

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Tesis para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS (Ingeniería Química)

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL
SISTRATO EN CULTIVOS DE TIBICOS
PARA LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS
COMO AGENTES EMULSIFICANTES**

PRESENTA:

I.Q. Brenda Vargas Muñiz

DIRECTORES



Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez



Dra. Angélica Román Guerrero

Fecha: 24 de marzo de 2021

Agradecimientos

Primeramente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada en el periodo de 2018-2020.

A los profesores que estuvieron conmigo en este ciclo de mi vida académica, al Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez y el Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter, que influyeron con sus lecciones y experiencias en mi formación para poder llevar a cabo la realización del proyecto que aquí se presenta.

A la Dra. Angélica Román Guerrero, por la confianza otorgada para la realización de este trabajo, por su experiencia y conocimientos, así como por todo el apoyo que me brindo durante este proyecto.

A mis compañeros de los laboratorios W-107 y R-003 por su apoyo y por compartir sus conocimientos conmigo, además de su gran amistad.

A mis compañeras y amigas del posgrado de Ingeniería Química, por su apoyo y motivación durante los momentos más difíciles en este proceso, así como por las experiencias vividas. Las quiero.

En especial a mi familia por todo su amor, cariño, apoyo y comprensión que fueron fundamentales en esta etapa, por siempre estar cuando más los necesito. Gracias por todo, los amo.

A mi novio por su amor, paciencia y apoyo para poder lograr una meta más.

BRENDA VARGAS MUÑIZ

ÍNDICE GENERAL

<i>Resumen</i>	7
Introducción	9
Capítulo I. Antecedentes	11
1. El kéfir	12
1.1 Kefirán	12
1.2 Kéfir de agua o Tibicos	13
1.2.1 Fermentación de los tibicos	14
1.2.2 Microbiota de los granos de kéfir de agua	15
1.3 Exopolisacáridos de granos de kéfir de agua	16
1.3.1 Clasificación de los EPS de kéfir	17
1.4 Función de las bacterias para los EPS	19
1.4.1 Efecto de la fuente de carbono sobre el EPS	19
1.5 Actividad superficial del EPS	22
1.6 Aplicaciones potenciales de EPS de kéfir de agua	23
1.6.1 Emulsiones	23
1.6.2 Recubrimientos	25
Capítulo II. Justificación	27
Justificación	28
Capítulo III. Hipótesis y objetivos	29
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Capítulo IV. Materiales y métodos	31
Materiales y reactivos	33
4.1 Preparación y acondicionamiento del cultivo de kéfir de agua.	33

4.2 Cuantificación de la biomasa	33
4.3 Obtención y purificación del EPS	34
4.4 Caracterización fisicoquímica de EPS	35
4.4.1 Determinación del contenido de azúcares	35
4.4.2 Determinación del contenido de proteína	35
4.5 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	35
4.6 Determinación de Peso molecular (PM)	36
4.7 Evaluación de la actividad superficial del EPS	36
4.7.1 Potencial Zeta (ζ)	36
4.7.2 Tensión interfacial dinámica	36
4.8 Formulación de emulsiones O/W	36
4.9 Morfología y distribución de tamaño de gota	37
5.1 Análisis estadístico	37
Capítulo V. Resultados y Discusión	38
5.1 Cultivos de kéfir de agua	39
5.2 Obtención del EPS	42
5.3. Caracterización del EPS	43
5.4 Diámetro hidrodinámico del EPS	44
5.5 Peso molecular (PM)	46
5.6. Espectroscopía de FT-IR.	48
5.7 Actividad superficial del EPS	51
5.7.1. Potencial zeta.	51
5.7.2. Tensión interfacial dinámica	52
5.8 Caracterización y estabilidad de emulsiones	54
5.8.1 Morfología y distribución de tamaño de gota	54
5.8.2 Estabilidad de las emulsiones O/W	56

Capítulo VI. Conclusiones y perspectivas	60
<i>Conclusiones</i>	61
<i>Perspectivas</i>	62
Nomenclatura	63
Referencias	64
ANEXOS	71
A. Equipos	71
B. Diversidad microbiológica en cultivos de kéfir de agua	71
C. Curva de calibración de determinación de carbohidratos	72
D. Curva de calibración de determinación de proteínas	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura propuesta para el kefirán (Micheli et al., 1999)	13
Figura 2. Granos de kéfir de agua	14
Figura 3. Estructura química del dextrano (De Belder, A. (2003). Handbook, Amersham Bioscience, dextran.).....	16
Figura 4. Gránulos de kéfir que producen EPS de kefirán como un heteropolisacárido constituido por monómeros de glucosa y galactosa (Tan et al., 2020)	17
Figura 5. Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) (B) (Tomada de: Madrigal & Sangronis, 2007).....	21
Figura 6. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones tipo O/W (Tomada de Bouyer et al., 2012).....	25
Figura 7. Producción de biomasa de granos de kéfir en peso fresco (g, - - -), y en biomasa de kéfir de agua en seco de granos de kéfir (%. - - -) en función del tiempo.....	39
Figura 8. Consumo de sustratos en función del tiempo.	40
Figura 9. Perfiles de distribución de diámetro hidrodinámico de los EPS y su índice de polidispersidad (PdI)	45
Figura 10. Gráficos de Debye para el EPS obtenido con IAG e IAL.	47
Figura 11 . Espectros IR de EPS de kéfir de agua obtenidos con las distintas fuentes de carbono. 49	
Figura 12. Espectro IR de EPS de kéfir de leche. Tomada De los Santos Trinidad (2020).....	50
Figura 13. Perfil de potencial zeta en función del pH para EPS de kéfir de agua.	52
Figura 14. Perfil de tensión interfacial para *EPS de kéfir de leche y EPS de kéfir de agua.	53

Figura 15. Micrografías de emulsiones O/W con EPS de sacarosa observadas a 10X y 100X para:
a) EPS de sacarosa AN (5%), b) EPS sacarosa AN (10%). 55

Figura 16. Evaluación de estabilidad de las emulsiones de EPS de sacarosa formuladas con AN. 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad poblacional microbiológica de granos de kéfir..... 41

Tabla 2. Rendimiento de producción del EPS con distintos sustratos 42

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del EPS 43

Tabla 4. Diámetro hidrodinámico (d_h) y valor medio de los EPS con Sacarosa, IAG e IAL 44

Tabla 5. Diámetro volumétrico de momento (D_{43}) 56

Resumen

En los últimos años la tendencia de consumo de alimentos ha sufrido cambios significativos, donde los consumidores han optado por aquellos que le aporten beneficios a la salud relacionados con la prevención de enfermedades o el mejoramiento con problemas relacionados a la digestión, además del aporte nutrimental que estos tienen. En este sentido, los alimentos fermentados con microorganismos probióticos representan un sector de los alimentos que ha recibido especial atención debido a los beneficios que aportan los probióticos a la salud del huésped. Entre estos alimentos se destacan el kéfir de agua o tibicos, los cuales se consideran como macrocolonias o microbiogreas que se componen de bacterias (ácido lácticas y ácido acéticas) en su mayoría y levaduras, en forma de un gel irregular, que se caracterizan por ser de un color blanquecino-transparente, además de ser de diversos tamaños. Dichos cultivos fermentan el medio en el que se encuentran al tener de sustrato una fuente de carbono presente debido a la diversidad de especies microbianas, y embebido en estas estructuras (granos de kéfir) se encuentra la del exopolisacárido dextrano, considerado por demostrar propiedades relacionadas con la estabilidad de los alimentos fermentados, además de presentar propiedades tecnofuncionales relacionadas con su solubilidad, su actividad superficial como agentes bio-espesantes, gelificantes, entre otros, y cuya aplicación no sólo ha considerado la industria de alimentos, sino también la industria farmacéutica.

