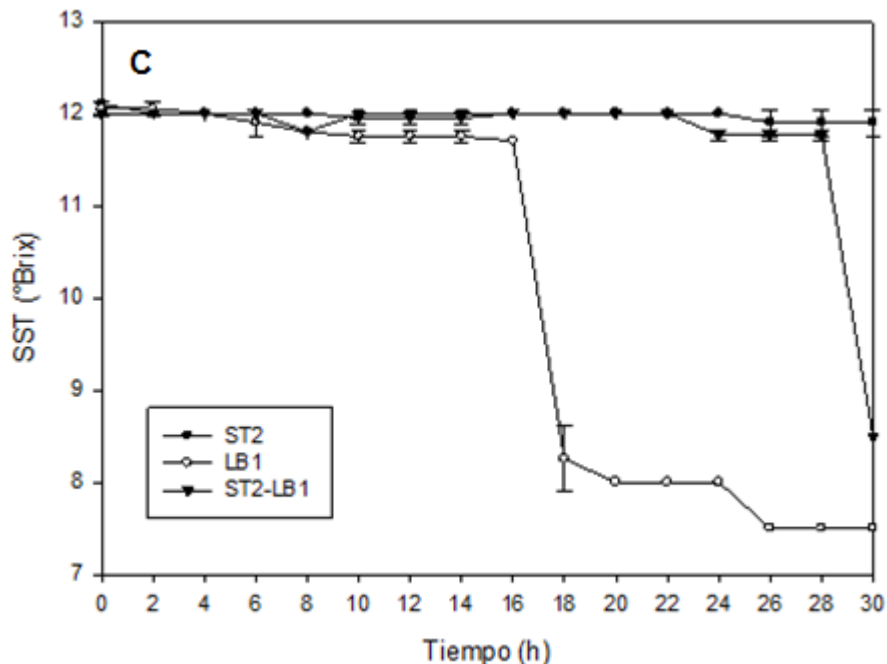
Se observa que de las tres temperaturas, la de 37 °C es la que en menor tiempo presenta mayor porcentaje de acidez siendo de 0.66% a las 20 h, siguiéndole la temperatura de 42 °C siendo de 0.64% a las 20 h y por último la temperatura de 45 °C siendo de 0.66% a las 30 h.

Estudios similares fueron reportados por Acevedo y col. (2010) los cuales indican que las cepas pertenecientes a BAL, *Lactococcus lactis subs. Lactis* (ATCC 29146) y *Lactobacillus paracasei subs. Paracasei* (ATCC 334) sembradas en suero de leche, aumentan su acidez a la temperatura de 35 °C y va disminuyendo hasta la temperatura de 40 °C, conforme aumenta la temperatura la velocidad de acidificación lo hace muy poco. Llegando a obtener como temperatura óptima de crecimiento 37 °C, y mencionan que otros factores como SST y cantidad de inóculo no tienen influencia alguna en la acidez.

#### **6.4.2 Cinéticas de SST en leche a temperatura de 37, 42 Y 45 °C de las cepas ST2, LB1 individuales y en conjunto**

Se realizaron cinéticas de SST a la par de las de acidez y pH, los resultados de las cinéticas de SST se observan a continuación, a las temperaturas de 37 °C (ver Figura 12 A), 42 °C (ver Figura 12 B) y 45 °C (ver Figura 12 C), de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, incubadas en leche semidescremada. Los resultados de SST a las 28 h de las cepas a la temperatura de 37 °C son los siguientes: 12.0 °Brix en la cepa ST2, 7.3 °Brix en la cepa LB1 y 9.5 °Brix en las cepas en conjunto. Los resultados de SST a las 20 h de las cepas a la temperatura de 42 °C son los siguientes: 12.0 °Brix para la cepa ST2, 7.5 °Brix para la cepa LB1 y 8.0 °Brix para las cepas en conjunto. Y los resultados de SST a las 30 h a la temperatura de 45 °C son los siguientes: 11.9 °Brix en la cepa ST2, 7.5 °Brix en la cepa LB1 y 8.5 °Brix en las cepas en conjunto.



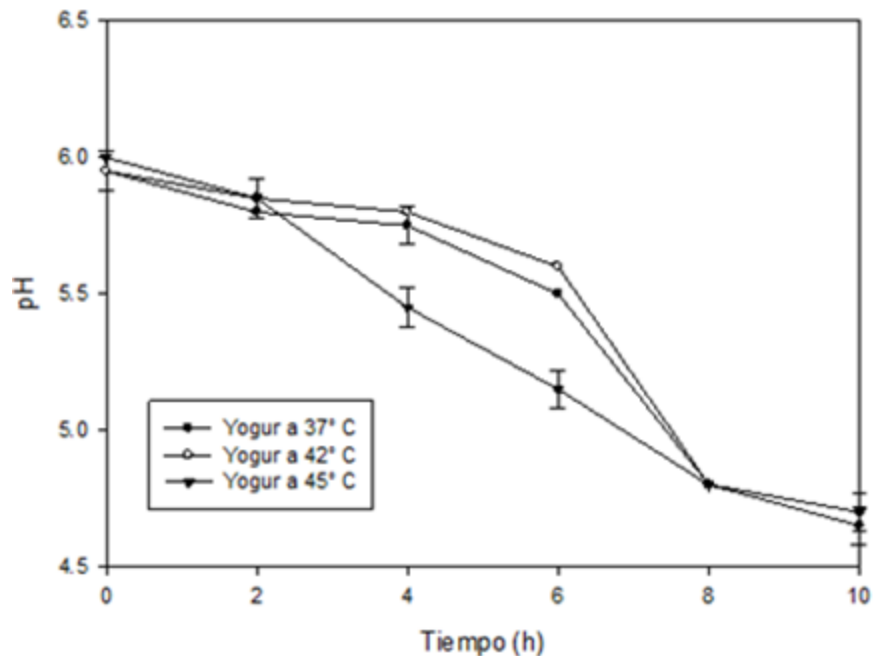


**Figura 12.** Cinéticas de SST en leche semidescremada a las temperaturas de A) 37 °C, B) 42 °C y C) 45 °C, de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

Se observa que no existen diferencias significativas en el contenido de SST en las tres temperaturas. Los valores de SST en yogur a las tres temperaturas se encuentran en el rango permitido, siendo igual o mayor a 8.5 ° Brix.

#### 6.4.3 Cinéticas de pH, acidez y SST en yogur a las temperaturas de 37, 42 Y 45 °C

Para concluir el apartado de cinéticas se realizaron cinéticas en yogur (preparado con 5% de inóculo de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1), más el 10% de glucosa). En la Figura 13 se observan los resultados de las cinéticas de pH en yogur a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. Dicho yogur a las temperaturas de 37 y 42 °C obtuvo un pH de 4.8 a las 8 h y a la temperatura de 45 °C obtuvo un pH de 4.7 a las 10 h.



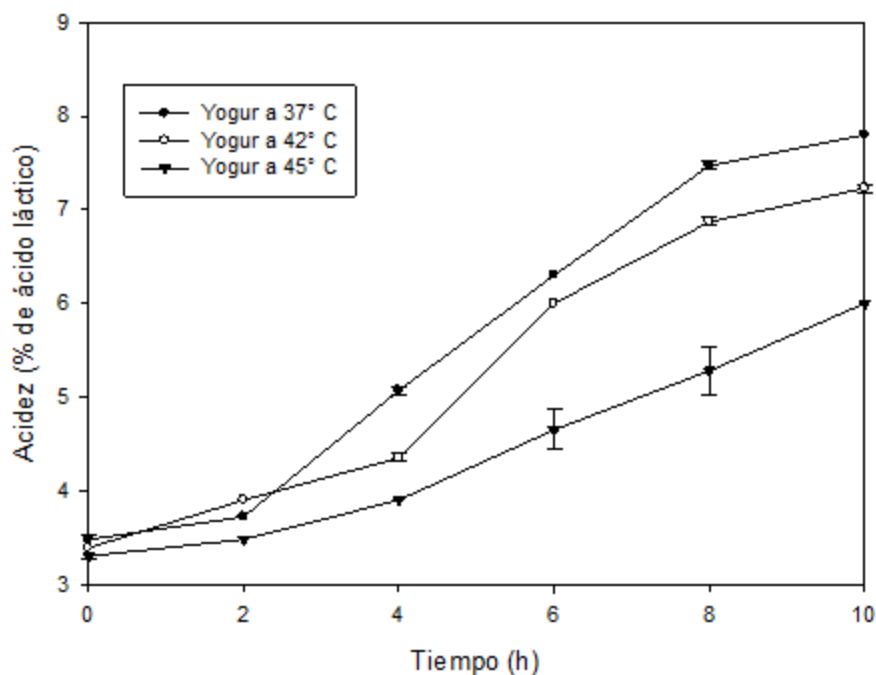
**Figura 13.** Cinéticas de pH a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur.

Se observa que no hubo diferencias a las temperaturas de 37 y 42 °C de acuerdo a la disminución de pH, sin embargo si hubo diferencias con la temperatura de 45 °C, ya que esta tarda más horas para obtener un pH de 4.8. Cabe mencionar que el pH óptimo del yogur es de 4.6 a 4.8, donde ST muestra un pH de 5.0 a 5.5 y LB presenta un pH de 4.0 a 5.0.

Estudios realizados por Vásquez–Villalobos (2015) obtuvieron el mismo comportamiento, los cuales indican que un yogur con leche descremada de cabra frutado con mango y plátano obtuvieron menores valores de pH cuando su temperatura de incubación era mayor, así como al adicionarle la pulpa de fruta. Resultando un valor de 4.35 y 4.36, obteniendo resultados similares a los nuestros.

Las cinéticas de acidez en el yogur (preparado con 5% de inóculo de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) más el 10% de

glucosa) a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C se observan en la Figura 14. Donde se obtuvo un porcentaje de acidez de 0.74 a las 8 h a la temperatura de 37 °C, un porcentaje de 0.68 a las 8 h a la temperatura de 42 °C y un porcentaje de 0.60 a las 10 h a la temperatura de 45 °C.



