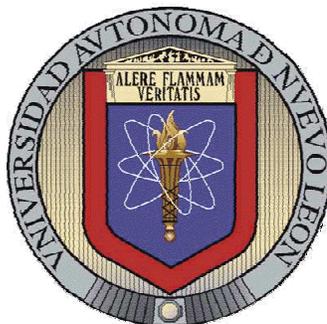


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EFFECTO DE LAS VARIACIONES ENTRE LAS FUENTES DE
CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE LA CAPACIDAD DE
PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO POR UNA
CEPA NATIVA DE *Enterobacter cloacae***

POR:

MAGDALENA DE JESÚS ROSTRO ALANIS.

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con orientación en Microbiología Industrial

ABRIL, 2010

**EFFECTO DE LAS VARIACIONES ENTRE LAS FUENTES DE
CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE LA CAPACIDAD DE
PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO POR UNA
CEPA NATIVA DE *Enterobacter cloacae***

Aprobación de la Tesis:

Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo
Director de Tesis

Dra. Mónica Noel Sánchez González
Revisor de la Tesis

Dra. María Teresa Garza González
Revisor de la Tesis

Dra. María Elena Rodríguez Cantú
Revisor de la Tesis

Dra. María Teresa Garza González
Revisor de la tesis
Sub-directora de Estudios

RESUMEN

Magdalena de Jesús Rostro Alanis

Fecha de graduación: Abril 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: EFECTO DE LAS VARIACIONES ENTRE LAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO POR UNA CEPA NATIVA DE *Enterobacter cloacae*

Número de páginas: 61

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial

Área de estudios: Microbiología Industrial

Las biopelículas son comunidades estructuradas de microorganismos, que están adheridas a superficies gracias a la secreción de exopolímeros. La composición de la biopelícula es variable; la matriz de esta es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células.

La cantidad de exopolisacárido en la biopelícula depende generalmente de la disponibilidad de sustrato de carbono y el balance entre el carbono y los otros nutrientes limitantes. Se estudio el efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno, así como el de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la capacidad de producción de EPS por una cepa nativa de *Enterobacter cloacae*, buscando incrementar la producción del mismo en el medio MSF-BE.

Conclusiones

- La producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* se incrementa positivamente por la variación de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MSF-BE2.
- Las fuentes de nitrógeno orgánicas (extracto de levadura y peptona de caseína) proporcionaron mayores incrementos de exopolisacárido (EPS) que las fuentes de carbono inorgánicas (nitrato de sodio y sulfato de amonio).
- La producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* es afectada por la variación de las concentraciones de la fuente de carbono (maltosa) y nitrógeno del medio de cultivo MSF-BE2; siendo las concentraciones altas las que proporcionan mejores resultados.
- La mayor producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* fue de 16.51g/L, valor dos veces más alto que el producido con las concentraciones iniciales del medio. Las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno que proporcionan este resultado fueron maltosa 25g/L y extracto de levadura 20g/L.

FIRMA DEL ASESOR: _____

DEDICATORIAS

A Dios...

Por darme el don de la vida y el amor, salud, una familia y permitirme terminar una etapa más de mi vida.

A mi familia...

A mis padres, Victorina Alanis Acosta y Cornelio Rostro López (†), por su amor, apoyo, cariño, comprensión y por todos sus esfuerzos a lo largo de mi vida. Los amo, que Dios los bendiga.

A mis hermanos, Elsa, Juan y Hugo, así como a Payo, Mela, Inés, Sugy, Yami, Ame y Huguito, por su cariño, motivación, apoyo y alegría, en todo momento.

A mi mejor amigo...

Luis E. por ser una persona muy especial en mi vida, por su amor, cariño, fortaleza, compañía y por caminar conmigo en todo momento.

A mis amigos...

Por permitirme su amistad y apoyo durante esta etapa de mi vida.

Gracias...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo y a la Facultad de Ciencias Químicas, por las facilidades otorgadas y la beca académica para la realización de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Martínez Silva (†), Dra. Mónica Noel Sánchez González, Dra. Teresa Garza González, Dra. Ma. Elena Rodríguez Cantú, Dra. Martha A. Suárez Herrera y a todos los maestros del área de Microbiología Industrial, por permitirme algo de su valioso tiempo, compartir su capacidad y experiencia, sus enseñanzas y asesoramiento durante la realización de esta tesis.

Al QFB. Carlos Castillo Zacarías por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología y por todas las facilidades prestadas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología: Carlos, Pedro, Allan, Rosy, Chema, Sandra, Claudia, Ángel, Rocío, Karool, Julian, Natalie, por su apoyo y agradable compañía.

A mis amigos: Luis E., Tanya, Arleth, Sergio, Pablo, Juan, Cahuich, Dimas... por su apoyo en todo momento.

Gracias...

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Biopelículas	1
1.1.1 Proceso de formación de las biopelículas	3
1.1.2 Composición de las biopelícula.....	5
1.2 Biopolímeros	5
1.2.1 Polisacáridos de origen microbiano.....	6
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 Variables que afectan la formación de la biopelícula.....	10
2.2 Variables en la producción de exopolisacáridos.....	11
2.3 <i>Enterobacter cloacae</i> como productor de exopolisacáridos...	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL PROYECTO.....	18
3.1 Hipótesis.....	18
3.2 Objetivo general.....	18
3.3 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Materiales y equipos.....	20
4.2 Microorganismo de estudio.....	21
4.3 Medios de cultivo experimentales.....	21

4.4 Preparación del inóculo.....	23
4.5 Cultivos experimentales.....	23
4.6 Procedimientos para la evaluación del exopolisacárido.....	23
4.6.1 Purificación y recuperación del exopolisacárido.....	23
4.6.2 Cuantificación del biopolímero.....	24
4.7 Determinación de consumo de carbohidratos.....	24
4.7.1 Determinación de azúcares reductores.....	24
4.8 Diseño de experimentos para evaluar la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno.....	26
4.9 Análisis estadístico.....	27
4.10 Disposición de residuos.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Recuperación de la cepa de <i>Enterobacter cloacae</i>	29
5.2 Medio de cultivo experimental.....	30
5.3 Efectos de la variación de la fuente de nitrógeno del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por una cepa de <i>Enterobacter cloacae</i>	37
5.4 Efectos de la variación de la concentración de la fuente de carbono (maltosa) y la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por <i>Enterobacter cloacae</i>	40

5.5 Efectos de la variación de la concentración de la fuente de carbono (maltosa) y la fuente de nitrógeno (peptona de caseína) del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por <i>Enterobacter cloacae</i>	41
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS.....	49
APÉNDICES.....	59
 APENDICE A.- CURVA ESTÁNDAR UTILIZADA PARA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Composición del medio de cultivo MSF-BE.....	22
II.	Concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno en el diseño de experimentos.....	26
III.	Combinación de las concentraciones del diseño de experimentos 2^2	27
IV.	Composición del medio MSF-BE2.....	36
V.	Producción de EPS con el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación diagramática de la estructura de una biopelícula bacteriana basada en el análisis sistemático de imágenes obtenidas con MCLB.....	3
2. Etapas de formación de una biopelícula.....	4
3. Aspecto macroscópico de las colonias de <i>Enterobacter cloacae</i> en agar nutritivo.....	29
4. Curva de consumo de azúcares reductores por <i>Enterobacter cloacae</i> en el medio MSF-BE.....	30
5. Curva de consumo de azúcares reductores por <i>Enterobacter cloacae</i> en el medio MSF-BE2.....	32
6. Esquema de fermentación y siembra a partir del medio MSF-BE.....	33
7. Esquema de fermentación y siembra a partir del medio MSF-BE.....	34
8. Placas de agar sembradas a partir del medio MSF-BE.....	35
9. Placas de agar sembradas a partir del medio MSF-BE2.....	35
10. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L	

en el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno durante 24 horas.....	37
11. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno durante 48 horas.....	38
12. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con extracto de levadura.....	40
13. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con peptona de caseína.....	41
14. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares Reductores.....	61

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

EPS	Exopolisacárido
g	Gramos
Kg	Kilogramos
g/L	Gramos por litro
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen
mg	Miligramos
N	Normalidad
mL	Mililitro
L	Litros
µL	Microlitros
M	Molar
min	Minutos
°C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
h	Horas
cm	Centímetros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
UV/Vis	Ultravioleta / Visible
MSF-BE	Medio Sergio Fernández – Biopelículas Enterobacter
MSF-BE2	Medio Sergio Fernández – Biopelículas Enterobacter 2

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Biopelículas

Los microorganismos en su medio natural se organizan en comunidades, donde conviven con especies diferentes (Lasa y col., 2005; Mikkelson y col., 2007).

En muchos habitats, las biopelículas probablemente son el ambiente normal de desarrollo de la mayoría de las células microbianas. (Sutherland, 2001). Esto se puede observar en el material resbaladizo que recubre las piedras de los lechos de los ríos, el material mucoso que recubre un florero después de que se le han depositado flores o la superficie interna de una tubería. También están presentes en el cuerpo humano realizando papeles benéficos como la biopelícula de lactobacilos presentes en la vagina que disminuyen el pH y previenen la colonización por microorganismos patógenos; pero en otras ocasiones se relacionan con distintos procesos infecciosos derivados de implantes médicos, donde dichas películas pueden provocar enfermedades crónicas. Otro claro ejemplo de biopelículas sería la placa dental, que esta formada por bacterias y se mantiene bajo control para

evitar el desarrollo excesivo de microorganismos que pueden provocar un deterioro del esmalte dental (Lasa y col., 2005; Costerton y col., 1999; Bagge y col., 2001; Diamond y col., 2007).

Con esto podemos definir a las biopelículas como comunidades estructuradas de microorganismos, adheridas a superficies gracias a la secreción de exopolímeros. Estas pueden estar compuestas de una especie o de múltiples especies microbianas y se pueden formar sobre una variedad de superficies animadas e inanimadas. En dichas comunidades predominan microorganismos que tienen la capacidad de producir polisacáridos extracelulares que les permiten adherirse firmemente a superficies sólidas, fenómeno que conduce a la formación de la biopelícula. (Degeest y Vuyst, 1999; Gibello y col, 1995; Cunliffe y col., 1999)

La biopelícula representa una estrategia de supervivencia, ya que proporciona protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana, así como del ataque de otras células y factores ambientales adversos. También proporciona una forma de almacenamiento de carbono, energía y otros nutrientes. Además, cuenta con un sistema de canales, sobre todo en biopelículas que han alcanzado un cierto grosor, los cuales le permiten establecer un vínculo con el medio externo para llevar a cabo el intercambio de nutrientes, oxígeno, agua y eliminar metabolitos de desecho; estos canales también le permiten tener una comunicación con otros microorganismos. (Figura 1) (Lewandowski y col., 1993; Lasa y col., 2005; Betancourt y col., 2004; Allison, 1998; Diamond y col., 2007).

Cuando las células están inmovilizadas en una masa estructurada, como una microcolonia encerrada en una matriz, los microambientes locales de células individuales poseerán diferente concentración de nutrientes, pH y oxígeno. Las células periféricas disponen de los nutrientes y el oxígeno en una mayor proporción que las células que se encuentran más profundamente en la biopelícula y el fenotipo de cada célula adherida es establecido por las características especiales de su propio micro-ecosistema

dentro de la estructura completa. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de una biopelícula y dificulta su estudio. (Costerton y col., 1994; Lasa y col., 2005).

