



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

**PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS A
PARTIR DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS
UTILIZANDO TUSA DE MAIZ COMO FUENTE DE
CARBONO**

JISSEL MARIANA ARMOA ROJAS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Mes – 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

Maestría en Biotecnología Industrial

**PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS A
PARTIR DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS
UTILIZANDO TUSA DE MAIZ COMO FUENTE DE
CARBONO**

JISSEL MARIANA ARMOA ROJAS

Orientador: **José Manuel Bruno Bárcena, Ph. D.**

Co Orientador: **Francisco Paulo Ferreira Benítez, MSc.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY

Mes – 2020

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)
DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

Dejar en blanco ésta página que será destinada para el registro del depósito de la tesis en la biblioteca de la FACEN.

**PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS A PARTIR DE BACTERIAS
ACIDO LACTICAS UTILIZANDO TUSA DE MAIZ COMO FUENTE DE
CARBONO**

Jissel Mariana Armoa Rojas

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial.

Fecha de aprobación: de de 2020.

MESA EXAMINADORA

MIEMBROS:

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Autónoma de Barcelona, España

Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de la Pampa, Argentina

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha de de 2019.

Prof. MSc. Andrea Weiler
Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres

José Armoa y Ana Rojas, a mi familia y a todas las personas que confiaron y me dieron una oportunidad de continuar en esta labor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial. Al Gerente General de la empresa Control Unión Py y a la Gerente del Laboratorio por brindar el espacio necesario para llevar a cabo este proyecto.

PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS A PARTIR DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS UTILIZANDO TUSA DE MAIZ COMO FUENTE DE CARBONO

Autor: Lic. Jissel Mariana Armoa Rojas
Orientador: Dr. José Manuel Bruno Bárcena, Ph. D.
Co Orientador: Prof. MSc. Francisco Paulo Ferreira Benítez

RESUMEN

Los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas han despertado un gran interés en distintos ámbitos industriales, mejoran de las propiedades físicas de los productos lácteos fermentados, tienen propiedades médicas, cumplen un rol como crioprotectores haciendo viables en la aplicación como prebióticos y/o en la preservación de probióticos. La producción de EPS implica un alto costo debido a los requerimientos nutricionales de las BAL, el objetivo de este trabajo es la producción de EPS por BAL utilizando hidrolizado de tusa de maíz como medio alternativo al medio de cultivo MRS. Se emplearon las cepas *L. plantarum* ATCC 8014 y *L. rhamnosus*, en distintos niveles de pH, temperatura y tiempo de incubación en condiciones estáticas. Para la cepa *L. plantarum* ATCC 8014 existe una diferencia significativa en la producción de EPS utilizando hidrolizado de tusa de maíz en comparación al medio de cultivo MRS, la temperatura de producción óptima en el hidrolizado fue de 30°C pH 6,5 y 48 horas de incubación (1,309 g/L); la producción de EPS por *L. rhamnosus* no mostró diferencia significativa entre los medios empleados, la temperatura óptima de producción en el hidrolizado fue de 37°C, pH 6,5 y 48 horas de incubación (1,629 g/L) El carbohidrato total de los EPS obtenidos en las condiciones mencionadas fueron de 83,18% y 80,73% para *L. rhamnosus* y *L. plantarum* ATCC 8014 respectivamente. La evaluación crioprotectora sobre la cepa *E.coli* ATCC 25922, mostró que el EPS producido por *L. rhamnosus* mantiene mejor la viabilidad de las células en un plazo de 168 horas de congelamiento. La tusa de maíz puede ser considerada como una fuente de carbono aplicable en la producción de EPS por BAL para sus distintas aplicaciones, en una producción sostenible y de bajo costo.

Palabras claves: Exopolisacáridos, Bacterias ácido lácticas, tusa de maíz, crioprotectora.

Título del trabajo de investigación en inglés

Author: Lic. Jissel Mariana Armoa Rojas
Advisor: Dr. José Manuel Bruno Bárcena, Ph. D.
Co Advisor: Prof. MSc. Francisco Paulo Ferreira Benítez

SUMMARY

The exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria had woken a great interest on the different industrial areas, they improve the physical properties of fermented dairy products, they have medical properties, play an important role as cryoprotectors making them viables in the application as prebiotics and/or the preservation of these prebiotics. The EPS production implies a high cost due to the BAL nutritional requirements, this work objective, is the production of EPS by LAB, using hydrolyzed corn-cob as an alternative to the MRS culture. *L. plantarum* ATCC 8014 and *L. rhamnosus* strains were used on different pH, temperature and incubation time under static conditions. For the *L. plantarum* ATCC 8014 strain, there is a significative difference in the EPS production, using hydrolized corn-cob on comparison to the culture medium MRS, the optimal production temperature in the hydrolizate was 30°C, pH 6.5 and 48 hours of incubation (1.309 g/L); the EPS production by *L. rhamnosus* did not show a significative diferente between the employed medium, the optimal temperature in the hydrolizate was 37°C, pH 6,5 and 48 hours of incubation (1,629±g/L). The EPS total carbohydrate obtained under the mentioned conditions was of 83,18% and 80,73% for the *L. rhamnosus* y *L. plantarum* ATCC 8014 respectively. The cryoprotective evaluation on the *E.coli* ATCC 25922 strain showed that the EPS produced by *L. rhamnosus* improves the viability of the cells within 168 hours of freezing. The corn-cob can be considered as a carbon source applicable in the EPS production by LAB for its different applications, in a low cost and sustainable production.

Keywords: Exopolysaccharides, Lactic Acid Bacteria, corn-cob, cryoprotector.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.2	Pregunta de investigación	3
1.3	Justificación.....	3
1.4	Objetivos.....	4
1.4.1	Objetivo General.....	4
1.4.2	Objetivos Específicos.....	4
1.5	Hipótesis.....	5
2	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1	Generalidades.....	5
2.1.1	Generalidades de las bacterias ácido lácticas.....	5
2.1.2	Bacterias ácido lácticas como probióticos.....	10
2.1.3	Taxonomía de las bacterias ácido lácticas.....	12
2.1.4	Clasificación de las bacterias ácido lácticas.....	14
	1. Homofermentativas estrictas.....	15
	2. Heterofermentativas estrictas.....	16
	3. Heterofermentativas facultativas.....	16
2.2	Género <i>Lactobacillus</i>	18
2.2.1	Composición de la pared celular de los Lactobacilos.....	20
	a) Peptidoglicanos.....	20
	b) Ácidos teicoicos.....	21
	c) Capas.....	S-
Layer.....	d) Polisacáridos.....	23
celular.....	de pared.....	24
2.2.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	26
2.2.3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	28
2.3	Exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas.....	30
2.3.1	Clasificación de los Exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas.....	32
	a) Homopolisacáridos.....	32
	b) Heteropolisacáridos.....	36
2.3.2	Funciones y Aplicaciones de los EPS.....	40
3.	METODOLOGÍA	45
3.1	Diseño y tipo de Investigación.....	45
3.2	Muestreo.....	45
3.3	Análisis proximal del sustrato.....	45
3.3.1	Determinación de Humedad (Método Oficial GAFTA 2:1:2014).....	45
3.3.2	Determinación del porcentaje de Proteína, mediante el método de Kjeldahl (Método oficial GAFTA 4:1:2014).....	46
3.3.3	Determinación de fibra total (Método oficial GAFTA 9:0:2014).....	47
3.3.4	Determinación de Cenizas (Método oficial GAFTA 11:0:2014).....	48
3.3.5	Determinación de carbohidratos totales.....	48
3.4	Preparación del hidrolizado de tusa de maíz.....	49
3.5	Preparación de inóculos.....	50
3.6	Determinación de azúcares totales en el hidrolizado.....	50

3.7	Determinación de glucosa total en el hidrolizado	51
3.8	Determinación de azúcares reductores en el hidrolizado.....	52
3.9	Determinación de fenoles totales en el hidrolizado	53
3.10	Producción de exopolisacáridos utilizando como medio el hidrolizado de la tusa de maíz.....	54
3.11	Extracción, pre-purificación y cuantificación de EPS.	55
3.12	Técnicas de análisis y procesamiento de la información.	55
3.13	Evaluación de la capacidad crioprotectora del EPS.....	56
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1	Análisis proximal de la tusa de maíz.....	57
4.2	Obtención de azúcares fermentables por medio de hidrólisis ácida del sustrato	59
4.2.1	Carbohidratos totales en el hidrolizado.....	59
4.2.2	Glucosa total en el hidrolizado.....	61
4.2.3	Azúcares reductores totales en el hidrolizado.....	62
4.3	Fenoles totales en el hidrolizado.....	64
4.4	Producción de exopolisacáridos.....	66
4.5	Análisis y procesamiento de los datos.....	81
4.6	Carbohidratos totales en Exopolisacáridos.....	91
4.7	Capacidad crioprotectora del EPS.....	93
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	95
5.1	Conclusiones.....	95
5.2	Recomendaciones.....	96
6.	BIBLIOGRAFIA.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de actividad probiótica	11
Figura 2. Visión mecanicista de las acciones probióticas por lactobacilos.....	13
Figura 3. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	16
Figura 4. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido láctica.....	17
Figura 5. Esquema representativo del peptidoglicano de <i>L. casei</i>	21
Figura 6. Esquema representativo de TA de pared celular.	23
Figura 7 Esquema general de la envoltura de Gram Positivas.....	26
Figura 8. Clasificación de los HoPS producidos por <i>Lactobacillus</i> spp.....	36
Figura 9. Clasificación de los HePS producidos por <i>Lactobacillus</i> spp.	39
Figura 10. Representación esquemática de las interacciones cruzadas microbianas establecidas entre los productores de EPS, los degradadores de EPS y los consumidores de OS-MS en el entorno intestinal.	41
Figura 11. Curva de Calibración para Ensayo de Carbohidratos totales en el hidrolizado.....	
Figura 12. Curva de Calibración para Ensayo de Azúcares reductores totales en el hidrolizado.....	
Figura 13. Curva de Calibración para Ensayo de Fenoles Totales.	
Figura 14. Producción de EPS por <i>L. plantarum</i> en hidrolizado de tusa de maíz, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.	
Figura 15. Producción de EPS por <i>L. plantarum</i> en medio de cultivo MRS, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.	
Figura 16. Producción de EPS por <i>L. rhamnosus</i> en hidrolizado de tusa de maíz, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.	
Figura 17. Producción de EPS por <i>L. rhamnosus</i> en medio de cultivo MRS, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.	
Figura 18. Curva de Calibración para Ensayo de carbohidratos totales de los EPS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Uso de Bacterias ácido lácticas en la industria Alimenticia.	7
Tabla 2 Ejemplos de alimentos disponibles actualmente que contienen cepas de <i>Lactobacillus</i>	9
Tabla 3 Resultados de los análisis fisicoquímicos de la tusa de maíz.	54
Tabla 4 Resultado de la cuantificación de carbohidratos totales en el hidrolizado. ..	55
Tabla 5 Resultado de la cuantificación de glucosa total en el hidrolizado.	56
Tabla 6 Resultado de la cuantificación de azúcares reductores en el hidrolizado.	58
Tabla 7 Resultado de la cuantificación de fenoles totales en el hidrolizado.....	59
Tabla 9. Resultados obtenidos de la fermentación de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 en medio de cultivo MRS	
Tabla 10. Resultados obtenidos de la fermentación de <i>L. rhamnosus</i> en hidrolizado de tusa de maíz.....	
Tabla 11. Resultados obtenidos de la fermentación de <i>L. rhamnosus</i> en medio de cultivo MRS	
Tabla 12. Pruebas de normalidad variable exopolisacáridos producidos por <i>L. plantarum</i> ATCC8014 según tratamiento aplicado	
Tabla 13. Estadísticos de prueba <i>L. plantarum</i> ATCC8014	
Tabla 14. Modelos predictivos para medir los exopolisacáridos producidos por <i>L. plantarum</i> ATCC8014	
Tabla 15. Tabla de coeficientes <i>L. plantarum</i> ATCC8014	
Tabla 16. Descriptivos variable original vs modelo predictivo <i>L. plantarum</i> ATCC8014.....	
Tabla 17. Pruebas de normalidad variable exopolisacáridos producidos por <i>L. rhamnosus</i> según tratamiento aplicado	
Tabla 18. Estadísticos de prueba <i>L. rhamnosus</i>	
Tabla 19. Modelo predictivo para medir los exopolisacáridos producidos por <i>L. rhamnosus</i>	
Tabla 20. Coeficientes del modelo predictivo para los exopolisacáridos producidos por <i>L. rhamnosus</i>	
Tabla 21. Descriptivos variable original vs modelo predictivo <i>L. rhamnosus</i>	
Tabla 22. Carbohidratos totales en exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas.....	
Tabla 23. Resultados obtenidos en los ensayos de crioprotección.....	

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

GRAS	Generally recognized as safe (Generalmente reconocido como seguro)
EPS	Exopolisacáridos
BAL	Bacterias ácido lácticas
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
QPS	Qualified Presumption of Safety (Presunción calificada de seguridad)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ISAPP	Asociación Científica Internacional para los Probióticos y Prebióticos
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMP	Vía Embden-Meyerhof-Parnas
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
WD	Ruta Warburg-Dickens
CO₂	Dióxido de carbono
PG	Péptido Glicano
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
MurNAc	N-acetil-D-murámico
TAs	Ácidos teicoicos
WTA	Wall teicoic acids (ácidos teicoicos de pared)
LTA	Lipoteic acids (ácido lipoteicoico)
WPC	Wall polysaccharides cell (polisacáridos de pared celular)
GalNAc	N-acetilgalactosamina
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
ADN	Acido desoxirribonucleico
HoPS	Homopolisacáridos
HePS	Heteropolisacáridos
GH	Glicosilhidrolasas
GS	Glucansacrasas
FS	Fructansacararas
EC	Comisión de Enzimas
UDP	Uridina 5'- difosfato
GTF	Glicosiltransferasa
g/L	Gramos por litro
Da	Dalton
GG-CaCl₂	Solución de Goma Gellan con cloruro de calcio
mm	Milímetro
°C	Grados Celsius
GAFTA	Grain and Feed Trade Association (Asociación del comercio de granos y alimentos)
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de Sodio
mg	Miligramos

rpm	Revoluciones por minuto
p/v	Proporción peso/volumen
µm	Micrómetro
ATCC	American Type Culture Collection
DO	Densidad óptica
MRS	Medio de cultivo Man, Rogosa, Sharpe
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
mg/mL	Miligramos por mililitro
µg/mL	Microgramos por mililitro
UFC	Unidad formadora de colonia
CPS	Polisacárido capsular

1. INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos se encuentran ampliamente en plantas, bacterias, hongos, algas y animales. Debido a su disponibilidad inmediata y propiedades reológicas (propiedades de viscosidad, plasticidad y elasticidad), los polisacáridos representan una clase de polímeros de alto valor con muchas aplicaciones industriales en las industrias alimentaria, cosmética, textil y farmacéutica. Una de esas aplicaciones es su uso como emulsionantes, estabilizadores y mejoradores de textura en la industria alimentaria (Pan & Mei, 2010).

En los últimos años, una creciente cantidad de evidencia sugiere que algunos polisacáridos aislados de fuentes microbianas cultivables tienen capacidades antioxidantes y baja citotoxicidad, estas características son de gran importancia y pueden reemplazar a los antioxidantes sintéticos (Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018).

Diferentes grupos bacterianos tienen la capacidad de producir Exopolisacáridos (EPS) de cadena larga que consisten en unidades ramificadas y repetitivas de azúcares en proporciones variadas, localizados fuera de la célula, y de entre ellos las bacterias ácido lácticas consideradas microorganismos de grado alimentario y clasificadas GRAS (*Generally recognized as safe*), estos han despertado un interés creciente en las áreas de investigación y producción industrial debido a su papel biotecnológico central en procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal (Pham *et al.*, 2000).

Los exopolisacáridos generados por las bacterias ácido lácticas (BAL) contribuyen a la reología y textura específica de los productos lácteos fermentados. Estos exopolisacáridos son aditivos seguros para nuevas formulaciones alimentarias y pueden tener aplicaciones alternativas en productos no alimentarios (Badel *et al.*, 2011)

Además, han ganado considerable atención en la industria láctea fermentada debido a su posible aplicación como viscosificadores, texturizadores y agentes emulsionantes. También poseen actividades antitumorales, inmunoestimulantes y de activación de macrófagos y linfocitos (Lin & Chien, 2007).

La optimización de los factores de crecimiento y la composición de los medios son criterios a considerar para la producción máxima de EPS por las cepas BAL. Teniendo en cuenta una producción más limpia de exopolisacáridos bacterianos con amplias aplicaciones industriales, este trabajo tiene como objetivo la evaluación de la capacidad de producción de exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas en un medio preparado a partir de desecho agroindustrial, tusa de maíz, como fuente de carbono.

Autores como (Misra *et al.*, 2013) han utilizado hidrolizado de tusa de maíz para producción de biomoléculas con cepa de *Candida tropicalis*, beneficiando además el costo de producción, en distintas condiciones como rangos de temperaturas, pH y tiempo de fermentación para el crecimiento y desarrollo de las BAL que favorezcan la optimización de dicha producción.

1.1 Planteamiento del problema

Las bacterias ácido lácticas son empleadas en fermentaciones industriales y están recibiendo gran interés al ser empleadas por la industria farmacéutica y de alimentos; estas bacterias se caracterizan por sus amplios requerimientos nutricionales especialmente con respecto a fuentes de nitrógeno.

Se ha demostrado que el crecimiento bacteriano se ve limitado por la disponibilidad de nutrientes esenciales, muchas cepas productoras de exopolisacáridos han sido estudiadas ampliamente, por ejemplo, la cepa *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus delbrueckii*, aislados de productos lácteos fermentados.

La producción de Exopolisacáridos a partir de estas bacterias ácido lácticas es inestable, esta característica ha sido observada por varios investigadores, donde se ha encontrado que estos microorganismos ganan y/o pierden la capacidad de producir biopolímeros de manera azarosa, además, se ha observado que los estreptococos lácticos pierden la capacidad de formar Exopolisacáridos cuando sobrepasan 12 transferencias periódicas, así también en distintos medios de cultivos empleados.

Esta inestabilidad es una desventaja que se presenta en los procesos industriales, ya sea para el empleo de la biomasa o de los Exopolisacáridos, además a esto se suma el costo elevado de los medios de cultivos empleados para la producción de estos biopolímeros (Klaenhammer *et al.*, 2005).

1.2 Pregunta de investigación

¿Es factible la producción de exopolisacáridos de bacterias lácticas con elevada producción utilizando tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional a escala laboratorial?

1.3 Justificación

Las bacterias ácido lácticas son consideradas microorganismo de grado alimenticio clasificadas como GRAS, existen en una gran variedad de nichos ecológicos donde compite con otros microorganismos por sobrevivir y evolucionar en la microbiota dominante como en bebidas y alimentos fermentados.

Las BAL, conocidos así por su abreviatura, producen sustancias químicas que crean un ambiente desfavorable para microbiotas competidoras; muchas de las bacterias BAL producen Exopolisacáridos, estos biopolímeros microbianos están desplazando a los obtenidos tradicionalmente de plantas y algas, las razones de esto es que se puede obtener una gran diversidad de estructuras.

El uso de estos Exopolisacáridos recibe una gran atención ya que pueden ser empleados en distintas áreas, como en la farmacéutica, actúa como agentes antivirales y antitumorales, en la industria de alimentos como aditivos, bioespesantes

para mejorar la textura y consistencia de los productos, agentes texturizantes y gelificantes.

En la extracción del petróleo los Exopolisacáridos microbianos se emplean en el llenado y en el proceso de recuperación del mismo actuando como espesante, también son empleados en la fabricación de recubrimientos comestibles cuya función es aumentar la vida útil del producto, los alginatos bacterianos se emplean en la industria textil, mientras en biorremediación son utilizados por su capacidad quelante formando complejos con metales pesados.

Es de gran interés encontrar especies de bacterias ácido lácticas nativas capaces de producir exopolisacáridos con igual o mejores propiedades reológicas que las previamente descritas, evaluar las condiciones más óptimas de producción y aplicar otras funciones como la crioprotección.

Los Exopolisacáridos representan un rol importante para la supervivencia y desarrollo de microorganismos, debido a que les proporcionan crioprotección en alta salinidad y bajas temperaturas. Y juntos los EPS y los microorganismos forman biopelículas que le confieren resistencia a una variedad de desafíos estresantes incluyendo antibióticos, cambios osmóticos, limitaciones de nutrición, los fagocitos y la exposición a la radiación (Alvarado, 2015).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Optimizar la producción de exopolisacáridos con cepas BAL utilizando tusa de maíz como fuente de carbono en el medio de cultivo.

1.4.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar análisis proximal del sustrato (fibra total, humedad, cenizas, proteínas, carbohidratos).
- b) Obtener azúcares solubles fermentables a partir del sustrato por medio de hidrólisis.

- c) Optimizar la producción de exopolisacáridos utilizando como fuente de carbono un residuo agroindustrial, tusa de maíz.
- d) Evaluar el pH, el tiempo de fermentación y la temperatura óptima del medio de cultivo utilizando como fuente de carbono tusa de maíz para la producción de exopolisacáridos bacteriano.
- e) Determinar la cantidad de exopolisacáridos producidos y la actividad crioprotectora del mismo.

1.5 Hipótesis

H₀= No es factible la producción de exopolisacáridos de bacterias lácticas con elevada producción utilizando tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional.

H_a= Es factible la producción de exopolisacáridos de bacterias lácticas con elevada producción utilizando tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

2.1.1 Generalidades de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas o bacterias ácido-lácticas (BAL) han despertado gran interés en el transcurso de los años por sus amplias aplicaciones en la industria farmacéutica y la industria de alimentos. Por medio de fermentaciones con bacterias ácido lácticas, se ha buscado producir y obtener ácido láctico, bacteriocinas, espesantes, componentes saborizantes y aislar cepas que puedan ser empleadas como probióticos (De Vos & Hugenholtz, 2004; Topisirovic *et al.*, 2006; Wilches Flórez, 2005).

Elie Metchnikoff, investigador microbiólogo del siglo XIX, es considerado como el “descubridor” oficial de los microorganismos vivos beneficiosos para la salud brindó una conferencia en Manchester sobre “*Flora and the human body*” en 1901, que después de estudiar y realizar varios ensayos sobre la relación entre las

BAL y el proceso digestivo del ser humano, sugirió que algunas infecciones gastrointestinales podrían mejorar si se emplean las BAL presentes en alimentos fermentados como el yogurt.

Obtuvo el Nobel de Medicina en 1908 por su descubrimiento acerca de la relación del mecanismo de acción de las leches fermentadas y de los efectos benéficos que presentaban sobre el organismo humano (Ribera Casado, 2017).

Metchnikof logró demostrar que la fermentación del yogur era posible por la acción de bacterias en forma de bastoncitos, que eran capaces de convertir el azúcar de la leche en ácido láctico; la sustancia resultante prevenía el desarrollo en el intestino de microorganismos dañinos que surgen tras la descomposición de alimentos. También logró aislar en laboratorio lo que él llamó “bacterias buenas” (Anukam & Reid, 2007; Vilagravel *et al.*, 2010).

Metchnikoff propuso que el envejecimiento es consecuencia de la acción de las sustancias tóxicas producidas por la microbiota intestinal y sugirió que la ingestión de bacilos que se encontraban en los alimentos lácticos podía bloquear estas toxinas y prolongar la vida (Ribera Casado, 2017).

Las BAL han sido reconocidas, desde hace mucho tiempo, como microorganismos benéficos en los alimentos y por su importancia en la salud, evita que microorganismos patógenos puedan proliferar, estimulan el sistema inmunológico contribuyen a la mejora del tracto gastrointestinal de los seres humanos (Anukam & Reid, 2007).

El descubrimiento de la acción que tienen las bacterias ácido lácticas sobre la leche probablemente fue de manera accidental, pero desde años el hombre las emplea para la conservación de sus alimentos, su utilización se hace permanente en la actualidad en forma de cepas o cultivos iniciadores (Vásquez M. *et al.*, 2009).

Las BAL son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, una de las principales es la fermentación de alimentos como leche, carne y vegetales. Estas bacterias han sido estudiadas por siglos en la industria de alimentos para la producción de alimentos fermentados como el yogurt, carnes maduradas, embutidos, panes con levadura de cerveza, té, salsa de soja, café, ensilaje, cacao, masa fermentada, tabla 1 (Parra Huertas, 2010).

Tabla 1: Uso de Bacterias ácido lácticas en la industria Alimenticia. Fuente: (Parra Huertas, 2010)

OBJETIVO	PRUEBAS QUE SE REALIZAN
Fermentación de la leche	<ul style="list-style-type: none"> -Efecto sobre el aroma/textura. -Velocidad de acidificación (a diferentes temperaturas). -Compatibilidad con otras cepas. -Actividad proteolítica. -Halo-tolerancia. -Estabilidad en sus características. -Resistencia a la aglutinación.
Producción de cultivos	<ul style="list-style-type: none"> -Rendimiento en la fermentación. -Mantenimiento de la viabilidad/actividad durante el proceso de fabricación. -Estabilidad en la forma liofilizada/congelada. -Actividad en forma de cultivos para inoculación directa

Así mismo las BAL son empleadas en la producción de bebidas como el vino, la sidra y la cerveza, dada a su actividad metabólica las bacterias ácido lácticas proporcionan algunas propiedades deseadas tales como sabores, aromas, modificación de la textura, protección contra el deterioro ocasionado por otros microorganismos y aumentan la calidad nutritiva (Korakli & Vogel, 2006; Savadogo *et al.*, 2004).

Las BAL son originarias de la antigua y tradicional fermentación artesanal de alimentos. La fermentación láctica está directamente relacionada con la industria tradicional de leches fermentadas, con la industria de procesos fermentativos, así como con la industria de cultivos starter; por tanto, las bacterias lácticas son ampliamente empleadas (Piard *et al.*, 1999a).

En las últimas décadas, las investigaciones se fueron centrando en la fisiología y la genética de las BAL, en vista que poseen un diverso potencial metabólico, que es específico para cada especie, el cual varía desde la formación de compuestos precursores del sabor hasta la excreción de compuestos antimicrobianos como bacteriocinas capaces de inhibir algunos microorganismos que son patógenos causantes de enfermedades e infecciones por alimentos y microorganismos esporulados (Korakli & Vogel, 2006).

Las BAL como cultivos iniciadores (starter) cumplen varias funciones en los alimentos, la principal es la seguridad higiénica a través de la acidificación del producto a un pH próximo a 4 por medio de la producción de ácidos orgánicos, mayoritariamente el ácido láctico, creando un ambiente desfavorable para el desarrollo de otros microorganismos (Piard *et al.*, 1999b).

Otros ácidos orgánicos de cadena corta como el acético también son producidos por especies BAL, igualmente la estabilidad durante el almacenamiento y el desarrollo de propiedades organolépticas de los alimentos fermentados, por medio de la producción de un gran número de enzimas glicolíticas, lipolíticas y proteolíticas, las BAL transforman los nutrientes fundamentalmente de los productos agrícolas en compuestos con propiedades organolépticas complejas (Boyaval *et al.*, 2001; G Jan *et al.*, 2002; Gwénaél Jan *et al.*, 2000).

En la actualidad se emplean cultivos iniciadores comerciales para la elaboración de diversos alimentos (Tabla 2), estos cultivos han sido aislados y seleccionado bajo ciertas propiedades deseadas para el producto final tales como la producción de aromas y sabores (Karimi *et al.*, 2012; Vásquez M. *et al.*, 2009).

Se siguen realizando alimentos fermentados sin tener manejo o conocimiento de los microorganismos involucrados como es el caso del queso artesanal, sin embargo, no todas las cepas que constituyen la microbiota presente en el queso artesanal cumple una función relevante en las propiedades deseadas del producto, por

ello la importancia de aislar y caracterizar cepas autóctonas de bacterias ácido lácticas (Pavunc *et al.*, 2012).

Tabla 2: Ejemplos de alimentos disponibles actualmente que contienen cepas de *Lactobacillus*. Fuente: (Campos & Mena, 2012).

FABRICANTE	NOMBRE DE LA MARCA	CEPAS
Danone	Actimel	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> DN-114 001 (<i>L. casei</i> <i>Immunitas(s)</i> /Defensis).
	DanActive Fermented milk	<i>L. casei</i> DN-114 001 (<i>L. casei</i> <i>Immunitas</i>)
Arla Foods	Cultura	<i>L. casei</i> F19
Yakult	Yakult	<i>L. casei</i> Shirota
Nestlé	LC1	<i>L. johnsonii</i> La1 (same as NCC533 and formerly <i>L. acidophilus</i> La-1).
Nextfoods Probi Ferrig	GooBelly, Pro Viva	<i>L. plantarum</i> 299v.
Nestlé	<i>Lactobacillus</i> fortis	<i>L. paracasei</i> St11 (o NCC2461).
Valio	Vifit and other	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG).
Danone (Paris, Francia)	DanActive Fermented milk	<i>L. casei</i> DN-114 001 (<i>L. casei</i> <i>Immunitas</i>)
Probi AB	ProViva (juices and culture milk)	<i>L. plantarum</i> 299v
NextFoods (Boulder, Colorado)	GoodBelly probiotic drinks	<i>L. plantarum</i> 299v
Valio Dairy (Helsinki, Finland)	Valio Gefilus®	<i>L. rhamnosus</i> GG

El mayor conocimiento acerca del potencial y de las aplicaciones de cepas autóctonas como cultivos iniciadores para la elaboración de alimentos fermentados, busca mejorar, optimizar, y controlar procesos fermentativos, para desarrollar productos con propiedades definidas y constantes (Pavunc *et al.*, 2012; Speranza *et al.*, 2015).