**Figura 14.** Cinéticas de acidez a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

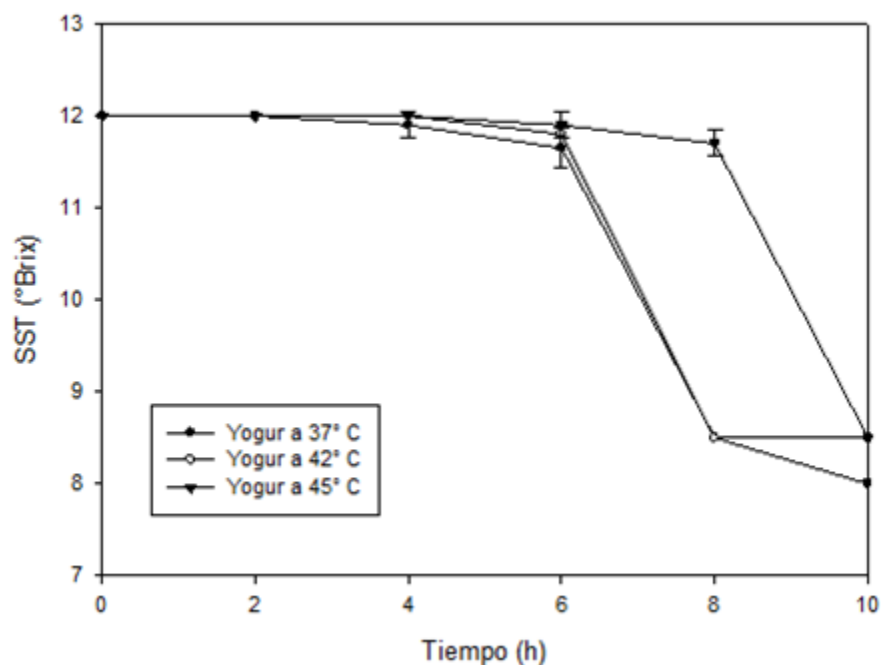
La mayor producción de ácido láctico se dio a la temperatura de 37 °C, siendo la temperatura en la que en menor tiempo presentó mayor porcentaje de acidez siendo de 0.78% a las 9 h, siguiéndole la temperatura de 42 °C siendo de 0.68% a las 8 h y por último la temperatura de 45 °C siendo de 0.60% a las 10 h.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, el porcentaje normal de acidez en el yogur es de 0.85 a 1.0% teniendo como mínimo 0.5%, el cuál es equivalente al porcentaje de ácido láctico. Aunque el contenido total de ácido en el yogur está conformado por múltiples ácidos, como es el ac.

Láctico a un 59%, ac. Cítrico a un 28%, ac. Acético a un 5.3%, ac. Fórmico a un 2.4% y ac. Succínico a un 2.3%.

Estudios realizados por Guzel-Seydim y col. (2005) en diferentes cultivos iniciadores de yogur a diferentes temperaturas de incubación (35 y 45 °C) mostraron que el contenido de ácido láctico y el pH de las muestras fueron afectados más significativamente por la cepa de cultivo iniciador que por la temperatura de incubación. Y estudios realizados por Vásquez-Villalobos (2015) evalúan dos tipos de yogur de leche descremada de cabra frutado con mango, a los cuales se les realizó acidez, resultando con un porcentaje de 0.76% y 0.75%. Obteniendo resultados similares a los nuestros.

En la Figura 15 se observa que al tiempo de formación de yogur el porcentaje de SST fue de 8.5% para las cinéticas realizadas a las temperaturas de 37 y 42 °C a las 8 h y a la temperatura de 45 °C a las 10 h.



**Figura 15.** Cinéticas de SST a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C en yogur. Los puntos de dispersión representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.



Se observa que no existen diferencias significativas en el contenido de SST entre las tres temperaturas para la realización de yogur. Y en el conjunto de las cinéticas se observa que el yogur se produjo más rápido a las temperaturas de 37 y 42 °C siendo a las 8 h, siguiéndole a la temperatura de 45 °C el cual tardó 10 h para producirse.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, los valores normales de sólidos solubles totales en el yogur son de 10.0 a 15.0% y no debe ser menor a 8.25%. Los carbohidratos en yogur son bajos por lo que se agregan edulcorantes, siendo el más usado la sacarosa debido a su alta disponibilidad, buena solubilidad, alto poder endulzante y fácil manipulación, esta se usa en cantidad de 5 a 10%.

Estudios realizados por Vásquez-Villalobos (2015) evalúan dos tipos de yogur de leche descremada de cabra frutado con mango, a los cuales se les analizó sólidos totales. Resultando un contenido de sólidos de 12.71% y 13.23% respectivamente, teniendo resultados mayores a los nuestros debido a la adición de fruta.

Con respecto a la temperatura de incubación se encontró una similitud de nuestros resultados con los de Nguyen y col. (2014) quienes al analizar un yogur elaborado con leche de búfalo a las temperaturas de 37, 40 y 43 °C, encontraron que a 37 °C se muestra una microestructura más compacta aunque la fermentación fue más lenta que a la temperatura de 43 °C a la cual se produjo mayor grado de sinéresis. Güler-Akin y col. (2007) analizaron un yogur a la temperatura de 37 °C el cual presentó menor separación de suero, mayor acidez titulable y contenido de ácido láctico (aunque en el almacenamiento su producción fue menor) y una mayor producción de acetaldehído y recuentos bacterianos viables. Kristo y col. (2003) estudiaron los efectos de la temperatura de incubación sobre la viabilidad y tiempo de fermentación de los probióticos (*bacteria*

*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*) en yogur a (37, 40 y 44 °C) observando la máxima viabilidad cuando el yogur se incubó a 37 °C, aunque el tiempo de incubación fue más largo. Esto indica que la disminución de temperatura en la incubación puede ser utilizada satisfactoriamente para la fabricación de yogur.

## 6.5 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas a evaluar fueron las siguientes: parámetros de color (L, a\*, b\*), fuerza de compresión (algunos autores lo manejan como textura), viscosidad aparente, grado de sinéresis y sinéresis en reposo, las cuales se evaluaron en las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) solas y en conjunto en leche semidescremada Alpura® y añadiéndole el 10% de glucosa o sacarosa, las cuales fueron incubadas a tres temperaturas 37, 42 y 45 °C, al tiempo de incubación en el que llegaron a un pH de 4.8, excepto la prueba de sinéresis de reposo la cual se evaluó a las 24 h y a los 7, 12 y 21 días.

### 6.5.1 Color

Se evaluaron los parámetros L\*, a\* y b\* de acuerdo a lo establecido por la CIE o Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de L'Eclairage) para calcular °Hue (tono), Cromo (saturación) y ubicar el espacio de color de cada una de las formulaciones. En el parámetro L\* que indica la luminosidad y que va de valores de 0 (negro) a 100 (blanco), los valores obtenidos estuvieron en un intervalo de 87.07 a 92.35; en el parámetro a\* que va en una escala de 0 a 100, existen valores negativos (indican verde) y positivos (indican rojo); las formulaciones oscilaron entre valores de -1.89 a -4.07, es decir en tendencia al verde; en el parámetro b\* que al igual que el caso anterior va en una escala de 0 a 100, existen también valores negativos (indican azul) y positivos (indican amarillo); las formulaciones oscilan entre valores de 9.89 a 17.96; es decir en colores con tendencia al amarillo.

Los parámetros de color a realizar fueron L, a\* y b\*, en leche sola, en las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto en leche con y sin azúcares a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C (ver Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultado de color de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) solas y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C

MUESTRA	COLOR		
	L	a*	b*
Leche	91.63 ± 0.08	-2.32 ± 0.29	12.00 ± 0.26
ST2 (42 °C)	90.66 ± 0.18	-2.32 ± 0.29	12.05 ± 0.26
LB1 (42 °C)	89.99 ± 0.12	-3.27 ± 0.39	10.57 ± 0.69
ST2-LB1 (42 °C)	92.35 ± 0.08	-3.26 ± 0.16	11.35 ± 0.46
ST2 (37 °C)	91.30 ± 0.08	-3.49 ± 0.11	10.39 ± 0.15
LB1 (37 °C)	91.27 ± 0.17	-1.86 ± 0.29	12.33 ± 0.28
ST2-LB1 (37 °C)	91.59 ± 0.25	-3.38 ± 0.22	10.82 ± 0.21
ST2-LB1 (45 °C)	87.77 ± 0.30	-1.89 ± 0.36	17.96 ± 0.35
ST2-LB1 (37 °C /DEXTROSA)	89.02 ± 3.69	-0.27 ± 0.33	17.03 ± 0.57
ST2-LB1 (37 °C /SACAROSA)	91.26 ± 0.19	-3.58 ± 0.34	9.89 ± 0.39
ST2-LB1 (42 °C /DEXTROSA)	88.45 ± 1.04	-4.01 ± 0.04	10.41 ± 0.21
ST2-LB1 (42 °C /SACAROSA)	88.36 ± 0.04	-4.07 ± 0.18	12.43 ± 0.20
ST2 (37 °C /DEXTROSA)	87.06 ± 0.45	-3.67 ± 0.66	13.87 ± 0.31
LB1 (37 °C /DEXTROSA)	88.67 ± 0.01	-3.11 ± 0.15	12.00 ± 0.24

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Se observa que en todas las muestras con adición de azúcares resultaron más coloridas que las que no contienen azúcares, en lo general un color de blanco a amarillo, mostrando un color crema. Los valores promedio de L no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=0.06$ ;  $p>0.05$ ), con respecto a la temperatura solo existen diferencias ( $F_{2,25}=1.42$ ;  $p>0.05$ ), y con respecto a la azúcar sí existen diferencias significativas ( $F_{2,25}=6.22$ ;  $p<0.05$ ). Los valores promedio de  $a^*$  no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=0.13$ ;  $p>0.05$ ) y con la temperatura solo existen diferencias ( $F_{2,25}=2.53$ ;  $p>0.05$ ), al igual que con la azúcar ( $F_{2,25}=2.00$ ;  $p>0.05$ ). Los valores promedio de  $b^*$  no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=0.47$ ;  $p>0.05$ ) y con la temperatura sí existen diferencias significativas ( $F_{2,25}=10.21$ ;  $p<0.05$ ), y con respecto a la azúcar solo existen diferencias ( $F_{2,25}=1.11$ ;  $p>0.05$ ) resultado del análisis de los datos en conjunto.

Para el caso de la coloración, se calculó °Hue que va de 0° (rojo), 90° (amarillo), 180° (verde) y 270° (azul) para determinar el tono; éste varió de 0.35 a 0.74 por lo que los tonos se encuentran en el rango del amarillo; se calculó Cromo para determinar la saturación de color que va de 0 (menos saturación de color) a 100 (colores saturados o puros) obteniendo valores de 132.08 a 196.04.

### **6.5.2 Grado de sinéresis**

El grado de sinéresis o sinéresis inducida se realizó en muestra de leche, en las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto en leche con y sin azucares a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C (ver Tabla 9). En donde se puede observar fue mayor en la cepa LB1, sobre la cepa ST2, y las cepas en conjunto (ST2-LB1). Mostrando mayor sinéresis a la temperatura de 45 °C, y a las temperaturas de 37 °C y 42 °C no se mostraron diferencias significativas. Las cepas en conjunto (ST2-LB1) con azúcares, presentaron la misma sinéresis a 37 °C, pero mayor a la temperatura de 42 °C,

produciendo mayor sinéresis la cepa ST2 al añadirle azúcares y por el contrario LB1 produciendo menor sinéresis con azúcar.