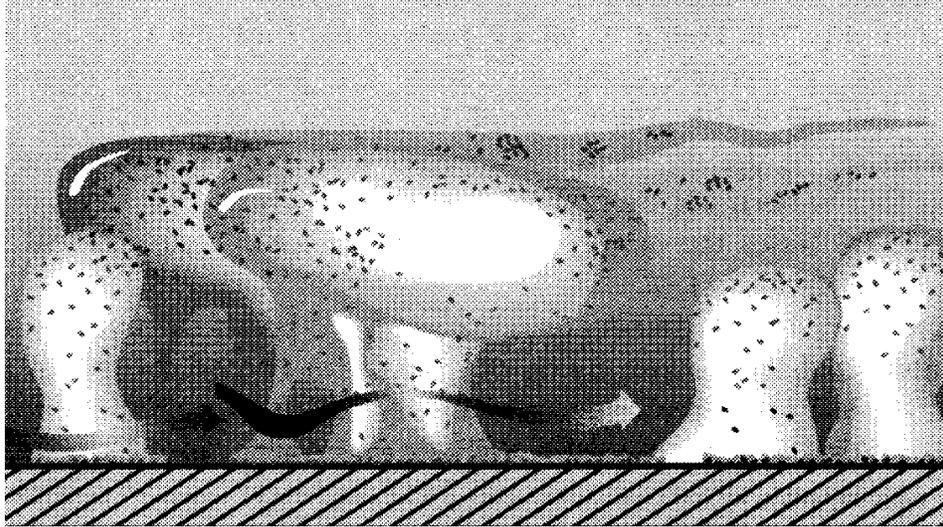


Figura 1. Representación diagramática de la estructura de una biopelícula bacteriana basada en el análisis sistemático de imágenes obtenidas con MCLB.

1.1.1 Proceso de formación de las biopelículas

La formación de la biopelícula está regulada por un proceso conocido como “*quórum sensing*” o autoinducción. El sistema de “*quórum sensing*” es un mecanismo de regulación y expresión de genes específicos dependiente de la acumulación en el medio exocelular de una molécula señal conocida como autoinductor la cual permite a la bacteria “sentir” la densidad de población existente. En bacterias Gram-negativas el autoinductor es acilhomoserina lactona y en bacterias Gram-positivas son péptidos (Lasa y col., 2005; Betancourt y col., 2004; Carniol y col., 2004).

El proceso de formación de las biopelículas es originada por una adherencia reversible, es decir, la unión del microorganismo a la superficie

es débil y fácilmente se puede desprender; existen varios factores involucrados en esta adherencia inicial, como la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares del microorganismo. (Diamond y col., 2007).

La adherencia inicial o reversible puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la redistribución de las células adheridas por movilidad sobre la superficie (Dalton y col., 1996), un segundo mecanismo resulta de la división binaria de las células adheridas (Heydorn y col., 2000) y el tercero es un mecanismo de agregación de las células del líquido sobrenadante. (Tolker-Nielson y col., 2000). En la siguiente etapa la bacteria comienza a secretar el exopolisacárido que lo adhiere de forma irreversible a la superficie, después de esto la biopelícula se desarrolla y crece. Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan para poder colonizar nuevas superficies cerrando así el ciclo de desarrollo de la biopelícula. Figura 2. (Lasa y col., 2005).

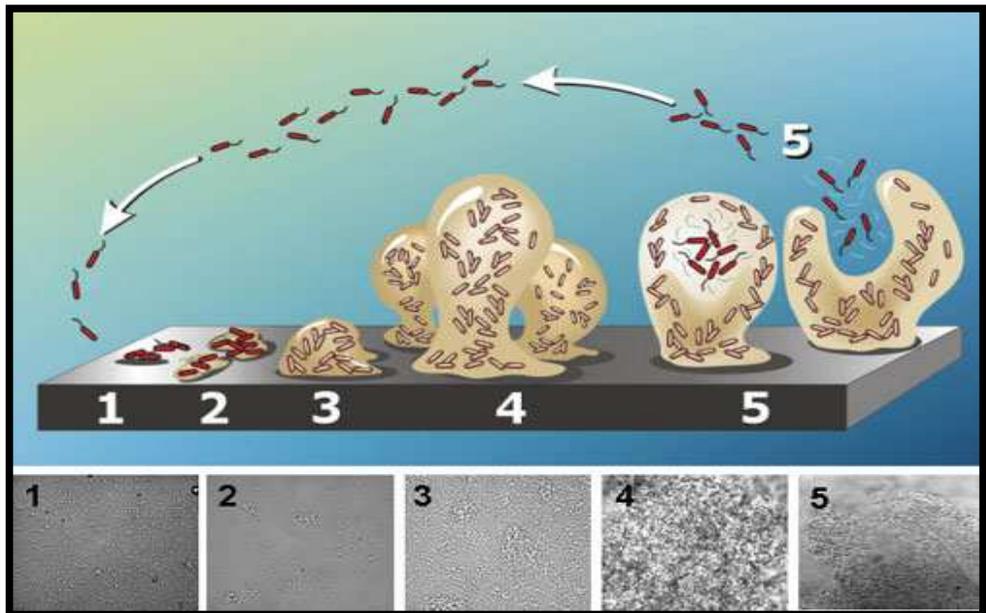


Figura 2. Etapas de formación de una biopelícula.

La capacidad de formación de una biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que, bajo ciertas condiciones, todos los microorganismos son capaces de formarlas. (Lasa y col., 2005).

1.1.2 Composición de las biopelículas

La composición de la biopelícula es variable. Las bacterias adherentes crecen actualmente en micro colonias de una gran variedad de formas y tamaños en las que ellas se encuentran envueltas en una matriz de material polimérico que constituye alrededor del 85% del volumen de cada una de esas unidades estructurales en la biopelícula; esta matriz es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y diversos productos provenientes de la lisis de las bacterias.

Una misma especie de microorganismo, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (Lasa y col., 2005; Abbasi y Amiri, 2008).

1.2 Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas naturales cuyas propiedades físicas y químicas dependen de sus propiedades estructurales y de sus funciones. (Macossay, 1995; Murray y col., 1994).

Los organismos son capaces de sintetizar varios polímeros entre los cuales se pueden distinguir ocho clases según su estructura química: ácidos nucleicos, poliamidas, polisacáridos, poliésteres orgánicos, polioésteres, poliésteres inorgánicos, poliisoprenoides y polifenoles. (Steinbüchel, 2001).

La mayoría de los biopolímeros poseen una estructura química y composición compleja por lo cual su síntesis química no es sencilla. Una característica importante que poseen los biopolímeros, a diferencia de los polímeros sintéticos, es que son biodegradables. Estos aspectos, más el constante incremento en el número de aplicaciones, respaldan las razones del creciente interés industrial para su producción.

Entre los diferentes biopolímeros que se pueden producir, los de origen microbiano tienen la ventaja de que su producción no depende de condiciones climáticas ni de recolección y sí en la factibilidad de usar materias primas simples y de alta accesibilidad para su producción. También de esta forma el biopolímero cuenta con mayor uniformidad en sus propiedades, pureza y características intrínsecas debido a que su biosíntesis es muy específica. Los microorganismos pueden sintetizar las primeras seis clases de polímeros mencionadas y destacan por tener aplicaciones en medicina, farmacia, agricultura y en muchas otras áreas, como materiales de envase. (Steinbüchel, 2001; Martínez y col., 1996; Parada y col., 2006)

1.2.1 Polisacáridos de origen microbiano

Los polisacáridos son macromoléculas de origen natural, tienen funciones como servir como soporte estructural confiriéndoles resistencia mecánica, servir como reservorio, etc., por lo que son la categoría más grande de la familia de los biopolímeros. Estos polímeros están unidos por enlaces tipo glucosídico. (Macossay, 1995).

Existen varios tipos de polisacáridos, entre los que se pueden encontrar a los homopolímeros, que están formados por subunidades de la misma estructura monoméricas, y los heteropolímeros, los cuales están formados de diferentes subunidades estructurales monoméricas. Entre los homopolímeros se pueden mencionar al almidón que contiene unidades de α -glucosa y la celulosa que contiene unidades de β -glucosa, ambas estructuras están hechas de isómeros de glucosa que difieren solamente en la posición del hidroxilo del carbón anomérico. Entre los heteropolisacáridos se pueden mencionar las galactomanosas (compuestos de galactosa y manosa), arabinoxilanos (compuestos de arabinosa y xilanos), peptidoglicanos, etc. (Hocking y Marchessault, 1994; Minervini y col., 2010).

Los polisacáridos de origen microbiano se pueden encontrar de dos formas, como inclusiones intracelulares que actúan como material de reserva o reguladores, como por ejemplo se pueden mencionar al polihidroxibutirato (PHB), en donde la secuencia de monómeros se representa por un grupo repetitivo de subunidades; la otra forma es como polisacáridos extracelulares, los exopolisacáridos, que se pueden encontrar como material mucilaginoso extracelular en forma de cápsulas o limos en donde las subunidades pueden ser desde disacáridos hasta hexasacáridos. Esta formación de material mucilaginoso extracelular por parte de los microorganismos ha generado un gran interés ya que refleja su respuesta inmediata a cambios en el medio ambiente. (Vincenzini y col., 1990; Sutherland, 2001).

Los polisacáridos de origen microbiano son sintetizados mediante reacciones multienzimáticas dentro de la célula, a través de mecanismos todavía no esclarecidos por la acción de enzimas, principalmente las transferasas. Estas enzimas tienen la capacidad de transferir residuos glicosídicos a una gran variedad de aceptores como alcoholes primarios,

azúcares simples o cadenas glicosídicas. En general el proceso consiste en sintetizar oligosacáridos a partir de azúcares activados, azúcar-nucleótido-fosfatados, los cuales se unen de manera secuencial a un lípido isoprenoide conocido como lípido portador de antígeno (LPA), en donde se unen las unidades monoméricas para iniciar su polimerización. El mecanismo de excreción en los polisacáridos extracelulares tampoco está esclarecido. (Quintero, 1985; Linton, 1990; Fuller, 1990; Pérez y col., 1995)

Los exopolisacáridos, son la base de la matriz de las biopelículas y poseen características intrínsecas que la dan valor comercial como:

- 1.- Alta viscosidad a bajas concentraciones.
- 2.- Propiedades gelantes.
- 3.- Compatibilidad con altas concentraciones de sales.
- 4.- Alta solubilidad en agua y conducta anticongelante.
- 5.- Polielectrólito y potencial de intercambio iónico.
6. Capacidad floculante, dispersante y versatilidad de adhesión.
- 7.- Biodegradabilidad.

Por consiguiente los polisacáridos pueden servir como agentes viscosantes, estabilizantes, gelificantes y emulsificantes en una gran variedad de productos alimenticios o farmacéuticos; otros pueden servir como fuente importante de monosacáridos, inclusive en estudios recientes se han reportado exopolisacáridos con propiedades antioxidantes y antitumorales. (Jin y col., 2010).

Un polisacárido tiene valor comercial potencial dependiendo de su composición característica, la cantidad producida por cultivo y la facilidad de recolectar y procesar el polisacárido. (Luhman, 1990; Mozzi y col., 1996; Steinbüchel, 2001; Poli y col., 2009).

Los exopolisacáridos encontrados en las biopelículas de origen microbiano varían en su composición y en sus propiedades físicas. Las principales diferencias entre los exopolisacáridos bacterianos y los de las

algas residen en la secuencia de los monosacáridos y en la presencia de grupos O-acetilo en la estructura. Lo anterior hizo necesario ver a cada especie microbiana y a cada exopolisacárido como entidades distintas y con propiedades únicas, ya sea en el modo de crecimiento planctónico o como biopelícula. (Hughes y col., 1988).