Es por ello que el presente trabajo planteó el manejo de cultivos de kéfir de agua y el uso de fuentes de carbono complejas como lo son las inulinas como sustrato, para conocer el efecto que posee sobre la estructura química, y actividad superficial del exopolisacárido producido, de tal manera que estos biopolímeros exhiban la capacidad de formar emulsiones del tipo O/W (aceite en agua) y su comparación con exopolisacáridos obtenidos de una fuente de carbono sencilla.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, el cultivo de kéfir de agua produjo distintos exopolisacáridos (EPS) empleando tres fuentes de carbono: sacarosa, inulina de alcachofa (IAL) e inulina de agave (IAG). La propiedad de las inulinas más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de cierto grupo de bacterias (bifidobacterias y lactobacilos), la planta de agave contiene entre un 16-25% de inulina mientras que la de alcachofa entre un 3-10%. El crecimiento del cultivo de kéfir tuvo un crecimiento similar con las tres fuentes de carbono, se encontraron diferencias significativas en la composición fisicoquímica de cada EPS, al realizar la cinética de crecimiento se encontró que después de 48 h se encontraba el mejor rendimiento de producción de EPS, obteniendo valores para

IAG e IAL de 330 mg/L y para sacarosa de 120 mg/L. También se realizó el análisis del contenido de proteínas y carbohidratos debido, a la relación que presentan ambos puede tener un efecto en la estabilidad de las emulsiones, con valores entre 280 a 494 mg/g_{EPS} en contenido de carbohidratos, siendo mayor el EPS de IAL y en contenido de proteína, valores que oscilaban entre 11 – 25 mg/g_{EPS} siendo el EPS de sacarosa el que obtuvo mayor contenido.

Dentro de esta caracterización fisicoquímica se evaluó el peso molecular (PM), y se encontraron valores que oscilaban entre 370 a 450 kDa, estos datos concuerdan con los reportados en la literatura. También se realizó espectroscopia de FT-IR, mostrando señales amplias y redondeadas en 3330 cm⁻¹ asociadas a la presencia de grupos -OH, presencia de grupos metilenos que se asocia a la vibración de estiramiento del grupo alifático en 2924 cm⁻¹, así como bandas en 1030 cm⁻¹ características de los polisacáridos.

Con respecto a la evaluación del potencial zeta se encontró que los tres EPS mostraban un comportamiento de polielectrolitos aniónicos, con potenciales zeta con carga negativa variando de -3 mV a -14 mV en pH de 3 a 8. Se evaluó la tensión interfacial de los EPS obtenidos de las inulinas los cuales se compararon con el EPS de kéfir de leche, donde se encontró que los EPS poseen la capacidad de reducir la tensión superficial, por lo tanto, funcionarían como buenos agentes emulsificantes. Para reforzar estos resultados se formularon emulsiones aceite en agua (O/W) empleando 5% y 10% de aceite de naranja (AN) con el EPS de sacarosa, las emulsiones que se formaron presentaban diámetros de gota a dos porcentajes de AN de entre 1.177 – 1.242 μm, al cabo de 6 días de almacenamiento se evaluó la estabilidad de estas emulsiones, el diámetro de gota no presentó cambios significativos, lo que demostró que este EPS tuvo buena actividad superficial.

A pesar de estos resultados prometedores, algunas caracterizaciones no alcanzaron a cubrirse debido a la situación sanitaria que se presenta en la actualidad por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19), pero de acuerdo a las propiedades previas a la formación de las emulsiones se puede esperar que los EPS formados por IAG e IAL también van a tener una buena actividad superficial.

Introducción

Las tendencias de consumo de alimentos han sufrido cambios significativos en las últimas décadas. En la actualidad, los consumidores aprecian más aquellos alimentos que consideran contribuyen de manera benéfica a su salud, es decir, consumir alimentos que no sólo provean saciedad y nutrientes, sino que coadyuve a la prevención de enfermedades relacionadas con los hábitos alimenticios y al mejoramiento del bienestar físico y mental (Siró et al., 2008).

Los alimentos fermentados son considerados como alimentos funcionales, debido a que contienen microorganismos probióticos, microorganismos viables que, al administrarse en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped (Hill et al., 2014). Los alimentos lácteos fermentados representan una fuente importante de este tipo de nutracéuticos, siendo el yogur y el kefir, alimentos de alto consumo en el mundo.

El kéfir es una bebida láctea viscosa y ligeramente carbonatada, que puede contener una pequeña cantidad de alcohol (< 2.0% v/v; Açı́k et al., 2019), producido por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, y levaduras que fermentan lactosa como *K. marxianus* y otras que no la fermentan como *S. unisporus*, *S. cerevisiae*, y *S. exiguss* (Chen et al., 2018). Los gránulos de kéfir son pequeños cúmulos de microorganismos de forma irregular que actúan al inocular el sustrato a temperatura ambiente durante un periodo de 24 h aproximadamente, y su consumo se ha asociado con beneficios específicos para el huésped como son las actividades antimicrobianas, anticarcinogénicas, antiinflamatorias, probióticas, prebióticas. reductoras de colesterol y mejoramiento a la tolerancia de la lactosa (Sharifi et al., 2017).

Por otra parte, el kéfir de agua es una bebida fermentada hecha a partir del inóculo de los gránulos de kéfir en soluciones azucaradas, hasta convertirse en una bebida amarillenta y espumosa de sabor afrutado, dulce y ligeramente alcohólico. A diferencia del kéfir de leche, el kéfir de agua se encuentra poco estudiado, siendo la diversidad de especies microbianas el principal foco de estudio, donde se ha reportado que la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y bacterias ácido acéticas (BAA) se encuentran embebidas en una estructura esponjosa de exopolisacárido dextrano (Moinas et al., 1980).

Este exopolisacárido (EPS) es un dextrano, es decir un homopolisacárido de alto peso molecular hecho de glucosa, que ha demostrado poseer buena estabilidad y solubilidad, con usos potenciales en áreas como la médica, farmacéutica, alimentaria, textil, etc. (Davidović et al., 2015).