**Tabla 9.** Resultado de grado de sinéresis de las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) solas y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.

MUESTRA	SINÉRESIS INDUCIDA (%)
Leche	-
ST2 (42 °C)	-
LB1 (42 °C)	71.00 ± 2.64
ST2-LB1 (42 °C)	48.67 ± 2.30
ST2 (37 °C)	-
LB1 (37 °C)	70.67 ± 4.61
ST2-LB1 (37 °C)	48.67 ± 2.30
ST2-LB1 (45 °C)	60.00 ± 0
ST2-LB1 (37 °C /DEXTROSA)	48.00 ± 0
ST2-LB1 (37 °C /SACAROSA)	50.00 ± 0
ST2-LB1 (42 °C /DEXTROSA)	60.00 ± 0
ST2-LB1 (42 °C /SACAROSA)	60.00 ± 0
ST2 (37 °C /DEXTROSA)	79.00 ± 1.41
LB1 (37 °C /DEXTROSA)	49.00 ± 1.41

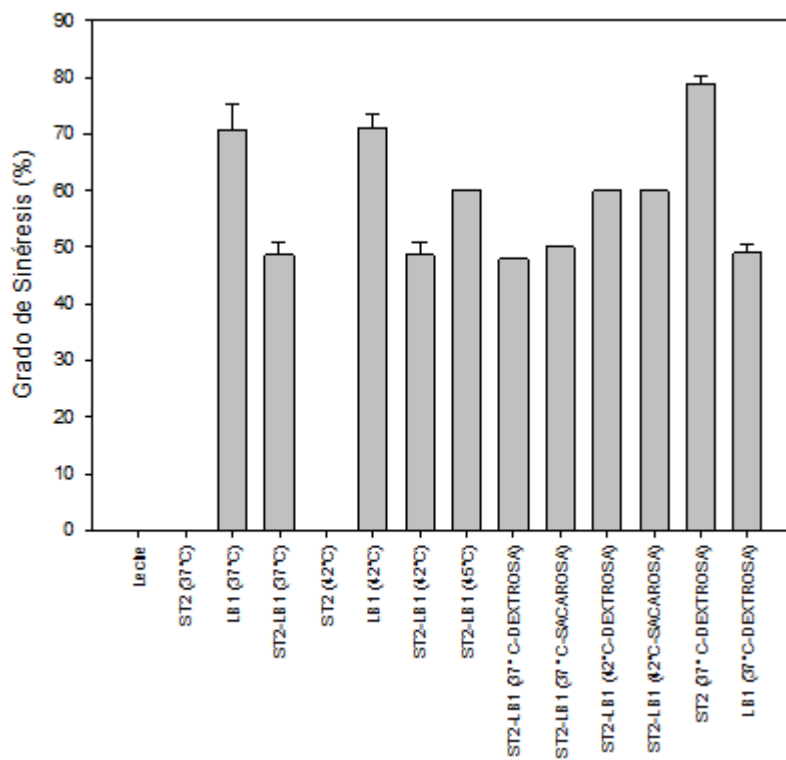
Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

- No se presentó sinéresis.

Los valores promedio de sinéresis mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=5.43$ ;  $p<0.05$ ), pero con respecto a la temperatura no existen diferencias significativas ( $F_{2,25}=0.21$ ;  $p>0.05$ ), y de acuerdo a la azúcar

solo existen diferencias ( $F_{2,25}=1.02$ ;  $p>0.05$ ) resultado del análisis de los datos en conjunto.

Se muestra graficado el porcentaje de sinéresis de las muestras (ver Figura 16), en donde observamos que la leche con las cepas en conjunto dio un valor de 48.67% a la temperatura de 42 °C y a la temperatura de 37 °C mostrando 48.67%. No resultando diferencias significativas a las dos temperaturas.



**Figura 16.** Grafica de grado de sinéresis en la leche y las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, así como con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

Los valores promedio de sinéresis al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1) a las tres temperaturas de 37, 42 y 45 °C y sin azúcar, observamos que mostraron diferencias significativas con respecto a la temperatura ( $F_{2,8}=36.12$ ;

$p < 0.05$ ) siendo la temperatura optima la de 37 °C. Los valores promedio al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1), a la temperatura de 37 °C, con los tres tipos de azúcar (sin azúcar, dextrosa y sacarosa), observamos que sí mostraron diferencias significativas con respecto al azúcar ( $F_{2,8}=49.75$ ;  $p < 0.05$ ) siendo el azúcar optimo la dextrosa.

Estudios realizados por Díaz y col. (2004) reportaron un porcentaje de sinéresis similar al nuestro de 45 a 65%, así como Rojas y col (2007) quienes reportaron valores de 50 a 70%. Y estudios realizados por Nguyen y col. (2014) en yogur preparado con leche de bufalo a tres temperaturas (37, 40 y 43 °C), obtuvieron que a la temperatura de 37 °C el yogur muestra una microestructura compacta aunque la fermentación fue más rápida a 43 °C esta presento un mayor grado de sinéresis. Por lo que se sugiere que en la fermentación la disminución de la temperatura sería ideal para mejorar la calidad de yogur.

### **6.5.3 Sinéresis de reposo**

La sinéresis de reposo se realizó en las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto en leche con glucosa a la temperatura de 37 °C, y de las muestras de yogur preparado con las cepas en conjunto, 10% de azúcar, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C , en los intervalos de 24 h, los días 7, 12 y 21(ver Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultado de la sinéresis de reposo de 24 h a 21 días de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.

<b>SINÉRESIS DE REPOSO (mL)</b>				
<b>MUESTRA</b>	<b>24 h</b>	<b>7 días</b>	<b>12 días</b>	<b>21 días</b>
<b>ST2-LB1 (37 °C /SIN AZÚCAR)</b>	-	<b>0.5</b>	<b>1.5</b>	<b>2.0</b>
<b>ST2-LB1 (37 °C /DEXTROSA)</b>	-	<b>0.2</b>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>
<b>ST2-LB1 (37 °C /SACAROSA)</b>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.5</b>
<b>ST2-LB1 (42 °C /SIN AZÚCAR)</b>	<b>0.2</b>	<b>0.7</b>	<b>2.0</b>	<b>3.5</b>
<b>ST2-LB1 (42 °C /DEXTROSA)</b>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>	<b>3.0</b>	<b>5.0</b>
<b>ST2-LB1 (42 °C /SACAROSA)</b>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.5</b>
<b>ST2-LB1 (45 °C /SIN AZÚCAR)</b>	<b>0.5</b>	<b>0.7</b>	<b>1.5</b>	<b>2.5</b>
<b>ST2 (37 °C /DEXTROSA)</b>	<b>13.0</b>	<b>18.0</b>	<b>20.0</b>	<b>22.0</b>
<b>LB1 (37 °C /DEXTROSA)</b>	<b>0.5</b>	<b>3.0</b>	<b>5.0</b>	<b>7.0</b>

- No se presentó sinéresis.

En la sinéresis de reposo se puede observar un incremento a la par de los días, presentando mayor sinéresis de la cepa ST2 sobre LB1 y a la temperatura de 42 °C sobre las temperaturas de 37 °C y 45 °C.

La sinéresis aumenta a medida que se incrementa la temperatura, el exceso de acidez, conforme el paso del tiempo debido a la relajación de los enlaces y a la desnaturalización de las proteínas que forman la red de caseína y la retención de agua disminuye cuando se incrementan los sólidos totales. Se sabe el yogur puede comercializarse a las 10 h de refrigeración a 4-9 °C, ya que en este periodo se desarrolla el aroma del yogur, se conserva durante una semana a 47 °C. Siendo la vida útil de almacén a unas 4 semanas.



Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Beal y col. (1999) en donde los efectos de la temperatura de fermentación en el proceso de acidificación y las propiedades reológicas de la leche con *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en condiciones relativamente de baja temperatura (37-39 °C), las tasas de gelificación y la acidificación se encontraron en niveles medios aunque la fermentación tomó más tiempo para terminar, pero los geles formados fueron más firme y con menor producción de sinéresis, bajo estas condiciones examinadas, se detectó un alto número de bacterias viables en el producto final durante el almacenamiento (21 días, 4 °C) para ambos microorganismos utilizados en el cultivo iniciador.

#### **6.5.4 Viscosidad aparente**

El yogur es un fluido no newtoniano ya que su viscosidad varía con la temperatura y la tensión cortante que se aplica. Por lo que no tiene un valor de viscosidad definido y constante. Es tixotrópico ya que su viscosidad disminuye con el tiempo y entre más se someta a esfuerzos de cizalla, aunque este fenómeno es reversible.

De acuerdo a la viscosidad aparente se analizó tanto en la leche sola, como en las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) de manera individual y en conjunto, en leche con y sin azúcares a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C (ver Tabla 11). Mostrando una viscosidad de la muestra de leche con las cepas en conjunto de 2320 cps a la temperatura de 42 °C y a la temperatura de 37 °C mostrando 2587 cps. Por lo que no hubo diferencias significativas a las dos temperaturas.

**Tabla 11.** Resultado de viscosidad aparente de las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con y sin azúcares, a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C

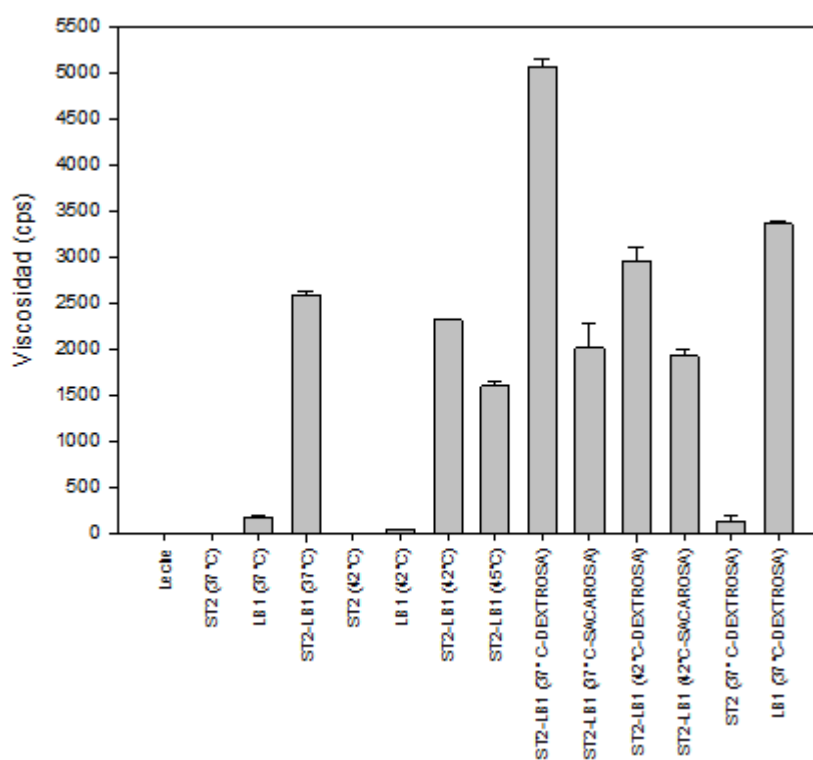
MUESTRA	VISCOSIDAD (cps)
Leche	-
ST2 (42 °C)	-
LB1 (42 °C)	40 ± 0
ST2-LB1 (42 °C)	2320 ± 0
ST2 (37 °C)	-
LB1 (37 °C)	173 ± 24.44
ST2-LB1 (37 °C)	2587 ± 46.18
ST2-LB1 (45 °C)	1600 ± 56.56
ST2-LB1 (37 °C /DEXTROSA)	5060 ± 84.85
ST2-LB1 (37 °C /SACAROSA)	2013 ± 264.45
ST2-LB1 (42 °C /DEXTROSA)	2962 ± 145.66
ST2-LB1 (42 °C /SACAROSA)	1923 ± 79.90
ST2 (37 °C /DEXTROSA)	140 ± 56.56
LB1 (37 °C /DEXTROSA)	3360 ± 28.28

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

- No se presentó sinéresis.