2.1.2 Bacterias ácido lácticas como probióticos

Muchas de las bacterias ácido lácticas son consideradas y empleadas como probióticos, las BAL no son patógenas (Figura 1). Muchas de las especies de BAL tienen el status de “*Generally Recognized As Safe*” según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) o QPS “*Qualified Presumption of Safety*” según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) lo que facilita su aplicación en alimentos y, por tanto, suscita su interés industrial (Ver Anexo A).

El concepto de probiótico ha evolucionado a lo largo del tiempo a partir de su significado original “para la vida”. La Organización Mundial de la Salud, en el 2008 hace revisión del concepto, y los considera como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped”.

En la actualidad el concepto mayormente usado y aceptado, llega desde la Asociación Científica Internacional para los Probióticos y Prebióticos (ISAPP), en palabras bastante recientes de su presidenta Mary Ellen Sanders, quien los asume como: “cultivos simples o mezclados de microorganismos vivos que, aplicados a los animales o al hombre, benefician al huésped, al mejorar las propiedades de la microbiota intestinal original” (Delgado Fernández *et al.*, 2014).

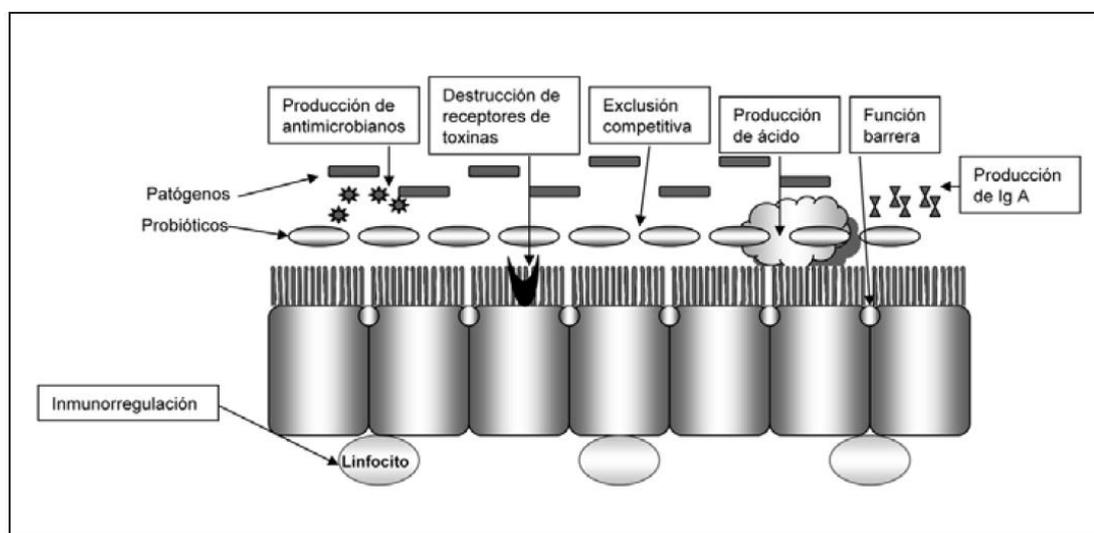
El interés científico y comercial sobre los probióticos, ha ido incrementando ya sea para el tratamiento o prevención de diferentes enfermedades humanas; muchos son empleados como alternativas a los antimicrobianos. Por ejemplo, en humanos, el consumo de probióticos puede ayudar a mantener el balance intestinal,

nutrición, así como proveer tratamiento de inflamaciones intestinales, desorden funcional y otras enfermedades extra-intestinales (Figura 2).

Las principales pruebas in vitro que se realizan en la actualidad a bacterias ácido lácticas como posibles probióticas, son las siguientes (Fujiya & Kohgo, 2010):

- i. Resistencia a las condiciones del tránsito gastrointestinal.
- ii. Adhesión a la mucosa y/o tejido epitelial del intestino.
- iii. Capacidad de persistir en el tracto gastrointestinal.
- iv. Producción de sustancias antimicrobianas contra bacterias patógenas.
- v. Capacidad de reducir la adhesión del patógeno a la superficie.
- vi. Actividad de hidrolasa de sal biliar.
- vii. Resistencia a espermicidas, en caso de ser utilizado como Probiótico vaginal.
- viii. Capacidad de influir en actividades metabólicas como la asimilación del colesterol, la actividad de la lactasa y la producción de vitaminas.

Figura 1: Mecanismo de actividad probiótica. Fuente: (Oliveira Fuster & González-Molero, 2007).



Los probióticos más comúnmente utilizados son cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se pueden encontrar en distintas presentaciones, como suplementos, en los llamados “alimentos probióticos”, en bebidas siendo el yogur el más usual, en

tabletas, cápsulas y sobrecitos que contienen las bacterias benéficas de forma liofilizada (Ogueke *et al.*, 2010).

Son empleados para distintos usos como; eliminación de la intolerancia a la lactosa, anti-diarreico, inmunomodulador, antidiabético, anticarcinogénico, hipocolesterolémico, antihipertensivo, anticarcinogénico: colon, mama, otros; antialérgico, enfermedades antiinflamatorias: colitis ulcerosa, complicaciones postoperatorias, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Parra Huertas, 2010).

Los estudios moleculares que se centran en los probióticos en sí tienen dos objetivos importantes: definir las mejores condiciones que impulsen el mejor rendimiento de las cepas probióticas y permitir la selección de nuevas cepas probióticas con criterios moleculares bien definidos (Lebeer *et al.*, 2008).

Hay dos categorías principales de factores que contribuyen al funcionamiento óptimo de los lactobacilos probióticos: factores que permiten una adaptación óptima a los nuevos nichos que encuentran temporalmente en el huésped (factores de adaptación) y factores que contribuyen directamente a los efectos promotores de la salud (factores probióticos) (Lebeer *et al.*, 2008).

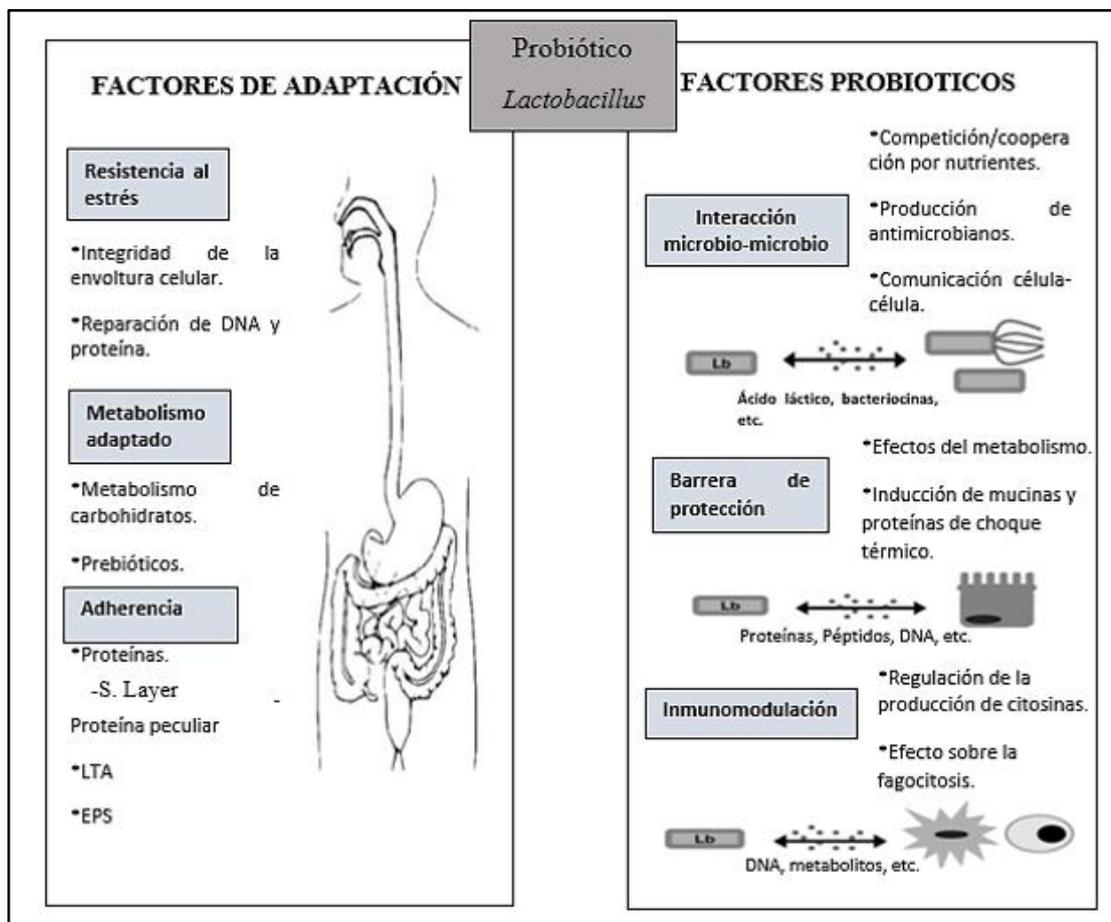
2.1.3 Taxonomía de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo representativo de microorganismos ampliamente distribuidos en una variedad de nichos ecológicos, se definen como una familia ubicua y heterogénea de microorganismos que tienen muchas características fisiológicas, morfológicas y metabólicas en común, son uno de los grupos de bacterias más importantes desde el punto de vista industrial y tienen una larga historia de uso en la fermentación (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000; Quigley, 2010).

En general, las BAL son Gram-positivas, presentan formas bacilares y cocoide de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm , son bacterias que no forman esporas, son inmóviles, oxidasa, benzidina y catalasa negativa, aunque en algunos casos se pueden presentar una pseudo-catalasa (Ekinci & Gurel, 2008; Savadogo *et al.*, 2006).

Cepas de *Lactobacillus* no producen superóxido dismutasa típica, pero utilizan otro mecanismo: la reacción de dismutación que es catalizada por iones de metales de transición como Mn^{2+} . Además, otras especies de *Lactobacillus*, como *L. plantarum*, producen pseudocatalasa de manganeso que controla la transformación de H_2O_2 en agua y oxígeno $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, con fuertes propiedades antioxidantes (Mishra *et al.*, 2015; Tomusiak-Plebanek *et al.*, 2018).

Figura 2: Visión mecanicista de las acciones probióticas por lactobacilos. Adaptado de (Lebeer *et al.*, 2008).



Tienen una baja concentración de en G+C, carecen de citocromo, presentan metabolismo anaerobio a pesar de esto son microaerofilicos y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de oxígeno, no obtienen energía por fosforilación oxidativa por transporte de electrones, sino por fosforilación a través del sustrato en ambientes ricos en azúcares, tienen metabolismo biosintético limitado a medios de cultivo con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Vásquez M. *et al.*, 2009).

Los homofermentativos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, esto es lo que les brinda la ventaja competitiva sobre otras bacterias, la temperatura de crecimiento óptimo está en un rango de 20°C a 40°C, además pueden crecer en una amplia gama de concentraciones de sal (Carr *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2007).

En 1919 Orla-Jensen inició la clasificación de las BAL; las especies de bacterias ácido lácticas se encuentran en dos filos distintos, Firmicutes y Actinobacteria. Dentro del filo Firmicutes, las BAL pertenecen al orden de los Lactobacillales e incluyen los siguientes géneros:

Aerococcus; *Alloiococcus*; *Carnobacterium*; *Enterococcus*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Leuconostoc*; *Oenococcus*; *Pediococcus*; *Streptococcus*; *Symbiobacterium*; *Tetragenococcus*; *Vagococcus* y *Weissella*

Que son organismos con bajo contenido de G-C, entre 31 y 49%. Dentro del filo Actinobacteria, las BAL pertenecen a los géneros: *Atopobium* y *Bifidobacterium*. Con un contenido de G-C de 36-46% y 58-61% respectivamente.

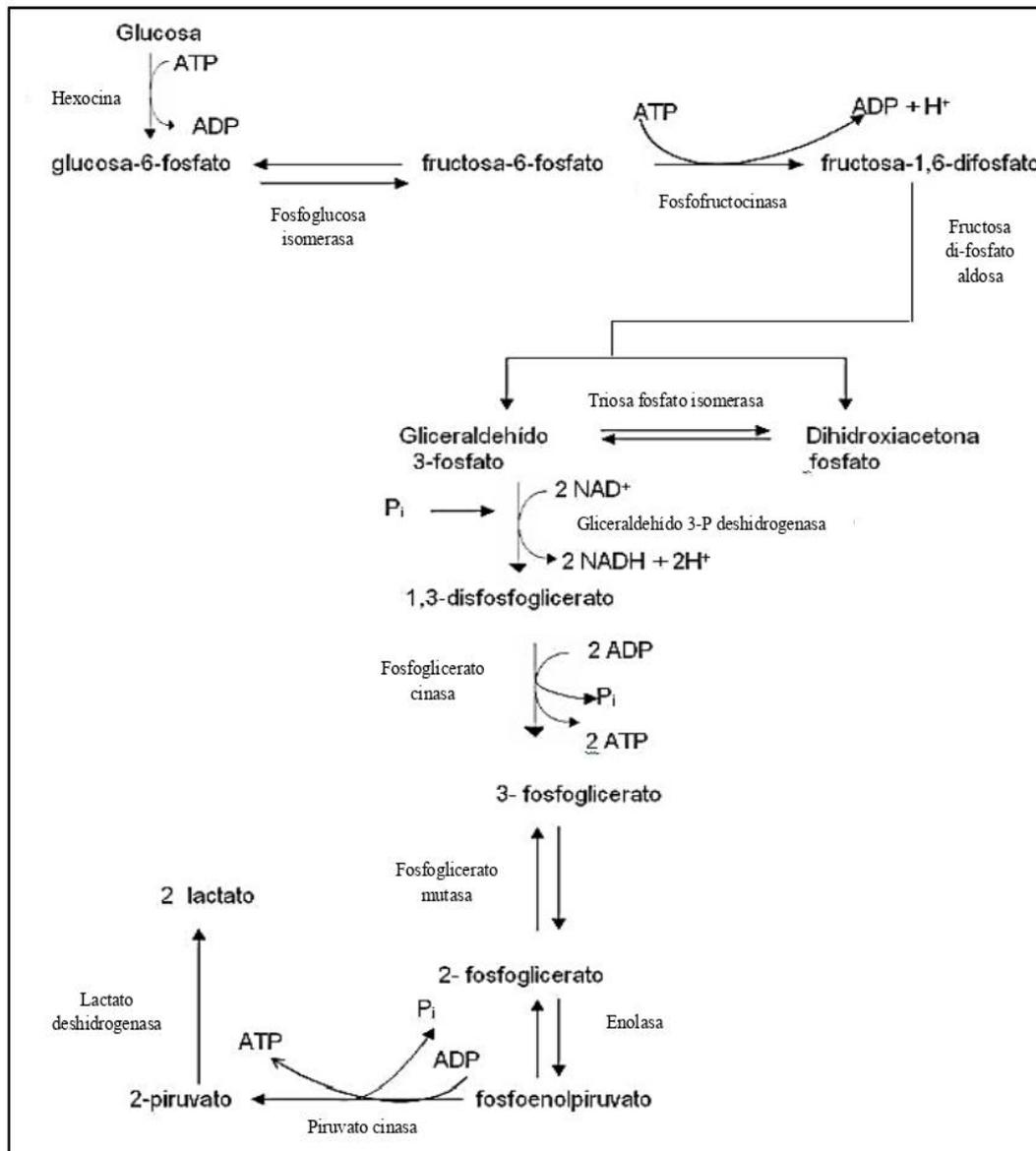
2.1.4 Clasificación de las bacterias ácido lácticas

El término “bacterias ácido-lácticas” no refleja una clase filogenética. Sino más bien las capacidades metabólicas de este grupo heterogéneo de bacterias (Klaenhammer *et al.*, 2005; Pfeiler & Klaenhammer, 2007).

Basado en el producto final, las BAL son agrupadas de acuerdo al tipo de fermentación y el producto final de las mismas en 3 grupos importantes:

1. **Homofermentativas estrictas:** Figura 3; son BAL que producen esencialmente ácido láctico como producto final de la fermentación; *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima fructosa-1,6P-aldolasa y exosa isomerasa, pero carecen de la fosfoetolasa, utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, GLICOLISIS) al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (85% o más) como principal producto de la fermentación de la glucosa.

Figura 3: Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas. Adaptado de (Parra Huertas, 2010).



Como no poseen piruvato-decarboxilasa, transfieren el hidrógeno formado por acción de la fosfotriosa-deshidrogenasa al ácido pirúvico con ayuda de las nicotinamida-adenina-dinucleotido (NAD), y lo transforma en ácido láctico. Dentro de este grupo se encuentran, por ejemplo, *Lactobacillus* de bastones largos, aislados o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseolítica notable. *Streptococcus*, de formas esféricas en cadenas, acidificación rápida y de poca actividad caseolítica (Carr *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2007).

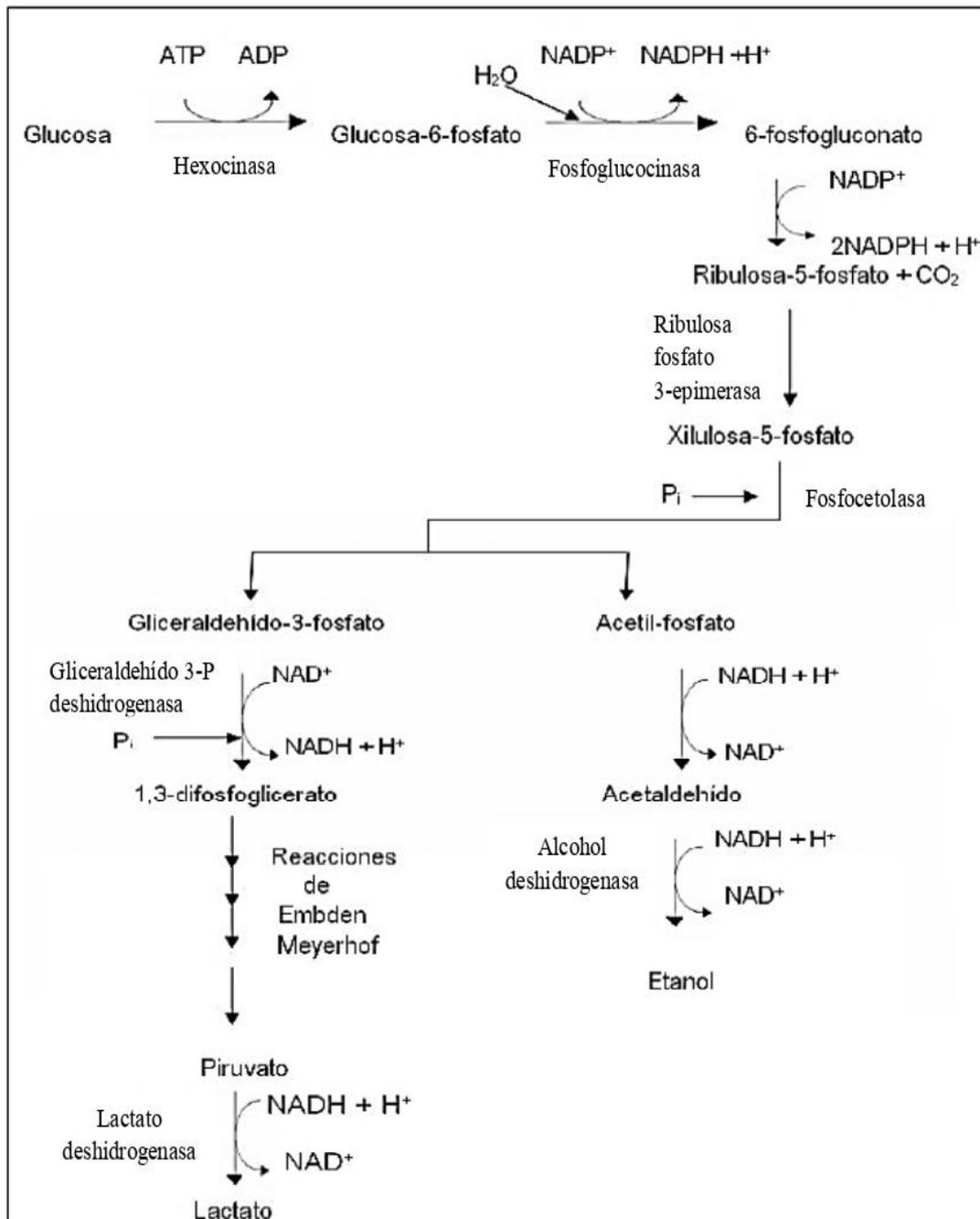
2. **Heterofermentativas estrictas:** Figura 4; son BAL que pueden acumular también una variedad de productos finales de la fermentación, incluyendo

ácido láctico, ácido acético y fórmico, etanol y dióxido de carbono. Este grupo está compuesto de un número de género incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

Contienen la enzima fosfocetolasa, pero carecen de la aldolasa y hexosa isomerasa; por ello, en lugar de seguir la vía EMP siguen la ruta Warburg-Dickens (WD), convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como acetato, etanol y CO₂, la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato o ruta Leloir (Carr *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2007; Parra Huertas, 2010).

3. Heterofermentativas facultativas: este grupo de BAL presentan una situación metabólica intermedia, poseen tanto fructosa-1,6P-aldolasa como fosfocetolasa y normalmente se comportan como homofermentativos frente a las hexosas y heterofermentativos con las pentosas (Parra Huertas, 2010).

Figura 4: Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido láctica. Adaptado de (Parra Huertas, 2010).



2.2 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es el género más grande de la familia Lactobacillaceae incluye 301 especies reconocidas y 35 subespecies (Febrero 22, 2020; <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Lactobacillus>), pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas ya que el producto principal del metabolismo de carbohidratos es el ácido láctico (C. H. Huang *et al.*, 2018).

Comprende un grupo muy heterogéneo que tradicionalmente se dividen en tres grupos de acuerdo a sus características de fermentación:

- a) homo-fermentativo obligado;
- b) hetero- fermentativo facultativo y
- c) hetero-fermentativo obligado.

Muchas bacterias lactobacilos están ligados con alimentos y productos alimenticios, principalmente porque contribuyen a la conservación debido a la acidificación, pero también por su capacidad de contribuir a sus características únicas de sabor y textura (Campos & Mena, 2012).

Taxonómicamente, el género *Lactobacillus* pertenece al filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y a la familia Lactobacillaceae. Su hábitat natural abarca desde carnes, productos lácteos, material vegetal, los tractos genitales y gastrointestinales de humanos y animales.

Son nutricionalmente exigentes, y requieren medios ricos para crecer y desarrollarse; carbohidratos, aminoácidos, péptidos, sales, ésteres de ácidos grasos y derivados de ácidos nucleicos; los lactobacilos forman una parte menor de la microbiota fecal adulta humana, alrededor del 0,01% al 0,6% del recuento bacteriano total. La presencia de lactobacilos es predominante en el tracto genitourinario femenino, donde dominan la microbiota (Lebeer *et al.*, 2008).

Los lactobacilos normalmente presentan morfología de varilla; sin embargo, dependiendo de las condiciones de los entornos donde están presentes, se pueden encontrar otras morfologías como espirales o varillas de cocci (Singh *et al.*, 2009).

Actualmente, los lactobacilos se utilizan ampliamente en campos relacionados con alimentos, piensos, productos farmacéuticos y biotecnología; por ejemplo, se usan como iniciadores de lácteos, probióticos, portadores de vacunas e inoculantes de ensilaje, que se encuentran entre las aplicaciones económicamente más interesantes de los *Lactobacillus* (Giraffa *et al.*, 2010).

Son aplicados como probióticos por sus mecanismos subyacentes a las capacidades de promoción de la salud que pertenecen a una de las siguientes categorías, a veces superpuestas:

- i. Inhibición de patógenos y restauración de homeostasis microbiana a través de interacciones microbio-microbio; la capacidad de los lactobacilos de inhibir el crecimiento de patógenos es bien conocida, ya que han sido empleados por siglos en la preservación de alimentos.
- ii. Mejora la función de la barrera epitelial.
- iii. Modulación de la respuesta inmune.

Dada la complejidad de estas tres funciones principales, puede entenderse que diferentes cepas evocan diferentes respuestas en el huésped. Por lo tanto, los resultados con una cepa específica de *Lactobacillus* no pueden generalizarse. La investigación molecular sobre lactobacilos presta mucha atención a estas propiedades específicas de la cepa.

Se han asociado diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* con diferentes efectos relacionados con sus capacidades específicas para expresar moléculas superficiales particulares o para secretar proteínas y metabolitos que interactúan directamente con las células huésped (Lebeer *et al.*, 2008).

2.2.1 Composición de la pared celular de los Lactobacilos

En bacterias Gram-positivas la pared celular está compuesta por las siguientes estructuras desde el espacio intracelular hacia el medio exterior: una membrana celular, una gruesa pared de peptidoglicano y polímeros asociados (ácidos teicoicos y lipoteicoicos), y en algunas especies aparecen envolturas adicionales como S-layer, cápsulas y EPS, estas características moleculares le confieren a la bacteria ciertas propiedades específicas (Mercedes, 2011).

a) Peptidoglicanos

Como la mayoría de las especies Gram-positivas, la pared celular de los lactobacilos se caracteriza por una gruesa capa de peptidoglicanos (PG), a veces conocida como murein sacculus, es una multicapa de 20 a 100 nm de grosor que desempeña un papel importante en la integridad estructural y protege a la célula contra la lisis. La PG de la pared celular está enriquecida de forma covalente y no covalente con ácidos teicoicos, polisacáridos y proteínas (Lebeer *et al.*, 2008).

El glicano está constituido por dos aminoazúcares, estos se presentan como residuos alternados, con enlaces β 1-4 de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetil-D-murámico (MurNAc); las cadenas varían desde 10 hasta 170 unidades de disacáridos. Las unidades de péptidos y de glicano se unen a través del grupo carboxilo del ácido láctico del MurNAc al aminoácido terminal de un tetrapéptido. Los glicotetrapéptidos están unidos entre sí por las unidades tetrapeptídicas, que forman un marco continuo (Mercedes, 2011).

La característica constante del compuesto tetrapeptídico es la presencia de D-Alanina, la que siempre es la unidad de relación entre las cadenas de peptidoglicano. El compuesto peptídico que se une al ácido murámico en BAL es el tetrapéptido L-Ala-D-iso-Glu-meso-DAP o L-Lis-D-Ala. Las uniones cruzadas entre las dos cadenas de peptidoglicano se pueden establecer de una manera directa o a través de un puente peptídico interpuesto (Mercedes, 2011).

Estos polímeros aniónicos de la pared celular generalmente están hechos de unidades de repetición de fosfato de poliglicerol o fosfato de polirribitol anclado covalentemente a PG (TAs de pared) o unidos a la membrana citoplasmática (ácidos lipoteicoicos) (Delcour *et al.*, 1999; Lebeer *et al.*, 2008).

Los ácidos teicoicos de pared (WTA, por sus siglas en inglés) se asocian covalentemente al peptidoglicano, mientras que los ácidos lipoteicoicos (LTA, por sus siglas en inglés) tienen carácter macroanfífilo, se hallan insertos en la membrana plasmática por un ancla glicolipídica. Ambos polímeros conforman largas cadenas cargadas negativamente de poliglicerolfosfatos, siendo el principal sustituyente, en bacterias del género *Lactobacillus*, el éster de D-Alanina. El grado de sustitución modula la carga neta aniónica de los TAs (Mercedes, 2011).

Existen diferencias considerables entre las moléculas WTA y LTA de diferentes cepas de *Lactobacillus*, especialmente en el grado de sustitución y la longitud de la cadena. Junto con el peptidoglicano, WTA y LTA constituyen una malla polianiónica que provee funciones relacionadas no sólo con la elasticidad, porosidad y mantenimiento de un medio iónico apropiado, sino también con el tráfico de iones, nutrientes, proteínas y antibióticos, como conforman la capa más extensa se les adjudica un rol protector de la envoltura celular (Mercedes, 2011).