Se ha encontrado que las propiedades físicas de los exopolisacáridos y por lo tanto de las biopelículas dependen de las interacciones entre sus cadenas, mediadas por las moléculas de agua y las entidades iónicas presentes. Además estas estructuras resultaron ser influenciadas por la presencia o ausencia de grupos aniónicos libres derivados de los ácidos urónicos o grupos fosfato. Los puentes de hidrógeno que involucraron los grupos hidroxilo expuestos, también resultaron ser muy significativos. Las regiones hidrofóbicas, derivadas ya sea de los grupos O-acetilo o las 6-desoxihexosas tales como la L-ramnosa o la L-fucosa resultaron tener también una fuerte influencia. (Mack y col., 1996)

Estructuralmente, los exopolisacáridos presentan un pseudo-esqueleto en el que hay una predominancia de enlaces (1-3) ó (1-4), ya sea la configuración alfa o más comúnmente la beta. La composición actual de los exopolisacáridos microbianos muestra un rango de posibilidades casi infinito. Algunos son simples homopolisacáridos, como por ejemplo la mutana obtenida de *Streptococcus mutans* que presenta enlaces alfa (1-3) ó el beta (1-6)-glucano conteniendo aminoazúcares obtenido de *Staphylococcus epidermidis*, (Mack y col., 1996). Los polímeros más complejos pueden estar compuestos de 3 a 5 monosacáridos diferentes y unidades repetitivas de hexa-, hepta- u octasacáridos. La complejidad se incrementa con la presencia de grupos acilo en la estructura principal. Un ejemplo de una estructura compleja de exopolisacárido microbiano puede ser observada en el ácido colánico. Este exopolisacárido es secretado por muchas cepas de *Escherichia coli* y también por otras especies entéricas como *Enterobacter cloacae*, la unidad repetitiva de este polímero es un

hexasacárido compuesto de cuatro azúcares en los cuales tanto los grupos acetilo como los grupo piruvato están presentes, (Lawson y col., 1996).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Variables que afectan la formación de la biopelícula

La formación de la biopelícula generalmente se ve favorecida por la presencia de nutrientes carbohidratados en exceso. (Bryan y col., 1986). La naturaleza cualitativa del ambiente, las células y sus actividades metabólicas, pueden ser modificadas en gran parte cuando el sustrato acumulado en la biopelícula, también sirve como sustrato, suministrando al menos una porción de sus requerimientos nutricionales a los organismos en la biopelícula. (Costerton, 1987)

Las velocidades de los procesos celulares así como las secuencias de reacciones metabólicas individuales dentro de la biopelícula, son susceptibles de ser limitadas por el sustrato como un resultado de una resistencia a la transferencia de masa entre la fase líquida y la biopelícula y la resistencia a la difusión dentro de la biopelícula misma. Estas consideraciones refieren no sólo a las fuentes orgánicas de carbono y energía sino también a la fuente de nitrógeno y a los iones inorgánicos,

donde ellos pueden actuar tanto como limitantes del crecimiento como aceptores terminales de electrones, incluyendo el oxígeno para las especies aeróbicas. (Characklis, 1984)

Además, que al mismo tiempo en el que el nutriente o componente inorgánico se difunde a través del grosor de la biopelícula, éste está siendo utilizando y reducido en concentración como resultado directo de las actividades dentro de la biopelícula.

En la comunidad de la biopelícula estos efectos alcanzan su punto más crítico con el desarrollo de anaerobiosis dentro de una biopelícula aeróbica, lo cual puede derivar en un efecto de ablandamiento o el crecimiento de especies anaeróbicas tales como las bacterias sulfato reductoras. (Nielsen, 1987)

2.2 Variables en la producción de exopolisacáridos

La composición y cantidad del exopolisacárido microbiano producido esta determinada genéticamente, sin embargo es posible influenciar las dos por alteraciones de las condiciones del cultivo (Mozzi y col., 1996).

La cantidad de exopolisacárido en la biopelícula depende generalmente de la disponibilidad de sustrato de carbono y el balance entre el carbono y otros nutrientes limitantes. (Sutherland, 2001). La fuente de nitrógeno es uno de estos nutrientes limitantes, Degeest y Vuyst (1999), realizaron un estudio donde demostraron la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la cantidad y el tamaño del exopolisacárido producido por microorganismos. En este caso utilizaron una cepa de *Streptococcus thermophilus* LY03, la cual cultivaron en un medio donde la fuente de carbono fue lactosa y la fuente de nitrógeno fue un complejo de peptona y

extracto de levadura. Ellos observaron que *S. thermophilus* LY03 produjo simultáneamente dos tipos de exopolisacáridos, pero con tamaño molecular diferente; la proporción a la cual son producidos dependió fuertemente de la relación carbono/nitrógeno del medio de cultivo. También observaron que un incremento en las concentraciones iniciales de complejo de nitrógeno provoca la disminución de la masa molecular del biopolímero. (Degeest y Vuyst, 1999).

La relación entre la fuente de nitrógeno y los otros nutrientes limitantes también influye sobre la producción de polisacáridos extracelulares. En 1998, Kimmel, y colaboradores, observaron que conforme incrementaban la concentración de fuente de nitrógeno aumentaba el rendimiento, hasta llegar a un nivel donde el rendimiento permanecía igual. El microorganismo de estudio fue una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, el cual fue cultivado en un medio que tenía bacto-casitona como fuente de nitrógeno en una concentración de 10g/L, la cual incrementaron hasta 30g/L, y con esta concentración obtuvieron el mayor rendimiento alcanzado, 0.354g/L. El aumento de la concentración de fuente de nitrógeno a 40 g/L en el medio de cultivo no dio lugar a un nivel creciente de producción del exopolisacárido, este fenómeno lo atribuyeron a que los demás macronutrientes, como el potasio, magnesio, calcio, o sodio; así como los elementos traza de micronutrientes llegaron a ser ahora los nutrientes limitantes en el medio de cultivo. (Kimmel y col., 1998). Otros investigadores demostraron que el sulfato de magnesio ejerce efecto estimulante en la producción de polisacárido por cepas de *Lactococcus casei*. (Kojic y col., 1992)

La presencia o ausencia de ciertos aminoácidos y vitaminas en el medio de cultivo también influye sobre la capacidad de producción de polisacáridos extracelulares. En 1998, Grobber G.J. y colaboradores, realizaron un estudio en un medio de cultivo químicamente definido y simplificado, en el cual emplearon la técnica de omisión de un solo

componente, la cual permite una indicación clara de los nutrientes requeridos tanto para el crecimiento como para la formación de polisacáridos microbianos. Ellos observaron el efecto en estos dos parámetros con la omisión de ciertos aminoácidos y de algunas vitaminas. El microorganismo que utilizaron fue una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, el cual presentó menor crecimiento en el medio simplificado que en el medio completo, pero la cantidad de exopolisacárido producida fue perceptiblemente mayor; la producción estaba dos veces más alta que en el medio completo. (Grobben y col., 1998).

Las condiciones de crecimiento también influyen sobre la producción de polímeros. No existe un sistema de condiciones del medio que garanticen el aumento de producción de exopolisacáridos, puesto que los microorganismos difieren en la temperatura, pH y otros factores óptimos que son críticos para la producción del mismo. Numerosos estudios revelan que el microorganismo produce exopolisacáridos en situaciones de estrés, y que los valores óptimos de producción generalmente difieren a los valores óptimos de crecimiento. Sin embargo, Minervini en un estudio de producción de polímero por *Lactobacillus curvatus* encontró que las mejores condiciones de producción de polímero coinciden con las mejores condiciones de crecimiento del microorganismo. (Minervini y col., 2010)

La temperatura de incubación también es un factor importante en la producción de exopolisacáridos microbianos. Se han realizado numerosos estudios con el fin de examinar el efecto de la temperatura, todos ellos muestran una variedad de resultados, Kimmel S. A. y colaboradores (1998) refieren que la producción de polímero en una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se ve favorecida en temperaturas superiores a su temperatura óptima de crecimiento. Contrariamente el mayor número de estudios demuestran que la máxima producción del polímero se obtiene a temperaturas menores que la temperatura óptima de crecimiento, Berg D. y colaboradores (1995), lo observaron con una cepa de *Lactobacillus sake*. Ellos evaluaron los efectos de temperatura y pH, el rendimiento máximo

obtenido fue de $1.4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en condiciones anaeróbicas con temperatura de incubación 20°C y con un pH inicial de 5.8. Otros grupos de investigadores, Tallegren y colaboradores, y Wilches y colaboradores coinciden, al igual que Berg, que trabajar con el microorganismo a temperaturas menores a las óptimas para su desarrollo aumenta la producción de polisacáridos extracelulares. (Berg y col., 1995; Kimel y col., 1998; Tallegren y col., 1999; Wilches y col., 2004).

El microorganismo al desarrollarse en una temperatura menor a la temperatura óptima de crecimiento, va a crecer de manera más lenta, por lo que utiliza una cantidad menor de sustrato para su desarrollo, lo que trae consigo que haya una mayor cantidad de sustrato disponible en el medio para la formación de polisacáridos. En el caso particular de Tallegren y colaboradores, el sustrato fue sacarosa, la cual fue transformada a varios polímeros de azúcar. Ellos encontraron que la cantidad de exopolisacárido producido fue diez veces mayor que la biomasa obtenida del microorganismo. (Tallegren y col., 1999).

El pH del medio de cultivo también es un factor crítico para la formación de exopolisacáridos. Los estudios refieren que los valores cercanos a la neutralidad son los que arrojan mejores resultados para la producción del polímero en bacterias y los valores de pH alrededor de 3.5 son los que arrojan mejores resultados cuando se trabaja con hongos. (Kojic y col., 1992; Papinutti, 2010).

La viscosidad del exopolisacárido es influenciada por los componentes del medio de cultivo. En 1995, Berg y colaboradores realizaron estudios donde determinaron que el exopolisacárido producido por una cepa de *Lactobacillus sake* tenía mejores propiedades viscosantes que la goma xantana y que la viscosidad disminuía si se adicionaba al medio cloruro de sodio, efecto que atribuían a la presencia de grupos cargados negativamente presentes en el exopolisacárido. (Berg y col., 1995). En otro estudio demostró que la viscosidad del exopolisacárido se ve afectada por los

carbohidratos usados como fuente de carbono, posiblemente por la heterogeneidad en la distribución de la masa molecular del exopolisacárido. (Fukada y col., 2010)

2.3 *Enterobacter cloacae* como productor de EPS

Estudios demuestran que la fuente de carbono no afecta la composición química de la estructura del exopolisacárido producido por una misma especie microbiana, pero si influyen en la cantidad producida del mismo. (Fukada y col., 2010)

Existen varios documentos relacionados con la producción de exopolisacáridos por diferentes especies de *Enterobacter*, los cuales han mostrado que varían en su composición de azúcar, pudiendo contener glucosa, manosa, galactosa, fucosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico, entre otros. Por ejemplo, *Enterobacter aerogenes* produce un polisacárido constituido por ramnosa, galactosa y glucosa; mientras que el de *Enterobacter agglomerans* consiste en glucosa, galactosa y ácido glucurónico. En otras ocasiones la composición es la misma pero varía la proporción de los azúcares en el polímero, tal es el caso de *Enterobacter sakasaki* y *Enterobacter cloacae*. Ambos producen un polímero constituido por fucosa, glucosa, galactosa, y ácido glucurónico, el primero con una proporción de 2:2:1:0.7, mientras que el segundo se ha encontrado en tres diferentes proporciones 2:1:1:1, 2:3:2:1 y 11:4:5:4. (Nishikawa y col., 1979; Iyer y col., 2005; Shimada y col., 1997; Isobe y col., 2001; Meade y col., 1993).

En 2005, en la Facultad de Ciencias Químicas, de la UANL, Fernández, Orozco y Martínez realizaron el aislamiento de una cepa presente en una biopelícula procedente de un área industrial. A través de

pruebas bioquímicas el microorganismo fue identificado como *Enterobacter cloacae*. Este microorganismo posee la capacidad de sintetizar exopolisacáridos. *Enterobacter cloacae* produjo 0.95g/L de polímero al crecer a 35°C y 200rpm en el medio MSF-BE (Medio Sergio Fernández – Biopelículas Enterobacter). El análisis térmico del polímero demostró que el material era no termofusible. El análisis del polímero por espectroscopía de IR indicó la presencia de enlaces que pueden ser asociados a estructuras de carbohidratos enlazados unos con otros como los del tipo C-O-C (1082 cm^{-1}) y C-C (1226.76 cm^{-1}), también se encontró abundancia de grupos hidroxilo O-H (3307 cm^{-1}), que forman parte de la estructura típica de los carbohidratos.

La posición de estos grupos funcionales no puede ser determinada mediante el uso de esta herramienta analítica, sin embargo en referencia con la identificación de los principales grupos funcionales presentes en la estructura de los exopolisacáridos de origen microbiano hay una serie de similitudes con lo publicado para otros polisacáridos extracelulares producidos por microorganismos, tal es el caso de Raguene y colaboradores que estudiaron un polímero sintetizado por *Alteromonas macleodii subsp. fijiensis*, así como los grupos de investigación de Beech y Nievens que trabajaron con cepas de *Pseudomonas*, y más recientemente, los grupos de investigación de Fusconi y Liu, que estudiaron un exopolisacárido producido por *Gordonia polyisoprenivorans* y *Paenibacillus polymyxa*, respectivamente. Al igual que Fernández y colaboradores, ellos destacan la presencia de grupos correspondientes a carbonilos (C=O) presentes en enlaces tipo éster, de carboxilos C(O)-OH o de amidas C(O)-NH₂, enlaces C-O-C, radicales OH y enlaces C-C. (Raguene y col., 1996; Beech y col., 1999; Nivens y col., 2001; Fusconi y col., 2010; Liu y col., 2010).