Las características fisicoquímicas y estructurales del exopolisacárido tienen una relación directa con el tipo de fuente de carbono que utilizan los microorganismos para producirlas (Wang & Bi, 2008). De esta forma, los polisacáridos de origen microbiano han demostrado ser nuevos materiales biopoliméricos que pueden competir económicamente con otras gomas naturales, como la goma arábica, el carragenano, que es producido por algas marinas y vegetales respectivamente.

Dentro de las propiedades funcionales que presentan estos EPS, las propiedades reológicas y de superficie resultan prometedoras, debido a que han demostrado ser de suma importancia para controlar y comprender sus aplicaciones industriales, además que estas propiedades están influenciadas por su estructura y composición de los polisacáridos y dependen del microorganismo del cual se ha extraído (Jindal & Singh Khattar, 2018).

Por lo que en este trabajo se pretende explorar la posibilidad de utilizar el EPS de kéfir de agua como agente con actividad superficial para la formulación y estabilización de alimentos, y el efecto del tipo de sustrato sobre la actividad superficial.

Capítulo I. Antecedentes

1. El kéfir

El kéfir es una bebida láctica ácida, ligeramente carbonatada que ha ganado importancia en el gusto de los consumidores, debido a los atributos nutracéuticos y beneficios a la salud que se han asociado con su consumo, mismo que le ha dado la denominación de producto considerado como seguro (GRAS) según la FDA. Para la producción de esta bebida, es necesario el uso de gránulos de kéfir, los cuales están compuestos de una mezcla simbiótica de microorganismos, principalmente de bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, y *Streptococcus*, bacterias ácido acéticas (BAA) del género *Acetobacter* principalmente, y levaduras como *Kluyveromuces*, *Saccharomyces* y *Torula*, los cuáles se encuentran embebidos dentro de la matriz de proteína-polisacárido (Farnworth, 2005).

Los gránulos de kéfir consisten en estructuras gelatinosas, blandas, insolubles en agua, de forma irregular y con tamaños que varían de 0.3-3.0 cm de diámetro (Tan et al., 2020). El consorcio de microorganismos presentes en los gránulos, producen metabolitos que han sido asociados a efectos benéficos para la salud, como son las actividades hipocolesterolémicas, antiaterogénicas, antioxidantes, anticolitis y actividad beta-galactosidasa (Plessas et al. 2017). Además de proteger al consumidor contra microorganismos patógenos, debido a los efectos sinérgicos del etanol, ácidos orgánicos, bacteriocinas, así como otros compuestos bioactivos y microorganismos probióticos (Piermaría et al., 2016).

1.1 Kefirán

El EPS de los gránulos de kéfir, es llamado kefirán o kefirano y ha sido considerado uno de los polisacáridos más interesantes por sus aplicaciones potenciales en áreas como la de alimentos, farmacéutica, médica, etc., y a sus actividades antibacteriales (Rodrigues et al., 2005), antitumorales (Murofushi et al., 1983), modulador del sistema inmune (Medrano et al., 2008), reductor del nivel de colesterol en sangre (Maeda et al., 2004), así como sus propiedades reológicas (Rimada y Abraham, 2006), biodegradabilidad (Ghasemlou et al., 2011b), biocompatibilidad (Shahabi-Ghahfarrokhi et al., 2015), seguridad (Piermaría et al., 2016), actividad emulsificante, estabilizante (Botelho et al., 2014), resistencia contra la hidrólisis (Micheli et al., 1999), y propiedades mecánicas y de barrera, así como permeabilidad al vapor de agua (Moradi y Kalanpour, 2019).

El kefirán es un biopolímero con gran cantidad de grupos hidroxilo y un elevado peso molecular (10^6 Da), es un glucogalactano ramificado soluble en agua, compuesto por cantidades equivalentes de D-glucosa y D-galactosa, unidos por enlaces α -1-6 glucosídicos, con ramificaciones localizadas en las posiciones 2, 3 o 4 (Davidović et al., 2015). En la Figura 1 se muestra la estructura química propuesta para el kefirán.

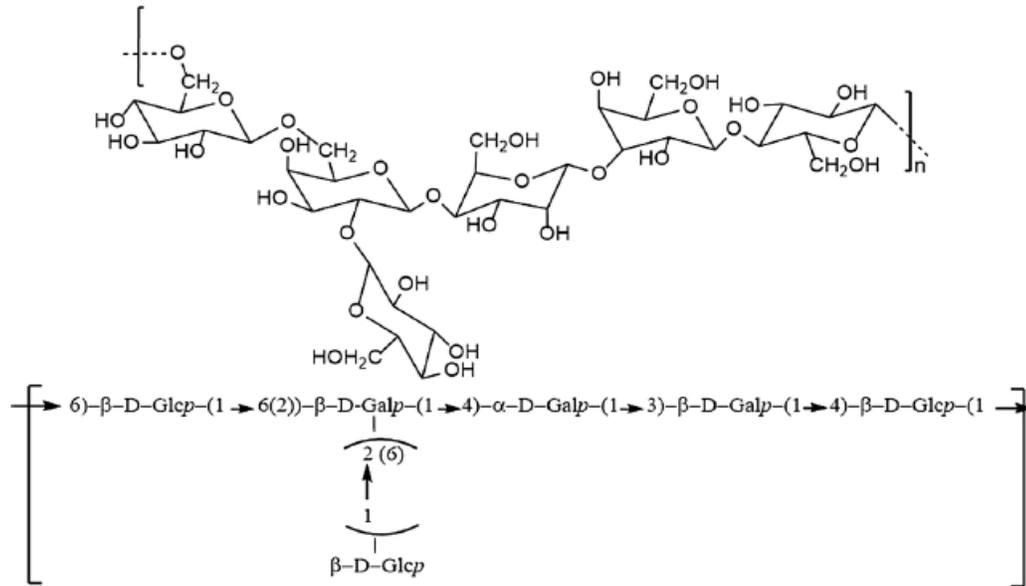


Figura 1. Estructura propuesta para el kefirán (Micheli et al., 1999)

1.2 Kéfir de agua o Tibicos

Los tibicos, también conocidos como Tibis, granos de kéfir de agua, granos de kéfir de azúcar, búlgaros de agua, son microbiogreas o macrocolonias compuestas principalmente por bacterias y levaduras que constituyen una asociación simbiótica muy estable, con forma de gel irregular (figura 2), son similares a masas gelatinosas compactas, se caracterizan por tener un color blanquecino o amarillento, translúcidas u opalescentes, de un tamaño variable.

Están constituidos por una matriz de polisacáridos, generalmente dextranos, dispuestos en dos capas. Se encuentran formados por una capa externa la cual es compacta y en ella se hallan bacterias y levaduras, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO_2 producto que se forma de la fermentación (Terrazas Casildo, 2005).