Los valores promedio de viscosidad aparente mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=11.49$ ;  $p<0.05$ ), y también existen diferencias significativas con respecto a la adición de azúcar ( $F_{2,25}=5.26$ ;  $p<0.05$ ), lo contrario sucedió con la temperatura donde no existen diferencias significativas ( $F_{2,25}=0.24$ ;  $p>0.05$ ) dicho resultado es del análisis de los datos en conjunto.

En los resultados de viscosidad aparente graficados (ver Figura 17) se puede observar que la viscosidad aumenta al estar las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) en conjunto y separadas. Donde LB1 presenta mayor viscosidad sobre ST2, y al añadirle azúcar, presentando mayor viscosidad con glucosa que con sacarosa, y observando mayor viscosidad a la temperatura de 37 °C, siguiéndole a 42 °C y por ultimo 45 °C.



**Figura 17.** Grafica de viscosidad de la leche y las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, así como con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

Y los valores promedio al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1) a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C y sin azúcar, observamos que mostraron

diferencias significativas con respecto a la temperatura ( $F_{2,8}=628.00$ ;  $p<0.05$ ) siendo la temperatura optima la de 37 °C. Por último, los valores promedio al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1) a la temperatura de 37 °C con los tres tipos de azúcar (sin azúcar, dextrosa y sacarosa), observamos que mostraron diferencias significativas con respecto al azúcar ( $F_{2,8}=577.95$ ;  $p<0.05$ ) siendo el azúcar optimo la dextrosa.

Resultados similares fueron reportados por Mortazavian y col. (2006) quienes estudiaron los efectos de las condiciones de cultivo con el fin de mejorar la viscosidad del producto, la cual se vio afectada por la temperatura y la asociación de tensión, se obtuvo el yogur más viscoso a la más baja temperatura que requiere el tiempo de fermentación más largo. Resultados obtenidos por Rojas y col. (2007) obtuvieron valores mayores a los nuestros, reportando una viscosidad del yogur de 8500–9979 cps. Sin embargo Díaz y col. (2004) reportaron una viscosidad similar a la nuestra de 4000–5000 cps en yogur. Por otro lado Wang y col. (2015) realizaron estudios reológicos mostrando que las cepas productoras de EPS producían mayor viscosidad en la leche desnatada, a temperatura inferior, y a pH ácido, siendo parámetros en los que nuestra viscosidad mejoró.

#### **6.5.5 Fuerza de compresión**

En los resultados de la tensión superficial de las muestras se observa presentó mayor fuerza de compresión las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) en conjunto que individuales, aunque la cepa LB1 presentó mayor tensión superficial sobre ST2 y aún más de las cepas al añadirle azúcar. Obteniendo mayor tensión superficial a la temperatura de 37 °C, siguiéndole la de 42 °C y por último la de 45 °C, y con glucosa que con sacarosa, observándose a la vista las mejoras de la consistencia (ver Tabla 12).

**Tabla 12.** Resultados de la prueba tensión superficial de la leche sola y de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto en leche, sin y con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C.

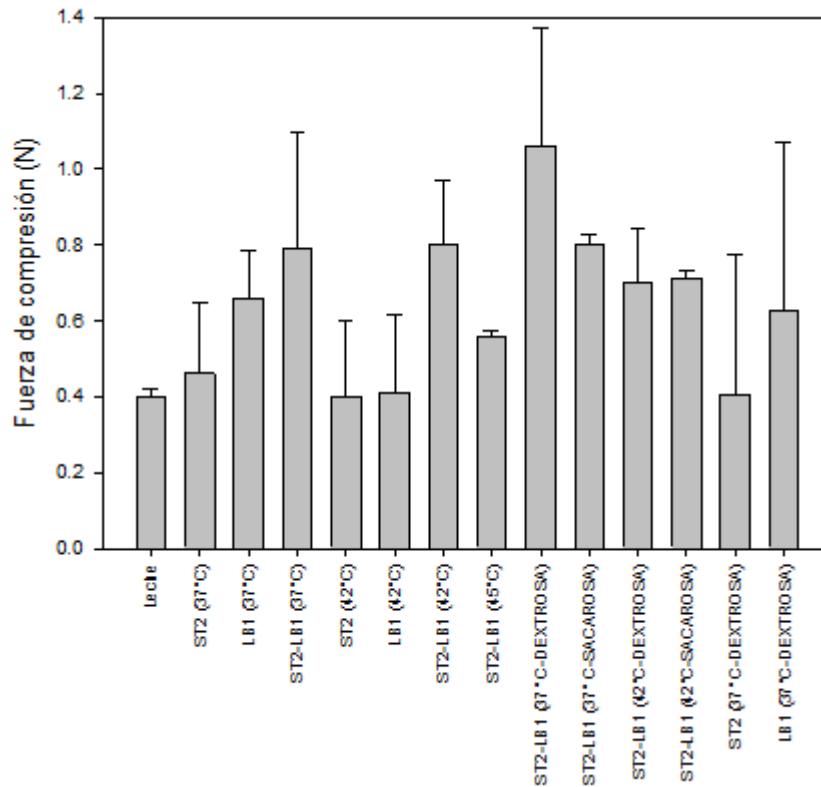
<b>MUESTRA</b>	<b>FUERZA DE COMPRESIÓN (N)</b>
Leche	<b>0.40 ± 0.01</b>
ST2 (42 °C)	<b>0.40 ± 0.01</b>
LB1 (42 °C)	<b>0.41 ± 0.01</b>
ST2-LB1 (42 °C)	<b>0.80 ± 0.02</b>
ST2 (37 °C)	<b>0.46 ± 0</b>
LB1 (37 °C)	<b>0.66 ± 0.07</b>
ST2-LB1 (37 °C)	<b>0.79 ± 0.07</b>
ST2-LB1 (45 °C)	<b>0.56 ± 0</b>
ST2-LB1 (37 °C /DEXTROSA)	<b>1.06 ± 0.06</b>
ST2-LB1 (37 °C /SACAROSA)	<b>0.80 ± 0.01</b>
ST2-LB1 (42 °C /DEXTROSA)	<b>0.70 ± 0.01</b>
ST2-LB1 (42 °C /SACAROSA)	<b>0.71 ± 0</b>
ST2 (37 °C /DEXTROSA)	<b>0.40 ± 0.01</b>
LB1 (37 °C /DEXTROSA)	<b>0.62 ± 0.01</b>

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Los valores promedio de fuerza de compresión mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa ( $F_{2,25}=19.00$ ;  $p<0.05$ ), por el contrario con la temperatura donde no existen diferencias significativas ( $F_{2,25}=0.56$ ;  $p>0.05$ ), y con respecto a la azúcar solo existen diferencias ( $F_{2,25}=2.15$ ;  $p>0.05$ ) resultado del análisis de los datos en conjunto.

Los valores promedio de fuerza de compresión al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1) a las tres temperaturas (37, 42 y 45 °C) y sin azúcar, observamos que sí mostraron diferencias significativas con respecto a la temperatura ( $F_{2,8}=36.12$ ;  $p<0.05$ ) siendo la temperatura optima la de 37 °C. Los valores promedio de viscosidad al analizar solo las cepas en conjunto (St2-Lb1), a la temperatura de 37 °C, con los tres tipos de azúcar (sin azúcar, dextrosa y sacarosa), observamos que sí mostraron diferencias significativas con respecto al azúcar ( $F_{2,8}=32.19$ ;  $p<0.05$ ) siendo el azúcar optimo la dextrosa.

Los resultados graficados de la fuerza de compresión (ver Figura 18) mostraron una fuerza de compresión de la muestra de leche con las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) en conjunto de 0.80 N a la temperatura de 42 °C y a la temperatura de 37 °C una fuerza de compresión de 0.79 N. No habiendo diferencias significativas a las dos temperaturas. Se mostró mayor fuerza de compresión en las muestras con las cepas en conjunto en leche que en las muestras de las cepas por separado en leche, esto quiere decir que hay sinergismo de las cepas presentando mejor textura, firmeza, consistencia.



**Figura 18.** Grafica de fuerza de compresión en leche y las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) individuales y en conjunto, con 10% de glucosa y 10% de sacarosa a las temperaturas de 37, 42 y 45 °C. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones.

Estudios realizados por Díaz y col. (2004) reportaron resultados similares a los nuestros, una fuerza de compresión en yogur de 0.41-0.86 N, así como Benítez y col. (2011) quienes reportaron una fuerza de compresión de 0.41–1.20 N. Y estudios realizados por Rauzón y col. (2003) analizaron la textura a las mismas condiciones que nosotros, utilizando también cepas productoras de EPS, demostrando que las cepas productoras de EPS aumentaron la textura y viscosidad en yogur en comparación con cepas no productoras de EPS, las cuales fueron analizadas con TA-TX2 Analizador de Textura y el viscosímetro Brookfield RVT., al igual que Guzel-Seydim y col. (2005) quienes analizaron diferentes

cultivos iniciadores de yogur a diferentes temperaturas de incubación (35 y 45 °C) mostrando que la consistencia y la viscosidad del yogur aumentaron así como disminuyó la separación de suero de leche cuando se utilizó un cultivo productor de EPS y se incubará a 35 °C.