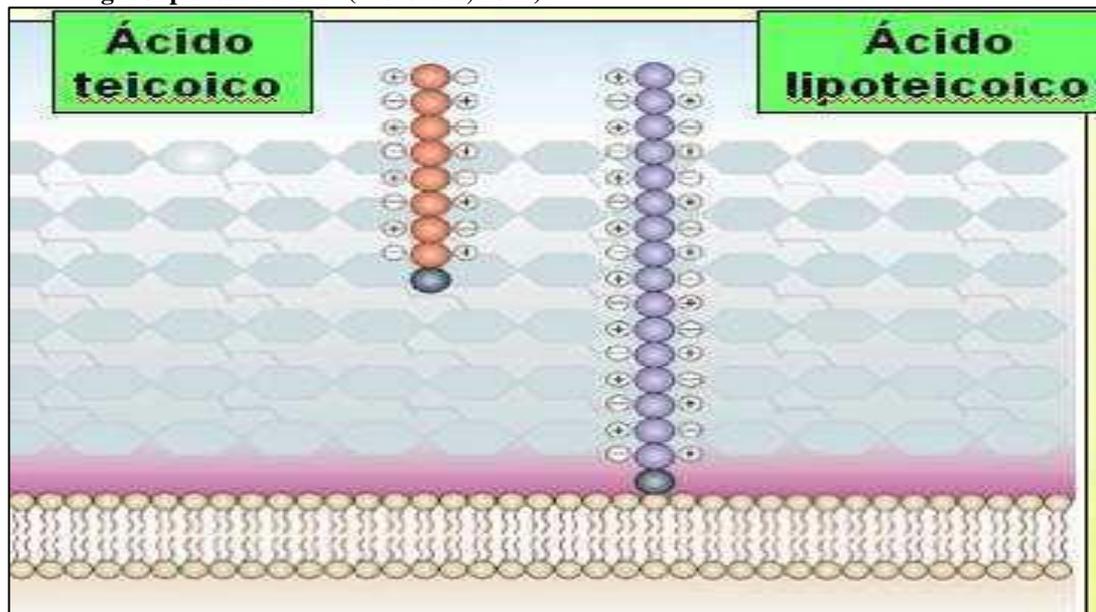
Los que están hechos de unidades repetidas de fosfato de glicerol o ribitol constituyen un depósito de fosfato que puede movilizarse cuando el fosfato se vuelve escaso. Como polímeros aniónicos, juegan un papel como fuente de cationes, en particular Mg^{+2} (Delcour *et al.*, 1999; Mercedes, 2011).

En *Lactobacillus*, los WTA están generalmente compuestos de poliglicerolfosfatos, con excepción de muchas cepas de la especie *L. plantarum* que posee polirribitolfosfato. En cuanto a los LTA en el género *Lactobacillus*, se podría decir que la diversidad es menor en cuanto a la naturaleza del polímero ya que sólo se han aislado poliglicerolfosfatos con D-Alanil como único sustituyente (Tomita *et al.*, 2009).

Además, aunque todos los lactobacilos tienen TA en sus paredes celulares, no todas las paredes celulares de *Lactobacillus* parecen contener WTA. Por ejemplo, las paredes celulares de muchas cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei* parecen contener solo LTA, en contraste con la mayoría de las cepas de *L. plantarum*, que contienen los dos tipos de TA (Vélez *et al.*, 2007).

Además, se puede liberar una fracción de LTA a través de la desacilación (eliminación del anclaje lipídico) o la expansión de PG de adentro hacia afuera sin la eliminación del anclaje lipídico, lo que indica que las LTA de ciertas cepas de *Lactobacillus* a veces pueden actuar como factores solubles, lo cual es importante para la interpretación de algunos estudios funcionales (Vélez *et al.*, 2007).

Figura 6: Esquema representativo de TA de pared celular. Los WTA se encuentran unidos covalentemente al PG. Los LTA se hallan unidos a membrana mediante un ancla glicolipídica. Fuente: (Mercedes, 2011).



c) Capas S-Layer

Las capas S son matrices de proteínas de superficie paracrystalina comúnmente expresadas por especies de los dominios Bacteria y Archaea; un componente adicional de la envoltura que la hace aún más refractaria a la permeabilidad de material genético. La mayoría de las capas S están compuestas de

una sola especie de proteína que varía mucho en tamaño en diferentes géneros bacterianos (Sillanpaa *et al.*, 2000).

Las secuencias primarias de las proteínas de la capa S exhiben poca similitud, pero sus composiciones de aminoácidos son similares. La proteína de la capa S es la principal especie de proteína única y representa del 10 al 20% de la proteína celular total de la célula bacteriana. Se transportan sobre la membrana y se ensamblan en una capa bidimensional en la superficie bacteriana. Se han atribuido diversas funciones a las capas S de especies bacterianas individuales, incluida la mediación de la unión bacteriana a los tejidos del huésped (Sillanpaa *et al.*, 2000).

Algunas cepas específicas de lactobacilos están rodeadas por la capa S, por ejemplo, algunos *Lactobacillus* que contienen S-Layer; *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. brevis*, *L. helveticus*, and *L. crispatus* (Lebeer *et al.*, 2008).

Las proteínas de la capa S suelen ser proteínas pequeñas y altamente básicas de 40 a 60 kDa con estructuras terciarias generalmente muy estables. Estas proteínas están unidas de forma no covalente a la pared celular, principalmente a polímeros secundarios de la pared celular (LTA, WTA y polisacáridos neutros), y se ensamblan en capas superficiales con altos grados de orden posicional, a menudo cubriendo completamente la pared celular (Lebeer *et al.*, 2008).

Aunque se han identificado estructuras de glucano en las proteínas de la capa S de varias bacterias Gram-positivas, la mayoría parece no estar glicosilada en lactobacilos. Hasta la fecha, se ha informado una estructura detallada de glucano en las proteínas de la capa S solo para *L. buchneri*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, algunos lactobacilos como *L. rhamnosus* GG parecen tener glucoproteínas en su superficie celular (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005; Lebeer *et al.*, 2008).

d) Polisacáridos de pared celular

Los polisacáridos de la pared celular (WPC, por sus siglas en inglés), son componentes ubicuos de la envoltura celular de los lactobacilos, además de los

peptidoglucanos y los ácidos teicoicos y forman la base de muchos sistemas de tipificación serológica (Lebeer *et al.*, 2008).

Conceptualmente, se hace una distinción entre los polisacáridos capsulares, que forman la cáscara externa más gruesa íntimamente asociada, y a menudo unida covalentemente a la pared celular, y los polisacáridos unidos a la célula, que están asociados libremente con ella (Lebeer *et al.*, 2008).

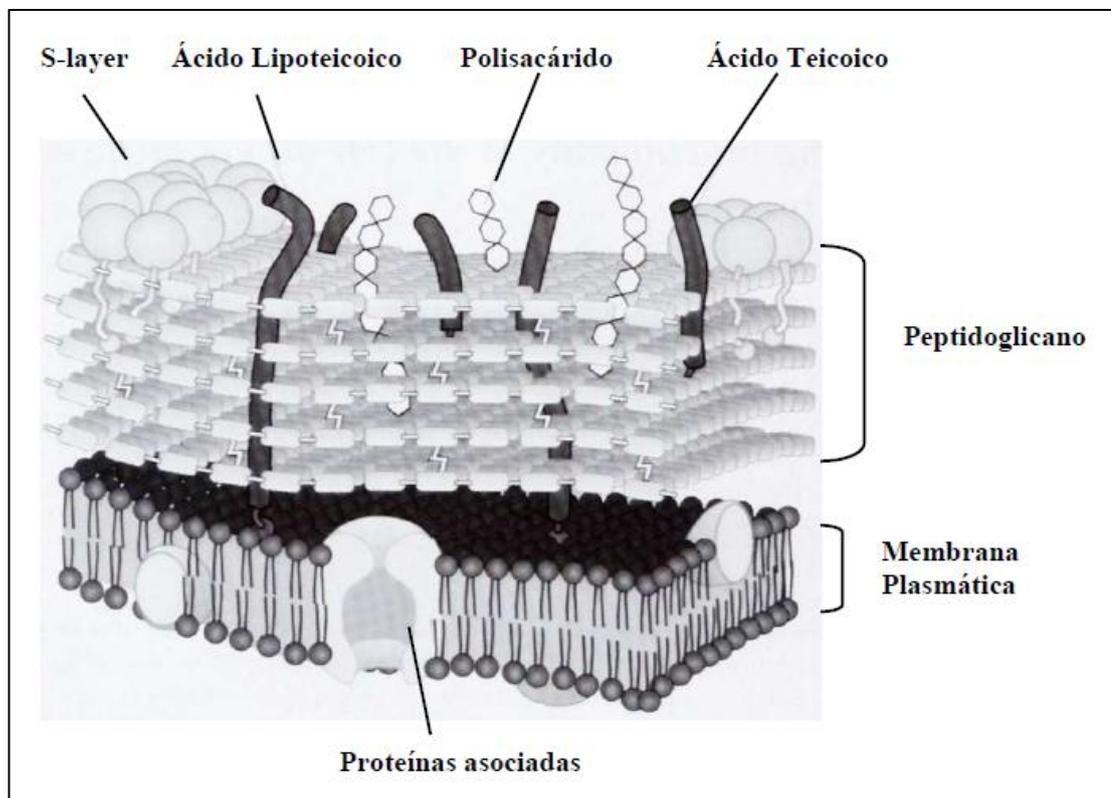
Algunos polisacáridos extracelulares también se liberan en el medio. A veces se les llama polisacáridos neutros para distinguirlos de los ácidos teicoicos de polisacáridos aniónicos, aunque algunos también pueden ser ácidos ya que pueden estar ramificados con sustituyentes aniónicos, en particular glicerol fosfato. En el caso de *L. buchneri*, se demostró que los grupos hidroxilo de un polisacárido neutro de la pared celular son responsables de la unión de la proteína de la capa S a la pared celular (Delcour *et al.*, 1999; Lebeer *et al.*, 2008).

A menudo es difícil la diferenciación entre las diversas clases de WPC. Para los lactobacilos, se prefiere el término EPS y se refiere a los polisacáridos extracelulares que pueden unirse a la pared celular o secretarse a los alrededores. Al igual que los polisacáridos en general, los EPS de lactobacilos son estructuras complejas que difieren no solo en la naturaleza de los monómeros de azúcar sino también en sus modos de enlace, ramificación y sustitución, lo que contribuye en gran medida a la variedad estructural de la pared celular de *Lactobacillus* (Delcour *et al.*, 1999).

Los EPS de lactobacilos son generalmente heteropolisacáridos compuestos de diferentes restos de azúcar (glucosa, galactosa, ramnosa, GlcNAc y N-acetilgalactosamina- GalNAc). También pueden estar presentes residuos como el ácido glucurónico y el glicerol-3-fosfato, al igual que los grupos fosfato, acetil y piruvilo, aunque solo en un subconjunto de cepas de *Lactobacillus* (Lebeer *et al.*, 2008).

En los lactobacilos, la mayoría de los EPS se secretan o permanecen débilmente unidos a la pared celular por interacciones electrostáticas (iones, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas). La producción de EPS también depende en gran medida de las condiciones ambientales, y la regulación de la producción de EPS y la longitud de la cadena se produce, al menos en parte, a través de la acción de un sistema fosforegulatorio que incluye una tirosina quinasa autofosforilante (Delcour *et al.*, 1999; Lebeer *et al.*, 2008).

Figura 7: Esquema general de la envoltura de Gram Positivas. Fuente: (Mercedes, 2011).



2.2.2 *Lactobacillus plantarum*

Streptobacterium plantarum (Orla-Jensen 1919) renombrado posteriormente *Lactobacillus plantarum* (Pederson 1936) por diferencias bioquímicas y morfológicas. *L. plantarum* usualmente fermenta hexosas a través de la vía metabólica EMP, y posee una racemasa que resulta en la formación de ácidos D y L-

lácticos. Además, fermenta pentosas para formar ácido láctico y acético en presencia de fosfoacetolasa inducible (Vescovo *et al.*, 1979).

L. plantarum muestra una morfología de bastoncitos con dimensiones de aproximadamente 0.9-1.2 x 1.0-8.0 μm ; se puede encontrar solo o en pequeñas cadenas. Son heterofermentativos, anaerobio facultativo. Exhibe características mesofílicas, puede crecer en temperaturas que oscilan entre 15 °C y 45 °C, y se alcanza la condición de crecimiento óptima cuando el microorganismo se cultiva en presencia de 4 a 6% de cloruro de sodio y en un pH entre 4 y 9 (Kandler & Weiss, 1986).

Las especies *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum* están estrechamente relacionadas genotípicamente y muestran fenotipos muy similares y se confunden fácilmente. Los estudios serológicos han demostrado que la mayoría de las cepas de *L. plantarum* pertenecen al grupo serológico B, ya que contienen ribitol y ácido teicoico en sus paredes celulares (Campos & Mena, 2012).

L. plantarum tiene deshidrogenasas específicas de ácido láctico (LDH) que forman lactato L (+) y D (-). El glucólisis anaeróbico normal daría ácido láctico L (+) mientras que el ácido láctico D (-) podría sintetizarse a partir del sistema de glicoxalasa. La función de la deshidrogenasa de ácido láctico D (-) puede ser convertir el ácido láctico D (-) en ácido pirúvico, que podría utilizarse para sintetizar algunos otros compuestos como la alanina (Singh *et al.*, 2009).

L. plantarum fermenta carbohidratos como amígdala, celobiosa, esculina, gluconato, manitol, melezitosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa en más del 90%, y arabinosa y xilosa entre 11 y 89% (Bergey *et al.*, 2009).

Las sondas de azúcar han demostrado que la fermentación de azúcar era principalmente homoláctica con cierta actividad heteroláctica (producción de acetato). Los ácidos orgánicos como el málico, el acético y el etanol pueden metabolizarse parcialmente, lo que resulta en la producción de dióxido de carbono, ácido láctico y acético (Plumed-Ferrer *et al.*, 2008).

L. plantarum ha mostrado diversas respuestas para algunos factores de estrés como choque térmico (55°C, 10 min), bilis (0.5%), estrés oxidativo (0.1% H₂O₂), pH bajo (2,5), etanol (10%), sal (7,5% de NaCl) y detergente (0,05% de dodecilsulfato de sodio) (Parente *et al.*, 2010).

Este organismo está ampliamente extendido tanto en productos alimenticios como en el tracto intestinal humano, y puede ser aislado de diferentes fuentes, incluidos productos lácteos, carne, pescado, frutas, verduras y productos de cereales; esta característica puede explicarse por su genoma relativamente grande, que presenta varias proteínas involucradas en las funciones de regulación y transporte, además, exhibe alto potencial metabólico (Singh *et al.*, 2009).

Tiene un estado GRAS bien aceptado; con un gran potencial probiótico, se ha estudiado fundamentalmente en las últimas décadas por el gran interés en la industria alimentaria; se relaciona tradicionalmente con una gran variedad de fermentaciones de alimentos y piensos (Campos & Mena, 2012).

2.2.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus es ampliamente utilizado como probiótico en humanos y en animales. *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* están estrechamente relacionados filogenéticamente y fenotípicamente; juntos, son considerados como el grupo *Lactobacillus casei*; los miembros de este grupo son facultativamente heterofermentativos, tienen un contenido de 45–47% en moles de ADN G+C y tienen tipos de peptidoglucano idénticos (l-Lys-d-Asp) (C. H. Huang *et al.*, 2018).

Inicialmente *L. rhamnosus* fue considerado como una sub-especie de *L. casei*, luego Collins *et al* (1989) propusieron una reclasificación del grupo *L. casei* donde consideraron como una cepa a *L. rhamnosus* (Goldstein *et al.*, 2015).

Algunas cepas de *L. rhamnosus* son usadas en la industria alimenticia debido a sus actividades probióticas y antimicrobianas. Sus usos incluyen, no solo como probióticas, sino también como protectoras de productos lácteos fermentados y no fermentados, bebidas, alimentos listos para el consumo, salchichas y en ensaladas (Valík *et al.*, 2008).

Es una bacteria Gram-positiva, en forma de varilla, 0,8 a 1,0 μm de ancho y desde 2,0 a 4,0 μm de longitud, puede crecer en forma individual o en cadenas cortas, microaerófila y anaerobia facultativa. Puede crecer en forma individual o en cadenas cortas. No forma esporas, ni es móvil y es catalasa negativa (Goldstein *et al.*, 2015).

Es mesófila, pero algunas cepas pueden crecer a temperaturas inferiores a 15 °C o superiores a 40 °C, es una bacteria muy exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, para crecer necesita ácido fólico y otras vitaminas como riboflavina, niacina o ácido pantoténico. También exige calcio mineral. Su crecimiento inicial requiere medios ácidos, con pH entre 4,5 y 6,4 (Valík *et al.*, 2008).

Su metabolismo es homofermentativo facultativo. Convierte las hexosas en L (+) ácido láctico hasta 1,5% en el medio de glucosa, de acuerdo con la vía EMP. También fermenta las pentosas. En ausencia de hexosas, produce ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y etanol (Nocianitri *et al.*, 2017; Valík *et al.*, 2008).

La combinación de cepas de *L. rhamnosus* tiene la capacidad inmunomoduladora; tiene potencial para ser utilizado en la salud oral (Campos & Mena, 2012).

Una de las cepas probióticas más estudiadas y conocida disponible comercialmente es la cepa *L. rhamnosus* GG, varios estudios han demostrado que acorta la duración y mejora los síntomas de la diarrea infantil por rotavirus, tiene

algún efecto en la prevención de enfermedades atópicas entre los bebés y modula las respuestas inmunes (C. H. Huang *et al.*, 2018).

2.3 Exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas

En la última década, la mayoría de los estudios sobre EPS producidos por bacterias del ácido láctico se han centrado en la influencia de las condiciones de crecimiento fisiológico en la biosíntesis de EPS, la genética de la biosíntesis de EPS y la aclaración de la composición y las estructuras primarias de estos EPS.

Aparentemente, los EPS tienen algún tipo de función biológica. Además, la síntesis de EPS es una propiedad relativamente estable y los organismos productores de EPS tienen una presencia estable en diversos entornos. El estudio de la relación estructura-función de EPS sigue siendo una cuestión relevante.

Las células bacterianas pueden sintetizar varios polisacáridos que se definen por su ubicación con respecto a la célula; algunos se encuentran dentro de las células en el citosol y son utilizadas como fuentes de carbono o energía en el metabolismo celular (Jutta Cerning, 1990).

Otros polisacáridos son componentes de la pared celular, como el peptidoglucano y los ácidos teicoicos, existe un tercer grupo que se encuentran unidos débilmente a la superficie celular o son excretados al ambiente como sustancia mucosa, a este grupo se le denomina exopolisacáridos (Jutta Cerning, 1990).

Los EPS representan un amplio grupo de heterobiopolímeros de alto peso molecular, que son producidos por una amplia gama de microorganismos en su ambiente ecológico natural durante su proceso metabólico normal (J. Wang, Zhao, Tian, *et al.*, 2015).

El nombre exopolisacáridos fue propuesto por Sutherland (1972), el cual proporciona un término general para todas estas formas de polisacáridos bacterianos

que se encuentran fuera de la pared celular, se presenta en dos formas básicas, ya sea como una cápsula íntimamente asociada con la superficie celular o secretada al medio ambiente (Bazaka *et al.*, 2011; Jutta Cerning, 1990).

En algunos casos, los polisacáridos capsulares y los secretados al medio exterior son producidos por el mismo microorganismo. Distinguir entre las dos formas puede ser difícil. Dependiendo de su relación estructural con la célula bacteriana, se les ha denominado polisacáridos limo, capsular o micro-capsular (Bazaka *et al.*, 2011).

Algunas bacterias invierten más del 70% de su energía en la producción de EPS, presumiblemente para obtener una ventaja selectiva en el medio ambiente no son esenciales para las bacterias porque la eliminación enzimática o física de EPS no afecta negativamente la viabilidad celular *in vitro* (Looijesteijn *et al.*, 2001).

Aunque el papel ecológico de dichos EPS en las bacterias no ha sido elucidado por completo, el role en supervivencia debe ser crucial ya que las bacterias productoras invierten gran cantidad de energética en su producción y lo utilizan como fuente de energía. Algunos estudios demuestran que las funciones estos biopolímeros en general son de naturaleza protectora (Nácher, 2015; Pérez-Ramos *et al.*, 2016):

- i. Protección frente a condiciones ambientales adversas como la desecación, fagocitosis, ataque de bacteriófagos, antibióticos o compuestos tóxicos para las células, estrés osmótico actuando como una barrera física;
- ii. En el reconocimiento celular;
- iii. Otras funciones posibles de EPS incluyen el secuestro de cationes esenciales, la colonización de diversos ecosistemas, por medio de la adhesión a superficies y en la formación de biopelículas.
- iv. Además, los se han propuesto varias funciones fisiológicas como antioxidante, anticancerígeno, inmunomodulador, antibacteriano, hipoglucémico, antihipertensivo, propiedades reductoras del colesterol.

En los últimos años se han aislado diversas cepas de BAL productoras de EPS, a partir de diferentes productos alimentarios fermentados como, leche fermentada, yogur, granos de kéfir, cárnicos, cereales fermentados y bebidas alcohólicas. Debido a las propiedades fisicoquímicas únicas y actividades biológicas, los EPS producidos por BAL se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones que incluyen productos alimenticios, productos farmacéuticos, biofloculantes, bioemulsionantes y productos químicos (Nácher Vázquez *et al.*, 2012).

Los EPS bacterianos presentan una amplia variabilidad en su composición química, estructura y peso molecular. De acuerdo con las composiciones de monosacáridos, los EPS se pueden clasificar en homo-polisacáridos (HoPS) constituidos por un único tipo de monosacárido, y hetero-polisacáridos (HePS) formados por dos o más tipos de monosacáridos (J. Wang, Zhao, Tian, et al., 2015).

2.3.1 Clasificación de los Exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas

a) Homopolisacáridos

En la síntesis de los HoPS se requiere tan solo de una enzima codificada por un solo gen para la síntesis del polímero, y en la mayoría de los casos, la proteína anclada a la membrana cataliza la síntesis extracelularmente, figura 8. Se componen de unidades repetidas que contienen solo un tipo de monosacárido: D-glucopiranososa (glucanos), D-fructopiranososa (fructanos) y en menor proporción galactosa (galactanos) (Nácher Vázquez *et al.*, 2012).

Estos polisacáridos generalmente muestran masas moleculares altas (hasta 10^7 Da) inclusive superiores a los HePS, tienen diferentes grados y tipos de ramificación, sitios de enlace y longitud de la cadena; según su estructura, los fructanos se pueden dividir en dos grupos: (i) inulinas (β -2,1 vinculados) y (ii) levanos (β -2,6 vinculados) (Nácher Vázquez *et al.*, 2012).

Los glucanos se pueden clasificar en α - y β - D-glucanos. Los primeros se encuentran más ampliamente en bacterias ácido lácticas y son producidos por cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. Según los

enlaces en la cadena principal, los α -Glucanos se subdividen en dextranos (α -1,6), mutanos (α -1,3), glucanos (α -1,2), reuteranos (α -1,4) y alternanos (α -1,3 y α -1,6) (Laura *et al.*, 2012).

Estos polímeros pueden tener ramificaciones de cadena lateral que involucran otros enlaces α diferentes de la cadena principal. Por ejemplo, los dextranos producidos por varias BAL, como los *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, pueden tener ramificaciones con enlaces α -1,2, α -1,3 o α -1,4 (Korakli & Vogel, 2006; Laura *et al.*, 2012).

Los β -Glucanos son una clase de EPS compuesta de residuos unidos (1,3) β -D-Glucopiranosido que también pueden contener cadenas laterales de unidades de β -D-Glucopiranosido unidas por enlaces (1,2), son menos frecuentes en comparación a α -D-Glucanos, incluyen los glucanos lineales y los glucanos β (1,3) sustituidos en 6 que tienen estructuras bifurcadas o cíclicas (McIntosh *et al.*, 2005).

Una de estas estructuras, ha sido aprobada como aditivo alimentario por la FDA, y esencialmente es un β (1,3) -D-Glucano lineal, es el Curdlano, que puede tener algunas cadenas inter o intra-cadena enlaces. El Curdlano tiene propiedades reológicas y gelificantes térmicas únicas, con aplicaciones en la industria alimentaria y otros sectores (1,6). La producción de este EPS no es muy alta, alrededor de 100–500 mg/L (McIntosh *et al.*, 2005; Notararigo *et al.*, 2013).

Los tipos de fructanos que han sido descritos se dividen según los enlaces en la cadena principal en inulinas β - (2,1), producidas exclusivamente por BAL, y los levanos β - (2,6), producidos tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (van Hijum *et al.*, 2006).

Los enzimas que se encargan de la síntesis de los HoPS son las glicosilhidrolasas (GH), polimerasas extracelulares que utilizan la energía del enlace glicosídico de la sacarosa para unir glucosas o fructosas (Laura *et al.*, 2012).

Los β -glucanos son producido por glicosiltransferasas que usan azúcares de nucleótidos como sustrato. Por otro lado, los α -glucanos son sintetizados por glucansacrasas (GS) y fructanos son sintetizados por fructansacararas (FS), que pueden usar la energía del enlace glucosídico de sacarosa para ligar glucosa o fructosa a la cadena de polisacáridos en crecimiento (Laura *et al.*, 2012; Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Según el tipo de HoPS, estas enzimas reciben nombres específicos establecidos por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) en función a la reacción catalizada y la especificidad que tienen sobre un sustrato determinado, así es como se distinguen entre:

- a. Dextransacararas (EC 2.4.1.5).
- b. Alternansacararas (EC 2.4.1.140).
- c. Inulosacararas (EC 2.4.1.9) y,
- d. Levansacararas (EC 2.4.1.10).

Las reuteransacararas y las mutansacararas se clasifican junto con las dextransacararas. En el caso concreto de los β - D- glucanos, su síntesis se produce utilizando como sustrato UDP- glucosa (uridina 5'- difosfato glucosa) por la acción de la glicosiltransferasa (GTF) (Nácher, 2015; Pérez-Ramos *et al.*, 2016; Werning *et al.*, 2008).

A pesar de que las GS y FS llevan a cabo reacciones similares a partir de un mismo sustrato, que es la sacarosa, existen grandes diferencias en cuanto a su estructura y la secuencia de sus aminoácidos. Por ello, de acuerdo con la clasificación del sistema CAZy el cual se basa en la similitud de secuencia, las GS forman parte de la familia 70 (GH70) y las FS son miembros de la familia 68 (GH68) (Nácher, 2015).

Las GS por su parte han sido descritas únicamente en BAL, mientras que las FS están presentes en bacterias Gram positivas, Gram negativas, plantas y hongos (Cantarel *et al.*, 2009; Nácher, 2015).

Los Dextranos son los HoPS más utilizados en la industria, las bacterias pueden producir un alto nivel de 1-10 g/L, y esta producción confiere un fenotipo mucoso a las cepas productoras, cuando se cultivan en presencia de sacarosa, en cambio, en cultivos con presencia de glucosa esta característica no es detectada (Leemhuis *et al.*, 2013).

Los dextranos son una clase de EPS compuesta de enlaces glucosídicos α - (1,6) y que están ramificados con enlaces α - (1,2), α - (1,3) o α - (1,4). El grado de estas ramificaciones varía según el origen de la dextransacarasa. El dextrano más utilizado por la industria es un polisacárido que contiene 95% de enlaces α -1,6 y 5% de enlaces α -1,3 sintetizados por *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Los mutantes son los glucanos sintetizados por varios serotipos de *S. mutans* y *S. sobrinus*, que difieren de los dextranos en que contienen un alto porcentaje de enlaces α - (1,3) (Notararigo *et al.*, 2013; Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

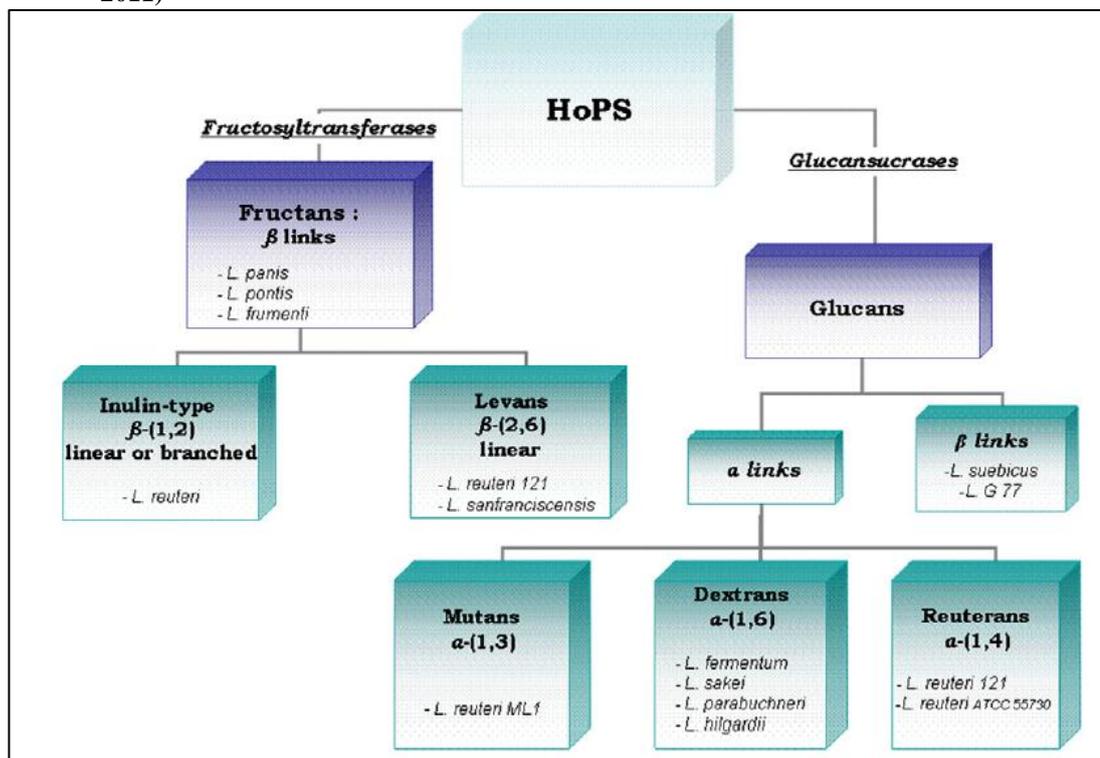
Los Reuteranos son glucanos solubles en agua con enlaces glucosídicos principalmente α - (1,4) sintetizados por reuteransacarasa. Las cepas que producen reuteransacarasa son especies de *L. reuteri* (Kralj *et al.*, 2004; Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

El EPS producido por alternansacarasa contiene enlaces glucosídicos α - (1,6) y α - (1,3) alternos. Estos HoPS son producidos por cepas de *L. mesenteroides* y tienen las características de alta solubilidad, baja viscosidad y resistencia al hidrólisis enzimática (Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

La levansacarasa cataliza la síntesis de levano mediante la transferencia del grupo fructosilo de sacarosa no activada en la cadena de fructanos. El Levano es un fructano unido principalmente por enlaces β - (2-6)- glucosídicos con algunas cadenas ramificadas unidas β - (2,1). Es un HoPS natural con diversas aplicaciones industriales (T. Zhang et al., 2014).