El exopolisacárido producido por *Enterobacter cloacae* presenta un comportamiento dilatante característico de las gomas en el agua, muy similares a las de la goma guar, un polisacárido comúnmente utilizado en la industria de alimentos y que contiene unidades de glucosa y galactosa.

(Fernández y col., 2005). Otros investigadores, Meade y colaboradores, en 1994, encontraron que el polisacárido extracelular producido por *Enterobacter cloacae* es altamente viscoso, comparable al de la goma xantana y el alginato. (Meade y col., 1994). En 1997, Shimada y colaboradores, al igual que el grupo de investigadores de Meade, comparan las propiedades reológicas del exopolisacárido producido por una cepa de *Enterobacter sp.* con la goma xantana. (Shimada y col., 1997)

En el 2007, Prasertan P. y colaboradores estudiaron los factores que afectan la producción de un biopolímero por una cepa de *Enterobacter cloacae* WD7. El microorganismo produjo 4.8g/L de biopolímero al crecer a pH 7, con temperatura de 30°C y 200r.min⁻¹; en un medio donde la fuente de carbono que arrojó mejores resultados fue la sacarosa al 3%(p/v) y la concentración óptima de fuente de nitrógeno fue de 0.05%(p/v) de extracto de levadura. Ellos observaron un efecto negativo al aumentar la velocidad de agitación (200r.min⁻¹) debido a que se reducía la producción del biopolímero (Prasertan y col., 2007).

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL PROYECTO

3.1 Hipótesis

Sobre la base de los elementos expuestos anteriormente, se estableció la siguiente hipótesis:

“La producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae* se incrementa variando la composición del medio de cultivo MSF-BE.”

3.2 Objetivo general

Para el desarrollo de este trabajo se definió el siguiente objetivo general:

Incrementar la producción de 0.95g/L de exopolisacárido producido por *Enterobacter cloacae* en el medio de cultivo MSF-BE.

3.3 Objetivos específicos

Para el desarrollo de este trabajo se definieron los siguientes objetivos específicos.

- Evaluar los efectos de la variación de los componentes del medio de cultivo MSF-BE, en la producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae*.
- Evaluar los efectos de la variación de fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas del medio de cultivo MSF-BE, en la producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae*.
- Evaluar los efectos de la variación de la concentración de las fuente de carbono (maltosa) y nitrógeno del medio de cultivo MSF-BE, en la producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae*.
- Cuantificar el exopolisacárido obtenido mediante análisis gravimétrico.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y equipos

Los reactivos que se utilizaron durante el estudio fueron: maltosa (Hycel), extracto de levadura (Merk), cloruro de calcio (Merk), sulfato de magnesio (Merk), agar bacteriológico (Bioxon), caldo nutritivo (Bioxon), agar nutritivo (Bioxon), ácido 3,5-dinitrosalicílico (Aldrich), tartrato de sodio (CTR Scientific), dextrosa anhidra (Productos Químicos Monterrey S.A.), fructosa (J.T. Baker), sacarosa (J.T. Baker), hidróxido de sodio (CTR Scientific), ácido sulfúrico (Fermont), fenol (Productos Químicos Monterrey S.A.), alcohol etílico (DEQ), ácido tricloroacético (Productos Químicos Monterrey S.A.), fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker) fosfato de potasio dibásico (Productos Químicos Monterrey S.A.).

Los equipos que se utilizaron para los análisis realizados fueron: espectrofotómetro UV/Vis (Spectronic® GenesysTM5), microcentrifuga (Eppendorf 5415D), autoclave (All american), campana de flujo laminar

(Novatech), balanza analítica (AND), incubadora con agitación (Shel Lab), incubadora (Lab line 3525), estufa de vacío (Thelco), baño de agua (Polyscience), plancha con agitación (Thermoline).

4.2 Microorganismo de estudio

La cepa de *Enterobacter cloacae* se mantuvo en agar nutritivo en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La cepa fue obtenida originalmente como microorganismo predominante de una bio-película procedente de un área industrial.

El microorganismo fue activado en caldo nutritivo y después sembrado en agar nutritivo y almacenado en glicerol al 15 % en a -20°C.

4.3 Medios de cultivo experimentales

La cepa nativa de *Enterobacter cloacae* fue originalmente aislada y crecida en el medio MSF-BE. Los componentes del medio se muestran en la Tabla I.

Las partes completas y por separado del medio de cultivo MSF-BE fueron esterilizadas en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos, posteriormente enfriadas a temperatura ambiente y almacenadas en el refrigerador para ser mezcladas y aforada la mezcla a 1 litro con agua

destilada estéril en condiciones de asepsia inmediatamente antes del experimento.

Para analizar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción del polímero se utilizó como base el medio MSF-BE y el medio MSF-BE sin la parte IV, (MSF-BE2).

TABLA I

Composición del medio de cultivo MSF-BE

Componente	Concentración
Parte I	
Maltosa	0.828 moles de carbono / litro en el medio final.
Parte II	
Buffer	
KH ₂ PO ₄	0.46 g
K ₂ HPO ₄	1.55 g
Agua destilada	0.2 litros
Parte III	
Extracto de levadura	10.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.2 g
Cloruro de calcio	0.1g
Agua destilada	0.3 litros
Parte IV	
Ácido oleico	15 % v/v
Alquil Bencen Sulfonato de Sodio	15 % v/v
Trietanolamina	15 % v/v
Hidróxido de sodio (50 %)	2% v/v
Agua del Grifo	53 % v/v
	De esta parte IV se agregan 0.003 litros en 0.197 litros de agua destilada

Las fuentes de nitrógeno a ensayar en estos dos medios fueron dos de tipo orgánico: extracto de levadura y peptona de caseína; y dos de tipo inorgánico: sulfato de amonio y nitrato de sodio. Todas ellas usadas en forma individual en la proporción correspondiente que asegurara la presencia de 1 g/L de nitrógeno en el medio de cultivo: nitrato de sodio =

6.07g/L; sulfato de amonio = 4.71g/L; extracto de levadura = 10g/L; peptona de caseína = 10g/L.

4.4 Preparación del inóculo.

Los inóculos se prepararon al transferir una asada del microorganismo en 50 mL de medio MSFB-BE2 contenido en matraces Erlenmeyer de 250mL e incubando a 35°C y 120 rpm por 24 horas.

4.5 Cultivo experimentales

Después del tiempo de incubación se transfieren 2 mL del inóculo a un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 20 mL de medio a probar. Estos cultivos fueron incubados a 35°C y 120 rpm por 48 horas. Los matraces fueron monitoreados a las 24 y 48 horas.

4.6 Procedimientos para la evaluación del exopolisacárido

4.6.1 Purificación y recuperación del exopolisacárido

Para la recuperación del exopolisacárido fue necesario primero centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos para separar las células del sobrenadante. Posteriormente para asegurar la eliminación de las proteínas presentes en el caldo de cultivo, se desproteinizaron las muestras. Los caldos de fermentación fueron adicionados con 1mL de ácido tricloroacético concentrado por cada 100mL de caldo, y el precipitado formado fue eliminado por centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos.

Una vez eliminada la proteína, el polisacárido fue recuperado del sobrenadante mediante la adición de tres volúmenes de etanol (99,5%) (v/v) frío (4° C).

El polisacárido fue redissuelto en agua destilada para luego proceder a una diálisis contra agua corriente durante 24 horas para su purificación final. Para la diálisis se utilizaron tiras de membranas Spectra/Por® 1 de 50mm.

4.6.2 Cuantificación del biopolímero

El polímero purificado fue cuantificado mediante análisis gravimétrico, secando al vacío en una estufa (Thelco) (0.1 mm Hg) por 24 horas a 50 °C hasta obtener peso constante.

4.7 Determinación de consumo de carbohidratos

4.7.1 Determinación de azúcares reductores

Para cuantificar el consumo de azúcares a lo largo del proceso de fermentación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos para separar las células del sobrenadante. Posteriormente las muestras fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético.

Los azúcares reductores se determinaron en el sobrenadante desproteinizado por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959).

En un tubo de 13x100 se colocaron 0.4mL de cada muestra a analizar y se le añadieron 0.4mL del reactivo 3,5-dinitrosalicílico, los tubos con la mezcla se calentaron a ebullición dejando reaccionar durante 5 minutos e inmediatamente después se pasaron a un baño de hielo, ahí mismo se llevaron a 2 mL con agua destilada fría y se agitaron. Finalmente las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro (Spectronic® GenesysTM5). Un blanco fue preparado sustituyendo la muestra por 0.4mL de agua destilada.

Para determinar la concentración de azúcares reductores a través de los datos de absorbancia de las muestras, se preparó una curva estándar utilizando soluciones de maltosa en un intervalo de concentración de 0.001 a 0.003M. (Apéndice A).

Todas las muestras así como la curva estándar de calibración se realizaron por triplicado.

La preparación del reactivo 3,5-dinitrosalicílico utilizado en esta técnica, consistió en suspender 150g de tartrato de sodio y potasio en 250mL de agua destilada (en baño de agua), por otro lado se suspendieron 5g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 100mL de una solución de hidróxido de sodio 2N hasta disolución completa. Se mezclaron las dos soluciones y se aforó a 500mL con agua destilada.

4.8 Diseño de experimentos para evaluar la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno

Después de seleccionar las fuentes de nitrógeno que arrojaron mayor producción de exopolisacárido, se realizaron dos diseños de experimentos para evaluar el efecto de la variación de las concentraciones de fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre la capacidad de producción del polímero en el medio MSF-BE2.

Se propusieron dos diseños de experimentos del tipo factorial 2^2 ; dos variables a dos niveles de concentración. Las variables fueron la fuente de carbono y fuente de nitrógeno. En el primer diseño de experimentos se analizó la relación maltosa con extracto de levadura mientras que en el segundo se analizó maltosa con peptona de caseína.

En ambos diseños, los dos niveles de concentración que se manejaron fueron: mayor (+1) y menor (-1), para la fuente de carbono, maltosa, el nivel mayor (+1) correspondió a una concentración de 25g/L y el nivel menor (-1) a 15g/L. Para la fuente de nitrógeno, el nivel mayor (+1)

correspondía a 20 g/L y el menor (-1) a 10g/L. Las concentraciones en g/L se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno en el diseño de experimentos.

Variables	Niveles	
	-1	+1
Fuente de C (g/L)	15	25
Fuente de N (g/L)	10	20

La combinación de las concentraciones de fuente de carbono y fuente de nitrógeno en los cuatro experimentos de cada diseño experimental se muestra en la Tabla III.

TABLA III

Combinación de las concentraciones del diseño de experimentos 2².

Experimentos	1°	2°
1	-1 (15g/L)	-1 (10 g/L)
2	+1 (25 g/L)	-1(10 g/L)
3	-1 (15 g/L)	+1(20 g/L)
4	+1 (25 g/L)	+1(20 g/L)

4.9 Análisis estadístico

Los experimentos de cultivo de microorganismos fueron realizados por triplicado (n =3). La toma de muestras para análisis se realizó a tiempos preestablecidos, en forma aleatoria y sin reemplazo. Las muestras fueron definidas como un matraz para cada tiempo de muestreo por condición

experimental. Los matraces retirados se utilizaron para la ejecución de procesos analíticos.

4.10 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos en contenedores específicos de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Residuos Peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Aquellos residuos que estuvieron en contacto con células microbianas se esterilizaron antes de su disposición.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Recuperación de la cepa de *Enterobacter cloacae*.

La recuperación del microorganismo fue difícil, debido a que la cepa tenía mucho tiempo de almacén. Primero se hizo crecer en caldo nutritivo y posteriormente se mantuvo en agar nutritivo. En su apariencia macroscópica, *Enterobacter cloacae* muestra colonias de bordes redondeados, de elevación convexa, de color amarillo claro, translúcidas y de aspecto viscoso. Figura 3.