Figura 2. Granos de kéfir de agua

Se menciona que los tibicos son provenientes de México. Los gránulos originales viven en las nopaleras de *Opuntia* alimentando de las excreciones azucaradas de estas cactáceas. En Oaxaca, popularmente se les conoce como algas marinas o como granillo y son generalmente utilizados a nivel doméstico. Posteriormente, se nombró como tibicos a los gránulos de este cultivo, conocido también como cabaiasis. Otras fuentes lo denominan hongos chinos y otras apuntan a Japón como su procedencia. También se hace referencia al Tíbet, de donde vendría la palabra tibicos. Asimismo, se cree que es una adaptación durante muchos años del tradicional kéfir de leche procedente del Cáucaso, pero cultivado en agua con azúcares o jugos de frutas (fructosa natural) (Espinoza Chancay & Pincay Porras , 2012).

1.2.1 Fermentación de los tibicos

Los granos de kéfir pueden usarse para el procesamiento de bebidas, recuperarse al final del proceso y usarse en otro proceso fermentativo (Costa dos Santos et al., 2019). El kéfir de agua es una bebida fermentada que se elabora con los granos de kéfir de agua, los cuales se usan como inóculo, a una mezcla de agua, azúcar (sacarosa), higos secos y posiblemente otros ingredientes a una incubación de 2 a 4 días (Laureys & De Vuyst, 2014). Una vez establecidos los tibicos en un medio que favorezca su crecimiento, lo primero que se puede ver es un velo superficial transparente y delgado que aumenta al proseguir la fermentación. Los tibicos surgen en el fondo al espesarse y sedimentarse dicho velo. La fermentación se logra a temperatura ambiente (López Rojo, 2016), debido al crecimiento asociativo de varias especies microbianas en los granos de kéfir como los son bacterias, mohos y levaduras. Cada uno de estos microorganismos posee características propias que afectan el proceso de la fermentación. Dichas especies no actúan solas, sino que cooperan entre sí para la obtención global de fermentación.

En la producción de etanol y ácidos orgánicos de la bebida kéfir de agua se observa que en el proceso de fermentación aumenta la concentración de ácido láctico, etanol y ácido acético como consecuencia de las fermentaciones láctica, alcohólica y acética respectivamente, además de la formación de otros compuestos orgánicos, como péptidos bioactivos y exopolisacáridos (Monroy et al., 2017).

1.2.2 Microbiota de los granos de kéfir de agua

Los granos de kéfir de agua están constituidos por un consorcio estable de microorganismos, que se encuentran embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS), proteínas, lípidos formando pequeños gránulos, semiduros, entre los microorganismos simbióticos presentes están principalmente las bifidobacterias, bacterias ácido lácticas (BAL), y ácido acéticas (BAA), además de distintas levaduras (Rodríguez et al., 2017).

Se conoce que las BAL son capaces de producir diferentes α -glucanos y fructanos a partir de la sacarosa. La formación de estos EPS es catalizada por enzimas dextransucrasas o fructansucrasas. Estas enzimas cortan el enlace glucosa-fructosa de la sacarosa, liberando uno de los monosacáridos y transfiriendo el otro monosacárido a una molécula aceptora. Los α -glucanos tienen una alta heterogeneidad estructural y generalmente se encuentran divididos en grupos de acuerdo con el tipo de enlace de la estructura central. Los α -glucanos que se describen con mayor frecuencia son los dextranos, estos son una clase de homopolisacáridos (Figura 3), un polímero ligado a α (1 \rightarrow 6), que se produce por ciertas especies de *Lactobacillus* y/o *Leuconostoc*. El esqueleto lineal del dextrano puede estar ramificado por cadenas laterales, resultantes principalmente de enlaces α (1 \rightarrow 3) y, ocasionalmente de α (1 \rightarrow 4) o α (1 \rightarrow 2). La estructura exacta de cada tipo de dextrano y el grado de ramificación de los enlaces α (1 \rightarrow 2), α (1 \rightarrow 3) y α (1 \rightarrow 4) depende de la especie del organismo microproductor y, por tanto, del tipo específico de dextransucrasas implicadas. El tamaño de las moléculas de dextrano puede cambiar con la influencia de la temperatura, la concentración de sacarosa y la presencia de otros azúcares durante la reacción de síntesis (Alves de Oliveira, 2013; Fels et al., 2018).

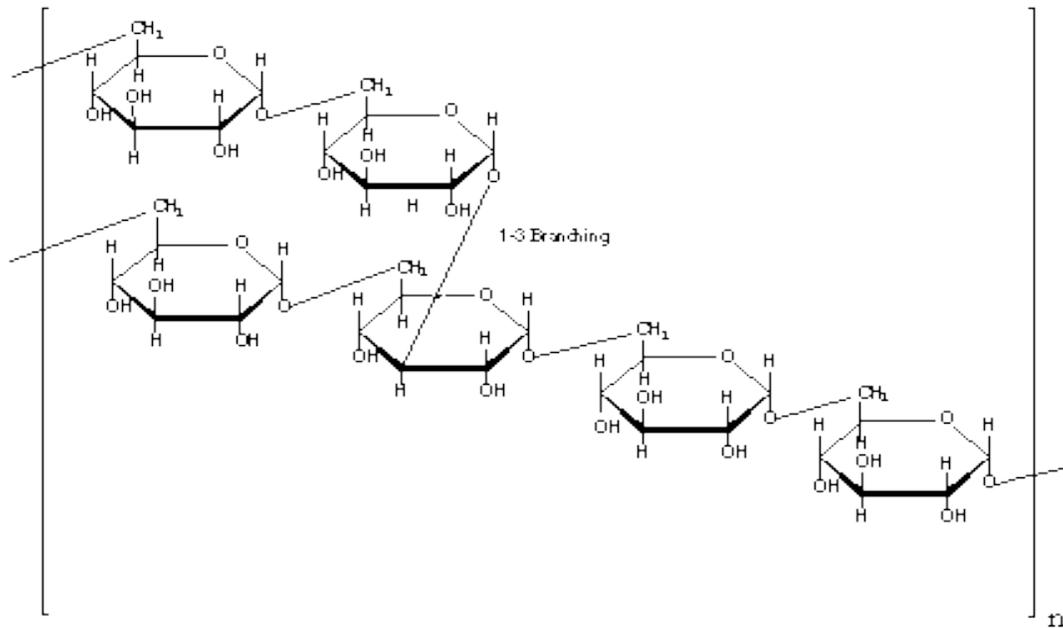


Figura 3. Estructura química del dextrano (De Belder, A. (2003). *Handbook, Amersham Bioscience, dextran.*).