Las enzimas que polimerizan la fracción de fructosa en inulina fructanos son las fructansacarasas. Los EPS de tipo inulina son fructanos o fructo-oligosacáridos que contienen enlaces β - (2,1). La Inulina es un polisacárido de almacenamiento natural con una gran variedad de aplicaciones alimenticias y farmacéuticas (Apolinário *et al.*, 2014).

Figura 8: Clasificación de los HoPS producidos por *Lactobacillus* spp. Fuente: (Badel *et al.*, 2011)



b) Heteropolisacáridos

Los HePS están contruidos por una columna de subunidades repetidas que son lineales o ramificadas, con masas moleculares variables (hasta 10^6 Da). Cada una

de estas subunidades varían en número de tri- a octa-sacáridos diferentes y con frecuencia tiene una gama de patrones de enlace diferentes. Los enlaces entre monosacáridos que se encuentran con mayor frecuencia son enlaces β -(1,4) o β -(1,3) en la columna, caracterizados por una fuerte rigidez y enlaces α -(1,2) o α -(1,6) en los más flexibles (Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Los componentes más comúnmente encontrados en HePS son monosacáridos tales como pentosas (D-Arabinosa, D-Ribosa, D-Xilosa), hexosas (D-Glucosa, D-Galactosa, D-Manosa, D-Alosa, L-Ramnosa, L-Fucosa), amino azúcares (D-Glucosamina y D-Galactosamina) o ácidos urónicos (ácidos D-Glucurónicos, ácidos D-Galacturónicos), figura 9. También pueden estar presentes sustituyentes orgánicos o inorgánicos tales como sulfato, fosfato, acetato, succinato, glicerol y piruvato (Laura *et al.*, 2012).

Los HePS se producen a partir de nucleótidos de azúcar, en su síntesis intervienen enzimas glicosiltransferasas intracelulares específicas unidas a membranas que polimerizan las unidades repetitivas, sintetizadas a nivel de membrana en su lado citoplasmático (Laura *et al.*, 2012; Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Genes incluidos en operones o unidades mayores, codifican las enzimas glicosiltransferasas, junto a otros genes que determinan la longitud de la cadena, su polimerización y secreción, así como los que regulan su síntesis (Laura *et al.*, 2012).

En la biosíntesis de los HePS los genes implicados se encuentran organizados en operones o en agrupamiento génicos. Tienen una estructura funcional altamente conservada entre BAL, el cual es similar a los genes que están implicados en la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido en enterobacterias, estos operones pueden encontrarse tanto en el cromosoma o en plásmidos de especies termófilas o mesófilas (Nácher, 2015).

Este tipo de estructuras se han descrito en especies como *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* y *L. lactis*. Los genes que están presentes en los operones se encuentran orientados en la misma dirección, obteniéndose un único transcripto cuyos productos génicos son proteínas reguladoras, proteínas implicadas en la síntesis de las unidades de repetición, en el transporte y en la polimerización (Laws *et al.*, 2001; Náchér, 2015; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

Las condiciones de crecimiento (pH, temperatura y tiempo de incubación) y la composición del medio (carbono, fuentes de nitrógeno y otros nutrientes) pueden afectar el rendimiento del polímero y la composición del azúcar (Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Gellan es un EPS bacteriano aniónico que se une al calcio, este HePS se compone de unidades repetidas de tetrasacárido de dos residuos de β -D-Glucosa, uno de β -D-Glucuronato y uno de α -1-Ramnosa. La goma Gellan tiene una amplia gama de aplicaciones en la industria farmacéutica y otras industrias, como las industrias de alimentos para humanos y animales, como agente estabilizante, espesante, emulsionante y gelificante.

Debido a sus características reológicas apropiadas; se ha aplicado en forma de hidrogel como un andamio de ingeniería de tejidos, la gelificación se induce enfriando una solución de GG-CaCl₂ a la temperatura corporal, mientras que las células y las sustancias bioactivas como las enzimas pueden incorporarse antes de la gelificación a temperaturas > 37 ° C (Douglas *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2013).

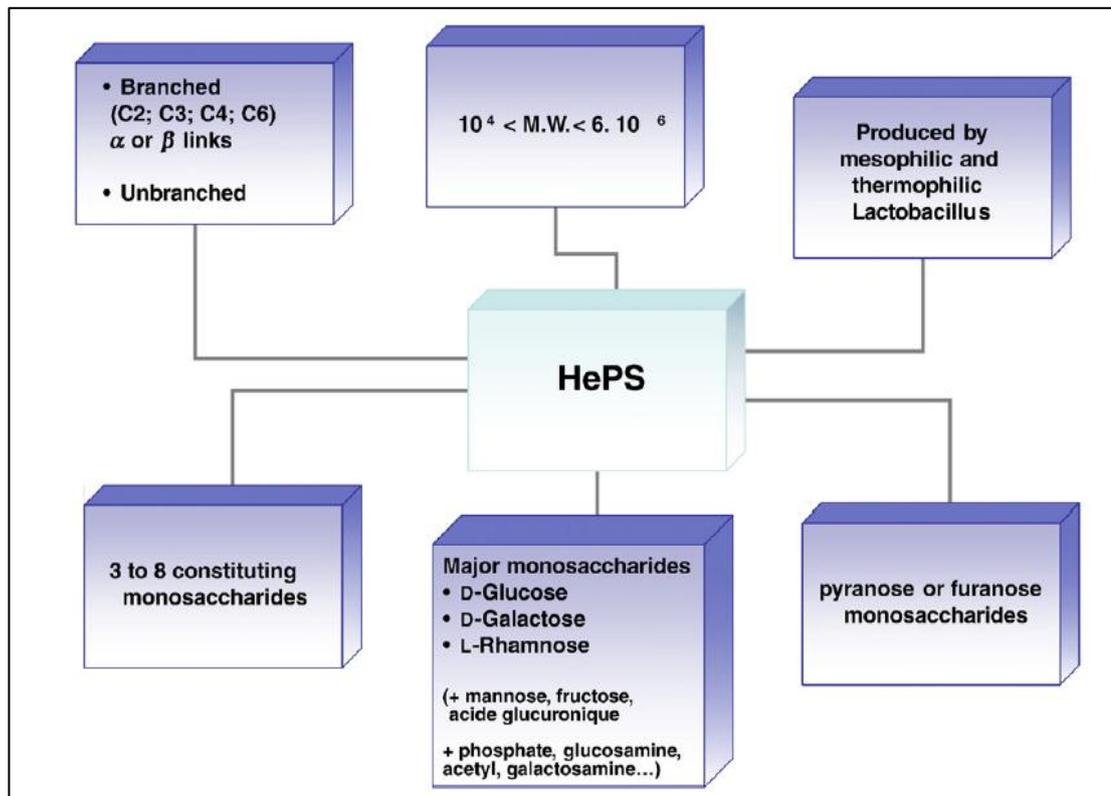
La goma de xantano es un polisacárido aniónico. Está formado por subunidades de pentasacáridos, formando una cadena principal de celulosa con cadenas laterales trisacáridas compuestas de ácido manosa β - (1,4) -glucurónico, β - (1,2) -manosa unida a residuos de glucosa alternativos en la columna vertebral por enlaces α - (1,3) (Vorhölter *et al.*, 2008).

Debido a sus propiedades reológicas, como la alta viscosidad y la pseudoelasticidad, el xantano se usa en la perforación de petróleo, en productos de construcción para optimizar las propiedades de los materiales y en las industrias textil, farmacéutica, cosmética, alimentaria y otras industrias como espesante, emulsionante y estabilizador (Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Kefiran es un HePS producido por *L. kefiranofaciens* y varias otras especies de *Lactobacillus* (*L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir* y *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*). Es un glucogalactano soluble en agua, está compuesto por una unidad repetida de hexa o hepta-sacárido ramificado que contiene cantidades aproximadamente iguales de residuos de D-glucosa y D-galactosa (Frengova *et al.*, 2002; Y. Wang *et al.*, 2008).

El Kefiran tiene propiedades antimicrobianas, actividades antitumorales, para modular el sistema inmunitario intestinal y tener importantes propiedades reológicas de interés para la salud y aplicaciones industriales (Nielsen *et al.*, 2014; Pérez-Ramos *et al.*, 2016).

Figura 9: Clasificación de los HePS producidos por *Lactobacillus* spp. Fuente: (Badel *et al.*, 2011)



2.3.2 Funciones y Aplicaciones Biotecnológica de los EPS

Las extraordinarias propiedades de los biopolímeros que producen las BAL, que están libres de peligros para la salud, generalmente han sido reconocidos como seguros (Ahmed *et al.*, 2013).

Una comprensión integral de la conformación molecular de los polisacáridos es esencial para dilucidar mejor la relación entre su estructura y función (Shao *et al.*, 2015).

Históricamente, la investigación con EPS bacteriana ha sido principalmente de origen médico. La mayoría de los estudios fueron de inmunología donde se estudiaron antígenos presentes en la superficie bacteriana y su papel en la patogenicidad. La producción de cápsulas parece ser insuficiente para asegurar la

virulencia en especies bacterianas. La evidencia de los primeros estudios demostró que muchas bacterias inofensivas, incluidas las que se encuentran en el suelo o en el medio ambiente acuático, están fuertemente encapsuladas, Figura 10 (Jutta Cerning, 1990).

Los EPS no parecen funcionar como fuentes de energía, ya que las bacterias formadoras de limo generalmente no son capaces de catabolizar el polímero que sintetizan. Se ha observado la degradación de EPS producida por *S. pyogenes*, pero no se ha obtenido evidencias de que el organismo utiliza los polisacáridos descompuestos. Sin embargo, los organismos no relacionados en cultivos mixtos pueden usar limo producido por otros organismos (Li *et al.*, 2014).

La conformación de los polisacáridos juega un papel importante en su reconocimiento biológico por las células (Z. Huang *et al.*, 2009).

Como los EPS son estructuras muy hidratadas, tiene la función de conferir protección a las células frente a la deshidratación, es un gran reservorio de agua que facilita la dispersión de los nutrientes. También permiten a las células adherirse a diferentes superficies, por uniones tanto hidrofóbicas como electrostática, forman los conocidos “biopelículas”, donde las células crecen y se desarrollan formando microcolonias, con la posibilidad de colonizar diferentes ambientes gracias a la biopelícula (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

Las bacterias incrustadas en dicha matriz adhesiva están protegidas contra fuerzas mecánicas y compuestos antimicrobianos. Actúan como mecanismo de defensa frente a ataques de fagos, fagocitosis, depredación por protozoos, anticuerpos y agentes microbianos (Ripoll, 2009).

Los polisacáridos se usan ampliamente en la industria alimentaria como aditivos. Pertenecen a un grupo de compuestos hidrofílicos conocidos como hidrocoloides, que se utilizan en muchas formulaciones de alimentos para mejorar la vida útil y las cualidades organolépticas, esto es debido a sus propiedades como

agentes espesantes y gelificantes, formando una suspensión viscosa o geles cuando se dispersan en agua (Pérez-Ramos *et al.*, 2016; Saha & Bhattacharya, 2010).

El EPS bacteriano utilizado en la industria alimentaria desempeña un papel como agente emulsionante, estabilizante y de viscosidad debido a sus características funcionales únicas (Li *et al.*, 2014).

Contribuyen a la reología, textura y la viscosidad de productos alimenticios fermentados como el yogur y el queso. Las bacterias del ácido láctico productoras de exopolisacáridos juegan un papel importante en la fermentación de alimentos, ya que los productos obtenidos con su ayuda se caracterizan por su seguridad higiénica, estabilidad de almacenamiento y atractivas propiedades sensoriales (Savadogo *et al.*, 2004).

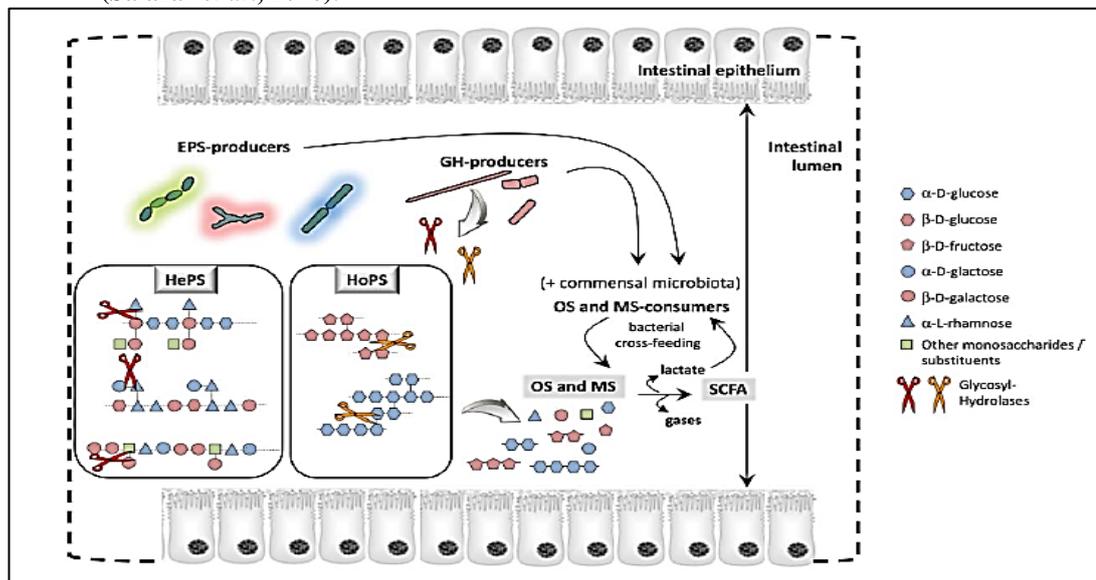
Además, los EPS microbianos se han convertido en una alternativa de interés como agentes inmunomoduladores, antiinflamatorios, antibiofilm y antioxidantes en las industrias médica y farmacéutica, se ha reportado que presenta actividad antitumoral y actúa como agente reductor del colesterol en sangre en humanos. El EPS producido por BAL permanece estable en el tracto gastrointestinal del huésped, lo que mejora la colonización de bacterias beneficiosas (J. Cerning, 1995; Kanmani *et al.*, 2013; Kavita *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2010; Konieczna *et al.*, 2018; Sungur *et al.*, 2017).

EPS producido por *L. rhamnosus* expresaron propiedades inmunosupresoras induciendo altas niveles de IL-10 y bajo o nulo TNF- α IL-6 y IL-12, los EPS estuvieron involucrado en las propiedades inmunosupresoras (Bleau *et al.*, 2010).

EPS de *L. plantarum* ha exhibido una excelente capacidad de inhibir la adhesión de *E. coli* O157: H7 a las células HT-29, y presentaron propiedades probióticas en la actividad antibiofilm en varias bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, y actividad antitumoral contra las células HT-29 (Liu *et al.*, 2017; J. Wang *et al.*, 2015).

Algunas EPS bacterianas se pueden usar para diversas industrias como hospedantes de moléculas hidrófobas, resinas de intercambio iónico, materiales encapsulantes, bioabsorbentes y biofloculantes, agentes de eliminación de metales pesados, agentes de administración de fármacos (Kanmani *et al.*, 2011; Kavita *et al.*, 2014).

Figura 10: Representación esquemática de las interacciones cruzadas microbianas establecidas entre los productores de EPS, los degradadores de EPS y los consumidores de OS-MS en el entorno intestinal. HePS: heteropolisacáridos, HoPS: homopolisacáridos, OS: oligosacáridos, MS: monosacáridos y SCFA: ácidos grasos de cadena corta. Fuente: (Salazar *et al.*, 2016).



Los exopolisacáridos bacterianos han surgido como un importante material polimérico de uso industrial, con grandes ventajas competitivas, tiene una producción sostenible a partir de energías renovables, son biodegradables y biocompatibles (Nicolaus *et al.*, 2010).

Los EPS bacterianos han sido utilizados ampliamente en aplicaciones de alto valor añadido como en procesos y/o productos alimentarios, farmacéuticos, cosméticos y médicos, en los cuales, los EPS actúan como estabilizante, emulsificantes, espesantes, texturizantes o como agentes de unión debido a su comportamiento no newtoniano y su elevada viscosidad en medio acuoso (Freitas *et al.*, 2011; Poli *et al.*, 2010).

Las investigaciones se centran en utilizar los EPS para la creación de nuevas estructuras, tanto micro como nanoesferas, perlas o cápsulas poliméricas, que puedan contener compuestos bioactivos como vitaminas, antioxidantes, prebióticos o probióticos (Aguilera *et al.*, 2008).

Algunos EPS bacterianos tienen la capacidad de establecer interacciones intermoleculares químicas y físicas, resultando en una matriz polimérica cohesiva capaz de formar una película o film. Algunas investigaciones se han centrado en desarrollar matrices poliméricas con ciertas propiedades como transparencia, barrera, propiedades mecánicas, bioactividad y biocompatibilidad, para múltiples aplicaciones, principalmente para recubrimiento de sustancias comestibles y empaquetamiento de alimentos (Alves, 2011; Matsumoto & Kuroyanagi, 2010).

La capacidad que tienen los EPS para formar matrices poliméricas hace posible su manipulación *in vitro* para moldearlos como materiales estructurales como por ejemplo nanopartículas, hidrogeles o expansores, que se adapten a aplicaciones biomédicas específicas incluyendo la administración de fármacos en geles para técnicas de imagen como la ecografía, la ingeniería de tejidos o apósitos para heridas (Matsumoto & Kuroyanagi, 2010; Rodríguez-Carmona & Villaverde, 2010).

Debido a las características de los EPS, que pueden ser moldeables, estos desempeñan un importante papel en el desarrollo de nuevos fármacos, y no solo por su capacidad de formar matrices poliméricas, sino también por sus actividades biológicas inherentes, como, por ejemplo, el xantano, el dextrano sulfatado y el curdlan sulfatado se utilizan como agentes antivirales y anticancerígenos (Ghosh *et al.*, 2009; Takeuchi *et al.*, 2009).

Los EPS pueden ser utilizados como una fuente de oligosacáridos y monómeros de azúcar, esto supone un valor añadido adicional, por ejemplo, la fructosa es un azúcar tanto difícil de obtener. Los oligosacáridos que contienen fructosa, tienen propiedades que potencian su uso en fármacos, como agentes anticarcinogénicos o antiinflamatorios, así también, en productos de cosmética como

agentes anti edad, los polisacáridos que tienen alto contenido de fructosa, u otros componentes de valor añadido, pueden ser considerados como productos químicos apreciables (Freitas *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2007).

Los EPS producidos por *L. plantarum* han demostrado actividad citotóxica contra el cáncer de colon y las líneas de cáncer de mama, 88,1% y el 73,1% a una concentración de 10 mg/mL, respectivamente (Ayyash *et al.*, 2020).

Los exopolisacáridos bacterianos, en especial la goma xantana, son aplicados en extracción de petróleo como fluidos de perforación, ya que tienen la capacidad de aumentar la viscosidad a bajas concentraciones (Baba Hamed & Belhadri, 2009).

Otras aplicaciones de los EPS bacterianos que está tomando mayor atención son la captura de compuestos tóxicos, la activación de la sedimentación de lodos, la incorporación de nanopartículas de arcillas en espumas acuosas para suprimir la vaporización de gasolina y la producción de absorbentes elásticos para la absorción química del dióxido de carbono (Fonseca, 2014; Freitas *et al.*, 2011).

3 METODOLOGÍA

3.1 Diseño y tipo de Investigación

Diseño experimental mixto con componentes cualitativos y cuantitativos.

3.2 Muestreo

Por conveniencia. La tusa de maíz (sustrato) a estudiar fue colectada en el Mercado Municipal de la ciudad de San Lorenzo, Departamento Central, Paraguay con las siguientes coordenadas 25°19'59"S, 57°31'59"O, del contenedor de desecho municipal.

3.3 Análisis proximal del sustrato

Las muestras fueron recolectadas y transportadas en bolsas de polietileno, hasta el laboratorio de Control Unión Paraguay – Asunción, las mismas fueron enjuagadas con agua destilada para retirar materiales como arena, se dejó escurrir en papel absorbente. Fue triturado en un molino industrial de la marca ANALYSER, se secó a 100°C por 40 minutos en estufa de la marca MEMMERT modelo UF110, luego del secado se procedió a la molienda nuevamente con el molino industrial, las muestras fueron seleccionadas utilizando una zaranda de 1–5 mm de largo y 1 mm de grosor (Misra *et al.*, 2013). Se realizaron las siguientes determinaciones físicoquímicas según el “Grain and Feed Trade Association” (GAFTA), todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

3.3.1 Determinación de Humedad (Método Oficial GAFTA 2:1:2014)

En un recipiente con tapa se pesó 5 g de la muestra molinada repartiendo de forma uniforme, se colocó en la estufa MEMMERT modelo UF110 precalentada a 103°C durante 4 horas, se enfrió durante 45 minutos en el desecador y se pesó anotando el resultado. El contenido de humedad, como porcentaje de la muestra, se calculó utilizando la siguiente fórmula (1):

$$\text{Humedad} = \frac{(m1 - m2) * 100}{m1}$$

m 1=masa(g) de la muestra antes del secado

m 2= masa (g) de la muestra después del secado

Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (σ).

3.3.2 Determinación del porcentaje de Proteína, mediante el método de Kjeldahl (Método oficial GAFTA 4:1:2014)

Se pesó 1 g de la muestra y se transfirió al balón de digestión, añadiendo 10 g de sulfato de potasio, 1 gramo de catalizador sulfato de cobre (II) y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se precalentó el digestor de la marca GERHARTD a 250°C y se colocaron los balones aumentando la temperatura a 440°C durante 2 horas, hasta obtener una solución verde claro.

Los balones fueron transferidos al equipo de destilación de la marca GERHARTD, los mismos han sido valorados con una solución de hidróxido de sodio. Para confirmar que los reactivos estaban libres de nitrógeno se realizó una prueba de blanco utilizando 1 g de sacarosa en lugar de la muestra.

La proteína bruta se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (2):

$$\text{Proteína Cruda} = (V_0 - V_1) \times C \times 0,014 \times 100 \times 6,25 \times M$$

Siendo:

V_0 = Volumen (mL) de NaOH consumido en la prueba de blanco

V_1 = Volumen (mL) de NaOH consumido en la titulación de la muestra

C = Concentración (mol/L) de NaOH

M = masa de la muestra

Se realizó el análisis en 0,5 g de acetanilida para el control de la exactitud del ensayo, con una recuperación de 99%. Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.3.3 Determinación de fibra total (Método oficial GAFTA 9:0:2014)

Se pesó 2,7 g de muestra preparada y fue transferida en una bolsa de lavado previamente secada en estufa una hora a 103°C, fue tratado con éter de petróleo, agitando y decantando 3 veces, se secó la muestra a 103°C por una hora. La muestra fue tratada con 400 mL de la solución de ácido sulfúrico 1,25%, la ebullición fue mantenida durante 30 minutos, a volumen constante en una placa de la marca GERHARTD. Terminado el tiempo las bolsas se enjuagaron con agua destilada caliente. La muestra fue tratada nuevamente con 400 mL de la solución de hidróxido de sodio 1,25%, la ebullición fue mantenida durante 30 minutos, a volumen constante. Terminado el tiempo las bolsas se enjuagaron con agua destilada caliente y con una pequeña porción de etanol 96%.

La muestra fue secada 2 horas a 103°C, enfriada en el desecador por 30 minutos, luego se pesó y se registró el resultado, a continuación, se colocó en la mufla de la marca NABERTHERM por 2 horas a 550°C, se enfrió en el desecador hasta temperatura ambiente y pesó.

El contenido de la fibra, como porcentaje de la muestra, se calculó con la siguiente fórmula (3):

$$\text{Contenido de fibra} = \frac{PE - (PM + PB)}{W} \times 100$$

Donde:

PE= Peso de la muestra + bolsa de lavado + Crisol (Peso Estufa)

PB= Peso de la bolsa vacía

PM= Peso del crisol y cenizas luego del tratamiento en mufla (Peso Mufla)

W= Peso de la muestra

Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.3.4 Determinación de Cenizas (Método oficial GAFTA 11:0:2014)

Se pesó 2 g de la muestra en un crisol de incineración, previamente secada y pesada, la misma fue llevada en la mufla precalentada a 550°C durante la noche, luego se enfrió en el desecador, se pesó y se registraron los resultados.

El contenido de ceniza, como un porcentaje de la muestra, se calculó usando la siguiente fórmula (4):

$$\text{Contenido de ceniza} = \frac{(M0 - M1)}{M2} \times 100$$

Donde:

M0= Masa del crisol más la ceniza.

M1= Masa del crisol.

M2= Masa de la muestra

Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.3.5 Determinación de carbohidratos totales

Se pesó 100 mg de la muestra en un tubo de ensayo de 10 mL, se realizó el hidrolizado de la misma con 5 mL ácido clorhídrico 2,5 N en baño de agua hirviendo por 3 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, para luego neutralizar con carbonato sódico, se enrazó a 100 mL y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se tomaron alícuotas de 0,5 y 1 mL para el análisis.

Curva patrón

Se preparó una solución stock de glucosa, 100 mg en 100 ml de agua destilada. Para la solución estándar de trabajo se tomó 10 mL de la solución stock y se diluyó a 100 mL con agua destilada, de la misma se preparó estándares tomando 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mL, el 0 fue el blanco, se completó el volumen a 1 mL incluyendo los tubos de muestra, a continuación, se agregó 4 mL de reactivo antrona 2% en ácido sulfúrico 95%, se calentó durante 8 minutos en baño de agua hirviendo, enfriando rápidamente. Se leyó la absorbancia a 630 nm espectrofotómetro UV-visible. De la ecuación de la gráfica obtenida se calculó la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra.

El contenido de carbohidratos en % se calculó mediante la siguiente fórmula

$$(5): \% \text{Carbohidratos} = \frac{C * 10}{M * V}$$

Donde:

C: mg de carbohidratos de la curva

V: alícuota de muestra analizada

M: masa de muestras ensayadas

Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.4 Preparación del hidrolizado de tusa de maíz

La hidrólisis de la tusa de maíz fue desarrollada según lo descrito por Misra *et. al.* con algunas modificaciones.

El sustrato previamente procesado (secado y tamizado por tamiz de 1mm) fue pesado en matraz Erlenmeyer de 250 mL con ácido sulfúrico 2 N en relación 1:4 p/v, calentado en autoclave a 100°C por 85 minutos.

Después de la reacción y enfriamiento, el material se filtró y se estimó el pH del hidrolizado. El mismo se trató mediante ajuste de pH, donde el pH del hidrolizado se elevó a 10 con hidróxido de sodio 1 N y se volvió a ajustar a 6,5 usando ácido clorhídrico 1 N, nuevamente fue filtrado al vacío con una membrana de 0,45 μ m y conservado a 4°C (Misra *et al.*, 2013).

3.5 Preparación de inóculos

Las cepas utilizadas en el ensayo fueron obtenidas a través del departamento de Biotecnología de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UNA.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 y *Lactobacillus rhamnosus* aislado dentro del proyecto “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos” PINV15-681 Programa de Prociencia del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

Ambas cepas fueron cultivadas en medio de cultivo caldo MRS (Man, Rogosa, Sharpe) por 48 horas a 37°C para su activación, fueron adaptadas para su crecimiento en el hidrolizado según lo descrito por Palakawong *et. al.* con algunas modificaciones. El inóculo inicial fue cultivado en un medio de cultivo compuesto por caldo MRS y el hidrolizado en una proporción 50:50 por 48 horas a 37°C en una incubadora de la marca SAN JOR, realizando el seguimiento por el método de tinción Gram, densidad óptica (DO), resiembra en placas con medio agar MRS, observación de turbidez en el medio (Palakawong Na Ayutthaya *et al.*, 2019).

3.6 Determinación de azúcares totales en el hidrolizado

Fue llevado a cabo según lo descrito por Chang & Murillo con algunas modificaciones.

Se preparó una dilución de la muestra, con un factor de dilución 50, a esta se le denominó muestra de trabajo. El reactivo antrona se preparó en una concentración de 0,2% en ácido sulfúrico al 80%.