Figura 3. Aspecto macroscópico de las colonias de *Enterobacter cloacae* en agar nutritivo.

5.2 Medio de cultivo experimental

En la primera parte experimental se tuvieron dificultades para producir el exopolisacárido en el medio MSF-BE. Se preparó el inóculo y del primer bloque de experimentos, no se obtuvo producción de exopolisacárido, no había precipitación de este.

Para conocer la causa del porqué no se obtenía el producto se evaluó primero el crecimiento del microorganismo en el medio, en esta prueba no fue posible utilizar el método de turbidimetría debido a que el medio MSF-BE es opaco. La opacidad es generada al añadir el componente IV del medio de cultivo correspondiente una mezcla de ácidos orgánicos.

Como no se pudo evaluar el crecimiento por densidad óptica se evaluó el consumo de azúcares en el medio midiendo azúcares reductores, durante 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

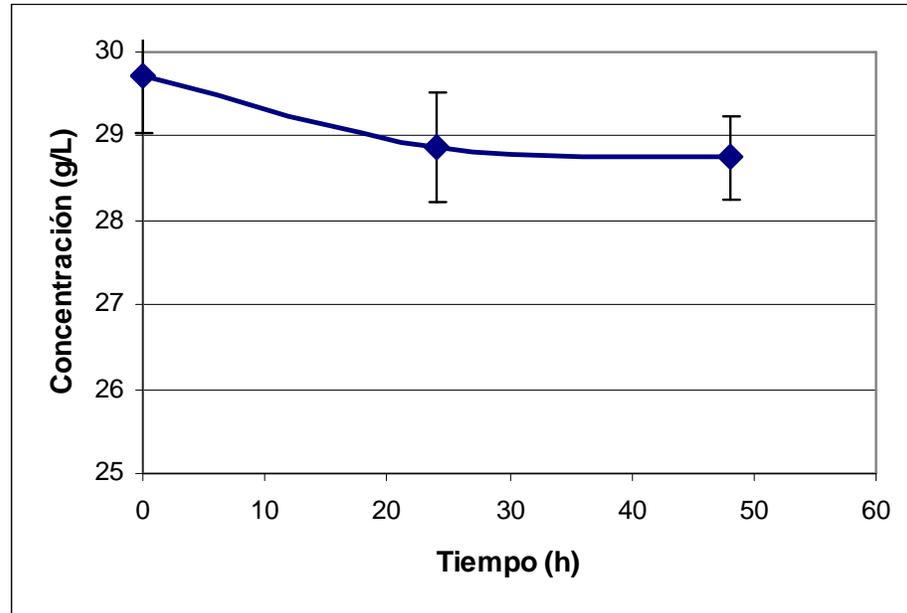


Figura 4. Curva de consumo de azúcares reductores por *Enterobacter cloacae* en el medio MSF-BE.

Se puede observar que durante el tiempo de fermentación que fueron 48 horas, el microorganismo utilizó solo una pequeña proporción de los azúcares y se reporta 1 g/L de carbohidrato consumido.

La primera premisa fue que el microorganismo había perdido la capacidad de desdoblar la maltosa y poder consumirla, por lo que se probó el crecimiento en MSF-BE agarizado, utilizando diferentes fuentes de carbono, monosacáridos y disacáridos, como: maltosa, sacarosa, fructosa y glucosa, y sembró por estría, incubando 24 horas a 35°C. En estas placas se observó crecimiento de pocas colonias en la primera línea de la estría, en las cuatro fuentes de carbono y no se observó diferencia entre los carbohidratos, por lo que se siguió trabajando con maltosa.

Lo siguiente en evaluar fue la parte IV del medio de cultivo MSF-BE, debido a que era lo que proporcionaba la opacidad del medio, para observar

sí esto tenía algún efecto sobre el crecimiento del microorganismo y producción del exopolisacárido.

Se realizó una evaluación de consumo de carbohidrato con el medio MSF-BE sin la parte IV del medio de cultivo. Para este análisis se determinaron azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller 1959), durante 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.

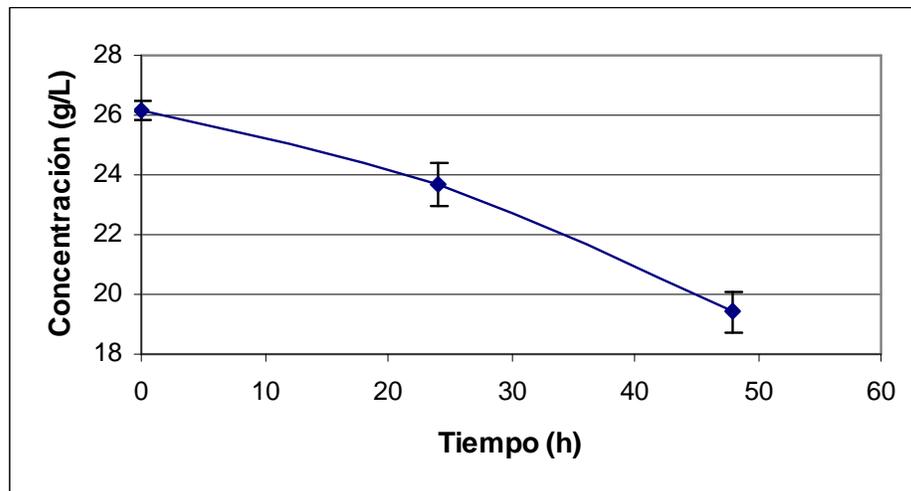


Figura 5. Curva de consumo de azúcares reductores por *Enterobacter cloacae* en el medio MSF-BE 2.

En la figuras 5 se observa que durante 48 horas de fermentación, el microorganismo utilizó mayor cantidad de azúcares con el medio MSF-BE sin la parte IV del medio que con el medio MSF-BE completo. Por tal razón se evaluó el crecimiento de la cepa en ambos medios de cultivo.

Se preparó el inóculo correspondiente para cada uno de los medios de cultivo, y posteriormente se llevó a cabo una fermentación durante 24 horas, a 35°C y 120 rpm. Al término de este tiempo, se sembró en una serie de tres cajas petri, las cuales contenían MSF-BE agarizado, MSF-BE sin la parte IV agarizado y agar nutritivo, como se muestra en el esquema de las Figuras 6 y 7. Las cajas fueron sembradas por dispersión en superficie e incubadas 24 horas a 35°C.

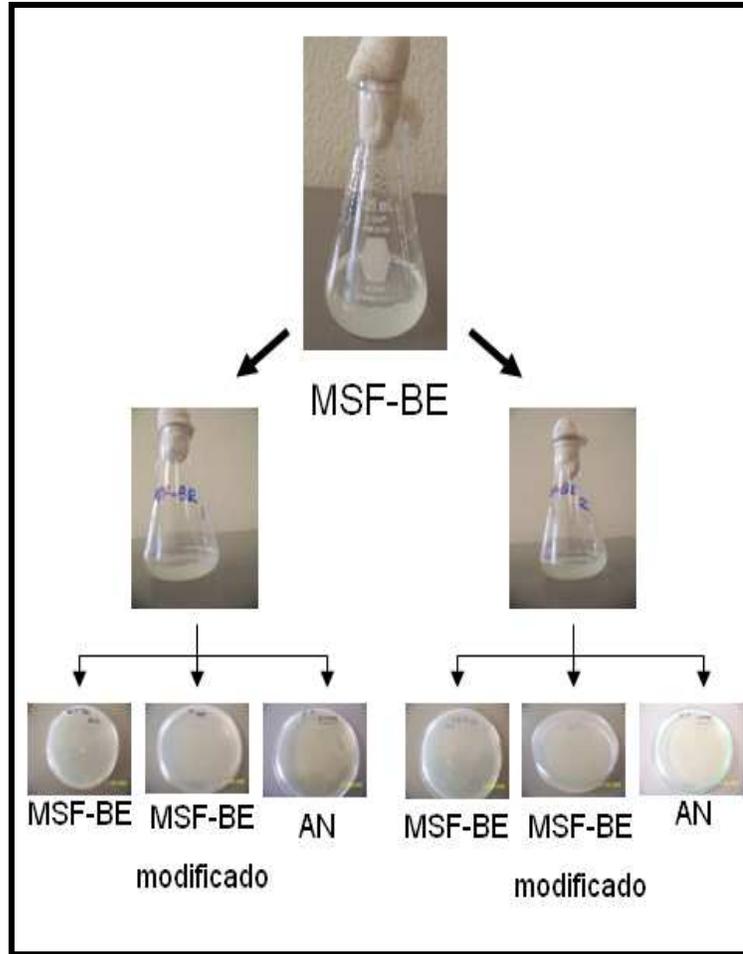


Figura 6. Esquema de fermentación y siembra a partir del medio MSF-BE

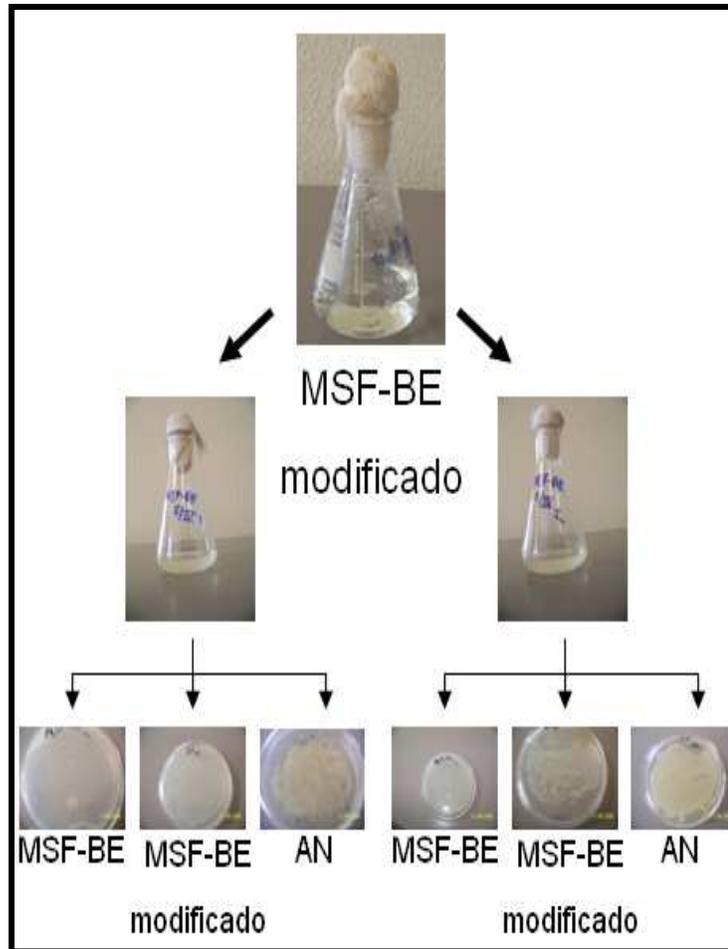


Figura 7. Esquema de fermentación y siembra a partir del medio MSF-BE modificado.

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos a partir de la fermentación en el medio MSF-BE. Se observa que no hay crecimiento en las cajas petri de los medios MSF-BE agarizado, MSF-BE sin la parte IV del medio agarizado ni en las de agar nutritivo.

En la Figura 9 se observan los resultados de la misma serie de cajas sembradas pero a partir del medio MSF-BE sin la parte IV, en las cuales se aprecia que si hay crecimiento en los medios MSF-BE sin la parte IV y en agar nutritivo pero no en el MSF-BE agarizado.