1.3 Exopolisacáridos de granos de kéfir de agua

También llamados polisacáridos extracelulares, se definen como polímeros de carbohidratos que pueden ser producidos por diferentes microorganismos (Botelho et al., 2014). Estos biopolímeros microbianos se producen a partir de la fermentación. Se pueden clasificar en tres principales grupos de acuerdo con el interés industrial: polisacáridos, proteínas y polihidroxialcanoatos (PHA's). Se cree que la función fisiológica del EPS es como primera línea de defensa biológica contra la fagocitosis, los antibióticos, las tensiones físicas como la desecación y el estrés osmótico (Fukuda et al., 2010), también como ocultamiento de la superficie bacteriana, como adhesivos para interacciones con otras superficies o sustratos bacterianos, etc. (Badel et al., 2011). Los EPS están constituidos principalmente por unidades glucosídicas, producidos por distintos microorganismos (bacterias, levaduras, hongos), se localiza en el exterior de la célula microbiana, en las cubiertas microbianas más externas glicocálix y a veces se encuentra desligados de la célula (Figura 4). La presencia de los EPS asociados a células microbianas, se pone de manifiesto por la mucosidad de las colonias y la viscosidad del medio. Están compuestos en su mayoría por carbohidratos, además de presentar sustituyentes orgánicos e inorgánicos además de azúcares (París Ripoll, 2009), lo que los hace compuestos biodegradables, biocompatibles y de baja toxicidad.

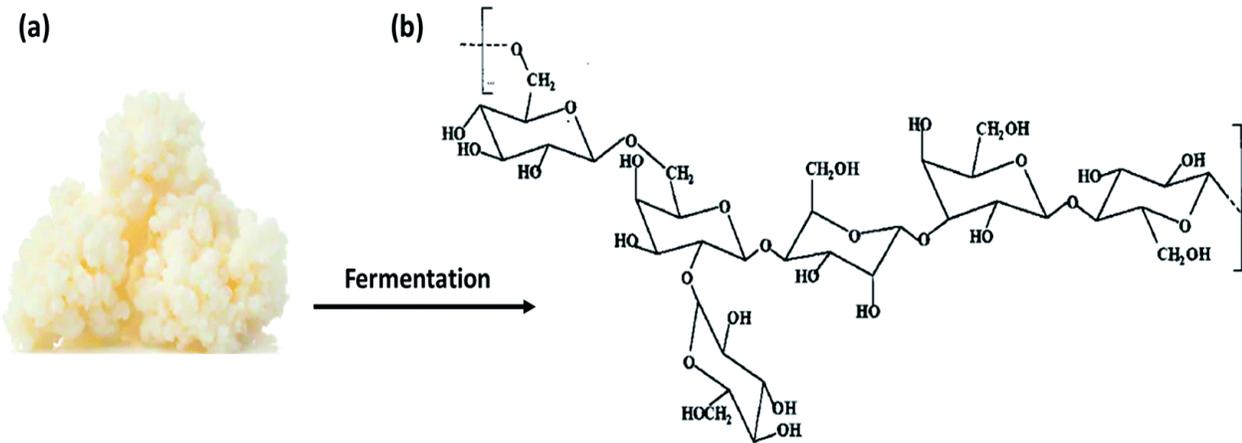


Figura 4. Gránulos de kéfir que producen EPS de kefiran como un heteropolisacárido constituido por monómeros de glucosa y galactosa (Tan et al., 2020)

Así como en el kéfir de leche, las principales BAL asociadas con la producción de EPS en el kéfir de agua pertenecen a los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weissella sp.* En este caso, cualquier fuente de alimentos que contenga azúcares fermentables, tiene el potencial de coadyuvar en el crecimiento de estos microorganismos (Angelin & Kavitha, 2020).

Para la producción de los gránulos, una solución de sacarosa (> 80 g/L) es fermentada por un consorcio de microorganismos, los cuales contienen moléculas de dextrano compuesto principalmente por cadenas lineales con uniones α -D-1,6-, y un bajo porcentaje de cadenas laterales con uniones α -D-1,3- (Fels et al., 2018; Coma et al., 2019). Lo cual representa la principal diferencia con el kéfir de leche, mientras comparten los mismos grupos de microorganismos: BAL, BAA, levaduras.

1.3.1 Clasificación de los EPS de kéfir

Los EPS producidos por BAL se han clasificado como macromoléculas de homopolisacáridos (HoP) y heteropolisacáridos (HeP). Los HoP están compuestos de un tipo de monosacáridos (hexosa), y se ha reportado que existen estructuras ramificadas o lineales y compuestas de glucosa o fructosa y se clasifican en α -D-glucanos (Dextran, Mutan, Alternan y Reuteran), β -D-glucanos, fructanos (Levan e Inulina) y poligalactanos.

Por otra parte, los HeP están constituidos por distintos tipos de monosacáridos, como la D-glucosa, D-galactosa y azúcares como L-ramnosa, manosa, arabinosa y fucosa. En algunos casos, también están presentes moléculas como la *N*- acetilglucosamina, *N*- acetilgalactosamina o ácido glucurónico. En estos casos los EPS se denominan como gelana, xantana y kefirán (Angelin & Kavitha, 2020).

Generalmente los HoPs presentan pesos moleculares que oscilan entre 4×10^4 y 6.0×10^6 Da, con rendimientos de producción mayores que aquellos obtenidos para los HePs, los cuales se han reportado con rendimientos entre 50 y 200 mg/L y con pesos moleculares del orden de 10^7 Da (Badel et al., 2011; Angelin & Kavitha, 2020). Cabe destacar que los HoPs han demostrado potencial en su producción industrial como dextranos para aplicaciones de separación de compuestos mediante permeación en gel (Sephadex®), como sustitutos de plasma sanguíneo (Dextran 70).

Por otra parte, los fructanos derivados de las inulinas, presentan generalmente enlaces β -(2,6) o β -(2,1) cuando éstos son excretados por *L. reuteri* 121, mientras que presentan estructuras lineales cuando los produce *L. johnsonii* NCC 533 (Anwar et al., 2008).

En el caso del EPS reuteran, éste se compone de un 70% de enlaces α -(1-4) y pocos α -(1,6), cuyas aplicaciones se han centrado en su uso en la industria de la panadería, debido a los efectos que provee en el desarrollo de sabor, textura y vida de anaquel de los productos obtenidos de la fermentación de las masas de panadería (Tieking et al., 2005).

Por su parte, los HePs ha demostrado poseer gran variabilidad en su estructura, con unidades repetitivas de siete monosacáridos, siendo la glucosa, galactosa, y ramnosa los principales. Estos EPS, pueden presentar carácter parcialmente aniónico debido a la presencia de residuos de ácido glucurónico y/o fosfatos. Sus denominaciones también son complejas dependiendo del principal monosacárido, por ejemplo, galactoglucano o glucogalactano, si las unidades monoméricas corresponden a la presencia de galactosa y glucosa. Además, también influye la proporción en la que se encuentran dispuestos dichos monosacáridos, por ejemplo, ramnoglucogalactano o galactoglucoramnano (Badel et al., 2011).