## 6.6 Obtención y cuantificación de EPS totales

### 6.6.1 Obtención de EPS totales en cepas solas y con azúcares

El objetivo de este apartado fue llegar a conocer las condiciones que permitieron obtener en cada caso una producción óptima y rentable de EPS. Para ello se evaluaron los efectos sobre el crecimiento bacteriano y la producción de polímero que tienen la variación de diversos factores, como la temperatura, fuente y concentración inicial de carbono en el medio de cultivo. Los microorganismos presentaron una producción de EPS parcialmente asociada al crecimiento. Sutherland en 1990-1998 demostró y sugirió que todo microorganismo al ser analizado debe ser cultivado bajo diferentes condiciones, para seleccionar aquellas que determinan una producción óptima y rentable desde el punto de vista de los sustratos empleados y el grado de conversión de los mismos hasta el EPS, así como unas propiedades adecuadas del biopolímero que correspondan con un producto final de calidad. En resumen, se ha descrito que factores como la temperatura, el pH o la composición del medio pueden influir en el proceso de degradación del EPS (Vuyst *et al.*, 1998; Yilmaz *et al.*, 2015).

Se realizó la obtención de EPS totales en las cepas seleccionadas las cuales fueron *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) en leche sin agregar azúcares y en la cepa ST2 con azúcares añadidos a las concentraciones de 5,10 y 15% p/v de glucosa y a las mismas concentraciones pero del azúcar sacarosa a 37 °C. Los resultados de EPSs se observan en la Tabla 13 y los resultados de EPSc en la Tabla 14.



**Tabla 13.** Peso de los exopolisacáridos extracelulares de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) solas y añadiéndole glucosa y sacarosa a las concentraciones de 5, 10 y 15% p/v.

<b>PESO DE EPSs EN CEPAS SOLAS Y CON AZUCARES</b>	
<b>CEPA</b>	<b>(mg/L<sup>-1</sup>)</b>
<b>ST2</b>	<b>248.50 ± 20.50</b>
<b>LB1</b>	<b>20.95 ± 1.20</b>
<b>ST2 CON 5% GLUCOSA</b>	<b>427.10 ± 1.55</b>
<b>ST2 CON 10% GLUCOSA</b>	<b>858.05 ± 0.77</b>
<b>ST2 CON 15% GLUCOSA</b>	<b>716.90 ± 0.84</b>
<b>ST2 CON 5% SACAROSA</b>	<b>104.65 ± 9.40</b>
<b>ST2 CON 10% SACAROSA</b>	<b>259.45 ± 33.58</b>
<b>ST2 CON 15% SACAROSA</b>	<b>366.05 ± 36.84</b>
<b>LB1 CON 5% GLUCOSA</b>	<b>185.37 ± 4.31</b>
<b>LB1 CON 10% GLUCOSA</b>	<b>370.29 ± 11.35</b>
<b>LB1 CON 15% GLUCOSA</b>	<b>254.70 ± 17.49</b>

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Se obtuvo el mayor peso de EPS extracelulares en las cepas con los azúcares añadidos que sin estos. Obteniendo mayor peso de EPSs en la cepa ST2 con el 10% de concentración de glucosa teniendo un peso de 858.05 mg/L<sup>-1</sup> y al 15% de concentración de sacarosa con un valor de 366.05 mg/L<sup>-1</sup> y la cepa LB1 con el 10% de glucosa teniendo un peso de 370.295 mg/L<sup>-1</sup>. Se observó mayor peso de EPS extracelulares en las cepas con los azúcares añadidos que sin estos. Obteniendo mayor peso de EPSs en la cepa ST2 al 10% de concentración de glucosa.

**Tabla 14.** Peso de los exopolisacáridos capsulares de las cepas *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) solas y añadiéndole glucosa y sacarosa a las concentraciones de 5, 10 y 15% p/v.

<b>PESO DE EPSc EN CEPAS SOLAS Y CON AZUCARES</b>	
<b>CEPA</b>	<b>(mg/L<sup>-1</sup>)</b>
<b>ST2</b>	<b>12.05 ± 5.02</b>
<b>LB1</b>	<b>19.60 ± 0</b>
<b>ST2 CON 5% GLUCOSA</b>	<b>152.00 ± 0.28</b>
<b>ST2 CON 10% GLUCOSA</b>	<b>50.20 ± 0.56</b>
<b>ST2 CON 15% GLUCOSA</b>	<b>72.95 ± 0.35</b>
<b>ST2 CON 5% SACAROSA</b>	<b>91.30 ± 1.97</b>
<b>ST2 CON 10% SACAROSA</b>	<b>57.00 ± 1.41</b>
<b>ST2 CON 15% SACAROSA</b>	<b>63.05 ± 1.20</b>
<b>LB1 CON 5% GLUCOSA</b>	<b>192.24 ± 6.97</b>
<b>LB1 CON 10% GLUCOSA</b>	<b>247.28 ± 14.14</b>
<b>LB1 CON 15% GLUCOSA</b>	<b>208.10 ± 11.36</b>

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Se obtuvo mayor peso de EPS capsulares en las cepas con los azúcares añadidos que sin estos. Obteniendo mayor peso de EPSc en la cepa ST2 con el 5% de concentración de glucosa teniendo un peso de 152.0 mg/L<sup>-1</sup> y con el 5% de concentración de sacarosa con un valor de 91.3 mg/L<sup>-1</sup> y la cepa LB1 con el 10% de glucosa teniendo un peso de 247.28 mg/L<sup>-1</sup>. Se observó mayor peso de EPS capsulares en las cepas con los azúcares añadidos que sin estos. Obteniendo mayor peso de EPSc en la cepa LB1 con el 10% de concentración de glucosa.

Se encontró una similitud en la concentración de azúcares añadidos en que las bacterias tuvieron mayor crecimiento y en la mayor producción de EPS totales, siendo la glucosa la que ayudo a la mayor producción de estos.

### 6.6.2 Cuantificación de carbohidratos (EPS) con la prueba de fenol sulfúrico

La cuantificación de EPS totales se realizó en las cepas elegidas las cuales fueron *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) en un medio con leche sin azúcares y en la cepa ST2 en un medio con leche y con los azúcares añadidos a las concentraciones de 5,10 y 15% de glucosa y sacarosa (Tabla 15 y 16).

**Tabla 15.** Cuantificación de los exopolisacáridos extracelulares de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) y de las cepas ST2 con 5, 10 y 15% de glucosa y sacarosa.

CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS EPSs (PRUEBA FENOL SULFÚRICO)	
CEPA	(mg/L <sup>-1</sup> )
ST2	95.50 ± 4.24
LB1	85.50 ± 4.24
ST2 CON GLUCOSA 5%	337.50 ± 15.56
ST2 CON GLUCOSA 10%	500.50 ± 7.07
ST2 CON GLUCOSA 15%	466.00 ± 9.19
ST2 CON SACAROSA 5%	240.50 ± 7.07
ST2 CON SACAROSA 10%	181.50 ± 1.41
ST2 CON SACAROSA 15%	161.50 ± 4.24

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Se obtuvo una mayor cuantificación de EPSs en las cepas con azúcares añadidos que sin estos. Presentando mayor cantidad de EPSs en la cepa ST2 con 10% de concentración de glucosa con un valor de 500.5 mg/L<sup>-1</sup> y con 5% de concentración de sacarosa con un valor de 240.5 mg/L<sup>-1</sup>.

**Tabla 16.** Cuantificación de los exopolisacáridos capsulares de las cepas *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 (ST2) y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) y de las cepas ST2 con 5, 10 y 15% de glucosa y sacarosa.

<b>CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS EPS<sub>c</sub> (PRUEBA FENOL SÚLFIRICO)</b>	
<b>CEPA</b>	<b>(mg/L<sup>-1</sup>)</b>
<b>ST2</b>	<b>17.50 ± 5.66</b>
<b>LB1</b>	<b>63.50 ± 5.66</b>
<b>ST2 CON GLUCOSA 5%</b>	<b>66.00 ± 0.71</b>
<b>ST2 CON GLUCOSA 10%</b>	<b>50.50 ± 0.71</b>
<b>ST2 CON GLUCOSA 15%</b>	<b>74.00 ± 0.71</b>
<b>ST2 CON SACAROSA 5%</b>	<b>21.50 ± 1.41</b>
<b>ST2 CON SACAROSA 10%</b>	<b>50.50 ± 0.71</b>
<b>ST2 CON SACAROSA 15%</b>	<b>55.50 ± 1.41</b>

Los resultados representan el promedio de 3 ensayos ± DE.

Se obtuvo mayor cuantificación de EPS capsulares en las cepas con azúcares añadidos que sin estos. Presentando mayor cantidad de EPS<sub>c</sub> en la cepa ST2 con 15% de concentración de glucosa con un valor de 74.0 mg/L<sup>-1</sup> y con 15% de concentración de sacarosa con un valor de 55.5 mg/L<sup>-1</sup>. Obteniendo una cuantificación de EPS total de ST2 sin azúcares de 113 mg/ L<sup>-1</sup> y de LB1 sin azúcares de 152 mg/ L<sup>-1</sup>.

El rendimiento de producción de EPS de las BAL es bajo, y varía según la cepa que los sintetiza; en el caso de la fermentación del yogur los rendimientos son los siguientes: en ST es de 53-337 mg/L y en LB es de 57-424 mg/L. En general el rendimiento de HePS oscila entre 24–600 mg/L (Vuyst *et al.*, 1998; Aznar *et al.*, 2011).

Ya existen estudios similares en yogur, por ejemplo Frengova y col (2000) revelaron en un yogur de cultivos mixtos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y obtuvieron gran cuantificación de EPS, observando que la actividad de producción es mayor cuando se cultiva en leche entera de vaca. Por otro lado demostraron que la actividad de formación de polímero de estreptococos termófilos fue menor (230-270 mg EPS / L<sup>-1</sup>) que la de los lactobacilos (400-540 mg EPS / L<sup>-1</sup>) al igual que este estudio. También observaron que los cultivos mixtos estimularon la producción de EPS en la fabricación de yogur y una concentración máxima de 720 a 860 mg EPS / L<sup>-1</sup> que se registró después de la plena coagulación de la leche. Por último dieron a conocer la estructura de monómero de los EPS formados por los cultivos iniciadores de yogur la cual consiste principalmente de los carbohidratos galactosa y glucosa (1:1), con pequeñas cantidades de xilosa, arabinosa, y / o manosa.