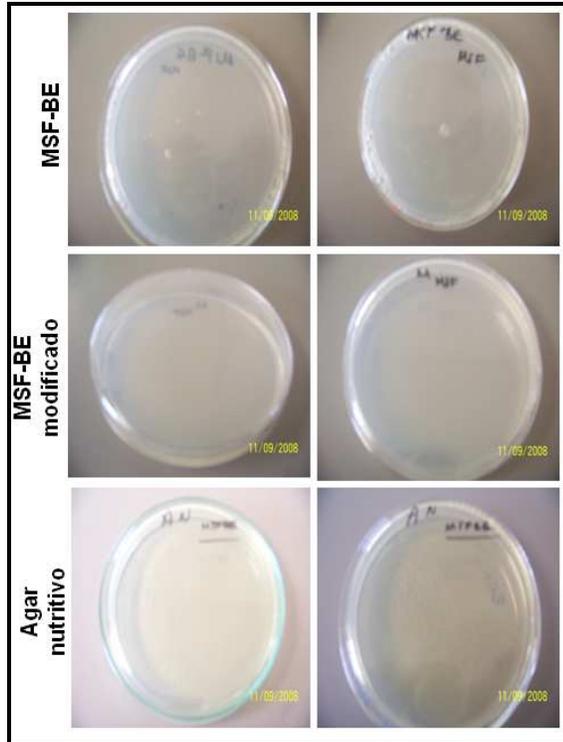


Figura 8. Placas de agar sembradas a partir del medio MSF-BE.

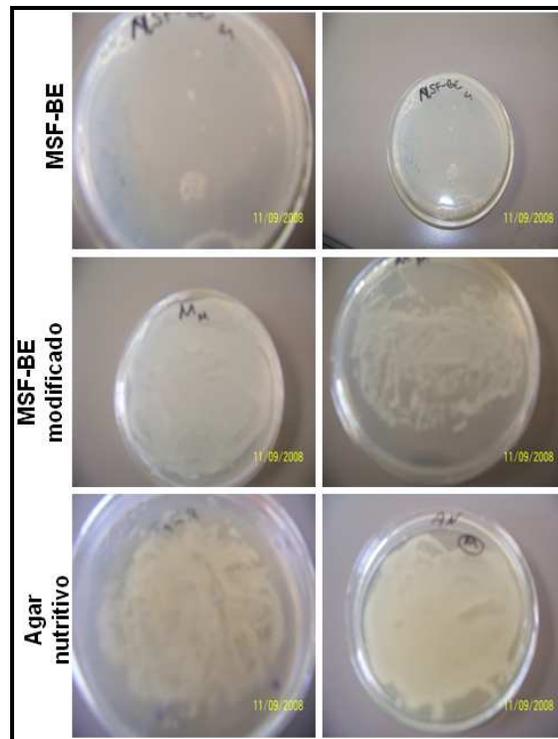


Figura 9. Placas de agar sembradas a partir del medio MSF-BE sin la parte IV.

Después de analizar estos resultados, la primera modificación del medio de cultivo MSF-BE que se realizó fue eliminar la parte IV, la correspondiente a los ácidos orgánicos. La composición del medio de cultivo MSF-BE2 se muestra en la Tabla IV.

TABLA IV
Composición del medio MSF-BE2

Componente	Concentración
Parte I	
Maltosa	0.828 moles de carbono / litro en el medio final.
Parte II	
Buffer	
KH ₂ PO ₄	0.46 g
K ₂ HPO ₄	1.55 g
Agua destilada	0.2 litros
Parte III	
Extracto de levadura	10.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.2 g
Cloruro de calcio	0.1g
Agua destilada	0.3 litros

Con el medio MSF-BE2 se llevó acabo la siguiente parte experimental.

5.3 Efectos de la variación de la fuente de nitrógeno del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por una cepa de *Enterobacter cloacae*

Los resultados obtenidos para esta condición experimental, de la variación de la fuente de nitrógeno en 24 y 48 horas en el medio de cultivo MSF-BE2 se muestran en las Figuras 17 y 18, respectivamente, en la cuales se observa que con las fuentes de nitrógeno orgánicas, extracto de levadura y peptona de caseína, se obtiene una mayor producción de exopolisacárido en comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánico, sulfato de amonio y nitrito de sodio. También se observó que no hay diferencia en cuanto a producto obtenido durante las primeras 24 y 48 horas de experimentación.

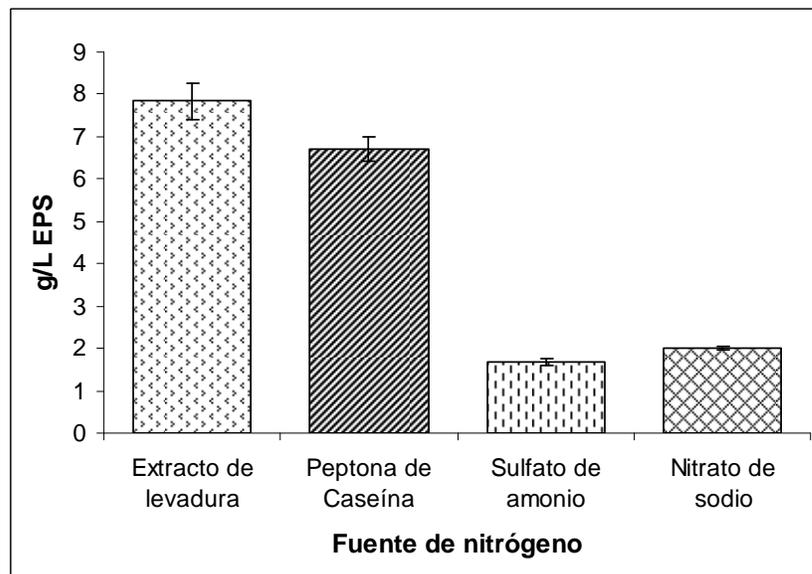


Figura 10. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno durante 24 horas.

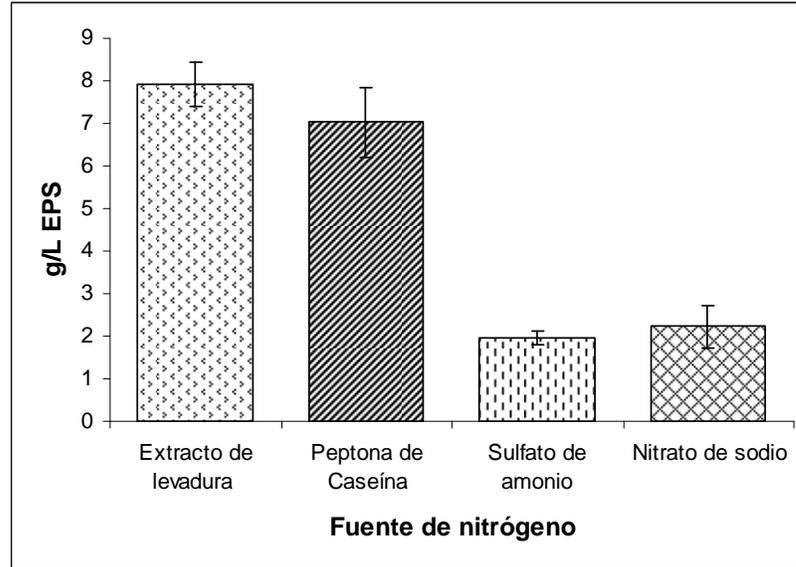


Figura 11. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno durante 48 horas.

Si se compara la producción de exopolisacárido utilizando las diferentes fuentes de nitrógeno a evaluar en el medio MSF-BE2, Tabla V, se observa que existe una diferencia de tres veces el valor obtenido con una fuente de nitrógeno orgánica que con una fuente de nitrógeno inorgánica.

Tabla V

Producción de EPS con el medio MSF-BE2 con diferentes fuentes de nitrógeno.

MSF-BE2	
Fuente de N	EPS g/L
Extracto de Levadura	7.85
Peptona de Caseína	6.72
Sulfato de amonio	1.67
Nitrato de sodio	2.0

Las fuentes de nitrógeno utilizadas en el medio MSF-BE2 que mostraron mejores resultados fueron las orgánicas, extracto de levadura y peptona de caseína. Además se determinó que la producción de exopolisacárido por la cepa de estudio se realizó en las primeras 24 horas de experimentación. Por lo tanto **y en base a lo anterior, se tomó la decisión de evaluar para** la siguiente parte experimental, el efecto de la variación de las concentraciones de fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre la capacidad de producción de exopolisacárido por *Enterobacter cloacae* utilizando el medio MSF-BE2 solamente con las fuentes de nitrógeno orgánicas, extracto de levadura y peptona de caseína, y durante las primeras 24 horas de experimentación.

Para evaluar tal efecto se realizaron dos diseños de experimentos factoriales 2^2 . (Ver sección 4.8)

5.4 Efectos de la variación de la concentración de la fuente de carbono (maltosa) y la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por *Enterobacter cloacae*

Los resultados obtenidos para esta condición experimental se muestran en la Figura 12. El experimento donde se obtuvo mayor producción de exopolisacárido fue el 4, donde tanto la variable 1, la fuente de carbono, como la variable 2, la fuente de nitrógeno, se encuentra en su nivel mayor correspondiente, 25g/L y 20g/L, respectivamente. El producto obtenido fue de 16.51g/L, que es dos veces más que el obtenido con las concentraciones originales del medio. La cantidad de producto obtenido anterior fue de 7.85g/L.

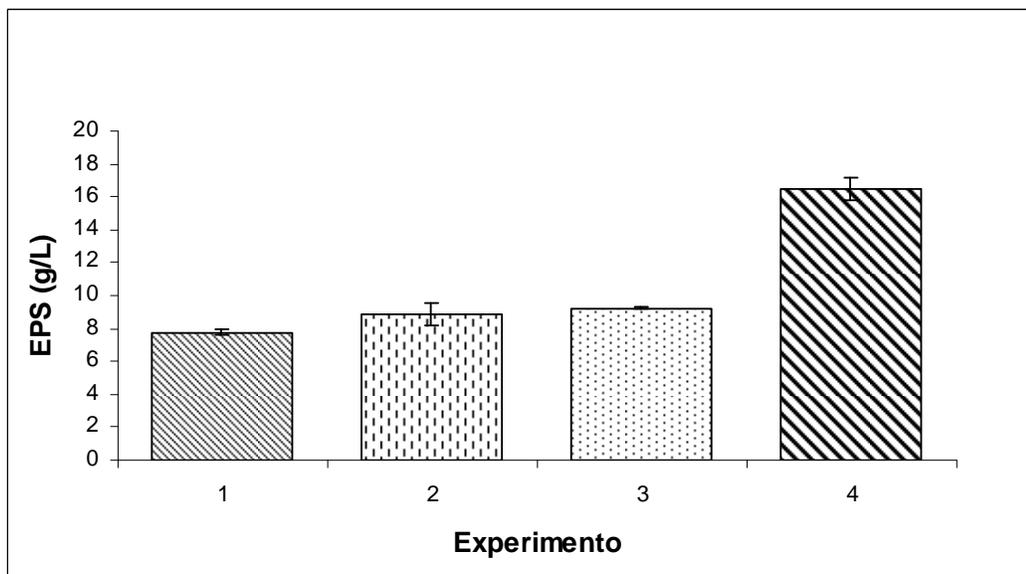


Figura 12. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 usando extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

5.5 Efectos de la variación de la concentración de la fuente de carbono (maltosa) y la fuente de nitrógeno (peptona de caseína) del medio MSF-BE2 sobre la capacidad de producción de EPS por *Enterobacter cloacae*

Los resultados obtenidos para esta condición experimental se muestran en la Figura 13. El experimento donde se obtuvo mayor producción de exopolisacárido fue el 3, donde la variable 1, la fuente de carbono, está en un nivel menor que corresponde a 15g/L y la variable 2, la fuente de nitrógeno, se encuentra en un nivel mayor, correspondiente a 20g/L. El producto obtenido es de 11.53g/L, más del 70% del obtenido con las concentraciones originales del medio. La cantidad de producto obtenido anterior fue de 6.72g/L.