1.4 Función de las bacterias para los EPS

Para entender la funcionalidad de los EPS en las distintas aplicaciones industriales antes mencionadas, es necesario comprender cuál es su papel en los cultivos microbianos. En este sentido, la función fisiológica de los EPS producidos por BAL del género *Lactobacilli* sp., a pesar de no estar completamente definida, se sabe que estas cepas de BAL desvían una pequeña fracción de azúcares fermentables para la biosíntesis del EPS y su producción implica gastos energéticos significativos que deben compensarse para beneficio de los microorganismos productores. En este sentido, los EPS poseen propiedades de adhesividad, favoreciendo las interacciones y asociaciones celulares entre las bacterias y levaduras, creando microambientes que facilitan la transferencia de metabolitos y sustratos; además de actuar como agentes protectores ante factores físicos y químicos adversos como la presencia de fuerzas mecánicas y compuestos antimicrobianos, permitiendo la supervivencia de los microorganismos en entornos carentes de sustratos y nutrientes (Badel et al., 2011; Llamas et al., 2012). Desde el punto de vista bioquímico, los EPS son sintetizados por las bacterias mediante dos vías de síntesis, de acuerdo con su ubicación intra- o extracelular.

Los HoPs generalmente son sintetizados fuera de la célula por glicosiltransferasas extracelulares, las cuales pertenecen a las glicosiltransferasas, donde las diferencias en las estructuras se atribuyen a la intervención de diferentes enzimas (Badel et al., 2011). En el caso de la biosíntesis de los HePs, ésta incluye varios pasos intracelulares y sólo la polimerización de las unidades monoméricas se lleva a cabo de forma extracelular, esto implica que los azúcares disponibles como sustratos en el medio de cultivo se internalicen en el citoplasma mediante un proceso de fosforilación. Posteriormente, los acarreadores de lípidos localizados en la membrana celular facilitan el ensamblaje de las unidades monoméricas catalizadas por glicosiltransferasas, utilizando azúcares nucleótidos como sustrato, donde la traslocación extracelular precede al proceso de polimerización final (Welman & Maddox, 2003).

1.4.1 Efecto de la fuente de carbono sobre el EPS

Diversos estudios relacionados con cultivos de kéfir de leche muestran que al cambiar el tipo de leche o la adición de otro ingrediente se hallaran cambios en los productos fermentados como mejoras en la textura, viscosidad, características sensoriales, apariencia, etc., así como influencia considerable en el rendimiento de EPS bacterianos de ácido láctico, además cambios en las estructuras químicas. Por lo tanto, se sabe que el tipo de sustrato tendrá una relación directa con las características fisicoquímicas del EPS (Liu et al., 2002; Wang & Bi, 2008).

Estudios realizados por Pop et al. (2016) reportaron la obtención de un EPS aislado de la biomasa de granos de kéfir fermentados en leche descremada, con características fisicoquímicas que incluían pesos moleculares de entre 2.4×10^6 a 1.5×10^7 Da, mientras que Liu et al. (2002) publicaron resultados de peso molecular para EPS obtenidos de la fermentación de granos de kéfir con leche de soya de alrededor de 1.73×10^6 Da, valor que fue similar pero inferior al estudio anterior. Y como estas características fisicoquímicas también se encuentran las relacionadas a espectros FT-IR que muestran los grupos funcionales característicos de los EPS, se pueden encontrar diferencias en la intensidad de las bandas para cada cierto EPS dependiendo del medio y las condiciones, así como en la región de los $1660 - 1220 \text{ cm}^{-1}$ son características asimétricas y simétricas que se extienden de los enlaces C-O y correspondientes a moléculas de proteínas (Barraza et al., 2013).

En el caso de los cultivos de kéfir de agua se considera como un cambio en el sustrato de fuente de carbono convencionales como lo es la sacarosa, glucosa, fructosa, melazas o jugos de frutas, etc., por inulinas, generalmente llamados fructanos, estos son carbohidratos de almacenamiento presentes en diversas plantas, vegetales, frutas y cereales, como lo son el agave, achicoria, cebolla, alcachofa, yacon, entre otros. Una de las propiedades más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, el organismo no es capaz de digerir estos compuestos ni de asimilarlos, sin embargo, pueden ser utilizados como sustrato energético, debido a que poseen la capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (*Bifidobacterias* y *lactobacilos*), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales, lo cual se considera de interés. Se presenta como un polvo blanco, sin olor, son de sabor neutral y sin efecto residual (Madrigal & Sangronis, 2007). Las inulinas están constituidas básicamente por cadenas lineales de fructosa, además de tener un grado de polimerización de 3 a 60 unidades de monómeros, compuesto de unidades de β -D- fructofuranosilo unidas entre sí por enlaces $2 \rightarrow 1$ y terminadas con una molécula de glucosa (Figura 5). Los estudios han demostrado que este compuesto tiene varios efectos fisiológicos en la salud humana. Además, se ha descubierto que la presencia de inulina está relacionada con la mayor viabilidad de los microorganismos probióticos durante su vida útil (Costa dos Santos et al. 2019).

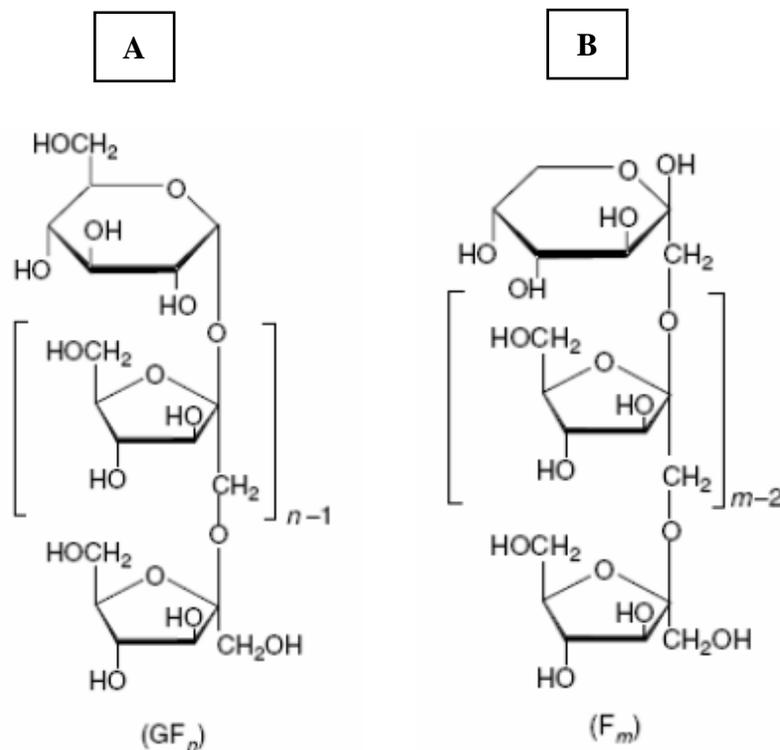


Figura 5. Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) (B) (Tomada de: Madrigal & Sangronis, 2007).

Como se mencionó la relación que se tiene la inulina y su efecto prebiótico se ve beneficioso para tener una mayor viabilidad de ciertos microorganismos, estudios realizados por Ayala et al. (2018) analizaron el efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*, obteniendo mejores resultados en el crecimiento de las BAL con el uso de la inulina de agave superando a la inulina de achicoria.