Estudios con resultados similares a nuestra producción de EPS fueron descritos por Ioanna y col. (2001) quienes cuantificaron de 50 a 135 mg/ L<sup>-1</sup> en LB y de 40 a 75 mg/ L<sup>-1</sup> de ST en leche; al igual que Belma y col (2006) quienes cuantificaron 211 mg/ L<sup>-1</sup> de LB y 114 mg/ L<sup>-1</sup> de ST en caldo MRS y 315 mg/ L<sup>-1</sup> de LB y 140 mg/ L<sup>-1</sup> de ST en leche; obteniendo valores superiores en LB1; al igual que Nwodo y col. (2012) los cuales cuantificaron de 57 a 424 mg/ L<sup>-1</sup> de LB y de 53 a 337 mg/ L<sup>-1</sup> de ST en leche.

Por otro lado, en base a el sitio de mayor producción de EPS tenemos que Tsvetoslava y col. (2014) analizaron bacterias halófilas las cuales alcanzaron su

máxima producción de EPS en la fase estacionaria de sus cepas, todas las cepas estudiadas fueron capaces de crecer y producir EPS en todos los sustratos ensayados, siendo el sustrato más idóneo la glucosa, y la temperatura ideal 32 °C. Estudios similares fueron realizados por Bouzar y col. (1996) los cuales indican que más del 50% de los EPS en la cepa *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNRZ 1187) se produce durante la fase de crecimiento exponencial y terminan de producirse en la fase estacionaria.

## 7. CONCLUSIONES.

Las cepas de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) ATCC 11842D-5 obtuvieron la mayor capacidad de producción de EPS.

La mayor obtención de peso de EPS extracelulares en leche semidescremada fue con 10% de glucosa.

El yogur adicionado con glucosa al 10% a temperatura de 37 °C elaborado con las cepas: *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ATCC 19258 y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* ATCC 11842D-5 (LB1) ATCC 11842D-5 presentó las mejores propiedades fisicoquímicas en cuanto pH, acidez, viscosidad, fuerza de compresión y sinéresis.

La producción y contenido de EPS así como las propiedades fisicoquímicas del yogur dependieron del tipo y concentración de la fuente de carbono así como de la temperatura de incubación.

## 8. REFERENCIAS

- Abdul Razack, S., Velayutham, V., y Thangavelu, V. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal Of Biology*, 37(3), 280-288.
- Acevedo, D., Rodríguez, A., y Fernández, A. (2010). Efecto de las variables de proceso sobre la cinética de acidificación, la viabilidad y la sinéresis del suero costeño colombiano. *Información tecnológica*, 21(2), 29-36.
- Amatayakul, T., Halmos, A.L., Sherkat, F., Shah N.P. (2006). Physical characteristics of yogurts made using exopolysaccharideproducing starter cultures and varying casein to whey protein ratios, *Int. Dairy J.* 16(8), 40–51.
- Aznar, R., Elizaquível, P., Sanchez, G., Salvador A., Fiszman S., Dueñas M.T., López P., Fernández de Palencia P. (2011) *Journal of Dairy Science*, 94, 3271-3278.
- Badel, S., Bernardi, P., Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 29(2), 54-66.
- Beal, C., Skokanova, J., Latrille, E., Martin, N., y Corrieu, G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 673-681.
- Bouzar, F., Cerning, J., y Desmazeaud, M. (1996). Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 205-211.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1), 113-130.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., y Landon, M. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters*, 10(4), 255-260.
- Condon, R., Mariné, A., y Rafecas, M. (1998). *Yogurt: elaboración y valor nutritivo*. Madrid: Fundación española de la nutrición. 17 (1) 167-169.
- Dave, R. I., Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31-41.
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International journal of food microbiology*, 126(3), 274-277.



- Díaz, J.B., Sosa, M. E., y Vélez, J. F. (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. effect of fiber addition and fat reduction on yogurt physicochemical properties. *Revista mexicana de ingeniería química*, 3(7), 287-305.
- Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., Haën, C., y Gozzini, L. (1997). Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS microbiology letters*, 153(2), 455-463.
- Doleyres Y., Schaub L., Lacroix C. (2005). Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties, *J. Dairy Sci.* 88(1), 4146–4156.
- Duboc, P., y Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Fariña, J.I., Viñarta, S.C., Cattaneo, M.M., y Figueroa, L.C. (2009). Structural stability of *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126  $\beta$ -glucan with fermentation time: a chemical, infrared spectroscopic and enzymatic approach. *Journal Of Applied Microbiology*, 106(1), 221-232.
- Feldmane, J., Ciprova, I., Semjonovs, P., y Linde, R. (2014). The influence of fermentation temperature on the development of exopolysaccharides in yoghurt production. In *9th Baltic Conference on Food Science and Technology" Food for Consumer Well-Being"*. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology. 67(2), 266-270.
- Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., y Simov, Z. I. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian journal of microbiology*, 46(12), 1123-1127.
- Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Guldager H.S., Ipsen R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yogurt cultures, *Int. Dairy J.* 16(1), 111–118.

- Güler-Akın, M. B., y Akın, M. S. (2007). Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chemistry*, 100(2), 788-793.
- Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E., y Seydim, A. C. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food control*, 16(3), 205-209.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., y Rastall, R. A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Ismail, B., Madhavan Nampoothiri, K. (2010). Exopolysaccharide production and prevention of syneresis in starch using encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 484.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F. (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *Int. J. Food Microbiol.* 40(1), 87-92.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F., Ziegler, G.R. (1998). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1), 659-664.
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., y Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83(3), 437-446.
- Lavezzari, D., Sozzi, T., y Pirovano, F. (1998). Microorganisms producing polysaccharides: differentiation between ropy and thickening strains. In *Texture of fermented milk products and dairy desserts-IDF Symposium*, 5(1), 5-6.
- Lessie, T.G., Phibbs, P.V. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilisation in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* 38(1), 359-387.
- Letisse, F., Chevallereau, P., Simon, J.L., Lindley, N.D. (2001). Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biot.* 55(1), 417-422.
- LICONSA, S., & SUS, C. D. L. L. Y. SECRETARIA DE SALUD NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea,

producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., y Broadbent, J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2147-2151.
- Mancuso-Nichols, C., Bowman, J.P., Guezennec, J. (2005). Effect of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *App. Environ. Microbiol.* 71(4), 3519-3523.
- Marshall, V. M., y Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International journal of food science & technology*, 34(2), 137-143.
- Michel, C., Beny, C., Delorme, F., Poirier, L., Spolaore, P., Morin, D., y d'Hugues. P. (2009). New protocol for the rapid quantification of exopolysaccharides in continuous culture systems of acidophilic bioleaching bacteria. *Applied Microbiology y Biotechnology*, 82(2), 371-378.
- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., y Reinheimer, J. A. (2006). Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(3), 248.
- Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., y Rezaei, K. (2006). Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organisms in freshly made yogurt. *International journal of dairy technology*, 59(1), 8-11.
- Mowry, R. W. (1963). The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue g8x and their combinations with the periodic acid-schiff reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 106(2), 402-423.

- Mozzi, F., Torino, M. I., y de Valdez, G. F. (2001). Identification of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria. In Food microbiology protocols Humana Press.8(1), 183-190.
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., y Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International immunopharmacology*, 11(12), 2246-2250.
- Nguyen, H. T., Ong, L., Kentish, S. E., y Gras, S. L. (2014). The Effect of Fermentation Temperature on the Microstructure, Physicochemical and Rheological Properties of Probiotic Buffalo Yoghurt. *Food and bioprocess technology*, 7(9), 2538-2548.
- Nwodo., Uchechukwu U. Ezekiel Green y Anthony I. Okoh. (2012). Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 14002-14015.
- Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche, 5(1), 67-87.
- Parra, R., Camargo, A. A., y Muñoz, D. L. (2012). Optimización de un medio de cultivo para la producción de exopolisacáridos durante el almacenamiento de yogurt de uchuva. *Ciencia en Desarrollo*, 3(1), 678-765.
- Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K., y Fung, D. Y. C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in applied microbiology*, 33(1), 45-49.
- Patel Anil Kumar., Philippe Michaud., Reeta Rani Singhania., Carlos Ricardo Soccol y Ashok Pandey. (2010). Polysaccharides from Probiotics: New Developments as Food Additives. *Food Technol. Biotechnol.* 48(5). 451-463.
- Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. D. J., Nascimento, R., Melo, I. S. D., y Assis, S. A. D. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(4), 710-714.
- Peña, V., Salinas, M y Ríos, S.R. (2006). Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. Ed. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. *Revista Chapingo-Horticultura*. 12(1), 159-163.

- Purwandari U., Shah N.P., Vasiljevic T. (2007). Effects of exopolysaccharide producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set type yogurt, *Int. Dairy J.* 17(1), 1344–1352.
- Qin, Q.Q., Xiong, Y.Y., Zhang, S.X., Luo, Y.B., y Hao, Y.L. (2011). Structural Characterization of the Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 and Its In Situ Application in Yogurt. *Journal Of Food Science*, 76(9), C1226-C1230.
- Radke-Mitchell, L. C., y Sandine, W. E. (1986). Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of dairy science*, 69(10), 2558-2568.
- Ramchandran, L., Nagendra P. SHAH. (2009). Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme- and  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low fat yogurt during refrigerated storage. *Dairy Sci. Technol.* 89(3), 583-600.
- Rawson, H. L., y Marshall, V. M. (1997). Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *International journal of food science & technology*, 32(3), 213-220.
- Rodríguez González, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora, 6(3), 655-667.
- Ruas-Madiedo, P., y De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of dairy science*, 88(3), 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., y Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2), 163-171.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., y Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & function*, 6(3), 679-693.
- Saarela, M. y G. Mogensen. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*: 84, 197-215.
- Sharpe, A. N., y Kilsby, D. C. (1971). A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. *Journal of applied bacteriology*, 34(2), 435-440.

- Stingle, F., Neeser, J. R., y Mollet, B. (1996). Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of bacteriology*, 178(6), 1680-1690.
- Sotolongo J. (2006). Conservación de microorganismos por liofilización. V Taller sobre Colecciones de Cultivos Microbianos, Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay, 65(3), 42-54.
- Torino, M. I., y de Valdez, G. F. (2004). Considerations to Avoid the Overestimation of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Environmental Microbiology*, Humana Press, 7(1), 125-133.
- Tsvetoslava, I. I., & Ivanov, R. (2014). Exopolysaccharides from Lactic acid Bacteria as Corrosion Inhibitors. *Journal of Life Sciences*, 8(1), 940-945.
- Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Bríñez, W., y Tovar, A. (2005). Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche. *Revista científica FCV-LUZ*, 5(1), 98-120.
- Vargas V. C. G. (2009). Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional - Michoacán), México. 6(1), 102.
- Vicente-García, V., Ríos-Leal, E., Calderón-Domínguez, G., Cañizares-Villanueva, R. O., y Olvera-Ramírez, R. (2004). Detection, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by a strain of *Phormidium* 94a isolated from an arid zone of Mexico. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(3), 306-310.
- Vuyst, D., y de Ven, V. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1059-1068.
- Wacher, C., Galvan, M. V., Farres, A., Gallardo, F., Marshall, V. M., y Garcia, M. (1993). Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *Journal of dairy research*, 60(2), 247-254.
- Wang, S. Y., Chen, K. N., Lo, Y. M., Chiang, M. L., Chen, H. C., Liu, J. R., y Chen, M. J. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the Kefir grain. *Food Microbiology*, 4(1), 543-567.

- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., y Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate polymers*, 125(1), 16-25.
- Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y., y Zhang, J. (2010). Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(1), 53-57.
- Yilmaz, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O., y Arici, M. (2015). Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics. *Journal of dairy science*, 98(3), 1604-1624.

## ANEXO A

---

### ROJO RUTENIO

#### *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*

---

5a



5b



5c



---

Imágenes de las cepas de LB en caldo MRS con rojo rutenio. 5a, cepa LB1; 5b, cepa LB2; 5c, cepa LB3. Las colonias de color rosa-blanco son las que producen EPS en su pared microbiana.



---

**ROJO RUTENIO**

***Streptococcus thermophilus***

---

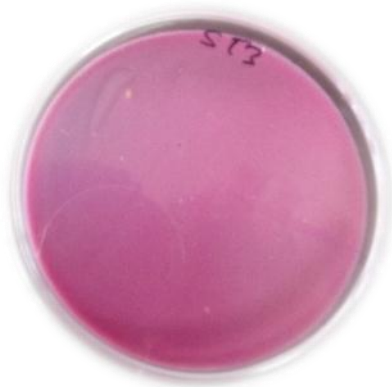
6a



6b



6c



6d

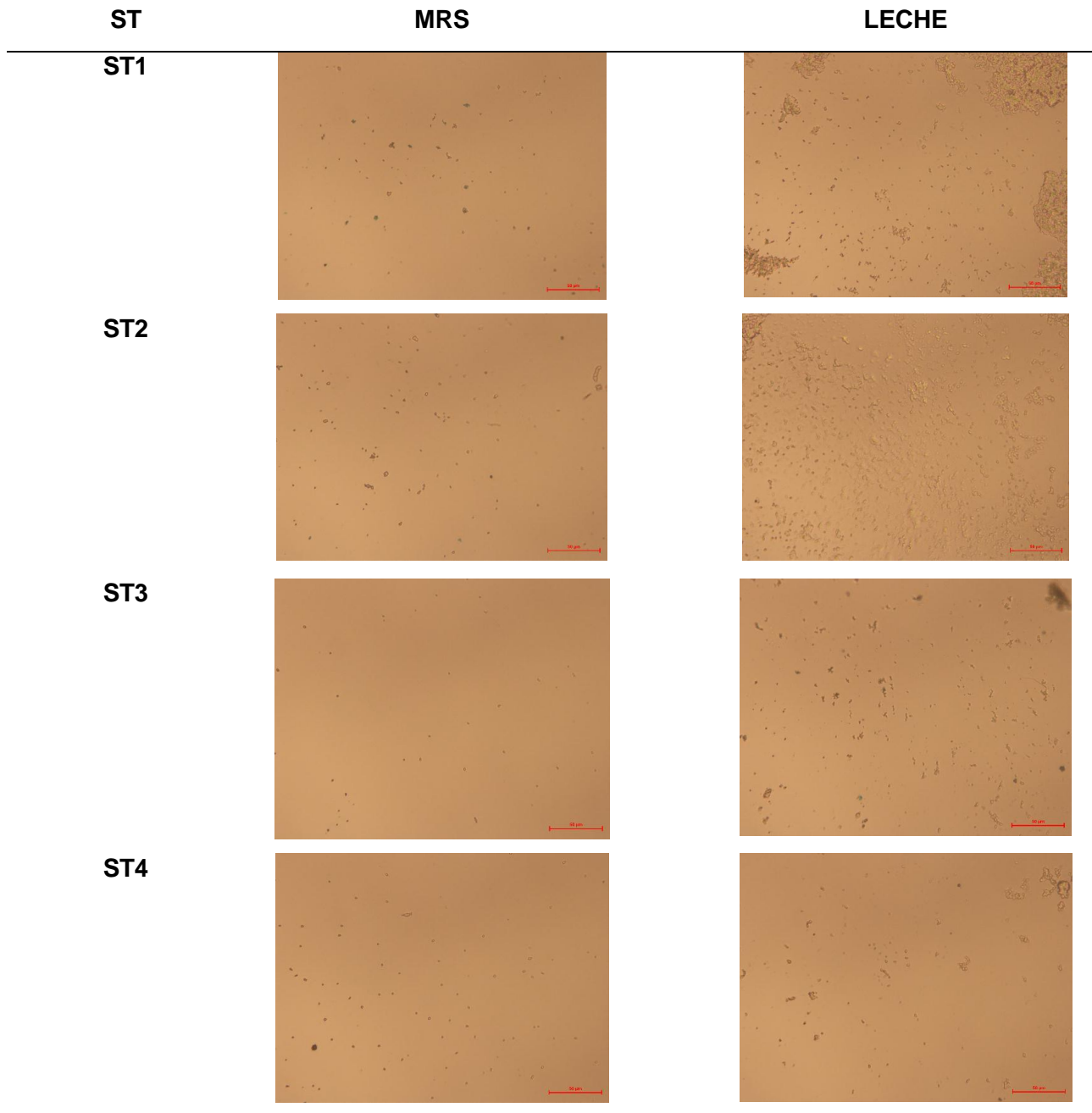


---

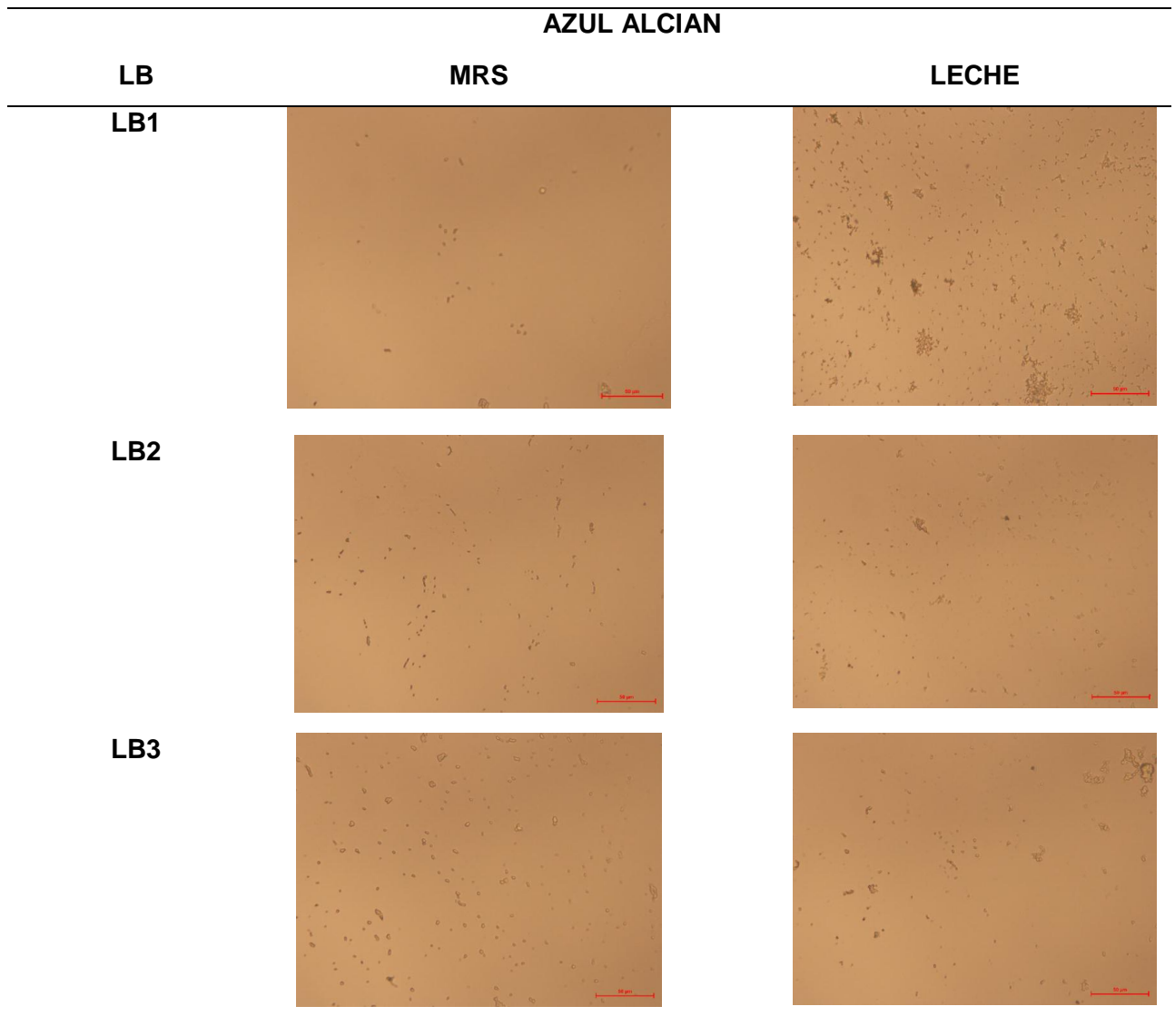
Imágenes de las cepas de ST en caldo MRS con rojo rutenio. 6a, cepa ST1; 6b, cepa ST2; 6c, cepa ST3; 6d, cepa ST4. Las colonias de color rosa-blanco son las que producen EPS en su pared microbiana.

## ANEXO B

### AZUL ALCIAN



Imágenes de las cepas de ST con azul alcian en caldo MRS y en leche.



Imágenes de las cepas de LB con azul alcian en caldo MRS y en leche.

## ANEXO C

### Leche Alpura semidescremada en polvo.

Reconstituida en 10%. Se prepara disolviendo 13.3 g en 100 mL de agua destilada. Posteriormente se esteriliza en autoclave (esterilización a vapor de agua) a 110 °C durante 10 min.

Contenido energético por 100 g de leche

Ingredientes	Cantidad g/L
Grasa	13,0 g
Proteína	29,5 g
Lactosa	46,9 g

La humedad de la leche descremada Alpura es de 3.854% BS, el pH 6.5-6.7 y densidad 1.031 g/mL. La densidad de la leche es de 1.037 a 1.038 g/mL.