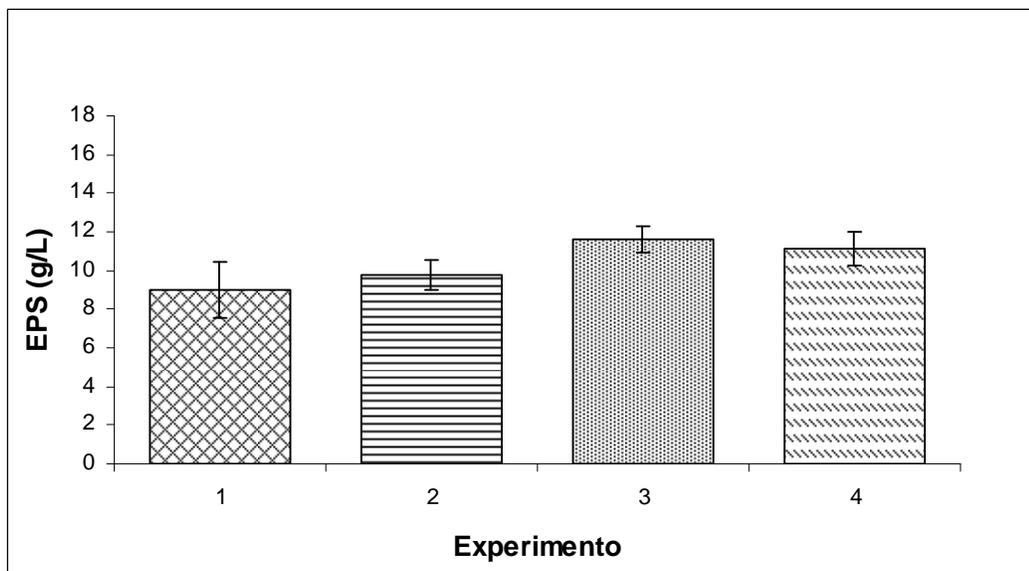


Figura 13. Gráfica de producción de exopolisacárido (EPS) en g/L en el medio MSF-BE2 con peptona de caseína.

Sin embargo, la desviación estándar del experimento 4 indica que entre los resultados obtenidos bajo esta condición experimental y los obtenidos con el experimento 3, no existen diferencias significativas.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El medio de cultivo MSF-BE original, fue pensado en función de simular en el laboratorio las características nutricionales disponibles en el micro ecosistema, la biopelícula, de dónde fue aislada inicialmente la cepa de estudio. [La parte IV del medio de cultivo contiene ingredientes que facilitaron inicialmente la formación de la biopelícula, gracias a la adhesión de estos materiales a la superficie y sus características de hidrofobicidad. \(Fernández, 2004\).](#)

La diferencia de producción del exopolisacárido actual, con la presencia y ausencia de la parte IV del medio de cultivo MSF-BE, es decir, medio de cultivo MSF-BE y MSF-BE2, por *Enterobacter cloacae*, se atribuye al tiempo y al método de conservación de la cepa, la cual fue mantenida desde el 2004 en agar nutritivo, medio básico de nutrientes donde el microorganismo ya no tiene la necesidad de producir una biopelícula bajo las mismas condiciones de las cuales fue aislado. El microorganismo al crecer bajo condiciones nutricionales y ambientales favorables, perdió la capacidad de crecer y de requerir los productos antes mencionados del medio de cultivo MSF-BE.

El nitrógeno es un componente esencial de proteínas y ácidos nucleicos y la deficiencia de éste perjudica al crecimiento y producción de metabolitos microbiano. En términos de crecimiento del microorganismo, las fuentes de nitrógeno orgánicas proporcionan mayor biomasa celular en

comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánicas. Las razones del porque sucede este fenómeno no son muy claras, frecuentemente se atribuye a que el nitrógeno que se encuentra en el nitrato de sodio y en el sulfato de amonio, las fuentes de nitrógeno inorgánicas utilizadas en este estudio, está más oxidado que el que está presente en las fuentes de nitrógeno orgánicas y que el trabajo metabólico requerido para ponerlo en el estado de reducción adecuado para ser incorporado al metabolismo es mayor que el requerido para las otras fuentes. Además que las fuentes orgánicas de nitrógeno proveen de requerimientos celulares como aminoácidos y vitaminas, y en ocasiones hasta una fuente extra de carbono.

Sin embargo la influencia del tipo de fuente de nitrógeno en la producción de exopolisacáridos por microorganismos, no siempre tiene el mismo comportamiento como el que se observa en el crecimiento. Existen algunos reportes donde la mayor producción de exopolisacárido se obtiene al utilizar una fuente de nitrógeno inorgánica, y otros donde en el medio existe una combinación de ambas. Un grupo de investigadores reportó un rendimiento de 43g/L de exopolisacárido producido por *Cordyceps taii* en un medio que contenía como fuente de nitrógeno sulfato de amonio pero adicionaron licor de soya y un mínimo de vitaminas. (Lim y col., 2004; Kim y col., 2003; Xiao y col., 2010).

La formación del exopolisacárido, en contraste con los reportes mencionados con anterioridad, se incremento con la utilización de las fuentes orgánicas de nitrógeno. En los experimentos para observar el efecto de la variación de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo MSF-BE2 sobre la producción de exopolisacárido se presentan resultados que demuestran que con las fuentes de nitrógeno orgánicas, extracto de levadura y peptona de caseína, se obtiene una mayor producción de exopolisacárido en comparación con las fuentes de nitrógeno inorgánico, sulfato de amonio y nitrito de sodio. Estudios similares han sido reportados. (Degeest y Vuyst, 1999; Minervini y col., 2010; Liu y col., 2010; Meng y col., 2010; Papinutti, 2010)

Estudios demuestran que la fuente de carbono no afecta la composición química de la estructura de un exopolisacárido producido por la misma especie microbiana, pero si influyen en la cantidad producida del mismo. (Fukada y col., 2010). En los experimentos del diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto de la variación de las concentraciones de fuente carbono y fuente de nitrógeno del medio de cultivo MSF-BE2 sobre la producción de exopolisacárido se presentaron resultados que demuestran que se obtiene mayor producción de exopolisacárido con la modificación de las concentraciones en el diseño, que con el obtenido con las concentraciones del medio original.

Se demostró, al igual que Papinutti en su estudio con *Ganoderma lucidum*, que teniendo una mayor concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, se obtiene una mayor producción de exopolisacárido y que el nitrógeno al igual que el carbono es uno de los nutrientes fundamentales en la formación del exopolisacárido producido como parte de la biopelícula por *Enterobacter cloacae*. (Papinutti, 2010)

Lo anterior puede confrontarse con la literatura que indica que la cantidad de exopolisacárido en la biopelícula depende generalmente de la disponibilidad de sustrato de carbono y el balance entre el carbono y los otros nutrientes limitantes. (Sutherland, 2001; Xiao y col., 2010)

El extracto de levadura es la fuente de nitrógeno orgánica que mostró mejores resultados, se obtuvo 16.51g/L, el doble de producto que con las concentraciones iniciales del medio. La mayor producción de exopolisacáridos microbianos en presencia de extracto de levadura ha sido reportada por otros autores. Mivervini y colaboradores obtuvieron 29.23g/L de EPS, utilizando una cepa de *Lactobacillus curvatus*; Liu y colaboradores obtuvieron 35.26g/L de EPS utilizando una cepa de *Paenibacillus polymyxa*; y el grupo de investigadores de Meng optimizaron un medio de cultivo para la producción de EPS por *Morchella esculenta* donde la fuente de nitrógeno

seleccionada por la mayor producción obtenida, fue el extracto de levadura. (Minervini y col., 2010; Liu y col., 2010; Meng y col., 2010).

Entre las dos fuentes de carbono orgánicas, la diferencia de producción del exopolisacárido se debe a que la peptona contiene solamente proteínas, péptidos y aminoácidos, que además de ser utilizados como fuentes de nitrógeno pueden también ser utilizadas como fuentes de carbono, mientras que el extracto de levadura contiene vitaminas además de lo mencionado, proteínas, péptidos y aminoácidos. La presencia de estas vitaminas ofrece ventajas nutricionales y factores de crecimiento que pueden resultar en mejores actividades enzimáticas para el microorganismo; dando como resultado la mayor producción del exopolisacárido.

Lo anterior es soportado por los resultados mostrados con *Streptococcus thermophilus* LY03 en donde, el proceso de acumulación de exopolisacáridos, la cantidad y el tamaño de éstos están fuertemente influenciado por la fuente de nitrógeno del medio. (Degeest y Vuyst, 1999).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

La producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* se incrementa positivamente por la variación de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MSF-BE2.

Las fuentes de nitrógeno orgánicas (extracto de levadura y peptona de caseína) proporcionaron mayores incrementos de EPS que las fuentes de carbono inorgánicas (nitrato de sodio y sulfato de amonio).

La producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* es afectada por la variación de las concentraciones de la fuente de carbono (maltosa) y nitrógeno del medio de cultivo MSF-BE2; siendo las concentraciones altas las que proporcionan mejores resultados.

La mayor producción de exopolisacárido (EPS) por *Enterobacter cloacae* fue de 16.51g/L, valor dos veces más alto que el producido con las concentraciones iniciales del medio. Las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno que proporcionan este resultado fueron maltosa 25g/L y extracto de levadura 20g/L.

RECOMENDACIONES

El trabajo aquí presentado da pié para la realización de proyectos de investigación que completen el entendimiento del fenómeno de producción de exopolisacáridos producidos por *Enterobacter cloacae*.

- Caracterizar las propiedades físicas y químicas del exopolisacárido producido por *Enterobacter cloacae*.
- Determinar la composición y proporción de los azúcares presentes en el exopolisacárido obtenido, por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Elucidar la estructura del exopolisacárido para conocer y entender sus propiedades físicas y químicas.
- La optimización del proceso para la producción de exopolisacáridos por *Enterobacter cloacae* a nivel “Mesa Banco”, para indagar los posibles usos de los mismos en el nivel comercial.

REFERENCIAS

1. **Abbasi A. y Amiri S., 2008.** Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. ***African Journal Biotechnology*. 7(10)** pp.1574-1576.
2. **Allison D. G. 1998.** Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. ***Biofilm Journal*. 3(1): 76-88.**
3. **Bagge D., Hjelm M., Johansen Ch., Huber I., Gram L. 2001.** *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. ***Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 2319-2325.**
4. **Beech I., Hanjagait L., Kalahi M., Neal A., Zinkevich V. 1999.** Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. ***Microbiology*. 145: 1491 – 1497.**
5. **Berg D., Robijn G., Janssen A., y col., 1995.** Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. ***Appl. Environ. Microbiol.* 61(8): 2840-2844.**
6. **Betancourt M., Botero J. E. y Rivera S. P., 2004.** Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. ***Colomb Med.* 35 (Supl 1): 34-39.**
7. **Bryan B., Linhardt R., Daniels L. 1986.** Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. ***Applied and Environmental Microbiology*. 51(6): 1304-1308.**

8. **Carniol K. and Gilmore M. S., 2004.** Signal transduction, quorum sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. ***Journal of Bacteriology*.186 (24):** 8161-8163.
9. **Characklis W.G. 1984.** Biofilm development: a process analysis. In: microbial adhesion and aggregation, Ed. K.C. Marshall, pp 137-157. Dahlem Konferenzen. Berlin: Springer.
10. **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J., Lad T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. 1987.** Bacterial biofilms in Nature and disease. ***Annu Rev. Microbiol.* 41:** 435 - 464.
11. **Costerton J.W., Lewandowski D., deBeer D., Caldwell D., Korber D. and James G. 1994.** Biofilms. The customized microniche. ***J. Bacteriol.* 176:** 2137-2142.
12. **Costerton J.W., Stewart P.S., and Greenberg E.P. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. ***Science.* 284:** 1318-1322.
13. **Cunliffe D., Smart C.A., Alexander C. and Vulfson E.N. 1999.** Bacterial adhesion at synthetic surfaces, ***Appl. Environ. Microbiol.* 65(11):** 4995-5002.
14. **Dalton H.M., Goodman A.E., Marshall K.C. 1996.** Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria. ***J. Ind. Microbiol.* 17:**228-234.
15. **Degeest, B. and Vuyst L. 1999.** Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. ***Appl. Environ. Microbiol.* 65(7):** 2863 - 2870.
16. **Diemond J., and Miranda G. 2007.** Biofil: latent threat or protective factor? State of art. ***Enf. Inf. Microbiol.* 27(1)** 22-28.