Se tomó 1 mL de la muestra de trabajo mezclando con 5 mL del reactivo antrona, llevando a ebullición en baño de agua por 15 minutos, enfriando luego a temperatura ambiente, se agitó vigorosamente y la absorbancia fue medida a 630 nm en espectrofotómetro UV-visible.

Curva patrón

Se prepararon soluciones patrón a partir de 500 ppm de glucosa anhidra, de concentraciones 10, 25, 50, 100 y 150 ppm en matraces aforados para la construcción de la curva de calibrado. En tubos de ensayos se tomaron 200 µL de cada solución y se trató con el reactivo antrona de la misma manera que las muestras. De los resultados se realizó la curva de calibrado para determinar la concentración equivalente de glucosa anhidra de los tubos de muestra.

A partir de la ecuación de la curva se obtuvo la concentración de carbohidratos totales en el hidrolizado (Chang & Murillo, 2017). Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.7 Determinación de glucosa total en el hidrolizado

La determinación de glucosa total se realizó con un Kit “Glucose liquicolor” de la marca Human, que realiza una prueba enzimática colorimétrica por glucosa por el método GOD-PAP (Glucosa oxidasa y peroxidasa).

En tubos de ensayos se agregaron 2 mL del reactivo enzimático más 20 μ l del hidrolizado diluido con un factor de 10, como control positivo el kit provee de glucosa como estándar. Se agitó y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 500 nm frente al blanco de reactivo en un espectrofotómetro UV-visible.

Para el cálculo de la concentración de glucosa se utilizó la siguiente ecuación.

$$C = 100 \times \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{estándar}}} \text{ mg/dL}$$

Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.8 Determinación de azúcares reductores en el hidrolizado

Según el método de (Miller, 1959), los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. La determinación de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado fue llevada a cabo siguiendo la descripción de Ávila Núñez *et. al.*

El reactivo DNS se preparó disolviendo 0,8 g de hidróxido de sodio en agua destilada, luego se adicionaron 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra-hidratado con agitación constante en un agitador magnético de la marca QUIMIS, luego se añadieron 0,5 g de DNS, esta mezcla se aforo a 50 mL y se almacenó en frasco ámbar a 4 °C.

La muestra de trabajo se preparó realizando una dilución del hidrolizado, con un factor de dilución 50.

En tubos de reacción se mezclaron 0,5 mL de la muestra de trabajo con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocaron en ebullición por 5 minutos en baño maría e inmediatamente la reacción se detuvo en baño de hielo por 5 minutos, luego se agregaron 5 mL de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo por 15 minutos, la absorbancia se determinó a 540 nm espectrofotómetro UV-visible.

Curva patrón

Se preparó una solución stock de 4 g/L de Glucosa anhidra, a partir de las mismas se realizaron diluciones con concentración de 0; 0,25; 0,50; 1; 2 y 4 g/L de glucosa para la curva patrón. Se tomaron 500 µL de cada solución en tubos de reacción y fueron tratadas con el reactivo DNS de la misma manera que la muestra de trabajo. De los resultados se construyó la curva de calibrado.

A partir de la ecuación de la curva se obtuvo la concentración de azúcares reductores (Ávila Núñez *et al.*, 2012). Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ).

3.9 Determinación de fenoles totales en el hidrolizado

La concentración de fenoles totales en el hidrolizado se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi con algunas modificaciones.

Se realizó una dilución del hidrolizado con un factor de 10, de la misma se tomaron 1 mL y se diluyeron a 5 mL. Esta solución fue denominada solución de trabajo.

En un tubo de reacción se adicionaron 200 μ L de solución de trabajo, 2000 μ L de agua y 200 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 2N (grado analítico, Merck), se llevó a 10 mL de volumen. Se agitó y luego se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 1500 μ L de carbonato de sodio al 20%. Se agitó. Después de 1 hora de reposo en oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

Curva patrón:

Para la curva patrón se preparó una solución Stock de ácido gálico en metanol de 100 mg/mL. A partir de esta solución se prepararon diluciones y se obtuvieron matraces con concentraciones de 0 a 20 μ g/mL de ácido gálico en matraces para construir la curva de calibración. En tubos de ensayos se tomaron 200 μ L de cada solución y se trató con los reactivos de la misma manera que las muestras. De los resultados se realizó la curva de calibrado para determinar la concentración equivalente de Acido Gálico de los tubos de muestra.

Los resultados se expresaron como como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/mL de hidrolizado, los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (σ) (Blainski *et al.*, 2013; Singleton *et al.*, 1965).

3.10 Producción de exopolisacáridos utilizando como medio el hidrolizado de la tusa de maíz

La producción de exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas, *L. plantarum* ATCC 8014 y *L. rhamnosus*, fue llevada a cabo utilizando 50 mL de hidrolizado de tusa de maíz, en frascos con tapa rosca de 250 mL, filtradas con membrana de

0,22 μ m y pasteurizadas a 60°C por 30 minutos en baño termostatzado de la marca MEMMERT.

Las variables independientes tenidas en cuenta durante la producción de exopolisacáridos bacterianos fueron pH 4,5; 5,5 y 6,5; temperatura (°C) 37; 35 y 30 y tiempo de fermentación 24; 48 y 72 horas, en condiciones estáticas.

Para el inicio de la fermentación se determinó el DO del inóculo preparado en un medio de cultivo compuesto por una proporción de 50:50 de caldo MRS y el hidrolizado de tusa de maíz, se inoculó los frascos con el hidrolizado a una densidad óptica inicial de aproximadamente 0,1 usando la ecuación (6) $C_1V_1=C_2V_2$.

Como control positivo se inocularon frascos de 250 mL con tapa que contenían 50 mL de caldo MRS con ambas cepas en estudio, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Como control negativo, se preparó en los mismos frascos, 50 mL del hidrolizado de la tusa de maíz en las mismas condiciones sin ser inoculada.

Pasado cada tiempo de fermentación se realizaron el conteo de colonias por el método UFC, las mismas fueron plaqueadas en medios de cultivos agar MRS incubadas a 37°C por 24 horas, para monitoreo de las células viables en el hidrolizado y, además, la extracción de los exopolisacáridos (Muñoz-Rojasa et al., 2016; X. Wang et al., 2017).

3.11 Extracción, pre-purificación y cuantificación de EPS

El proceso de extracción de los EPS fue llevado a cabo según lo descrito por Adesulu-Dahunsi *et. al.*

Una vez completado el tiempo de fermentación, el cultivo fue calentado a 100°C por 10 minutos para inactivar las enzimas que pueden degradar el EPS.

Las células se eliminaron por centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4 ° C en una centrifuga refrigerada de la marca Cryocence, y el sobrenadante libre de células se precipitó mezclando en dos volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó vigorosamente con la ayuda de un agitador magnético y el EPS precipitado se recogió por centrifugación a 5000 g durante 30 minutos a 4° C. El EPS resultante se secó a 50 ° C sobre papel de filtro por 30 minutos (Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018).

Se realizó una pre-purificación; los exopolisacáridos precipitados se disolvieron en agua ultrapura y nuevamente se precipitaron con un doble volumen de etanol absoluto frío y se recogieron por centrifugación. Este procedimiento se repitió tres veces para eliminar los restos celulares. El EPS parcialmente purificado se llevó a estufa a 50°C hasta peso constante, se pesó para obtener la producción final en g/L (A. T. Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018).

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó por el método de antrona anteriormente descrita, se analizó el EPS con la mejor producción obtenido para cada bacteria en estudio.

3.12 Técnicas de análisis y procesamiento de la información

Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS¹ versión 22.0. El mismo permitió realizar los análisis estadísticos pertinentes según las características de los datos de cada una de las muestras (con hidrolizado de tusa de maíz y con el medio de cultivo MRS) tanto para *L. plantarum* como para *L. rhamnosus*.

Se determinó si hay diferencias en la producción de exopolisacáridos de bacterias lácticas utilizando como sustrato el hidrolizado de tusa de maíz en comparación al medio de cultivo convencional. Como se han analizado 2 tratamientos en cada cepa, y siendo estas independientes, se realizó 2 tipos de

análisis; Prueba t de Student y la prueba de U Mann-Whitney, ambas para muestras independientes. En el primer caso, la prueba está sujeta al cumplimiento de los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

Se realizó la prueba de normalidad con el estadístico de contraste, dado que la cantidad de datos por tratamiento es de 27 (54 en total), se consideró el estadístico de Shapiro-Wilks para rechazar o no la hipótesis de normalidad.

Como se trata de un enfoque cuantitativo, ya que los datos recabados representan la temperatura, el pH, el tiempo, la UFC y los g/L de los exopolisacáridos se presentan en resultados numéricos. En la investigación cuantitativa se utilizó la recolección de datos para probar hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el objeto de establecer pautas de comportamiento y probar teorías. (Hernández, S. et al., 2012).

Estrategias o procedimientos para contrastar las hipótesis: Para contrastar las hipótesis se aplicó la prueba no paramétrica Prueba U de Mann-Whitney. Esta se utiliza como alternativa a la T de Student cuando no se puede suponer la normalidad de las muestras.

3.13 Evaluación de la capacidad crioprotectora del EPS

Se procedió de acuerdo a lo descrito por Alvarado, con algunas modificaciones.

Para evaluar la capacidad de crioprotección del EPS producido por ambas bacterias ácido lácticas, se sometió la cepa de *E. coli* ATCC 25922, de cultivo inicial de 12 horas en caldo Peptona, se realizó la lectura de la DO a 600nm en un espectrofotómetro UV-visible del cultivo inicial, de la misma se realizaron pasajes en caldo peptona con un DO aproximado de 0,5 utilizando la ecuación (6), se llevó a congelamiento por 24, 48 y 168 horas y descongelamiento en 24, 48 y 168 horas a temperatura ambiente.

Del cultivo congelado se realizaron pasajes en tubos de ensayos con caldos de Peptona con una DO aproximado de 0,1, se incubó por 12 horas a 37°C, monitoreando nuevamente la DO a 600 nm.

Se utilizó una concentración de 5 mg/ml de EPS disuelto en agua desionizada, se empleó como control positivo el glicerol a 25% y como control negativo agua desionizada. Se realizaron 10 ensayos para cada tratamiento (Alvarado, 2015).

Los resultados se presentan como la media de los análisis realizados \pm desviación estándar (σ)

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis proximal de la tusa de maíz

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los análisis fisicoquímicos de la tusa de maíz siguiendo las metodologías GAFTA, la muestra analizada tuvo un alto porcentaje de humedad $69,99 \pm 0,47\%$, este resultado coincide con los resultados publicados por (Pérez, 2016), $70 \pm 2\%$, el cual explica que la alta humedad en este material puede deberse a una menor porosidad del material, lo cual depende del tipo de especie que sea el sustrato y el nivel de madurez.

La proteína obtenida como resultado fue de $4,48 \pm 0,025\%$, un valor más alto a lo reportado por (Pérez, 2016), $2,5 \pm 0,1$ para la proteína en la tusa de maíz; los resultados de este análisis tiene coincidencia con lo reportado por (Requis Varillas, 2012), 4,38% de proteína pero en tusa de maíz morado; la FAO reporta que la mayor concentración de proteínas del maíz se encuentra en el grano, específicamente en la parte del embrión, que puede llegar a alcanzar hasta un 20% de proteína, después del almidón, las proteínas constituyen el siguiente componente químico del grano por orden de importancia (Food and Agriculture Organization, 2013).

La fibra es un componente vegetal que contiene polisacáridos y lignina y que es altamente resistente al hidrólisis de las enzimas digestivas humanas El resultado

obtenido para la fibra total del sustrato seco fue de $18,39 \pm 0,47\%$ valor inferior a lo reportado por (Pérez, 2016) $33 \pm 1\%$ de fibra para la tusa de maíz; también es inferior a lo reportado por (Cardona *et al.*, 2002), 32% de fibra total, esto podría deberse a algunas diferencias en la metodología empleada para la determinación de esta característica, los autores mencionados han utilizado el Método oficial AOAC 930.10, lo que también podría deberse a que el resultado entre estos autores coincidan.

El contenido de cenizas es una medida del total de minerales presentes en un alimento. Contenido de minerales es la medida de la cantidad de componentes inorgánicos específicos, como Ca, Na, K, Cl. El porcentaje de cenizas en la muestra seca analizada es de $1,83 \pm 0,20\%$; valor no muy alejado de lo reportado por (Cardona *et al.*, 2002); $1,6\%$ y lo reportado por (Misra *et al.*, 2013) $1,47 \pm 0,20\%$ de cenizas en tusa de maíz; la FAO reporta que el germen de la mazorca de maíz es relativamente la parte rica en minerales, con un valor medio del 11% , frente a menos del 1% en el endospermo. El mineral que más abunda en la mazorca de maíz es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio, encontrándose en su totalidad en el embrión. Como sucede con la mayoría de los granos de cereal, el maíz tiene un bajo contenido de Ca y de oligoelementos (Food and Agriculture Organization, 2013).

Han sido reportado altos niveles de contenido de carbohidratos en este sustrato, así como en distintas partes de la mazorca de maíz, revelando la riqueza de este material en cuanto a carbohidratos totales se refiere (Ministerio de Salud del Perú, 2009), como resultado de este trabajo, de acuerdo al método empleado, se obtuvo $14,57 \pm 0,10\%$ de carbohidratos totales, valor inferior a lo reportado por (Requis Varillas, 2012), $62,395\%$ de carbohidratos totales en la tusa de maíz; esta variación en los resultados podría deberse al método empleado para la determinación. (Misra *et al.*, 2013) también ha reportado valores superiores de carbohidratos para este sustrato, $73,17\%$.

Ensayo	Resultados %	Desviación estándar
--------	--------------	---------------------

Humedad	69,99	0,47
Proteína	4,48	0,025
Fibra total	18,39	0,47
Cenizas	1,83	0,20
Carbohidratos totales	14,57	0,10

TABLA 3: Resultados de los análisis fisicoquímicos de la tusa de maíz.

Según (Requis Varillas, 2012), las variaciones en los resultados obtenidos en una misma materia prima reportados por las diferentes fuentes de información referidas, se debe a factores como variedad, tipo de suelo, grado de fertilización, edad de recolección, época de cosecha, clima, edad de corte y proceso de almacenamiento, además que las metodologías aplicadas pueden tener variaciones en los resultados.

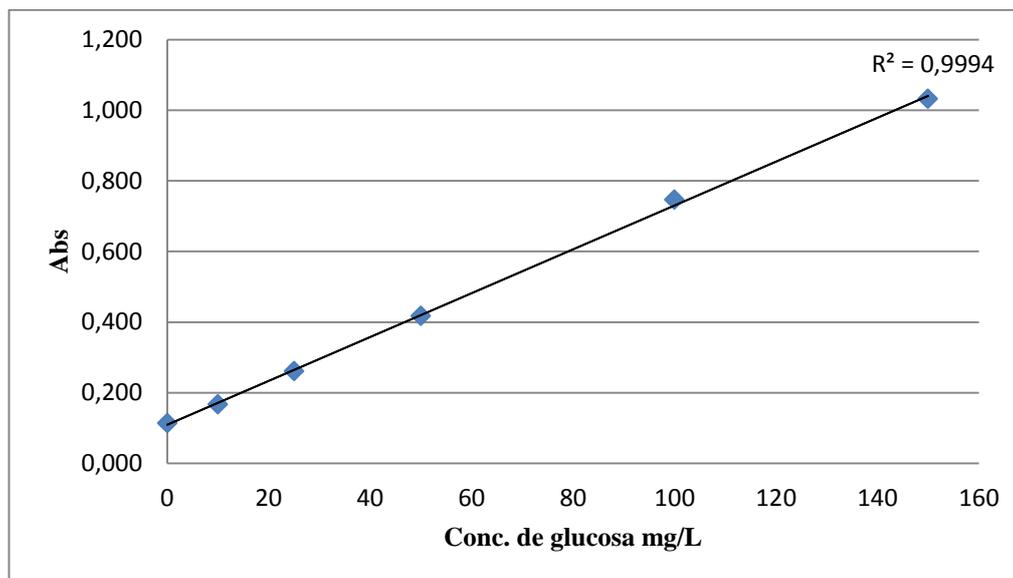
4.2 Obtención de azúcares fermentables por medio de hidrólisis ácida del sustrato

Por cada 100 g de sustrato seco de 1mm, se obtuvo aproximadamente 250 mL de hidrolizado crudo. Al realizar el ajuste de pH tendía a un cambio de color más oscuro, color café, el ajuste se realizó hasta obtener un pH 6,5.

4.2.1 Carbohidratos totales en el hidrolizado

En la tabla 4 se puede visualizar los resultados obtenidos en el ensayo realizado para la determinación de carbohidratos totales en el hidrolizado. En la figura 11 se presenta la curva de calibración utilizada.

Figura 11: Curva de Calibración para Ensayo de Carbohidratos totales en el hidrolizado.



Absorbancia	Concentración g/L	Promedio g/L	Desviación estándar
0,463	28,49		
0,46	28,25	28,76	0,69
0,476	29,54		

TABLA 4: Resultado de la cuantificación de carbohidratos totales en el hidrolizado.

El valor obtenido de la cantidad de carbohidratos totales en la muestra de tusa de maíz analizada fue de $28,76 \pm 0,69$ g/L. Análisis similares realizados sobre el mismo material de estudio, reportaron una cantidad mayor, 59 g/L de carbohidratos totales en el hidrolizado de tusa de maíz (Rui & Lixia, 2011).

Otros autores, sin embargo, aplicando la metodología similar a la empleada en este estudio para el hidrolizado, obtuvieron resultados menores de carbohidratos totales, 12,23 g/L (Cao *et al.*, 2009).

(Misra *et al.*, 2013) han reportado que las condiciones óptimas de hidrolisis para la extracción de carbohidratos de la tusa de maíz son las siguientes: 1% de ácido

sulfúrico, una proporción de 1:8 (p/v), 121°C por 30 minutos, en cambio (Rao *et al.*, 2006) ha publicado que las mejores condiciones de hidrolisis para la extracción de carbohidratos de la tusa de maíz son las siguientes: 1% de ácido sulfúrico, una proporción de 1:5 (p/v), 121°C por 60 minutos.

Como lo mencionado por (Cardona *et al.*, 2002), los resultados son difíciles de comparar ya que estos pueden variar según distintos parámetros y condiciones de la matriz evaluada, teniendo en cuenta que el muestreo fue realizado en temporada de siembra temprana en época de verano, siendo una planta que necesita de mucha humedad para llegar a su desarrollo completo.

4.2.2 Glucosa total en el hidrolizado

Absorbancia	Blanco	Concentración g/L	Promedio g/L	Desviación estándar
0,271		16,03		
0,280	0,169	16,57	16,31	0,27
0,276		16,33		

TABLA 5: Resultado de la cuantificación de glucosa total en el hidrolizado.

El cálculo manual se realizó según lo indicado por el fabricante del kit, los resultados se presentan en la tabla 5. La cantidad de glucosa total obtenida en el hidrolisis ácido fue de $16,31 \pm 0,27$ g/L.

Este resultado es menor según lo reportado por (L. Wang *et al.*, 2011) de 34,6 g/L, pero con la diferencia que los autores realizaron la fermentación con ácido fórmico con una proporción de 10:1 (p/v). (Misra *et al.*, 2013) ha informado una concentración de 3,56 g/L con ácido sulfúrico 1%, una relación de sólido: líquido de 1:8, 121°C por 30 minutos.

(Rao *et al.*, 2006) reportó un valor obtenido de 38 g/L coincidiendo con el valor observado por (L. Wang *et al.*, 2011); con ácido sulfúrico 1%, una proporción de 1 g de sustrato por cada 5 mL de solución ácida a 121°C por 60 minutos,

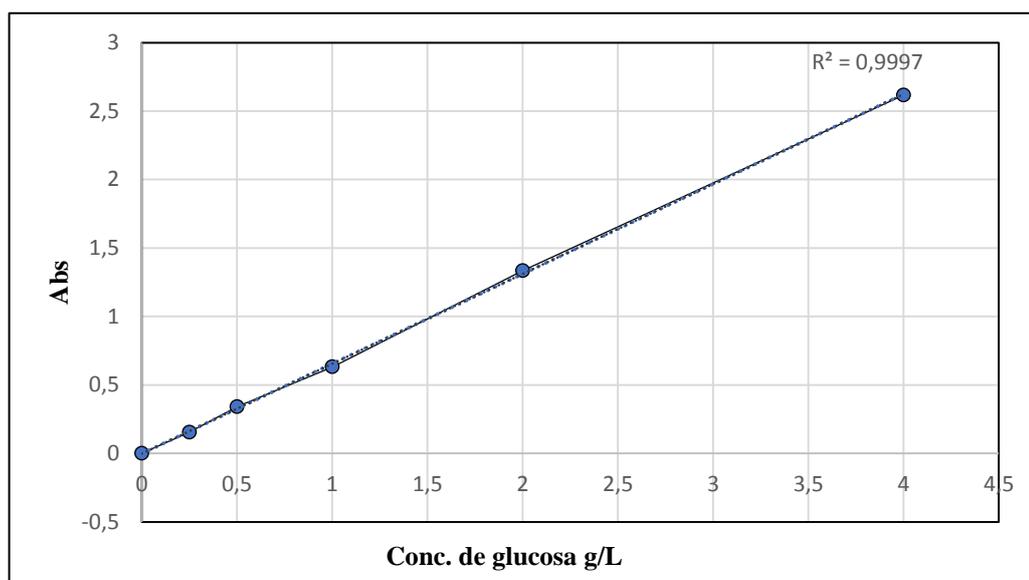
tratamiento similar al empleado en este estudio, sin embargo, la diferencia en el procedimiento es la forma del secado del sustrato, cuya humedad puede influenciar en los resultados ya que podría hidrolizarse menos cantidad de sustrato y la glucosa se estaría diluyendo.

(Rao *et al.*, 2006) realizaron el secado por 24 horas. En cambio, otros autores como (Cao *et al.*, 2009) reportaron un valor observado para la glucosa total de hidrolizado de tusa de maíz de 2,13 g/L, con 2% de ácido sulfúrico a 121°C por 180 minutos y una proporción peso/volumen 1:10. (Misra *et al.*, 2013), ha observado que con el aumento de la concentración de ácido sulfúrico en la hidrolisis disminuye la extracción de glucosa.

Los resultados sugieren que la concentración de glucosa en el hidrolizado depende del tipo de tratamiento al que es sometido el material, además, como es un sustrato con alta humedad, el paso del secado juega un papel importante en la proporción real peso/volumen.

4.2.3 Azúcares reductores totales en el hidrolizado

Figura 12: Curva de Calibración para Ensayo de Azúcares reductores totales en el hidrolizado.



Absorbancia	Concentración g/L	Promedio g/L	Desviación estándar
0,723	27,62		
0,712	27,20	27,44	0,22
0,720	27,50		

TABLA 6: Resultado de la cuantificación de azúcares reductores en el hidrolizado

En la figura 12 se puede observar la curva de calibración utilizada en el ensayo, la tabla 6 muestra los resultados obtenidos, la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado fue de $27,44 \pm 0,22$ g/L.

(Espinoza *et al.*, 2017) reportó una concentración de 84,18 g/L de azúcares reductores obtenido de la planta del maíz amarillo, pero la extracción de azúcares difiere de la aplicada en este estudio, los autores realizaron la extracción de azúcares mediante hidrólisis mixta (química-física y química) en continuo usando ácido sulfúrico 1,25% v/v, hidróxido de sodio 1,25 % p/v y agua destilada respectivamente, además que el secado del material utilizado antes de la hidrólisis lo realizaron de la siguiente manera, a 80-90 °C durante 4- 6 horas; la cual también difiere a la aplicada en este ensayo; para la determinación de la concentración de azúcares reductores emplearon el método de Folin-Wu.

Otros autores han reportado valores menores a lo citado anteriormente, (Montiel & Romero, 2015) han encontrado una concentración de 38 g/L de azúcares reductores con las siguientes condiciones de extracción, 20 g de material, ácido sulfúrico 7%, 90 minutos a 100°C, la determinación lo realizaron por el método de DNS, en este caso se coincide con el material de estudios, tusa de maíz.

El resultado obtenido en este trabajo tiene una diferencia de 10 g/L aproximadamente con lo reportado por (Montiel & Romero, 2015), coincidiendo en el método emplea para la determinación de la cantidad de azúcares reductores, la

diferencia podría explicarse por el tiempo del hidrólisis y la concentración de ácido empleado para la obtención de azúcares utilizando el mismo material de estudio.

Los azúcares no reductores fueron calculados por diferencia entre los totales y los reductores (Ávila Núñez et al., 2012). Teniendo como resultado 1,32 g/L de azúcares no reductores.

4.3 Fenoles totales en el hidrolizado

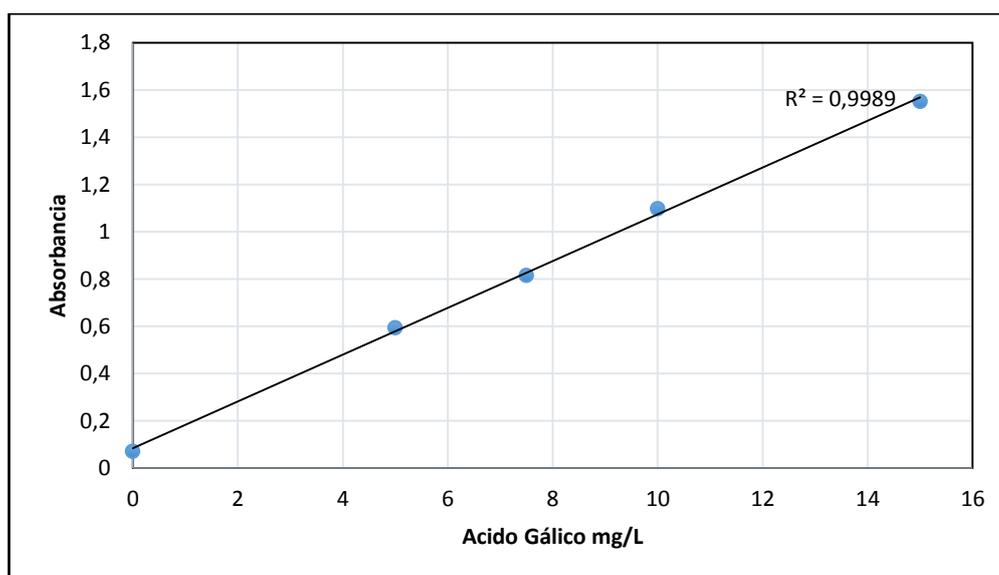


Figura 13: Curva de Calibración para Ensayo de Fenoles Totales.

Absorbancia	Concentración g/L	Promedio g/L	Desviación estándar
0,186	0,079		
0,182	0,077	0,77	0,0011
0,181	0,076		

TABLA 7: Resultado de la cuantificación de fenoles totales en el hidrolizado

El valor obtenido de la cantidad de fenoles totales fue de $77 \pm 1,16$ mg/L. Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de sensibilizar la membrana celular, y al saturarse los sitios de acción, la célula sufre un daño grave, provocando que se

colapse la membrana, existe una concentración crítica de fenoles en donde se puede observar esta reacción, de 350 mg/L (Rodríguez Saucedo, 2011).

En comparación con otras bacterias, como *Clostridium spp.* y *Bacteroides spp.*, los *Lactobacillus spp.* son más resistentes a los compuestos fenólicos. Los lactobacilos que muestran la capacidad de metabolizar compuestos fenólicos generalmente se aíslan de alimentos fermentados con alto contenido de compuestos fenólicos. La capacidad de tolerar y metabolizar estos compuestos depende de la cepa o la especie (Bel-Rhaid et al., 2013; Curiel et al., 2010).

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* son algunos de los lactobacilos, que metabolizan los ácidos fenólicos mediante actividades de descarboxilación y/o reducción. Otras vías metabólicas identificadas en los lactobacilos se basan en: glicosil hidrolasas, que convierten los glucósidos flavonoides en los aglicones correspondientes, y esterasa, galato de metilo, taninos o ésteres de ácido fenólico degradantes (Rodríguez et al., 2009).

Se ha comprobado la capacidad de fermentación de cepas de *Lactobacillus spp.* en medios que contenían ácido protocatecuico y p-cumarico, como ácidos fenólicos ($34,3 \pm 9,1$ y $31,8 \pm 7,4$ mg/L, respectivamente), ácidos clorogénico y cafeico ($16,4 \pm 3,6$ y $14,7 \pm 1,9$ mg/L, respectivamente), ácido neoclorogénico y el ácido p-cumarolquínico ($2,75 \pm 0,07$ y $2,70 \pm 0,02$ mg/L, respectivamente), flavonoides como la rutina ($93,96 \pm 16,89$ mg/L) y quercetina ($5,29 \pm 0,88$ mg/L) (Filannino et al., 2015).

(Misra et al., 2013), han reportado una metodología para la detoxificación de hidrolizados ácidos, que puede remover en un 100% los compuestos furfúricos y casi un 98% los compuestos fenólicos, que son inhibidores del crecimiento bacteriano, por ende, de la fermentación. Esto implica un paso previo más a la fermentación, además que lleva a la pérdida de carbohidratos y azúcares libres, casi un 4% de glucosa, presentes en el hidrolizado utilizando carbón activado.