Por otra parte, Costa dos Santos et al. (2019) estudiaron la optimización de la fermentación de leche de soya y la adición de inulina en cultivos de kéfir, mostraron que la adición de la inulina exhibió un mayor crecimiento de bacterias y levaduras además de contribuir con la firmeza, la disminución de la sedimentación y la aceptabilidad sensorial de la bebida.

1.5 Actividad superficial del EPS

Los EPS obtenidos del kéfir de leche como del kéfir de agua, han llamado la atención por sus propiedades fisicoquímicas potenciales en aplicaciones en alimentos, además de su definición como producto seguro (GRAS). En este sentido, una de sus principales aplicaciones es como agente bioespesante natural, dicha propiedad ha sido atribuida a la capacidad que tienen los EPS del kéfir para interactuar con proteínas, iones, entre otros; permitiendo reducir los efectos de sinéresis en alimentos debido a su capacidad de retención de agua. Propiedades como la viscosidad y la elasticidad son importantes desde el punto de vista reológico o de flujo, ya que éstas dependen de la estructura y rigidez de los materiales, la presencia de cargas en la estructura de los polisacáridos, la presencia de componentes distintos a la estructura de los sacáridos, como sustituyentes orgánicos (grupos acetilo, piruvilo o succinilo) o inorgánicos (grupos sulfato o fosfato) (Sasikumar et al., 2017).

Existen diversos estudios que han reportado el uso de polisacáridos obtenidos de diversas fuentes, con la finalidad de aplicarlos en la formación de recubrimientos y películas biopoliméricas, y últimamente con especial énfasis en el uso de EPS de origen microbiano, debido a que se considera que el uso de biomasa microbiana es una fuente sustentable e innovadora de biopolímeros biodegradables, con propiedades de translucencia, homogeneidad, y permeabilidad adecuados para diversos tipos de aplicaciones (Coma et al., 2019). También se usan como emulsionantes, estabilizadores, agentes gelificantes, aglutinantes, coagulantes, espesantes y en producciones de suspensiones y películas. Estas aplicaciones se basan en la estructura química de los biopolímeros (Botelho et al., 2014).

Por otra parte, Ghasemlou et al. (2011a) reportaron el uso de películas de compositos basados en kefirán y ácido oleico, empleando un proceso de emulsificación, con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera a la transferencia de humedad. Las emulsiones formadas mostraron distribuciones monomodales con tamaños de gota entre 1.13 – 2.06 μm , con un comportamiento reológico pseudoplástico y sin fenómenos tixotrópicos. Además, se encontró que el EPS de kefirán presenta un comportamiento de hidrofiliencia superficial, de acuerdo con el análisis de ángulo de contacto, el cuál disminuyó conforme se incrementó el contenido de ácido oleico.

Por otra parte, Sabatino et al. (2020) han reportado el uso de los EPS de kefirán como formadores de hidrogeles, los cuáles pueden ser formados mediante la aplicación de bajas temperaturas que incrementen en gran medida la viscosidad, o bien en combinación con proteínas, moléculas de azúcar o alcoholes como el etanol o el etilenglicol, con la finalidad de obtener productos inyectables. Radhouani et al. (2019) desarrolló criogeles de kefirán para su aplicación en la liberación de fármacos aplicables a la ingeniería de tejidos, demostrando que las propiedades funcionales de este tipo de EPS son vastas. Por lo que en este trabajo se realizará un estudio comparativo de las características funcionales que presentan los EPS obtenidos del kéfir de agua y los principales factores fisicoquímicos asociados a su funcionalidad y aplicación.

1.6 Aplicaciones potenciales de EPS de kéfir de agua

1.6.1 Emulsiones

El estudio de las emulsiones es gran interés debido a la inmensa cantidad de productos que se utilizan a diario, desde artículos de higiene personal, alimentos (helados, leche, mantequilla), así como productos agroquímicos como lo son pesticidas e insecticidas. En el sector farmacéutico, las emulsiones pueden servir para encapsular los fármacos activos y después liberarlos cuando se encuentren en la corriente sanguínea, debido a que la formación de estas emulsiones sería uno de los pasos iniciales para obtener sistemas de nanopartículas y micropartículas para la focalización de dichos fármacos. El principal reto que plantea el uso de emulsiones es la inestabilidad termodinámica que presentan. De hecho, son propensas a la desestabilización y la separación de fases. La adición de emulsionantes con propiedades interfaciales y/o espesantes permite la formación y estabilización de la emulsión. En la industria alimentaria, la introducción de polímeros naturales como proteínas y polisacáridos como agentes emulsionantes y/o estabilizantes ha sido un enfoque exitoso para la formulación de emulsiones altamente estables (Aramberri et al., 2006; Bouyer et al., 2012).

Una emulsión consta de dos líquidos inmiscibles (generalmente agua y aceite), de los cuales uno se dispersa como pequeñas gotas en el otro. En la mayoría de los alimentos, los diámetros de las gotas suelen estar entre 100 nm y 100 μ m, pero actualmente ha habido un interés creciente en la utilización de emulsiones con diámetros menores ($d < 100$ nm) debido a sus nuevas propiedades fisicoquímicas. Se pueden clasificar las emulsiones de acuerdo a su distribución espacial relativa de las fases, oleosa y acuosa. Se denomina tipo O/W al sistema que consta de gotitas de aceite dispersadas en una fase acuosa y tipo W/O cuando las gotas de agua se dispersan en una fase oleosa.

Además de las emulsiones convencionales mencionadas anteriormente, también es posible preparar emulsiones múltiples denominadas también emulsiones dobles o emulsiones de emulsiones, las cuales son sistemas multicompartimentalizados, caracterizados por la coexistencia de emulsiones de aceite-en-agua (O/W) y de agua-en-aceite (W/O), en las que los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas igualmente dispersas más pequeñas, Las más comunes son, aceite en agua en aceite (O/W/O) o emulsiones agua en aceite en agua (W/O/W) (Jiménez Colmenero, 2013; McClements, 2016).

Durante la emulsificación, el área interfacial entre las fases continua y dispersa aumenta considerablemente en comparación con la interfaz antes de la dispersión. La energía libre interfacial, aumenta considerablemente. De acuerdo con el dictamen termodinámico de que todos los sistemas evolucionan hacia su estado mínimo de energía global, las emulsiones tienden a separarse rápidamente para minimizar el área de contacto interfacial y la energía libre. La inestabilidad de estos medios se manifiesta de acuerdo a varios mecanismos: Floculación, coalescencia, cremado o sedimentación y maduración de Ostwald. La floculación es el resultado de fuerzas atractivas entre las gotas y conduce a la formación de flóculos en la fase dispersa. Pueden ocurrir en emulsiones estabilizadas con biopolímeros, ya sea por agotamiento o por mecanismos de puente. En algunos casos, la floculación es reversible y una simple agitación magnética o manual pueden romper los flóculos. Sin embargo, en otros casos, es irreversible y las gotas se unen. La coalescencia es el proceso por el cual dos o más gotas se fusionan para formar una única gota más grande.