17. **Dubois, M., K.A. Guilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956.** Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. ***Anal. Chem.* 28:350-356**

18. **Fernández S. 2004.** Acumulación "in vitro" de exopolisacáridos por una cepa nativa de *Enterobacter cloacae*. Efecto de factores ambientales y nutricionales. **Tesis doctoral. UH.**

19. **Fernández S., Orozco C. y Martínez J., 2005,** Caracterización parcial de los polisacáridos excretados por una cepa nativa de *Enterobacter cloacae*, ***Revista biología.* 19: 72-77.**

20. **Fukuda K., Tala S., Kentaro N., Fiamé L., Tadashi N., Kumi Y., Akitsugu S., Hidemasa M., Tadasu U. 2010.** Effects of carbohydrate source on physicochemical fermentum TDS030603 in a chemically defined medium. ***Carbohydrate Polymers.* 79: 1040-1045.**

21. **Fuller R.C. 1990.** *Bacterial polyester: past, present and future.* ***Novel biodegradable microbial polymers.*** Kluwer Academic Pub: 19-21.

22. **Fusconi R., Nascimento R., Guimarañes R., Rodrigues G., da Hora A. 2010.** Exopolysaccharides produced by *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 in GYM commercial médium: FT-IR study and emulsifying activity. ***Carbohydrate polymers.* 79: 403-408.**

23. **Gibello, A., Ferrer E., Sanz J. , Martin M. 1995.** Polymer production by *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenil acetic acid hydrolase genes cloned in *Escherichia coli*. ***Appl. Environ. Microbiol.* 61(12): 4167- 4171.**

24. **Grobben G.J., Chin-Joe I., Kitzen V.A., Boels I.C., Boer F., Sikkema, J., Smith M.R., and Bont, J.A.M., 1998** Enhancement of expolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium, ***Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1333-1337.**

25. **Heydorn A., Nielsen A.T. Hentzer M., Sternberg C., Givskov M. 2000.** Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology. 146:**2395-2407.
26. **Hocking P.J. and Marchessault R.H. 1994** *Chemistry and technology of biodegradable polymers*. Blackie academic and professional an imprint Griffin, Chapman. and. Hall, London. 48-91
27. **Hughes K.A., Sutherland I.W., Jones M.V. 1988.** The function of biofilm exopolysaccharides production following exposure to antimicrobial agents and enhanced desiccation resistance. **Microbiol. 144:** 3039-3047.
28. **Isobe Y., Matsumoto Y., Yokoigawa K. y Kawai H., 2001,** Properties of an extracellular polysaccharide produced by a strain of *Enterobacter* isolated from pond water. **Biosci. Biotechno. Biochem. 65 (6):** 1399-1401.
29. **Iyer, A., Mody K. and Jhe B. 2005.** Characterization of an exopolysaccharide produced by marine *Enterobacter cloacae*. **Indian journal of experimental biology. 43(5):**467-471.
30. **Jin M., Wang Y., Xu C., Lu Z., Huang M. 2010.** Preparation and biological activities of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* Z0206. **Carbohydrates Polymers**. En prensa.
31. **Kim S., Hwang H., Xu C., Sung J., Choi J., Yun J. 2003.** Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C7338. **J. Appl. Microbiol. 94:** 120-126
32. **Kimmel S.A., Robert F.R. and Ziegler G.R., 1998.** Optimization of exopolisaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in semidefined media. **Appl. Environ. Microbiol. 64(2):** 659-664.

33. **Kojic M., Vujcic M., Banina A. 1992.** Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from Cheese. ***Applied and Environmental Microbiology*. 58 (12):** 4086-4088.
34. **Lasa I., del Pozo, J. L., Penadés J. R., Leiva J., 2005.** Biofilms bacterianos e infección. ***Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 28 (2):** 163-175
35. **Lawson C.J., Mc Leary C.W., Nakada H.I. , Rees D.A., Sutherland I.W., Wilkinson J.F., 1996,** Structural studies of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and based catalizing fragmentation. ***J. Biochem*. 115:** 947-958.
36. **Lewandowski Z., Altobelli S.A., and Fukushima E. 1993.**NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and Kinetics on biofilms. ***Biotecnol. Prog.* 9:** 40-45
37. **Lim J., Kim S., Hwang J., Joo J., Kim H., Choi J., Yun J. 2004.** Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mycelial culture and exopolisaccharide production in *Collybia maculate*. ***Appl. Biochem. Biotechnol*. 119:** 159-70.
38. **Linton J.D. 1990.** *Physiology of exopolysaccharide production*. **Novel biodegradable microbial polymers:** 311-330
39. **Liu J., Luo J., Ye H., Sun Y., Lu Z., Zeng X. 2010.** Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. ***Carbohydrates Polymers*. 79:** 206-213.
40. **Luhman D., 1990.** *Structural diversity and functional versatility of polysaccharides*. **Novel biodegradable microbial polymers. :** 61-67
41. **Mack D., Fisher W., Krokotch A. Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R. 1996.** The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. ***J. Bacteriol*. 178:** 175-183

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

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

44. **Meade M. J., Nakas J.P., and Tanenbaum S.W. 1993,** Highly viscous polysaccharide produced by an *Enterobacter* isolated on a hemicellulose hydrolysate. ***Biotechnol*, 15: 389-392.**

45. **Meade M. J., Tanenbaum S.W. and Nakas J.P., 1994,** Optimization of novel extracellular polysaccharide production by an *Enterobacter sp.* On wood hydrolysates. ***Appl. Environ. Microbiol.* 60(4): 1367-1369.**

46. **Meng F., Liu X., Jia L., Song Z., Deng P., Fan K. 2010.** Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities *in vitro*. ***Carbohydrate Polymers*. 79: 700-704**

47. **Mikkelson H., Duck Z., Lilley K. S. and Welch M., 2007,** Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. ***Journal of Bacteriology*.189 (6): 2411-2416.**

48. **Miller G.L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. ***Anal. Chem.* 31: 426-428.**

49. **Minervini F., De Angelis M., Surico R., Di Cagno R., Gänzle M., Gobetti M. 2010.** Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA 10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. ***International Journal of Food Microbiology*. En prensa.**

50. **Mozzi F., De Glori G., Oliver G. 1996.** Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. ***Biotechnology Letters*. 18(4): 435-439.**
51. **Murray R., Granner D., Mayes P., Rodwell V. 1994.** *Bioquímica de Harper*. Edición 13. Editorial manual moderno. 162-168.
52. **Nielsen P.H. 1987.** Biofilm Dynamics and kinetics during high-rate sulfate reduction under anaerobic conditions. ***Appl. Environ. Microbiol.* 53:27-32.**
53. **Nishikawa, K., Oi S. and Yamamoto, T., 1979.** Induced production of acidic polysaccharide by benzalkonium chloride in a bacterium and some properties of the cidic polysaccharide produced. ***Agric. Biol. Chem.*, 43, 2305-2310.**
54. **Nivens D., Ohman D., Williams J., Franklin M., 2001.** Role of alginato and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. ***J. Bacteriol.* 183:1047-1057.**
55. **Papinutti L. 2010.** Effects of nutrients, pH and water potencial on exopolysaccharides prodction by a fangal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. ***Bioresource Technology.* 101: 1941-1946.**
56. **Parada J. L., Chanona J., Téllez D., Gutierrez G. y García M. 2006.** Aislamiento de exopolisacárido de *Lactobacillus bulgaricus*, su caracterización morfoestructural usando análisis fractal. **Libros Visión alimentos, tomo III, IPN. 331-335.**
57. **Pérez M., Guereca L. 1996.** Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. ***Appl Microbiol Biotechnol.* 44: 367-371.**

58. Poli A., Kazak H., Gürleyendag B., Tommomaro G., Pieretti G., Toksoy E., Nocolaus B. 2009. High level synthesis of levan by a novel Halomonas species growing on defined media. *Carbohydrate polymers*. **78**: 651-657.
59. Prasertsan P., Wichienchot S., Doelle H. y Kennedy J., 2007. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, Vol. **71(3)**: 468-475.
60. Quintero R. 1985. Prospectiva de la biotecnología en México. **Fundación Javier Barros**: 61-95.
61. Raguenes G., Pignet P., Gauthier G., Peres A., Christensen R., Rougeaux H., Barbier G., Guezennec J. 1996. Description of a new polymer-secreting bacteria from deep sea hydrothermal vent *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(1)**: 67-73.
62. Shimada A., Nakata H. y Nakamura I., 1997. Acidic exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp., *Journal of fermentation and bioengineering*, Vol. **84 (2)**: 113-118.
63. Steinbüchel A. 2001. Perspectives for Biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Biosci.* (1)1: 1-24.
64. Sutherland I. 2001, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. **147**: 3-9.
65. Tallgren A.T., Airaksinen U., Von Veissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J. and Leisola M., 1999, Exopolysaccharide producing bacteria from sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(2)**: 862.

66. **Tolker_Nielson T., Brinc U.C., Ragas, P.C., Andersen J.B., Jacobsen C.S., Molin S. 2000.** Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *J. Bacteriol.* **182**:6482-6489.

67. **Vincenzini M., De Philippis R., Sili C. and Materassi R. 1990.** A novel exopolysaccharide from a filamentous cyanobacterium: production, chemical characterization and rheological properties. *Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic Publishers*: 295–310.

68. **Wilches A. 2004.** Caracterización preliminar de enzimas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos producidos por *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **28 (109)**: 577-583.

69. **Xiao J., Xiao D., Xiong Q., Liang Z., Zhong J. 2010.** Nutritional requirements for the hyperproduction of bioactive exopolysaccharides by submerged fermentation of the edible medicinal fungus *Cordyceps taii*. *Biochemical Engineering Journal.* **49**: 241-249

APÉNDICES

Apéndice A

Curva estándar utilizada para la cuantificación de azúcares reductores

Apéndice A

Curva estándar utilizada para la cuantificación de azúcares reductores

Para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras, se preparó una curva de calibración estándar. La curva estándar utilizada tiene un rango de concentraciones de 0.001 a 0.003M. (0.3g/L a 1g/L) de maltosa.

Las soluciones de maltosa para la curva fueron preparadas a partir de una solución madre de 0.01M.

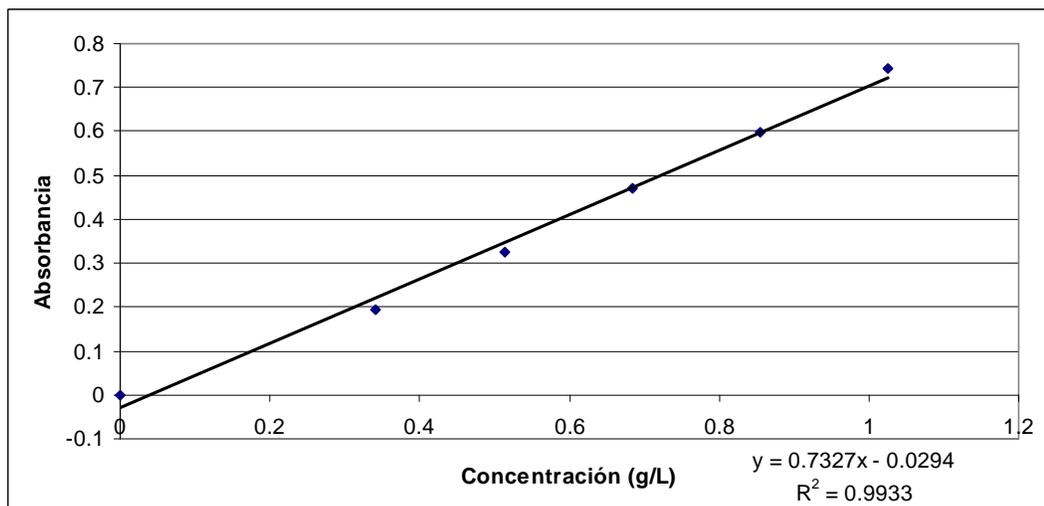


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Magdalena de Jesús Rostro Alanis
Candidata para el Grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial

Tesis: EFECTO DE LAS VARIACIONES ENTRE LAS FUENTES DE
CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE
EXOPOLISACÁRIDO POR UNA CEPA NATIVA DE *Enterobacter cloacae*

Campo de estudios: Microbiología Industrial

Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 1 de enero de 1986, hija de Cornelio Rostro López (+) y Victorina Alanis Acosta.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en diciembre del 2006, con título honorífico.