La finalidad de obtener el valor de fenoles totales en el hidrolizado de tusa de maíz es para el manejo de la concentración de compuestos fenólicos totales que las bacterias empleadas en el estudio pueden tolerar. La metodología de detoxificación de hidrolizados no fue aplicada en este ensayo, ya que, con la hidrólisis ácida no se obtuvo cantidades elevadas de carbohidratos y azúcares reductores como lo reportado por otros autores, y para no conllevar a la pérdida de los mismos se utilizó el hidrolizado con la concentración de fenoles totales conocido previamente.

4.4 Producción de exopolisacáridos

En la tabla 8 y la tabla 9 se muestra los resultados obtenidos durante la fermentación de *Lactobacillus plantarum* en el hidrolizado de tusa de maíz y en el medio de cultivo MRS respectivamente, en las diferentes condiciones de temperatura, pH y tiempo de fermentación. Se realizó el conteo de células viables al término de cada periodo de fermentación (24, 48 y 72 horas).

La producción de los exopolisacáridos en cada condición de fermentación se expresa en g/L, estos resultados son en base al peso seco de los exopolisacáridos extraídos.

L. plantarum ATCC 8014 mostró una mejor producción de EPS a pH 6,5; a temperatura 30°C en 48 horas de incubación utilizando hidrolizado de tusa de maíz, 1,309± 0,079 g/L (Figura 14-C). La cantidad de células viables en cambio se observó en mayor cantidad a 37°C, pH 6,5 en 48 horas de incubación.

Mismas condiciones fueron favorables para la producción de EPS utilizando medio de cultivo MRS, 1,211 g/L (Figura 15-C). Coincidiendo también con lo anterior, la cantidad de células viables se obtuvo a 37°C, pH 6,5 y 48 horas de incubación.

Para ambos casos la bacteria *L. plantarum* mostró mismo comportamiento en cuanto a las condiciones óptimas de producción de EPS, a mayor temperatura la

cantidad disminuyó, en cambio el pH óptimo a las temperaturas de 30°C y 35°C se mantuvo a 5,5.

Cuando la temperatura de incubación se acercó a la temperatura de crecimiento óptima de 37°C, la cantidad máxima de EPS disminuyó bruscamente en ambos casos, con hidrolizado y medio MRS.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH	EPS (g/L)	Log CFU. mL ⁻¹	Desviación estándar EPS
37	24	4,5	0,078	9,26	0,05
		5,5	0,083	9,46	0,02
		6,5	0,070	9,08	0,09
	48	4,5	0,080	8,03	0,012
		5,5	0,092	8,87	0,091
		6,5	0,077	11,30	0,031
	72	4,5	0,062	7,49	0,080
		5,5	0,087	7,76	0,032
		6,5	0,063	7,15	0,084
35	24	4,5	0,084	8,12	0,012
		5,5	0,603	9,28	0,083
		6,5	0,137	9	0,064
	48	4,5	0,098	8,30	0,037
		5,5	0,513	9,34	0,045
		6,5	0,160	9,36	0,029
	72	4,5	0,090	7,41	0,13
		5,5	0,429	8,99	0,071
		6,5	0,111	8,08	0,061
30	24	4,5	0,937	7,90	0,048
		5,5	0,983	9,73	0,083
		6,5	1,238	9,11	0,028
	48	4,5	0,985	7,73	0,191
		5,5	1,003	9,46	0,056
		6,5	1,309	9,98	0,079
	72	4,5	0,799	6,97	0,052
		5,5	0,849	7,58	0,027
		6,5	1,009	8,87	0,038

TABLA 8: Resultados obtenidos de la fermentación de *L. plantarum* ATCC 8014 en hidrolizado de tusa de maíz

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH	EPS (g/L)	Log CFU. mL ⁻¹	Desviación estándar EPS	
37	24	4,5	0,429	9,99	0,120	
		5,5	0,417	10,95	0,087	
		6,5	0,492	9,78	0,112	
	48	4,5	0,409	9,95	0,028	
		5,5	0,500	10	0,263	
		6,5	0,639	11,67	0,021	
	72	4,5	0,388	8,28	0,083	
		5,5	0,489	9,90	0,134	
		6,5	0,617	9,66	0,206	
	35	24	4,5	0,387	8,76	0,102
			5,5	0,399	9,60	0,093
			6,5	0,436	10,57	0,064
48		4,5	0,538	8,83	0,037	
		5,5	0,510	8,97	0,045	
		6,5	0,585	10,74	0,279	
72		4,5	0,488	7,99	0,133	
		5,5	0,459	7,10	0,071	
		6,5	0,510	8,80	0,061	
30		24	4,5	0,937	7,01	0,208
			5,5	1,186	7,08	0,083
			6,5	1,202	7	0,218
	48	4,5	1,080	6,55	0,019	
		5,5	1,200	7,75	0,096	
		6,5	1,211	7,58	0,079	
	72	4,5	0,835	5,08	0,052	
		5,5	0,988	6,97	0,027	
		6,5	0,987	6,36	0,138	

TABLA 9: Resultados obtenidos de la fermentación de *L. plantarum* ATCC 8014 en medio de cultivo MRS.

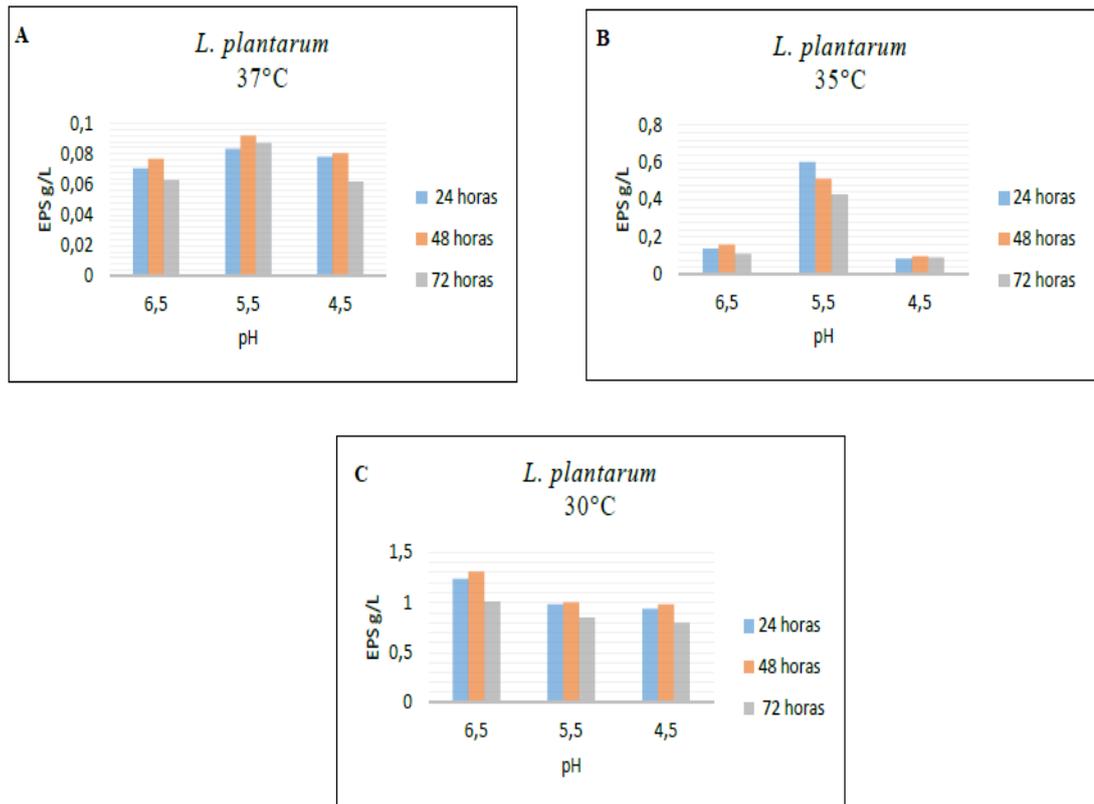
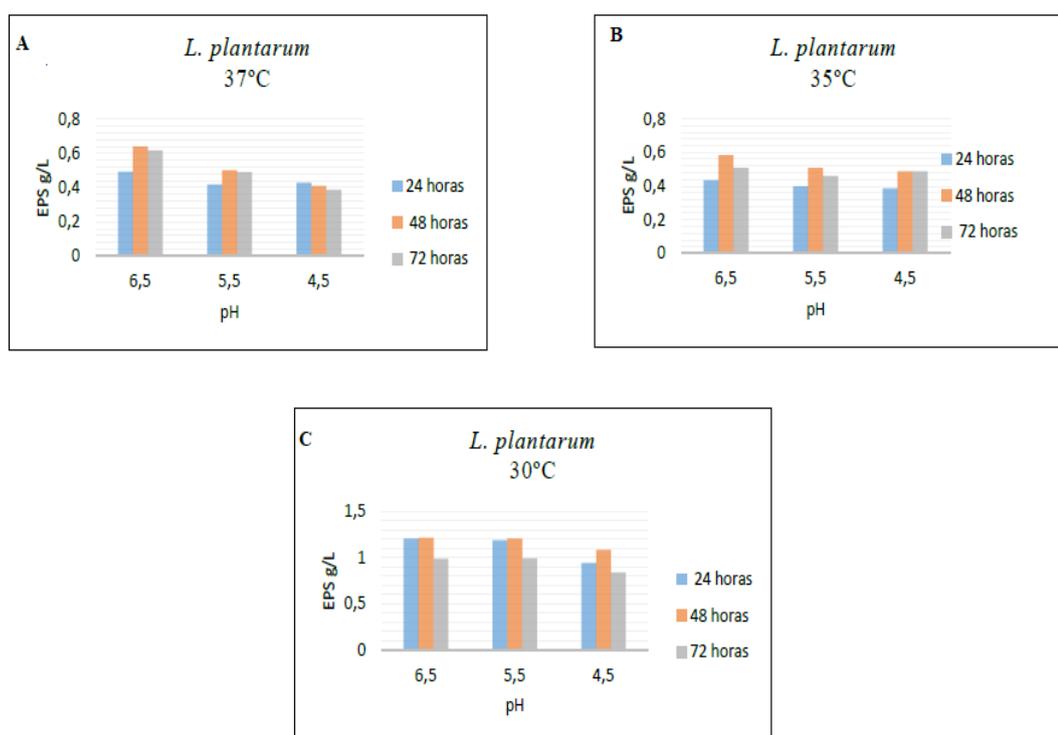


Figura 14: Producción de EPS por *L. plantarum* en hidrolizado de tusa de maíz, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.

Esta observación fue reportada por (Tallon *et al.*, 2003), la temperatura de crecimiento óptima obtenida por los autores fue de 37°C para *L. plantarum* EP56, coincidiendo con el resultado de este trabajo, en cambio la temperatura de mayor producción de EPS que los autores obtuvieron fue de 18°C. A medida que la temperatura se acercaba a la óptima de crecimiento celular, la producción de EPS se vio afectado en una disminución de hasta un 44%.

El log de UFC de *L. plantarum* máximo obtenido para la fermentación con hidrolizado y el medio MRS fue de 11,30 y 11,67 respectivamente a 37°C y pH 6,5, (Tallon *et al.*, 2003) reportaron un log de UFC 9,36 a la misma temperatura.

(Zamudio Malpartida, 2005) reportó una temperatura óptima de 30°C para la producción de EPS por la cepa *L. plantarum* Q5-3, observando también la discordancia con la temperatura usual óptima de crecimiento para esta bacteria ácido



láctica, la producción máximo que obtuvieron fue de 1,535 g/L de EPS, la cepa en estudio tuvo una mejor producción a un pH 5,5, los resultados obtenidos en este estudio son similares a los resultados publicados por la autora.

Figura 15: Producción de EPS por *L. plantarum* en medio de cultivo MRS, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.

Uno de los factores que influyen directamente sobre la producción de EPS por bacterias lácticas es la temperatura, a 30°C se ha encontrado que existe una óptima producción de estos biopolímeros, esto puede estar relacionado con la

naturaleza mesofílica de las cepas de *L. plantarum*, se ha informado la disminución de diez veces en la producción de EPS en *L. plantarum* como un efecto del incremento de la temperatura de incubación de 30 a 37 °(Zehir Şentürk et al., 2020).

(Y. Wang et al., 2010) obtuvieron una mayor producción de EPS por *L. plantarum* KF5 con las siguientes condiciones, 30°C, pH inicial 6,3 y 30 hora de incubación logrando obtener una producción de 0,0956 g/L. Resultado que difiere a lo obtenido en este trabajo, esto puede deberse a los fuentes de carbono empleados en cada caso, que también influye en la producción de EPS.

(Tsuda & Miyamoto, 2010) han observado que a 25°C la cepa *L. plantarum* 301102S produce mayor rendimiento exopolisacáridos, y que también difería de la temperatura óptima de crecimiento, obtuvieron 0,145 g/L de EPS en 18 horas de incubación, por otro lado, a mayor tiempo de incubación, 96 horas, los autores notaron una disminución en la producción de EPS, cuyo producción fue de 0,074 g/L.

En este trabajo también se tuvo el mismo comportamiento que reporta autores como (Tsuda & Miyamoto, 2010; L. Zhang et al., 2013), a mayor tiempo de incubación la cantidad de los exopolisacáridos disminuía. La producción máxima obtenido en hidrolizado de tusa de maíz fue de 1,3091 g/L a las 48 horas, a 72 horas esto disminuyó a 1,0091 g/L. Mismo caso se presentó con el medio MRS, 1,2109 g/L a las 48 horas y a las 72 horas de incubación disminuyó a 0,9867 manteniendo constantes las demás condiciones.

La producción de exopolisacáridos por BAL varía mucho de acuerdo a las condiciones de fermentación , fuente de carbono y nitrógeno (Ismail & Nampoothiri, 2010), obtuvieron una mayor producción de EPS de 1,08 g/L con la cepa *L. plantarum* MTCC 9510, a 37°C, 72 horas de incubación, pH 7,3; utilizando el medio de cultivo MRS enriquecido con sulfato de amonio.

A la misma temperatura (K. Wang *et al.*, 2014) obtuvieron 0,581 g/L de EPS con *L. plantarum* 70810 en un medio definido que contenía citrato de amonio, en este estudio se obtuvo un rendimiento similar a la misma temperatura utilizando el medio MRS.

(Sasikumar *et al.*, 2017) han publicado una producción de $2,8 \pm 0,5$ g/L EPS de *L. plantarum* BR2, a 37°C coincidiendo con la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria, con 72 horas de fermentación, los resultados obtenidos a esas condiciones de fermentación en este trabajo son inferiores a los reportado por los autores, los cuales utilizaron el mismo medio empleado por (Ismail & Nampoothiri, 2010).

Utilizando una fuente de carbono diferente a lo empleado en este estudio, (Dilna *et al.*, 2015) han reportado un alto rendimiento de EPS producido por *L. plantarum* RJF4 utilizando lactosa, a 37°C por 72 horas de incubación, con estas condiciones obtuvieron 1,5 g/L de EPS total purificado.

(X. Wang *et al.*, 2017), han utilizado MRS modificado, la peptona y la glucosa fueron reemplazadas por peptona de soja y lactosa en medio acompañado con MnSO₄ a 35°C y pH inicial 6,38, en estas condiciones obtuvieron 0,6 g/L de EPS por la bacteria *L. plantarum* KX041, este resultado es similar a lo obtenido en este trabajo bajo las mismas condiciones utilizando MRS, a pH 6,5, temperatura 35°C se obtuvo un máximo de EPS de 0,585 g/L.

(Min *et al.*, 2019), han obtenido 0,075 g/L de EPS de *L. plantarum* JLAU103 en medio de cultivo MRS, a 37°C por 24 horas de fermentación, este resultado coincide con lo obtenido utilizando hidrolizado de tusa de maíz, con las mismas condiciones de cultivo se obtuvo 0,070g/L de EPS, en cambio con el medio MRS se obtuvo una mayor producción 0,492 g/L.

En la tabla 10 y la tabla 11 se muestra los resultados obtenidos durante la fermentación de *Lactobacillus rhamnosus* en el hidrolizado de tusa de maíz y en el medio de cultivo MRS respectivamente, en las diferentes condiciones de temperatura, pH y tiempo de fermentación. Se realizó el conteo de células viables al término de cada periodo de fermentación (24, 48 y 72 horas).

El valor de la producción de los exopolisacáridos obtenidos en cada condición de fermentación se expresa en g/L, estos resultados son en base al peso seco de los exopolisacáridos extraídos.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH	EPS (g/L)	Log CFU. mL ⁻¹	Desviación estándar EPS
37	24	4,5	0,615	9,36	0,15
		5,5	0,706	9,99	0,017
		6,5	1,589	9,51	0,181
	48	4,5	0,689	9,56	0,112
		5,5	0,892	8,94	0,039
		6,5	1,629	10,34	0,0711
	72	4,5	0,530	8,81	0,208
		5,5	0,739	7,44	0,059
		6,5	1,390	8,26	0,044
35	24	4,5	0,181	8,10	0,118
		5,5	0,231	9,58	0,183
		6,5	0,637	9,88	0,085
	48	4,5	0,110	8,98	0,073
		5,5	0,251	9,47	0,054
		6,5	0,739	9,81	0,109
	72	4,5	0,106	7,47	0,301
		5,5	0,220	8,92	0,015
		6,5	0,703	8,97	0,096
30	24	4,5	0,715	7,29	0,121
		5,5	0,749	8,01	0,029
		6,5	0,968	8,04	0,204
	48	4,5	0,784	7,14	0,151
		5,5	0,800	8,18	0,156
		6,5	0,984	8,27	0,095

72	4,5	0,694	6,90	0,152
	5,5	0,821	7,95	0,093
	6,5	0,839	7,43	0,085

TABLA 10: Resultados obtenidos de la fermentación de *L. rhamnosus* en hidrolizado de tusa de maíz.

En el hidrolizado de tusa de maíz, la mayor cantidad de EPS se obtuvo a 37°C, 48 horas de incubación con un pH inicial de 6,5, en estas condiciones se logró extraer 1,629± 0,0711 g/L de exopolisacáridos, observándose una disminución a las 72 horas de incubación, 1,390± 0,044 g/L (Figura 16-A).

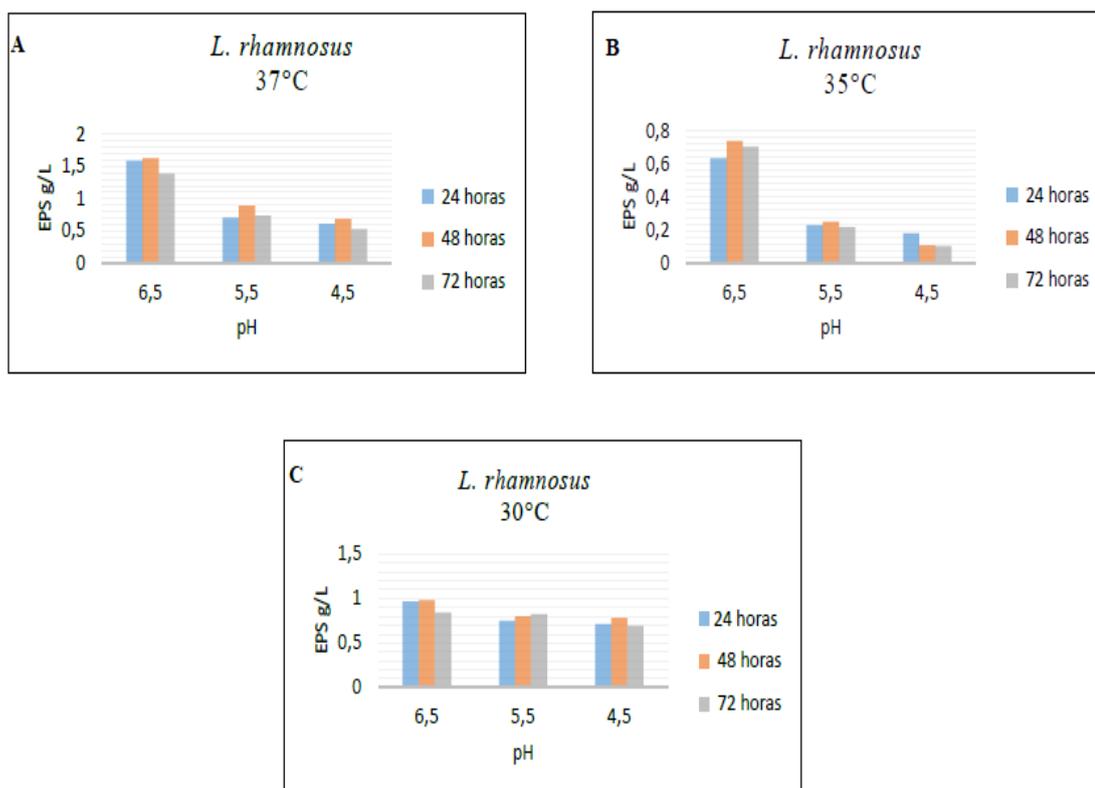
Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH	EPS (g/L)	Log CFU. mL ⁻¹	Desviación estándar EPS
37	24	4,5	0,605	6,48	0,122
		5,5	0,806	6,50	0,011
		6,5	1,627	4,58	0,038
	48	4,5	0,679	6,70	0,094
		5,5	0,902	6,78	0,026
		6,5	1,708	4,95	0,159
	72	4,5	0,523	5,81	0,109
		5,5	0,791	5,99	0,059
		6,5	1,530	3,90	0,301
35	24	4,5	0,199	8,38	0,043
		5,5	0,294	9,60	0,046
		6,5	0,937	10,99	0,091
	48	4,5	0,220	8,76	0,149
		5,5	0,316	9,45	0,159
		6,5	0,939	10,67	0,197
	72	4,5	0,186	7,99	0,106
		5,5	0,290	7,98	0,049
		6,5	0,769	9,93	0,088
30	24	4,5	0,730	7,33	0,158
		5,5	0,838	8	0,079
		6,5	0,803	8,40	0,304
	48	4,5	0,748	6,99	0,033
		5,5	0,849	7,82	0,055
		6,5	0,936	7,48	0,041

	4,5	0,726	5,37	0,164
72	5,5	0,790	5,53	0,127
	6,5	0,900	5,11	0,033

TABLA 11: Resultados obtenidos de la fermentación de *L. rhamnosus* en medio de cultivo MRS.

Con el medio de cultivo MRS, se observó el mismo comportamiento que en el caso anterior, *L. rhamnosus* tuvo una producción mayor a 37°C, pH 6,5 a 48 horas de incubación, con una producción de 1,708± 0,159 g/L. El cual, también tuvo una disminución a las 72 horas de fermentación, 1,530± 0,301 g/L (Figura 17-A).

(Yang et al., 2010) han publicado la producción de EPS por *L. rhamnosus* JAAS8, de 0,175 g/L, produciéndose una disminución a las 32 horas de incubación a 0,122 g/L en medio de cultivo MRS a 37°C, pH 6,6. Mismo comportamiento



observado en este trabajo con la cepa de *L. rhamnosus*, la cantidad de exopolisacáridos disminuía a medida que aumentaba el tiempo de fermentación, en ambos caso, con hidrolizado de tusa de maíz y con MRS.

Figura 16: Producción de EPS por *L. rhamnosus* en hidrolizado de tusa de maíz, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.

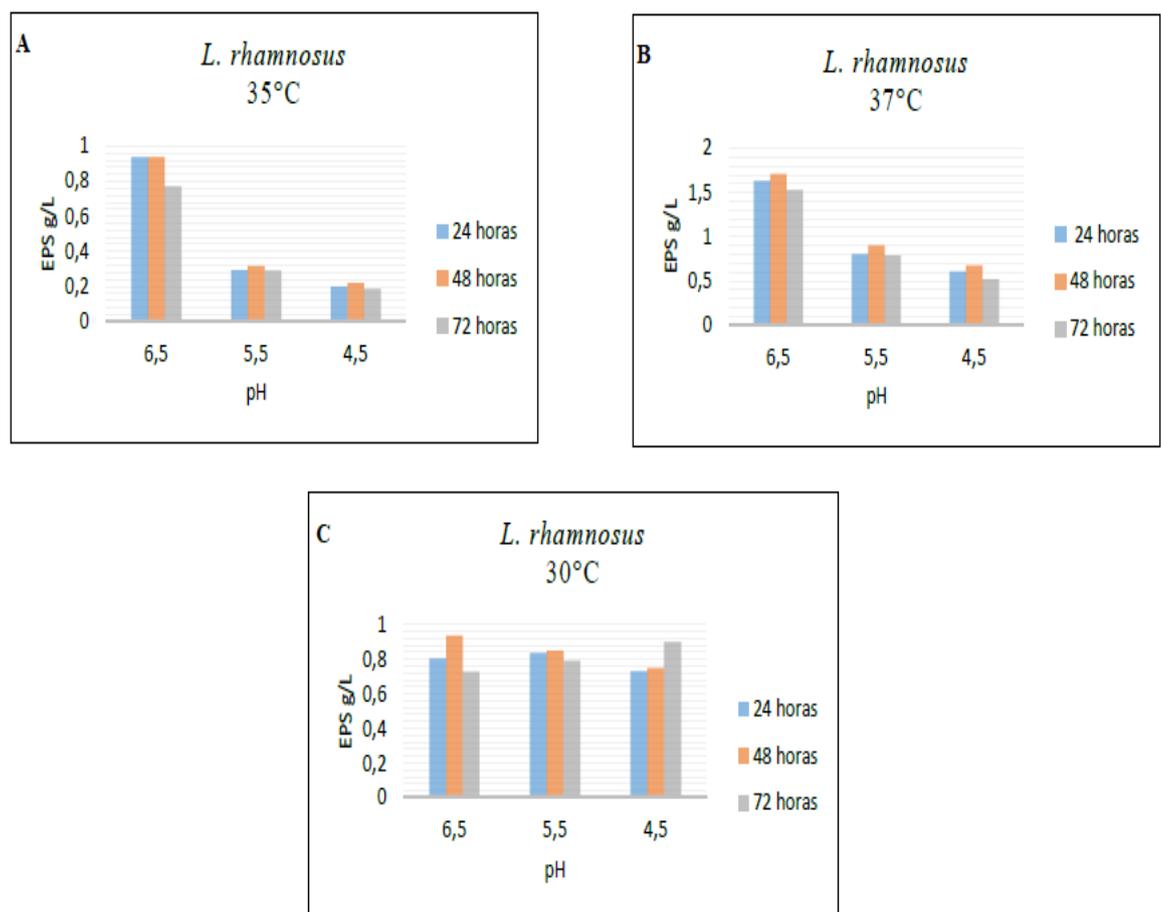
(Macedo et al., 2002), han reportado una de las producciones de EPS más elevadas por *L. rhamnosus* RW-9595M, utilizando como medio de cultivo permeado de suero suplementado con extracto de levaduras, vitaminas y aminoácidos, en 24 horas de incubación obtuvieron 2,775 g/L de exopolisacáridos a 37°C y pH controlado a 6. Estas condiciones coinciden con la temperatura y pH óptima obtenida en este trabajo para la mayor producción de EPS.

El log de la UFC en la producción máxima de exopolisacáridos reportados por (Macedo et al., 2002) fue de 10,03; este resultado coincide con lo obtenido en este trabajo; 10,34 para *L. rhamnosus* en hidrolizado de tusa de maíz, en cambio en el medio MRS se presentó un valor mucho menor 4,95; ambos en condiciones de mayor producción de EPS.

Figura 17: Producción de EPS por *L. rhamnosus* en medio de cultivo MRS, en distintos niveles de pH, tiempo y temperatura.

La biosíntesis de EPS por *L. rhamnosus* JAAS8 se vio asociado con la fase de crecimiento microbiano (Yang et al., 2010); el rendimiento aumenta durante la fase de crecimiento exponencial pero disminuye con la disminución del crecimiento bacteriano, específicamente aquellos polisacáridos que se desprenden de la cápsula. Esto consistió en informes anteriores, que indican que los rendimientos y las propiedades de EPS dependen también del tipo de microorganismos y no solo del medio en que crecen (Ng & Xue, 2017).

La composición del medio de cultivo definen la cantidad de producción de EPS y la biomasa, (Pham et al., 2000) reportaron una producción de 0,438 g/L de



exopolisacáridos utilizando glucosa y 0,495 g/L con lactosa para la cepa *L. rhamnosus* R en medio BMM, a 37°C, pH 6 y 72 horas de incubación, estos

resultados difieren de los resultados obtenidos en este trabajo, en las mismas condiciones, esto podría deberse a los distintos medios de cultivos empleados.

L. rhamnosus RW-9595M también fue empleado por (Péant et al., 2005) para la producción de EPS, teniendo como resultado 1,611 g/L de exopolisacáridos, en las siguientes condiciones; medio BMM, con 2 g/L triptona y 40 g/L glucosa, 37°C y pH 6, con 40 horas de fermentación. Esto muestra que una misma cepa puede tener una variación en la producción de EPS dependiendo de la composición del medio donde crece.

Lactobacillus rhamnosus E/N, tuvo una mayor producción de EPS en un medio que contenía 20 g/L lactosa como fuente de carbono, 0,219 g/L de EPS, en tanto que, con 20 g/L de glucosa la máxima producción de exopolisacáridos llegó a 0,130 g/L, con 20 g/L de galactosa la producción fue mucho menor 0,081 g/L de EPS. La modificación del medio de crecimiento cambiando la fuente de carbono no es solo una forma de optimizar el rendimiento, sino también de modificar la composición de EPS, ya que de ello depende su función (Polak-Berecka et al., 2013).