La humedad se realizó por el método de la estufa de aire de acuerdo a la AOAC, 2000 para conocer la humedad de la leche en polvo, se pesó el recipiente donde colocamos posteriormente nuestra muestra, posteriormente se colocó el recipiente con la muestra en la estufa y se mantuvo a temperatura de 60 °C durante 24 h, hasta que obtuvimos dos o tres pesos constantes, la muestra se pesó ya fría. Se evaporó el agua de la muestra y se calculó la humedad por diferencia de pesos con la Ecuación 5.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{M1-M2}{\text{peso muestra}} \times 100 \dots \text{Ec. Porcentaje de Humedad (5)}$$

M1= peso recipiente más muestra húmeda

M2= peso charola más muestra seca

M= peso de la muestra

## ANEXO D

### Cepas y condiciones de cultivo

Para el presente trabajo de investigación se emplearán cepas de ST y LB utilizadas de manera habitual como cultivos iniciadores para yogur de la colección ATCC utilizadas como cultivos iniciadores de yogur.

---

#### **Género *Lactobacillus* y subespecies:**

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen) Weiss et al. (ATCC 11842D-5) (Lb1)
  - *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC 7995D) (Lb2)
  - *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Orla-Jensen) Weiss et al. (ATCC BAA-365D) (Lb3)
- 

---

#### **Género *Streptococcus* y subespecies:**

- *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla- Jensen) Farrow and Collins (ATCC 19987) (ST1)
  - *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC 19258) (ST2)
  - *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC BAA-250D-5) (ST3)
  - *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* (Orla-Jensen) Farrow and Collins (ATCC BAA-491D-5) (ST4)
- 

Las cepas se cultivarán en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Difco Laboratories, Detroit, MI, se incubarán en estufa (Binder, USA)) a una temperatura

de 37 °C durante 24 h, en condiciones anaerobias (Drago et al. 1997). El inóculo utilizado es del 5%.

La composición del caldo MRS en un litro es la siguiente:

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad g/L</b>
Peptona de proteasa no.3	10,0 g
Extracto de res	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Dextrosa	20,0 g
Polisorbato 80	1,0 g
Citrato de amonio	2,0 g
Acetato de sodio	5,0 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Fosfato dipotásico	2,0 g

### **Conservación de las cepas**

Las cepas puras de LB y ST se conservarán en caldo MRS y tubo inclinado con agar MRS en refrigeración (Mabe, México) a 4 °C. Además, se conservarán por congelación (Sanyo Biomedical Freezer, Japón) a -40 °C en tubos eppendorf de 2 mL con glicerol (agente crioprotector) al 50% hasta su utilización (Sotolongo., 2006; Rodríguez *et al.*, 2007; Giono., 2010).

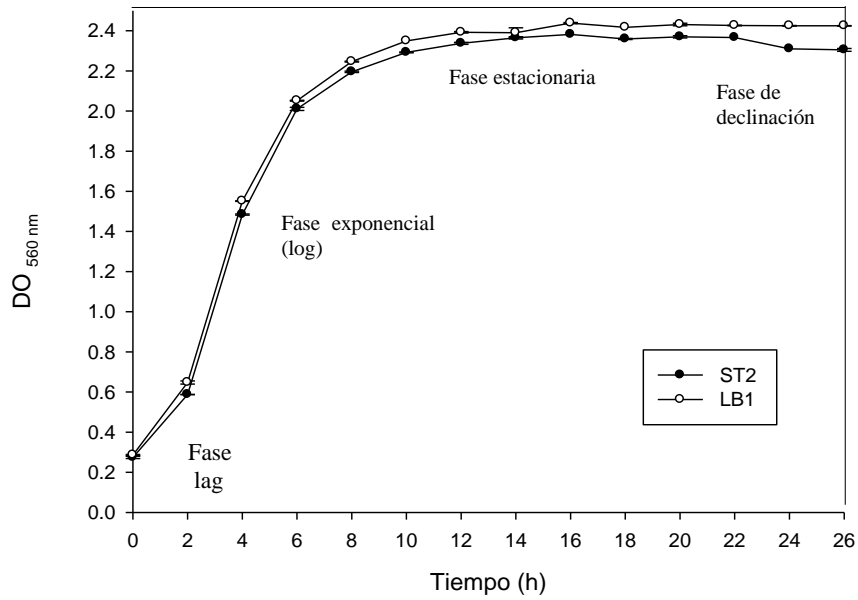
### **Recuento de bacterias viables-conteo en microgota**

Este método ofrece la ventaja de cuantificar solo a las bacterias viables presentes en una muestra. Implican la dilución seriada de la muestra en agua, caldo o solución salina, la inoculación de la dilución en medio de cultivo sólido y la incubación durante 24 a 48 h a la temperatura apropiada y en placa son métodos de estimación de bacterias viables en término de unidades formadoras de colonias (UFCs).

Se incubó la cepa en caldo MRS por 24 h a 37 °C, se centrifugó la suspensión con el microorganismo para ajustar las Ab (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0) en caldo MRS (DO 560 nm), se tomó posteriormente 1 mL y se colocó en un micro tubo estéril, se procedió a tomar 100 µl del tubo anterior y se homogenizo con 900 µl de solución salina previamente colocados en otro tubo. Se repite hasta realizar las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  y se procede a homogenizar. Se tomaron 10 µl de las diluciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  y se colocó una gota en una placa de agar MRS previamente preparada (agar bacteriológico 1.2 g/100 mL, caldo MRS 5.5 g/100 mL), se dejó secar y se colocó a 37 °C por 24 h. Se realizó por triplicado (Sharpe *et al.*, 1971).

## ANEXO E

### Cinéticas de crecimiento a temperatura de 37 °C de las cepas ST2 y LB1 en caldo MRS.



Cinéticas de crecimiento de 26 h de las cepas ST2 y LB1 en caldo MRS (Ab 560 nm) a la temperatura de 37 °C.



# ANEXO F

## Póster XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.



### PROPIEDADES FISIQUÍMICAS DE YOGUR ELABORADO CON CEPAS PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS BAJO DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

Maribel Jiménez-Fernández, Beatriz Baizabal-Vargas, María Guiomar Melgar-Lalanne.

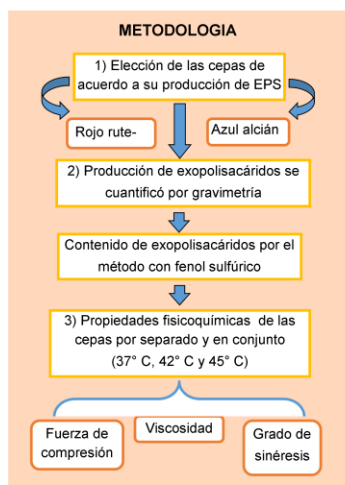
Posgrado en Ciencias Alimentarias, Instituto Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz 91190 México; marijfe@hotmail.com.



**INTRODUCCIÓN:** Los Exopolisacáridos (EPS) son polímeros extracelulares que pueden ser encontrados de dos formas ya sea adjunto a la pared de la célula en forma de capsula o extracelular donde es secretado en el entorno de forma mucosa, presentando beneficios tecnológicos y de salud. La producción de exopolisacáridos depende del tipo de cepa y de las condiciones del medio.

**OBJETIVO GENERAL:** Analizar la variación en la producción de EPS de cultivos iniciadores de yogur (cuatro cepas de *Streptococcus thermophilus* y tres cepas *Lactobacillus bulgaricus*).

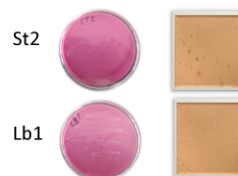
**CONCLUSIONES:** La producción y contenido de exopolisacáridos dependerá de la fuente de carbono así como la concentración de este. Y las propiedades fisicoquímicas a las distintas temperaturas mostraron diferencias significativas a la temperatura de 45° C siendo estas menos favorables para el yogur a comparación con las otras dos temperaturas las cuales no mostraron diferencias entre estas.



### RESULTADOS

1) Se eligieron las cepas de *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 y de *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842D-5.

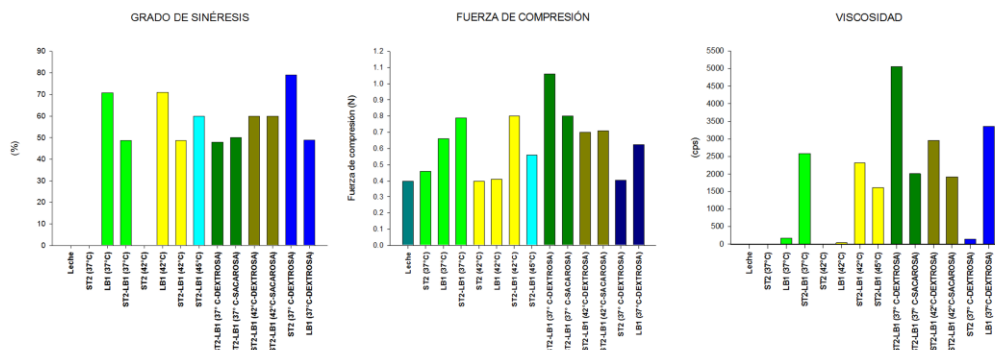
CEPAS	ROJO RUTENIO	AZUL ALCIAN
ST1	POS (+)	(+++)
ST2	POS (+)	(++++)
ST3	NEG (-)	(+)
ST4	NEG (-)	(+)
LB1	POS (+)	(++++)
LB2	NEG (-)	(++)
LB3	POS (+)	(++)



2) St2 produce más polisacáridos extracelulares y Lb1 produce más polisacáridos capsulares.

EPS TOTALES EN LECHE DESCREMADA			Cuantificación de carbohidratos (EPS totales) en leche descremada	
Cepas	Peso	Cuantificación	ATCC 19258 (10% dextrosa)	ATCC 19258 (5% sacarosa)
(St2) ATCC 19258	260.5 mg/L <sup>-1</sup>	113 mg/L <sup>-1</sup>	551 mg/L <sup>-1</sup>	262 mg/L <sup>-1</sup>
(Lb1) ATCC 11842D-5	40.5 mg/L <sup>-1</sup>	152 mg/L <sup>-1</sup>		

3) El yogur realizado a 37° C presentó mejores propiedades fisicoquímicas.



### REFERENCIAS

Uchchukwu U. Nwodo, Ezekiel Green and Anthony I. Okoh. (2012). Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002-14015. S. Badel, T. Bernardi, P. Michaud. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 54-66. Anil Kumar Patel, Philippe Michaud, Reta Rani Singhania, Carlos Ricardo Socol and Ashok Pandey. (2010). Polysaccharides from Probiotics: New Developments as Food Additives. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 451-463. Mozzi, F., Torino, M. I., & de Valdez, G. F. (2001). Identification of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria. In *Food microbiology protocols* (pp. 183-190). Humana Press. Lavezzari, D., Sozzi, T., & Pirovano, F. (1998). Microorganisms producing polysaccharides: differentiation betweenropy and thickening strains. In *Texture of fermented milk products and dairy desserts-IDF Symposium, Vicenza (Italy)*, 5-6 May 1997. IDF.