L. rhamnosus KF5 reportó una baja producción de EPS, 0,130 g/L en leche desnatada estéril, suplementado con 12% de glucosa durante 30 horas sin agitación a 32°C (Shao et al., 2014).

L. rhamnosus LOCK 0943, tuvo una producción mayor de EPS con 100 g/L de fructosa como fuente de carbono, $0,806 \pm 0,002$ g/L de exopolisacárido. *L. rhamnosus* LOCK 0935, produjo $0,805 \pm 0,00476$ g/L de EPS en un medio enriquecido con 50g/L de glucosa, fructosa y sacarosa. *L. rhamnosus* OM-1, en cambio, tuvo una mejor producción en un medio que contenía 17 g/L de glucosa y fructosa, y, 66 g/L de sacarosa, obteniendo una producción de $0,798 \pm 0,00190$ g/L de exopolisacáridos. Estas formas de análisis muestran claramente que el tipo de mezcla utilizada tiene un efecto significativo en la producción de EPS por las cepas estudiadas (Oleksy-Sobczak & Klewicka, 2019).

El pH del medio, puede tener un efecto en la producción de EPS. A un pH inicial de 6 las cepas de *L. rhamnosus* LOCK 0943 y OM-1 tuvieron una mayor producción del biopolímero, 0,941 y 0,955 g/L respectivamente, en cambio la cepa *L. rhamnosus* LOCK 0935 mostro una mejor producción de EPS a un pH 5 de 1,005 g/L de EPS; en este trabajo el pH en el cual se presentó la mayor producción de EPS fue de 6,5(Oleksy-Sobczak et al., 2020).

Así también el tiempo y la temperatura influye en la cantidad de EPS producido, la alta eficiencia de síntesis de EPS por *L. rhamnosus* LOCK 0943 fue observada en un cultivo de 24 horas a 37°C (1,140 g/L); y en un cultivo de 30 horas a 25°C (1,110 g/L); en un punto de vista de costos, se descubrió que prolongar la duración del cultivo en 6 horas requiere un costo financiero más bajo que usar una temperatura más alta de 37 °(Oleksy-Sobczak et al., 2020).

A las 24 horas de fermentación se obtuvo alta cantidad de EPS, en comparación a los valores reportados, tanto en hidrolizado de tusa de maíz y el medio de cultivo MRS, pero a temperatura de 37°C, a temperaturas menores la cantidad de EPS se vio disminuida.

Este trabajo coincide con la temperatura óptima y el pH reportado por los autores nombrados para la producción de exopolisacáridos con cepas de *L. rhamnosus*. La temperatura de mayor producción de EPS es 37°C según reportado por varios trabajos (Ng & Xue, 2017).

(Riaz Rajoka et al., 2018) también reportan una mejor producción de EPS a 37°C por la cepa *L. rhamnosus* SHA111 en medio de cultivo MRS con 48 horas de fermentación, obtuvieron 0,737 g/L de exopolisacáridos. Con el medio de cultivo MRS en las condiciones mencionadas, en este trabajo se logró obtener la máxima producción, a 72 horas con pH 5,5 se coincide con la cantidad reportada por los autores, 0,791± 0,059 g/L de EPS.

Medios de cultivo para el crecimiento de *L. rhamnosus* fueron optimizados para un mayor rendimiento en la producción de EPS, (Ng & Xue, 2017) han

empleado la cepa *L. rhamnosus* ZY en un medio MRS enriquecido con 3mM H₂O₂ y 10mM CaCl₂, con la cual obtuvieron 2,498± 0,0618 g/L en 24 horas de incubación a 37°C, también observaron la disminución de la cantidad de EPS a las 72 horas de incubación a 0,1786± 0,0103 g/L de EPS, el enriquecimiento del medio puede aumentar la producción de EPS en un tiempo relativamente corto pero no evita su degradación a tiempo de fermentación prolongado.

Otros estudios proporcionan información sobre la influencia positiva de las interacciones entre reinos en la estimulación de la biosíntesis de EPS, lo que representa el progreso hacia el desarrollo de un bio-ingrediente con amplias aplicaciones industriales. Como los co-cultivos de cepas de *L. rhamnosus* ATCC 9595, R0011, y RW-9595M, en asociación con *Saccharomyces cerevisiae*, esto logró el aumento de producción de EPS en 49%, 39% y 42% respectivamente en comparación a los mono-cultivos de las cepas de *L. rhamnosus* mencionadas (Bertsch et al., 2019).

(K. Wang et al., 2014), han publicado que el tiempo de fermentación influye en la producción de EPS por las BAL, y que este tiempo no siempre corresponde al tiempo óptimo de crecimiento celular.

La disminución en las cantidades de EPS después de una incubación prolongada se observó anteriormente para diferentes cepas de *Lactobacillus* productoras de EPS, probablemente debido a la acción de las glucohidrolasas en el cultivo que catalizó la degradación de los polisacáridos (Tsuda & Miyamoto, 2010; L. Zhang et al., 2013). Sin embargo, la falta de degradación de EPS durante la fermentación (hasta 56 h) con el probiótico *Bacillus coagulans* se atribuyó a la falta de actividad de la glucohidrolasa en el cultivo (L. Zhang et al., 2013).

La posible presencia de glucohidrolasas en el medio de fermentación, hidrolizando EPS a monómeros, podría causar tal disminución en el rendimiento de EPS durante la fermentación prolongada (Lin & Chien, 2007; Yang et al., 2010).

Esta condición también fue observada en la biosíntesis de polisacáridos capsular (CPS) de *L. plantarum* EP56, la cual disminuyó en aproximadamente un 40% durante la fase de crecimiento estacionaria, debido a la acción de las glucohidrolasas que degradan el CPS (Tallon et al., 2003).

(Pham et al., 2000) han informado por primera vez sobre la purificación y caracterización de las glucohidrolasas de *L. rhamnosus* R. Las hidrolasas de glucósidos aparecieron al final de la fase de crecimiento logarítmico y en la fase de declive de los cultivos de *L. rhamnosus* R, lo que puede explicar la razón de la degradación de EPS de bacterias ácido lácticas en cultivos prolongados.

Se ha informado que el tiempo de cultivo, la temperatura y el pH influyen en el crecimiento y la producción de EPS por BAL (Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi et al., 2018; Y. Wang et al., 2010). La fuente de carbono y nitrógeno pueden estar implicados directamente en el rendimiento y en la composición de la biosíntesis de exopolisacáridos por *Lactobacillus*, así también las interacciones entre distintas fuentes de carbono en un mismo medio (J Cerning et al., 1994; Oleksy-Sobczak et al., 2020).

Existen evidencias en donde no hay diferencias significativas entre medios que proporcionan mayor concentración de sacáridos y otras de menor concentración que influyan en el rendimiento de exopolisacáridos por *Lactobacillus*, en el ámbito económico esto significa una gran ventaja (Oleksy-Sobczak et al., 2020).

Además, el tratamiento térmico de las muestras como primer paso en el procedimiento de aislamiento de polisacáridos es crucial para completar la recuperación de los mismos. Las muestras sin este paso dieron una extracción de polisacárido más baja que las que incluyen este tratamiento (Ayyash et al., 2020; Y. Wang et al., 2010). Existen diferentes métodos de extracción de exopolisacáridos que pueden dar un mayor rendimiento, ya que estos métodos pueden extraer además los polisacáridos de la pared celular (Dilna et al., 2015).

La tusa de maíz ha sido ampliamente empleada en varios procesos de fermentación para la obtención de distintas biomoléculas como ácido láctico L(+) por *Rhizopus oryzae* NRRL-395 (Press, 2003); el hidrolizado de este sustrato se ha utilizado para la producción de xilitol por *Candida tropicalis* (Misra et al., 2013; Rao et al., 2006); (Driss et al., 2014) han obtenido xilooligosacáridos generados a partir de tusa de maíz para el empleo como nutrientes para bacterias lácticas. Siendo un sustrato prometedor y de bajo costo.

4.5 Análisis y procesamiento de los datos

Como resultado del análisis de las muestras de *L. plantarum* ATCC8014, se obtuvo que los exopolisacáridos obtenidos en la fermentación con hidrolizado de tusa de maíz mostraron un peso promedio de 0,4452 g/L, con un valor mínimo de 0,06 g/L y un valor máximo de 1,31 g/L. Para la fermentación con el medio de cultivo MRS, se obtuvo un peso promedio de 0,6785g/L, siendo el valor mínimo de 0,39g/L y el valor máximo de 1,21g/L.

Para *L. rhamnosus*, los exopolisacáridos obtenidos en la fermentación con hidrolizado de tusa de maíz mostraron un peso promedio de 0,7151 g/L, con un valor mínimo de 0,11g/L y un máximo de 1,63 g/L. Para la fermentación con el medio de cultivo MRS, el peso promedio fue de 0,7643g/L con un valor mínimo de 0,19 g/L y un máximo de 1,71g/L.

Considerando la siguiente pregunta ¿Hay diferencias entre la producción de exopolisacáridos de bacterias ácido lácticas utilizando tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional a escala laboratorial? Se analizaron los tratamientos de manera conjunta, tanto los realizados para *L. plantarum* ATCC8014 como para *L. rhamnosus*, cuyos resultados se detallan a continuación.

En primer término, se comprobó la normalidad de los datos a partir de la siguiente hipótesis:

Pruebas de normalidad						
Tipo de tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Exopolisacáridos H. tusa de maíz g/L	,297	27	,000	,787	27	,000
MRS	,236	27	,000	,809	27	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Estadístico de contraste (prueba de normalidad)-*L. plantarum* ATCC8014

Hipótesis de normalidad.

Ho: Los datos provienen de una distribución normal.

H1: Los datos no provienen de una distribución normal.

Criterio de normalidad $\alpha=0.05$

Regla de decisión

Si p-valor $\geq 0,05$ se acepta Ho.

Si p-valor es < 0.05 se rechaza Ho.

Tabla 12. Pruebas de normalidad variable exopolisacáridos producidos por *L. plantarum* ATCC8014 según tratamiento aplicado.

Como el tamaño de la muestra es menor a 30, se considera el estadístico de Shapiro-Wilk, para el cual ambos valores del p-valor (tratamiento con hidrolizado de tusa de maíz y tratamiento con medio MRS) $=0.000 < \alpha=0.05$ se rechaza la Ho, la variable exopolisacáridos no se comporta normalmente, es decir, los datos no provienen de una distribución normal, por lo tanto, se aplicó una prueba no paramétrica, la prueba U de Mann-Whitney.

Una vez definido el análisis estadístico a utilizar, se procedió a contrastar la hipótesis, previa comprobación de la no normalidad de los datos analizados. Se compararon los valores resultantes de los exopolisacáridos, según se haya utilizado tusa de maíz como sustrato o solo el medio de cultivo convencional, con un nivel de confianza del 95% se procedió a contrastar la siguiente hipótesis:

Hipotesis de contraste

H₀: No hay diferencias en la producción de exopolisacáridos por *L. plantarum* ATCC8014 utilizando tusa de maiz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional MRS.

H₁: Hay diferencias en la producción de exopolisacáridos por *L. plantarum* ATCC8014 utilizando tusa de maiz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional MRS.

Regla de decisión

Si p-valor $\geq 0,05$ se acepta Ho

Si p-valor es < 0.05 se rechaza Ho.

Estadísticos de prueba^a

	Exopolisacáridos g/L
U de Mann-Whitney	229,000
W de Wilcoxon	607,000
Z	-2,345
Sig. asintótica (bilateral)	,019

a. Variable de agrupación: Tipo de tratamiento

Tabla 13. Estadísticos de prueba *L. plantarum* ATCC8014.

Como p-valor =0,019 < 0,05 se acepta la H1; hay diferencias significativas entre los exopolisacáridos producidos por *L. plantarum* ATCC8014 utilizando

Resumen del modelo ^d				
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,865 ^a	,748	,743	,19786
2	,916 ^b	,839	,833	,15972
3	,925 ^c	,855	,846	,15308

a. Predictores: (Constante), Temperatura
b. Predictores: (Constante), Temperatura, Tipo de tratamiento
c. Predictores: (Constante), Temperatura, Tipo de tratamiento, Nivel de pH
d. Variable dependiente: Exopolisacáridos

hidrolizado de tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional; es decir, que el hidrolizado de tusa de maíz mejora la producción de exopolisacáridos por *L. plantarum* ATCC8014.

A modo de determinar cuales son las variables que influyen en el peso de los exopolisacáridos, se realizó un análisis de regresión múltiple, el cual nos permitió generar un modelo predictivo para el efecto considerando las pruebas hechas con *L. plantarum* ATCC8014.

Tabla 14: Modelos predictivos para medir los exopolisacáridos producidos por *L. plantarum* ATCC8014.

Al considerar el cuadro de resumen del modelo, se puede concluir que el modelo que mejor explica el peso de los exopolisacáridos es el modelo 3, ya que su R cuadrado es igual a 0,855, es decir se puede predecir el peso de los exopolisacáridos en un 85,5% con las variables del modelo 3 (temperatura, pH y tipo de medio de cultivo).

Tabla 15: Tabla de coeficientes *L. plantarum* ATCC8014.

Considerando los coeficientes del modelo 3, este quedar de la siguiente manera $y = 3,747 - 0,114 \text{temperatura} + 0,233 \text{tratamiento} + 0,060 \text{pH}$; donde y es la variable dependiente (exopolisacáridos) y las variables predictoras son la temperatura, el tipo de tratamiento y el nivel de pH; quedando excluida la variable UFC.

Se tiene una constante de 3,747 g/L; el tipo de tratamiento aporta 0,233 g/L por cada gramo de exopolisacárido. Al analizar el nivel de significancia, se observa que la temperatura y el tipo de tratamiento son altamente significativos.

Al comprobar el modelo predictivo elegido, este arroja resultados similares

Estadísticos descriptivos

,ya que el promedio de la variable exopolisacáridos es 0,56 g/L y el promedio utilizando el modelo predictivo es de 0,55g/L.

Modelo	Coeficientes ^a							
	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados			Correlaciones		
	B	Error estándar	Beta	t	Sig.	Orden cero	Parcial	Parte
1 (Constante)	4,426	,312		14,181	,000			
Temperatura	-,114	,009	-,865	-12,427	,000	-,865	-,865	-,865
2 (Constante)	4,076	,260		15,663	,000			
Temperatura	-,114	,007	-,865	-15,395	,000	-,865	-,907	-,865
Tipo de tratamiento	,233	,043	,302	5,367	,000	,302	,601	,302
3 (Constante)	3,747	,286		13,091	,000			
Temperatura	-,114	,007	-,865	-16,063	,000	-,865	-,915	-,865
Tipo de tratamiento	,233	,042	,302	5,600	,000	,302	,621	,302
Nivel de PH	,060	,026	,127	2,350	,023	,127	,315	,127

a. Variable dependiente: Exopolisacáridos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Exopolisacáridos	54	,06	1,31	,5618	,39050
Exopoli_predictor	54	,03	1,18	,5505	,36198
N válido (por lista)	54				

Tabla 16: Descriptivos variable original vs modelo predictivo *L. plantarum* ATCC8014.

Pruebas de normalidad							
Tipo de tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Exopolisacáridos g/L	H. tusa de maíz	,154	27	,099	,907	27	,019
	MRS	,218	27	,002	,889	27	,007

a. Corrección de significación de Lilliefors

Estadístico de contraste (prueba de normalidad)-*L. rhamnosus*.

Hipótesis de normalidad.

Ho: Los datos provienen de una distribución normal.

H1: Los datos no provienen de una distribución normal.

Criterio de normalidad $\alpha=0.05$

Regla de decisión

Si p-valor $\geq 0,05$ se acepta Ho.

Si p-valor es < 0.05 se rechaza Ho.

Tabla 17: Pruebas de normalidad variable exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus* según tratamiento aplicado.

Como el tamaño de la muestra es menor a 30, se consideró el estadístico de Shapiro- Wilk Para el tratamiento con hidrolizado de tusa de maíz el p-valor= 0,019 y para el tratamiento con el medio de cultivo MRS el p-valor =0,007; ambos valores del p-valor \leq 0,05, por lo tanto, se rechaza la H_0 , la variable exopolisacáridos no se comporta normalmente, es decir, los datos no provienen de una distribución normal. Por ello, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

A partir de la definición de la prueba estadística a utilizar, se procedió a contrastar la hipótesis resultado de la pregunta de investigación. Se compararon los valores resultantes de exopolisacáridos, según se haya utilizado tusa de maíz como sustrato o solo el medio de cultivo convencional MRS. Con un nivel de confianza del 95% se procedió a contrastar la siguiente hipótesis:

Hipotesis de contraste

H_0 :No hay diferencias en la producción de exopolisacáridos por *L. rhamnosus* utilizando tusa de maiz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional MRS.

H_1 :Hay diferencias en la producción de exopolisacáridos por *L. rhamnosus* utilizando tusa de maiz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional MRS.

Regla de decisión

Si p-valor \geq 0,05 se acepta H_0

Si p-valor es < 0.05 se rechaza H_0 .

Estadísticos de prueba^a

	Exopolisacáridos
U de Mann-Whitney	316,000
W de Wilcoxon	694,000
Z	-,839
Sig. asintótica (bilateral)	,401

a. Variable de agrupación: Tipo de tratamiento

Tabla 18: Estadísticos de prueba *L. rhamnosus*.

Como $p\text{-valor}=0,401 > 0,05$, se acepta la H_0 ; no hay diferencias significativas entre los exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus* utilizando hidrolizado de tusa de maíz como sustrato en comparación al medio de cultivo convencional MRS.

A modo de determinar cuales son las variables que podrían influir en la producción de los exopolisacáridos, se realizó un análisis de regresión múltiple, el cual permitió generar un modelo predictivo para el efecto considerando las pruebas hechas con *L. rhamnosus*.

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,619 ^a	,383	,371	,31037

a. Predictores: (Constante), pH

Tabla 19: Modelo predictivo para medir los exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus*.

A diferencia de los datos analizados *L. plantarum* ATCC8014, con las pruebas hechas para *L. rhamnosus*, solo se generó un modelo, el cual no es representativo, ya que solo puede predecir el peso de los exopolisacáridos en un 38,3% de los casos.

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
1 (Constante)	-,878	,288		-3,052	,004
pH	,294	,052	,619	5,685	,000

a. Variable dependiente: Exopolisacáridos

Tabla 20: Coeficientes del modelo predictivo para los exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus*.

Considerando los coeficientes del modelo 1, quedó de la siguiente manera $y = -0,878 + 0,294ph$; donde y es la variable dependiente (exopolisacáridos) y la variable predictora es solo el nivel de pH; quedando excluidas las demás variables (temperatura, tiempo, UFC).

Si comprobamos el modelo predictivo resultante, se puede comprobar que este arroja resultados similares ,ya que el promedio de la variable exopolisacáridos es 0,7394g/L y el promedio utilizando el modelo predictivo es de 0,7390g/L.

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar

Exopolisacáridos	54	,11	1,71	,7397	,39148
Exopoli_predictor	54	,44	1,03	,7390	,24230
N válido (por lista)	54				

Tabla 21: Descriptivos variable original vs modelo predictivo *L. rhamnosus*.

Teniendo en cuenta estos análisis, la producción de EPS por bacterias *L. plantarum* y *L. rhamnosus* se puede realizar utilizando el hidrolizado de tusa de maíz ya que la producción puede ser mejor o igual a lo obtenido utilizando medio de cultivo MRS.

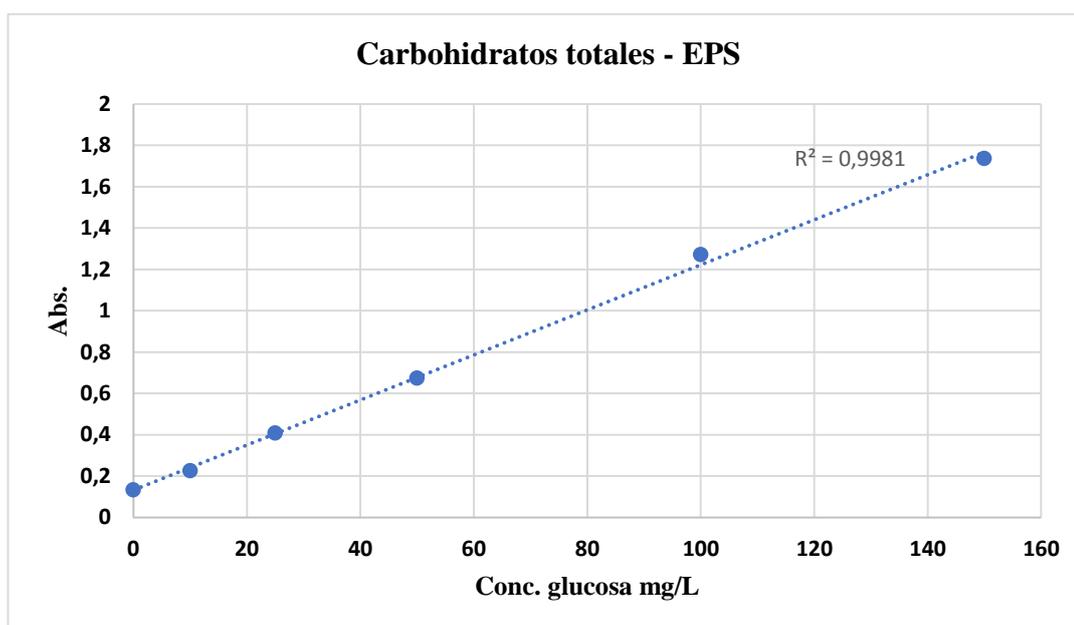
Desde el punto de vista financiero, la utilización de este medio alternativo genera costos menores, puede tener un ahorro de hasta 90% si se reemplaza el medio de cultivo convencional MRS, sin tener en cuenta otros gastos (infraestructura, equipos u otros) que requiere las condiciones de fermentación, esto puede estar sujeto a las necesidades de enriquecimiento del medio de cultivo que pueda favorecer la producción de EPS por bacterias ácido lácticas.

4.6 Carbohidratos totales en Exopolisacáridos.

El porcentaje de carbohidratos totales en los exopolisacáridos fue realizado por el método de antrona, en la figura 14 se representa la curva de calibración utilizada en el ensayo, la tabla 21 muestra los resultados obtenidos.

Los EPS seleccionados para ensayo fueron aquellos de mayor producción en el hidrolizado de tusa de maíz como en el medio de cultivo MRS, para cada cepa en estudio.

Figura 18: Curva de Calibración para Ensayo de carbohidratos totales de los EPS.



El ensayo realizado mostró que las muestras de EPS contenían cantidades significativas de contenido de carbohidratos. El alto contenido de carbohidratos de cepas BAL ha sido documentado por varios investigadores (Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi et al., 2018; Imran et al., 2016; Li et al., 2014).

EPS	EPS g/L	% Carbohidratos totales EPS
EPS-LR	1,629	83,18
EPS-LR*	1,708	88,69
EPS-LP	1,309	80,73
EPS-LP*	1,211	90,52

Tabla 22: Carbohidratos totales en exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas.

EPS-LR: Exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus*.

EPS-LP: Exopolisacáridos producidos *L. plantarum* ATCC 8014.

*Exopolisacáridos producidos en el medio de cultivo MRS.

Se ha reportado distintos porcentajes de carbohidratos en exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus* E/N, esto dependía de la fuente de carbono en el medio de crecimiento. Las concentraciones más elevadas se presentaron en los medios que contenían glucosa y galactosa. El resultado de este trabajo para el porcentaje de carbohidratos totales en los EPS obtenidos por *L. rhamnosus* es menor a lo reportado por (Polak-Berecka et al., 2013), el cual ha publicado un valor mínimo de 92,64% para exopolisacáridos producidos por *L. rhamnosus* E/N.

(Adekemi Titilayo Adesulu-Dahunsi et al., 2018) han reportado un valor máximo de 87,1% carbohidratos totales en EPS producidos por *L. plantarum* YO175 en el medio de cultivo MRS sacarosa modificado. Para la cepa *L. plantarum* ATCC8014 la mayor concentración de carbohidratos de dio en los exopolisacáridos producidos en el medio de cultivo MRS.

Los exopolisacáridos producidos en el medio de cultivo MRS por ambas cepas, presentaron mayor porcentaje de carbohidratos en comparación a los producidos en el hidrolizado de tusa de maíz. Esto podría coincidir con lo publicado por (Polak-Berecka et al., 2013), que el medio de crecimiento influye en la concentración de carbohidratos en los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas.

4.7 Capacidad crioprotectora del EPS

En la tabla 12 se presenta el promedio de las densidades ópticas, la diferencia de DO inicial y final después de someter a la cepa *E. coli* ATCC 25922 a ciclos de congelamiento y deshielo, se preparó 10 tubos de cada tratamiento. Se utilizaron los exopolisacáridos que mostraron mayor producción para cada cepa de *Lactobacillus* con hidrolizado de tusa de maíz.

El exopolisacárido producido por *L. rhamnosus* en hidrolizado de tusa de maíz mostró una mejor actividad protectora ante ciclos de congelamiento y descongelamiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922. En cambio, el

exopolisacárido producido por *L. plantarum* ATCC 8014 mostró mismo comportamiento que el control negativo (agua).

La viabilidad de las células de *E. coli* ATCC 25922 a -20°C fue mejor preservada utilizando el EPS producido por *L. rhamnosus*.

Otros trabajos reportan que los exopolisacáridos bacterianos tienen una prometedora aplicación como agente crioprotector industrial, y que existe una relación directa dosis-respuesta que se observa en el tiempo y temperatura a la cual se expone el microorganismo a ser preservado (Alvarado, 2015; Carrión et al., 2015; Sathiyarayanan et al., 2015).

El crioprotector más utilizado en los laboratorios para preservación de microorganismos por congelación es el glicerol (25-35%). Muchas veces se fracasa en preservar microorganismos por congelación. Esto podría ser debido a que las bacterias mueren al no emplearse el protector adecuado, sin estos protectores podrían formarse agujas de agua y también se genera un estrés osmótico debido a la baja disponibilidad de agua que ocurre durante el proceso de congelación (Duque et al., 2010).

TIEMPO (horas)		EPS-LP	EPS-LR	GLICEROL	AGUA
24	DO inicial	0,0904	0,1048	0,0904	0,1035
	DO final	1,0646	1,0856	1,0993	1,0325
	Diferencia	0,9742	0,9808	1,0089	0,9290
48	DO inicial	0,0946	0,0993	0,0745	0,0984
	DO final	1,0070	1,0369	1,0095	0,9037
	Diferencia	0,9124	0,9376	0,9350	0,8053
168	DO inicial	0,0878	0,0992	0,0980	0,0955

DO final	0,7090	0,8144	0,9985	0,7060
Diferencia	0,6212	0,7152	0,9005	0,6105

Tabla 23: Resultados obtenidos en los ensayos de crioprotección. DO: densidad óptica, EPS-LP: Exopolisacáridos-*L. plantarum*, EPS-LR: Exopolisacáridos-*L. rhamnosus*.

Exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus* también ha demostrado tener capacidad crioprotectora, se ha demostrado que confiere la crioprotección para la cepa misma, pero también para las células como *E. coli*, lo que sugiere que, por lo tanto, se puede aplicar como agente para la criopreservación celular, solo o en combinación con otros crioprotectores actualmente en uso (Lindsay & Nosek, 2020).

El estrés por congelación y descongelación se ha vuelto importante para los procesos de fermentación desarrollados más recientemente, como parte de los esfuerzos para mejorar los procesos de producción y conservación de alimentos fermentados, incluido las BAL. El estrés por congelación y descongelación es un estrés complejo que puede consistir en deshidratación, estresores físicos, baja temperatura y/o estrés oxidativo (Lindsay & Nosek, 2020).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se logró realizar el análisis proximal del sustrato empleado previo a su hidrolizado.

Por cada 400 mL de ácido sulfúrico 2 N empleado para el hidrolisis del sustrato se obtuvo 250 mL de final de hidrolizado que contenía $28,76 \pm 0,69$ g/L de carbohidratos totales; $77 \pm 1,16$ mg/L de fenoles totales; $16,31 \pm 0,27$ g/L de glucosa total; $27,44 \pm 0,22$ g/L de azúcares no reductores y $1,32$ g/L de azúcares no reductores.

Las cepas empleadas, *L. plantarum* ATCC8014 y *L. rhamnosus*, crecieron favorablemente en hidrolizado de tusa de maíz sin necesidad de realizar una detoxificación o enriquecerla con otra fuente de carbono o nitrógeno. Las condiciones óptimas evaluadas para la producción de EPS por *L. plantarum* ATCC8014 en el hidrolizado fueron pH 6,5; temperatura 30°C y 48 horas de incubación, obteniendo como una producción máxima de $1,309 \pm 0,079$ g/L.

L. rhamnosus presentó una producción óptima de EPS en el hidrolizado de tusa de maíz a 37°C, 48 horas de incubación con un pH inicial de 6,5, en estas condiciones se logró extraer $1,629 \pm 0,0711$ g/L.

Los porcentajes de los carbohidratos totales de los exopolisacáridos producidos por *L. plantarum* ATCC8014 y *L. rhamnosus* en el hidrolizado fueron de 90,52% y 88,69% respectivamente.

Estadísticamente, la producción de EPS por *L. plantarum* ATCC8014 es mejorada con el empleo del hidrolizado de tusa de maíz en comparación a la producción en medio de cultivo MRS. En cambio, la producción de EPS por *L. rhamnosus* no mostró diferencia significativa en el empleo del hidrolizado o el medio de cultivo convencional.

El exopolisacárido producido por *L. rhamnosus* en el hidrolizado mostró una mayor capacidad crioprotectora que la producida por *L. plantarum* ATCC8014.

La tusa de maíz, considerado un desecho agroindustrial, puede ser empleado como sustrato en la producción de EPS por bacterias ácido lácticas, considerando el bajo costo en comparación al medio de cultivo convencional empleado en los laboratorios, siendo una ventaja desde el punto de vista económico-industrial.

5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda evaluar el sustrato en más cepas aisladas de bacterias ácido lácticas productoras de EPS.
2. Se podría emplear la combinación del hidrolizado de tusa de maíz con fuentes de nitrógeno.
3. Se recomienda el análisis de la composición química y de la masa molecular de los exopolisacáridos producidos en el proceso.
4. Se recomienda evaluar el escalado del procedimiento con las condiciones óptimas de fermentación obtenidas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., Ojediran, J. O., Ogunsakin, A. O., & Banwo, K. (2018). Extracellular polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, optimization, and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 514–525.
- Adesulu-Dahunsi, Adekemi Titilayo, Jeyaram, K., Isiaka Sanni, A., & Banwo, K. (2018). Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ*.
- Aguilera, J. M., Lillford, P. J., & Watzke, H. (2008). Why food materials science? In *Food Materials Science: Principles and Practice* (pp. 3–10). Springer New York.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., & Khan, S. T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 343–350.
- Alvarado, V. (2015). *EVALUACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS POTENCIALES APLICACIONES INDUSTRIALES* (p. 123).
- Alves, V. D. (2011). Characterization of biodegradable films of a new microbial polysaccharide produced using glycerol byproduct. *Carbohydr Polym.*
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff ' s Observation Brief history of Elie Metchnikoff Probiotics

- beyond fermented dairy products. *Communicating Current Reserach and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 466–474.
- Apolinário, A. C., De Lima Damasceno, B. P. G., De Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., & Da Silva, J. A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, *101*(1), 368–378.
- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(3 SPEC. ISS.), 511–529.
- Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, *12*(2), 129–135.
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., Esposito, G., Hunashal, Y., Obaid, R. S., & Hamed, F. (2020). Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic Lactobacillus plantarum C70 isolated from camel milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, *144*, 938–946.
- Baba Hamed, S., & Belhadri, M. (2009). Rheological properties of biopolymers drilling fluids. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, *67*(3–4), 84–90.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, *29*(1), 54–66.
- Bazaka, K., Crawford, R. J., Nazarenko, E. L., & Ivanova, E. P. (2011). Bacterial extracellular polysaccharides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*,
- Bel-Rhlid, R., Thapa, D., Kraehenbuehl, K., Hansen, C. E., & Fischer, L. (2013). Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by Lactobacillus johnsonii NCC 533. *AMB Express*, *3*, 1–7.
- Bergey, D., DR Boone - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, & 2009, U. (2009). *Family I. Bacillaceae p. 21-128*.
- Bertsch, A., Roy, D., & LaPointe, G. (2019). Enhanced exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus in co-culture with Saccharomyces cerevisiae. *Applied Sciences (Switzerland)*, *9*(19).
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content

- from limonium brasiliense L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., & Lamontagne, L. (2010). Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 666–675.
- Boyaval, P., Pichereau, V., & Leverrier, P. (2001). Changes in Protein Synthesis and Morphology during Acid Adaptation of. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2029–2036.
- Campos, A. I. P., & Mena, A. L. (2012). *Lactobacillus*: Classification, uses and health implications. In *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications*.
<http://web.a.ebscohost.com/cicco.idm.oclc.org/ehost/ebookviewer/ebook/bmx1YmtfXzU0MTE0OF9fQU41?sid=42890e77-6ed6-44c7-81c0-d8092cf34732@sessionmgr4007&vid=0&format=EB&rid=1>
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 233–238.
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D. J., Guo, W., Liu, B., Feng, Y., & Zhao, Q. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7182–7188.
- Cardona, M., Sorza, J., Posada, S., Carmona, J., Ayala, S., & Álvarez, O. (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15(2), 240–246.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370.
- Carrión, O., Delgado, L., & Mercade, E. (2015). New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp . ID1. *Carbohydrate Polymers*, 117, 1028–1034.

- Cerning, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le Lait*, 75(4–5), 463–472.
- Cerning, J, Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., & Bouillanne, C. (1994). *Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by Lactobacillus casei CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer*. 60(11), 3914–3919.
- Cerning, Jutta. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1–2), 113–130.
- Chang, R., & Murillo, L. (2017). *aprovechables en las algas Ulva sp y Chaetomorpha sp para la producción de etanol que funcione como biocombustible , por el método de la antrona Spectrophotometric determination the quantity of profitable carbohydrates in Ulva sp and sp Chaetomorpha algae*. 40, 53–66.
- Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2010). Ability of Lactobacillus brevis strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, 120(1), 225–229.
- De Vos, W. M., & Hugenholtz, J. (2004). Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 22(2), 72–79.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1–4), 159–184.
- Delgado Fernández, R., Barreto Argilagos, G., de la Caridad Rodríguez Torrens, H., Asistente, P., Químicas Profesor Titular, D., & Agropecuarias Profesor Auxiliar, D. (2014). Breve reseña de la evolución histórica del concepto de probióticos Brief review on historical evolution of the probiotics concept. *Mediciego*, 20(2). <http://www.medigraphic.com/pdfs/mediciego/mdc-2014/mdcs142x.pdf>
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic Lactobacillus plantarum RJF4. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1179–1186.

- Douglas, T. E. L., Krawczyk, G., Pamula, E., Declercq, H. A., Schaubroeck, D., Bucko, M. M., Balcaen, L., Van Der Voort, P., Bliznuk, V., van den Vreken, N. M. F., Dash, M., Detsch, R., Boccaccini, A. R., Vanhaecke, F., Cornelissen, M., & Dubruel, P. (2016). Generation of composites for bone tissue-engineering applications consisting of gellan gum hydrogels mineralized with calcium and magnesium phosphate phases by enzymatic means. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *10*(11), 938–954.
- Driss, D., Zouari-ellouzi, S., Chaari, F., Kallel, F., Ghazela, I., Bouaziz, F., & Chaabouni, S. E. (2014). Ac ce pt us. “*Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.*”
- Duque, E., Rodríguez-andrade, O., Torre, J. De, Jesús, R. P., Edificio, J., Universitaria, C., Manuel, S., E-mail, M. C. P., Científicas, I., Albareda, P., España, C. P., & México, C. P. (2010). Bacterias Preservadas , una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnología*, *14*(2).
- Ekinci, F. Y., & Gurel, M. (2008). Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, *91*(3), 892–899.
- Espinoza, K. C., Gamboa, C. A. G., Matara, J. C., Torres, L., Barragán, J. A., & Rodríguez, C. N. (2017). Extracción de azúcares reductores totales ART por métodos físicos y químicos de planta de Zea mays (Poaceae) “maíz amarillo duro.” *Arnaldoa*, *24*(1), 289–300.
- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, *46*, 272–279.
- Fonseca, O. C. (2014). *Caracterización de una nueva bacteria antártica, y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro*. 1–195. www.tdx.cat
- Food and Agriculture Organization. (2013). *El maiz en la nutrición humana - Composición química y valor nutritivo del maíz*. Fao.Org. <http://www.fao.org/3/t0395s/t0395s03.htm>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 29, Issue 8, pp. 388–398). Elsevier Current Trends.

- Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., & Simov, Z. I. (2002). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 57(9–10), 805–810.
- Fujiya, M., & Kohgo, Y. (2010). Novel perspectives in probiotic treatment: The efficacy and unveiled mechanisms of the physiological functions. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 3(3), 117–127.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 51–70.
- Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., & Ray, B. (2009). Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. In *Glycobiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 2–15).
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480–487.
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S98–S107.
- Hernández Sampieri, R., Calos, F. C., & Pilar, B. L. (2012). Metodología de la Investigación Jurídica. In *Society*.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107.
- Huang, C. H., Li, S. W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and classification for the Lactobacillus casei group. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–13.
- Huang, Z., Huang, Y., Li, X., & Zhang, L. (2009). Molecular mass and chain conformations of Rhizoma Panacis Japonici polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 596–601.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N. S., & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus plantarum

- NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 731–745.
- Ismail, B., & Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049–1057.
- Jan, G., Belzacq, A.-S., Haouzi, D., Rouault, A., Métivier, D., Kroemer, G., & Brenner, C. (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 9(2), 179–188.
- Jan, Gwénaél, Rouault, A., & Maubois, J. L. (2000). Acid stress susceptibility and acid adaptation of propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii. *Lait*, 80(3), 325–336.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). *Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL.. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2., 1209—1234. Edited by Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG.*
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827–4833.
- Kanmani, P., Suganya, K., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A., & Arul, V. (2013). Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by enterococcus faecium mc13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 1001–1015.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Amiri-Rigi, A. (2012). Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiology*, 29(1), 1–9.
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2014). Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 29–35.
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S., & Kim, S. H. (2010). Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 123–130.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., &

- Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3 SPEC. ISS.), 393–409.
- Konieczna, C., Słodziński, M., & Schmidt, M. T. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* kl 53a and *Lactobacillus casei* fyo affect their adhesion to enterocytes. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 273–281.
- Korakli, M., & Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790–803.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology*, 150(7), 2099–2112.
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - A perception. In *Journal of Basic Microbiology* (Vol. 47, Issue 2, pp. 103–117). John Wiley & Sons, Ltd.
- Laura, M., Notararigo, S., Ncher, M., de Palencia, P. F., Aznar, R., & Lopez, P. (2012). Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Food Additive*. InTech.
- Laws, A., Gu, Y., & Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597–625.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764.
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its

- functional characteristics in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 732–739.
- Lin, T. Y., & Chien, M. F. C. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419–1423.
- Lindsay, D. S., & Nosek, B. A. (2020). *Lactobacillus curvatus* Strains Specifically Show High Levels of Tolerance to Freeze-Thaw Stres. 21(1), 1–9.
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., & Tao, X. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6895–6905.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T., & Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1–2), 71–80.
- Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12(5), 419–426.
- Matsumoto, Y., & Kuroyanagi, Y. (2010). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(6–7), 715–726.
- McIntosh, M., Stone, B. A., & Stanisich, V. A. (2005). Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), 163–173.
- Mercedes, M. (2011). *Tesis Doctoral Modificaciones en la envoltura de Lactobacillus casei durante el Modificaciones en la envoltura de durante el crecimiento bajo estrés osmótico Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de María Mercedes Palomino Dire.*
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Min, W. H., Fang, X. Bin, Wu, T., Fang, L., Liu, C. L., & Wang, J. (2019). Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(6), 758–766.

- Ministerio de Salud del Perú. (2009). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. In *Perú*.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015). Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615–3626.
- Misra, S., Raghuvanshi, S., & Saxena, R. K. (2013). Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1596–1601.
- Montiel, K., & Romero, L. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de la coronta(olote) del maíz variedad HS-5, por el método de hidrólisis ácida diluida - fermentación separada, laboratorios de química*. 1–256. [http://repositorio.unan.edu.ni/1357/1/Monografía KiaraLeticia.pdf](http://repositorio.unan.edu.ni/1357/1/Monografía%20KiaraLeticia.pdf)
- Muñoz-Rojasa, J., Morales-García, Y. E., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P., & Pérez-y-Terrón, R. (2016). Instituciones de Educación Superior La labor investigadora e innovadora en México. *Instituciones de Educación Superior La Labor Investigadora e Innovadora En México*, 5.
- Nácher, M. (2015). *Dextranos de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos: Caracterización y aplicaciones*. 3–22.
- Nácher Vázquez, M., López, I. I., Notararigo, S., De, P. F., Delgado, P., Novella, R. A., Teresa, M., Chasco, D., & García, P. L. (2012). *APLICACIONES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS EN LA CALIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS*.
- Ng, I. S., & Xue, C. (2017). Enhanced exopolysaccharide production and biological activity of *Lactobacillus rhamnosus* ZY with calcium and hydrogen peroxide. *Process Biochemistry*, 52, 295–304.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. In *Environmental Technology* (Vol. 31, Issue 10, pp. 1145–1158). TF.
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), 123–135.
- Nocianitri, K. A., Antara, N. S., Sugitha, I. M., Sukrama, I. D. M., Ramona, Y., &

- Sujaya, I. N. (2017). The effect of two *Lactobacillus rhamnosus* strains on the blood lipid profile of rats fed with high fat containing diet. *International Food Research Journal*, 24(2), 795–802.
- Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M., De Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Aznar, R., López, P., & Prieto, A. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 57–64.
- Ogueke, C. C., Owuamanam, C. I., Ihediohanma, N. C., & Iwouno, J. O. (2010). Probiotics and prebiotics: Unfolding prospects for better human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9), 833–843.
- Oleksy-Sobczak, M., & Klewicka, E. (2019). Optimization of Media Composition to Maximize the Yield of Exopolysaccharides Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., & Piekarska-Radzik, L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. *Lwt*, 122, 109055.
- Olveira Fuster, G., & González-Molero, I. (2007). *Probióticos y prebióticos en la práctica clínica*.
- Palakawong Na Ayutthaya, P., Charoenrat, T., Krusong, W., & Pornpukdeewattana, S. (2019). Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production. *3 Biotech*, 9(3), 0.
- Pan, D., & Mei, X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 908–914.
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 270–279.
- Parra Huertas, R. (2010). Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.

- Pavunc, A. L., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blazić, M., & Šušković, J. (2012). Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology*, *50*(2), 141–151.
- Péant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P., & Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Microbiology*, *151*(6), 1839–1851.
- Pérez-Ramos, A., Nácher-Vázquez, M., Notararigo, S., López, P., & Mohedano, M. L. (2016). Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. Elsevier Inc.
- Pérez, K. (2016). Evaluación de tusa y cáscara de maíz como sustratos para el cultivo de *pleurotus pulmonarius*. *Ciencia y Tecnología: Revista de La Universidad de Costa Rica*, *32*(1), 31–46.
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, *15*(12), 546–553.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2302–2310.
- Piard, J.-C., Le Loir, Y., Poquet, I., & Langella, P. (1999a). Bacterias laticas. As bacterias laticas no centro dos novos desafios tecnologicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, *80-88*.(1999).
- Piard, J.-C., Le Loir, Y., Poquet, I., & Langella, P. (1999b). Bacterias laticas. As bacterias laticas no centro dos novos desafios tecnologicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, *80-88*.(1999). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2016214944>
- Plumed-Ferrer, C., Koistinen, K. M., Tolonen, T. L., Lehesranta, S. J., Kärenlampi, S. O., Mäkimattila, E., Joutsjoki, V., Virtanen, V., & Von Wright, A. (2008). Comparative study of sugar fermentation and protein expression patterns of two *Lactobacillus plantarum* strains grown in three different media. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5349–5358.
- Polak-Berecka, M., Waško, A., Szwajgier, D., & Choma, A. (2013). Bifidogenic and

- antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Polish Journal of Microbiology*, 62(2), 181–188.
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Marine Drugs*, 8(6), 1779–1802.
- Press, A. I. N. (2003). *l (+) -Lactic acid production from corncobs by Rhizopus oryzae*. 36, 573–575.
- Quigley, E. M. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61(3), 213–218.
- Rao, R. S., Jyothi, C. P., Prakasham, R. S., Sarma, P. N., & Rao, L. V. (2006). Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, 97(15), 1974–1978.
- Requis Varillas, F. V. (2012). *Manejo agronómico del maíz morado en los valles interandinos del Perú*. 23.
- Riaz Rajoka, M. S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., & Hussain, N. (2018). Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 638–647.
- Ribera Casado, J. M. (2017). The hundredth anniversary of the death of Elie Metchnikoff (1845-1916). *Educacion Medica*, 18(2), 136–143.
- Ripoll, X. P. (2009). *Universidad de Granada Facultad de Farmacia Departamento de Microbiología interés industrial a partir del lactosuero y permeatos ”*.
- Rodríguez-Carmona, E., & Villaverde, A. (2010). Nanostructured bacterial materials for innovative medicines. In *Trends in Microbiology* (Vol. 18, Issue 9, pp. 423–430). Elsevier Current Trends.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 79–90.
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en

- la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 153–170.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 163–171.
- Rui, Z., & Lixia, Z. O. (2011). The anticoagulant activity of polysaccharide and sulfate from corn-cob. *Proceedings 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, HHBE 2011*, 202–204.
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 587–597.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 56, Issue 9, pp. 1440–1453). Taylor and Francis Inc.
- Sasikumar, K., Kozhummal Vaikkath, D., Devendra, L., & Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152–1156.
- Sathiyarayanan, G., Yi, D. H., Bhatia, S. K., Kim, J. H., Seo, H. M., Kim, Y. G., Park, S. H., Jeong, D., Jung, S., Jung, J. Y., Lee, Y. K., & Yang, Y. H. (2015). Exopolysaccharide from psychrotrophic Arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 and its potential applications. *RSC Advances*, 5(103), 84492–84502.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - A minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678–684.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Savadogo, P. W., Barro, N., Ouattara, A. S., & Traoré, A. S. (2004). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3), 189–194.
- Shao, L., Wu, Z., Tian, F., Zhang, H., Liu, Z., Chen, W., & Guo, B. (2015).

- Molecular characteristics of an exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KF5 in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1429–1434.
- Shao, L., Wu, Z., Zhang, H., Chen, W., Ai, L., & Guo, B. (2014). Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydrate Polymers*, 107(1), 51–56.
- Sillanpaa, J., Martinez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keranen, J., Hook, M., Westerlund-Wikstrom, B., Pouwels, P. H., & Korhonen, T. K. (2000). Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6440–6450.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 448–457
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., & Jr, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Speranza, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Altieri, C., & Sinigaglia, M. (2015). Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for Fior di Latte, a traditional cheese of southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 88–97.
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., & Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*, 47, 137–144.
- Takeuchi, A., Kamiryu, Y., Yamada, H., Eto, M., Shibata, K., Haruna, K., Naito, S., & Yoshikai, Y. (2009). Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4. *International Immunopharmacology*, 9(13–14), 1562–1567.
- Tallon, R., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705–712.

- Tomita, S., Furihata, K., Nukada, T., Satoh, E., Uchimura, T., & Okada, S. (2009). Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(3), 530–535.
- Tomusiak-Plebanek, A., Heczko, P., Skowron, B., Baranowska, A., Okoń, K., Thor, P. J., & Strus, M. (2018). Lactobacilli with superoxide dismutase-like or catalase activity are more effective in alleviating inflammation in an inflammatory bowel disease mouse model. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3221–3233.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., & Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 230–235.
- Tsuda, H., & Miyamoto, T. (2010). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87–92.
- Valík, L., Medved'ová, A., & Liptáková, D. (2008). Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(2), 60–67.
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157–176.
- Vásquez M., S. M., Suárez M., H., & Zapata B., S. (2009). Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutricion*, 36(1), 64–71.
- Vélez, M. P., Verhoeven, T. L. A., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrichts, I., Granette, C., Pot, B., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2007). Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3595–3604.
- Vescovo, M., Dellaglio, F., Bottazzi, V., & Sarra, P. G. (1979). Deoxyribonucleic

- acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologica*, 2(4), 317–330.
- Vilagravel, B., Esteve-Garcia, E., & Brufau, J. (2010). Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; Modes of action. *World's Poultry Science Journal*, 66(3), 369–380.
- Vorhölter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K., & Pühler, A. (2008). The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 33–45.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., & Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119–126.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133–139.
- Wang, L., Jiang, Y., Li, C., Li, X., Meng, L., Wang, W., Lili Wang, & Mu, X. (2011). Microwave-assisted hydrolysis of corn cob for xylose production in formic acid. *ICMREE2011 - Proceedings 2011 International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment*, 1, 332–335.
- Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., & Lü, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173–1184.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 43(3), 283–288.

- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895–903.
- Werning, M. L., Corrales, M. A., Prieto, A., De Palencia, P. F., Navas, J., & López, P. (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1→3)-β-D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5259–5262.
- Wilches Flórez, A. (2005). Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (eps). *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 3(2), 12–18.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90330202>
- Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, 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.
- Zamudio Malpartida, K. L. (2005). *Lactobacilos nativos productores de Exopolisacáridos de interés biotecnológico*. 75.
- Zehir Şentürk, D., Dertli, E., Erten, H., & Şimşek, Ö. (2020). Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 121–129.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., & Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 270–275.
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M., & Jiang, B. (2014). Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 975–981.
- Zhu, G., Sheng, L., & Tong, Q. (2013). A new strategy to enhance gellan production by two-stage culture in *Sphingomonas paucimobilis*. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 829–834.

ANEXOS

Anexo A: Algunos ejemplos de productos comerciales que contienen cepas probióticas de BAL.

B.: *Bifidobacterium*, L.: *Lactobacillus*, Lact.: *Lactococcus*, Ped.: *Pediococcus*, S.: *Streptococcus*, Sacc.: *Saccharomyces* (Campos & Mena, 2012).

FABRICANTE	PRODUCTOS	CEPAS
Jarrow Formulas	Jarrow-Dophilus EPS®	<i>B. breve</i> R0070, <i>B. longum</i> BB536, <i>L. casei</i> R0215, <i>L. helveticus</i> (<i>L. acidophilus</i>) R0052, <i>L. plantarum</i> R1012, <i>L. rhamnosus</i> R0011.
	Jarrow-Dophilus® Allergen-Free	<i>B. breve</i> BR-03, <i>B. lactis</i> BS-01, <i>L. acidophilus</i> LA-02, <i>L. paracasei</i> LPC-00, <i>L. plantarum</i> LP-01, <i>L. rhamnosus</i> LR-04.
	Jarrow-Dophilus® + FOS	<i>B. lactis</i> BI-04, <i>B. longum</i> BB536, <i>L. acidophilus</i> LA-14, <i>L. casei</i> R0215, <i>L. plantarum</i> R1012, <i>L. rhamnosus</i> R0011.
	Ultra Jarrow-Dophilus®	<i>B. breve</i> Bb-03, <i>B. lactis</i> BI-04, <i>B. longum</i> BB536, <i>L. acidophilus</i> La-14, <i>L. casei</i> Lc-11, <i>L. paracasei</i> Lpc-37, <i>L. plantarum</i> Lp-115, <i>L. rhamnosus</i> R0011, <i>L. salivarius</i> Ls-33, <i>Lact. Lactis</i> LI-23.
NOW Foods: Nutrition for Optimal Wellness	Acidophilus and Bifidus 8 Billion	<i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> .
	Acidophilus, 3 Billion, Stabilized	<i>L. acidophilus</i> .
	Acidophilus 4 X 6 Powder	<i>B. lactis</i> (<i>bifidum</i>), <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. paracasei</i> sub-sp., <i>S. thermophilus</i> .
	BerryDophilus™	<i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L.</i>

		<i>plantarum, L. salivarius.</i>
	Gr8-Dophilus™	<i>B. bifidum, B. lactis, B. longum, L. acidophilus, L. casei, L. rhamnosus, L. salivarius, S. thermophilus.</i>
	Probiotic-10™25Billion	<i>B. bifidum, B. breve, B. longum, L. acidophilus, L. casei, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius, S. thermophilus.</i>
EFI: Essential Formulas Incorporated	Dr. Ohhira's Probiotics® Original Formula	<i>B. breve ssp. Breve, B. infantis ssp. Infantis, B. longum, E. faecalis TH10, L. acidophilus, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei ssp. Casei, L. fermentum, L. helveticus ssp. Jugurti, L. plantarum, S. thermophilus.</i>
Amerifit Nutrition, Inc.	Culturelle® for KIDS	<i>L. rhamnosus GG (strain ATCC 53103)</i>
Healthy Origins ®	Healthy Origins® Probiotic	<i>B. breves, B. Lactis, B longum, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius.</i>
Flora	Udo's Choice Infant's Blend Probiotic	<i>B. bifidum, B. breve, B. infantis, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei, S. thermophilus.</i>
	Udo's Choice Children's Probiotic and Udo's Choice Adult's Probiotic	<i>L. casei, L. rhamnosus, L. acidophilus, L. plantarum, L. bulgaricus, S. thermophilus, B. breve, B. bifidum.</i>
	Udo's Choice, Super 8 Hi-Potency Probiotic	<i>L. acidophilus, L. rhamnosus, L. plantarum, L. bulgaricus, L. salivarius, S. thermophilus, B. bifidum, B. longum</i>
	Udo's Choice Advanced Adult's Probiotic	<i>L. casei, L. rhamnosus, L. acidophilus, L. plantarum, L. bulgaricus, B. breve, B. bifidum, B. longum, S. thermophilus.</i>
	Udo's Choice Super Bifido Plus Probiotic	<i>L. rhamnosus, L. plantarum, L. acidophilus, Lact. lactis, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei, B. breve, B. bifidum, B. longum.</i>
	Udo's Choice Super 5 Lozenge Probiotic	<i>L. acidophilus, L. bulgaricus, L. salivarius, B. bifidum, S. thermophilus.</i>
Renew Life	Ultimate Flora, critical Care	<i>B. bifidum (HA 132), B. breve (HA 129), B. longum (HA 135), L. acidophilus (HA 122), L. bulgaricus (HA 137), L. casei (HA 108), L. lactis (HA 148), L. plantarum (HA 119), L. rhamnosus (HA 111), L. salivarius (HA 118).</i>
American Health®	Chewable Acidophilus with Bifidus	<i>L. acidophilus, B. bifidum.</i>
Natural Factors	Acidophilus and Bifidus	<i>L. rhamnosus HA-111, L.</i>

		<i>acidophilus</i> HA-122, <i>B. bifidum</i> HA-132.
Nature's Way	Primadophilus® Kids	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> .
	Primadophilus® Bifidus	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> .
	Primadophilus® Children	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> .
	Primadophilus® Fortify™	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> .
	Primadophilus® Intensive	<i>L. acidophilus</i> -122, <i>L. rhamnosus</i> -111, <i>B. breve</i> -129, <i>B. longum</i> -135, <i>B. bifidum</i> -132.
	Primadophilus® Junior	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> .
	Primadophilus® Kids	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> .
	Primadophilus® Optima	<i>L. casei</i> -108, <i>B. longum</i> -135, <i>L. acidophilus</i> -122, <i>L. planatrum</i> -199, <i>L. rhamnosus</i> -111, <i>L. rhamnosus</i> -114, <i>B. breve</i> -129, <i>B. bifidum</i> -132, <i>Lact. lactis</i> -136, <i>S. thermophilus</i> -110, <i>B. infantis</i> -116, <i>L. bulgaricus</i> -137, <i>L. salivarius</i> -118, <i>L. helveticus</i> -128.
	Primadophilus® Optima Max Bifido	<i>B. breve</i> HDS-0129, <i>B. longum</i> HDS-0135, <i>B. bifidum</i> HDS-0132, <i>B. infantis</i> HDS-0116, <i>L. casei</i> HDS-0108, <i>L. paracasei</i> HDS-0196, <i>L. rhamnosus</i> HDS-0111, <i>L. acidophilus</i> HDS-0122, <i>L. rhamnosus</i> HDS-0114, <i>L. salivarius</i> HDS-0118.
Primadophilus® Original	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> .	
Sedona Labs®	iFlora® Multi-Probiotic®	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> (<i>infantis</i>), <i>B. lactis</i> HN019, <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. grasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Lact. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> .
	iFlora® Kids Multi-Probiotic®	<i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> (<i>infantis</i>), <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> BB536, <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> .
	iFlora® Nasal Sinus Support.	<i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i> .
	iFlora® Woman Multi-Probiotic®	<i>B. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L.</i>

		<i>rhamnosus, S. thermophilus.</i>
Garden of life	Primal Defense Ultra	<i>Sacc. Boulardii, L. plantarum, Bac. subtilis, L. paracasei, B. longum, L. brevis, B. bifidum, B. breve, B. lactis, L. acidophilus, L. salivarius, L. rhamnosus, L. casei.</i>
Sigma-Tau Pharmaceuticals	VSL#3	<i>B. breve, B. longum, B. infantis, L. acidophilus, L. plantarum, L. paracasei, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, S. salivarius subsp. thermophilus.</i>
Biogaia	BioGaia Probiotic chewable tablets or drops,	<i>L. reuteri</i> ATTC 55730
Probiomics	proTract® for Intestinal Health, proTract® IBS, proTract® for atopic dermatitis.	<i>L. fermentum</i> VRI003 (PCC)
Italframaco, S.A.	Prodefen.	<i>L. casei</i> PXN37, <i>L. rhamnosus</i> PXN54, <i>L. acidophilus</i> PXN35, <i>L. bulgaricus</i> PXN39, <i>B. infantis</i> PXN27, <i>B. breve</i> PXN25, <i>S. thermophilus</i> PXN66.
Salvat S.A. Laboratories	Protransitus LP	<i>L. plantarum</i> 299v.