La sedimentación o cremado consiste en la migración de glóbulos o gotitas hacia la parte superior o inferior de la dispersión, dependiendo de las densidades relativas de las dos fases líquidas. Por último, la maduración de Ostwald es un mecanismo de difusión de moléculas de fase dispersa a través de la fase continua, sin ningún contacto entre las gotas, relacionado con la solubilidad de la fase dispersa en la fase externa, el cual se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas hasta que estas últimas prácticamente desaparecen (Aramberri et al., 2006; Bouyer et al., 2012; McClements, 2016). Los mecanismos de inestabilidad descritos anteriormente se muestran en la Figura 6.

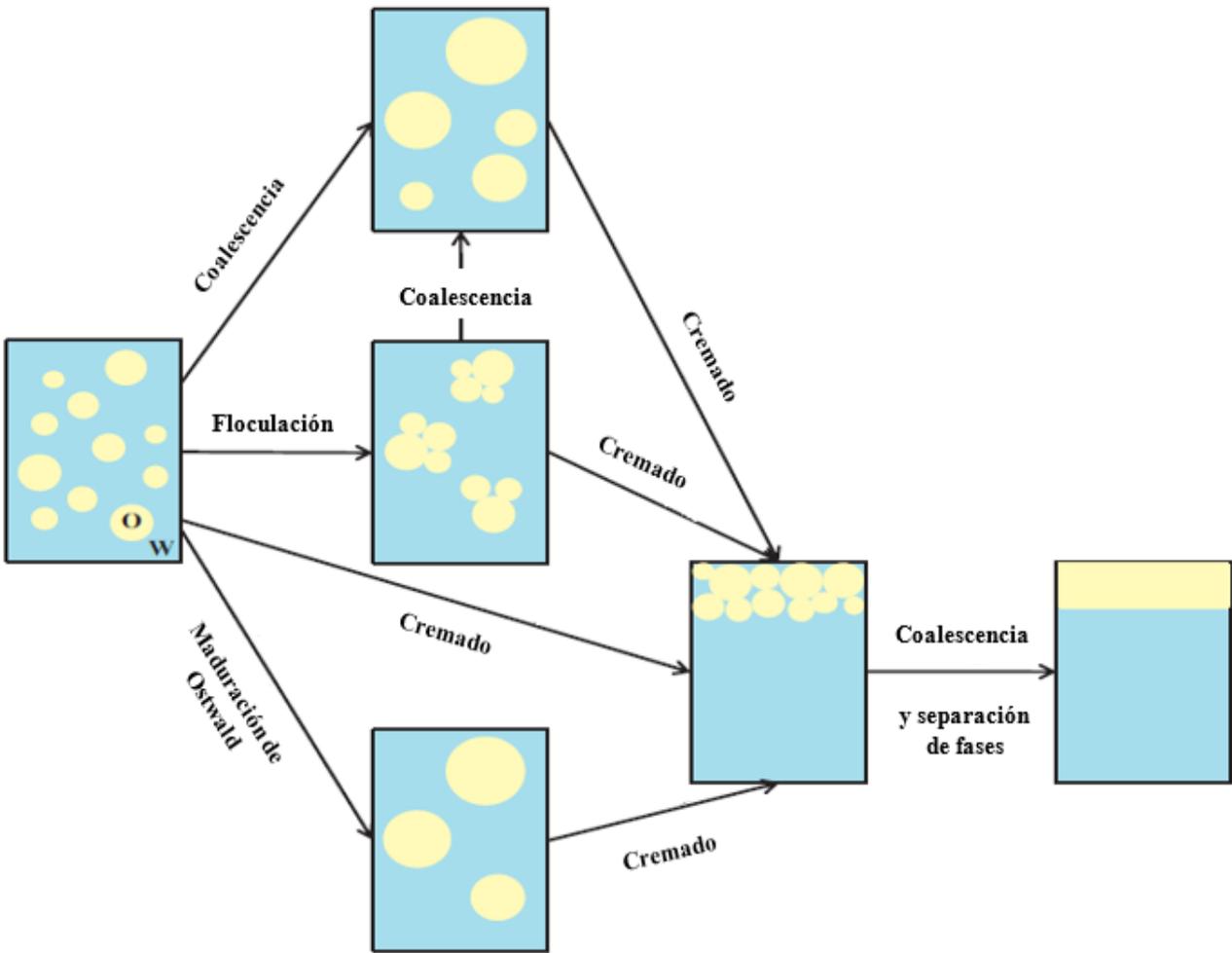


Figura 6. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones tipo O/W (Tomada de Bouyer et al., 2012).

1.6.2 Recubrimientos

La industria de alimentos y embalaje en los últimos años ha empleado nuevas formas de proteger los alimentos de las condiciones ambientales y las tensiones mecánicas. El uso de polímeros sintéticos y plásticos para envases ha crecido, sin embargo, se ha presentado problemas ambientales debido a la incapacidad de los materiales para biodegradarse, es por ello que la industria alimentaria ha explorado el uso de materiales biológicos naturales y polímeros en los envases. Las ventajas que ofrecen los recubrimientos comestibles son: ser libres de tóxicos y seguros para la salud, presentan propiedades sensoriales como ser transparentes y no ser detectados durante su consumo, regular distintas condiciones de interfase o superficiales del alimento, a través del agregado de aditivos como antioxidantes, agentes antimicrobianos y nutrientes.

En diversos estudios el uso de polisacáridos de diferentes fuentes para preparar películas y recubrimientos con diferentes propiedades ha indicado que estos carbohidratos con materiales prometedores. La atención que se le ha dado a los EPS de BAL como aditivo alimentario en la industria ha sido la mínima, principalmente debido a los bajos niveles de producción comparados con los producidos por bacterias gramnegativas. Para la aplicación comercial, los EPS deben producirse en niveles altos en medios de bajo costo y el procedimiento de aislamiento debe ser fácil, con estas consideraciones el EPS producido de los granos de kéfir podría ser una alternativa asequible. Entre las ventajas promotoras de salud del kefir se encuentra la inmunomodulación o la protección del epitelio, además de ser un polisacárido soluble en agua que contiene cantidades aproximadamente iguales de glucosa y galactosa, así como un excelente potencial como agente formador de películas, pero una de las desventajas es que las películas de polisacáridos son relativamente rígidas y, por lo tanto, se necesitan plastificantes para facilitar la manipulación. Los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares y aumentan la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (Tg), sin embargo, también disminuyen la permeabilidad al vapor de agua de la película. El glicerol es uno de los plastificantes más utilizados en las técnicas de fabricación de películas (Piermaria et al., 2009; Ghasemlou et al., 2011b; Fernández Valdés et al., 2015).

Capítulo II. Justificación

Justificación

En la búsqueda de usos que se les da a los cultivos de kéfir de agua se ha encontrado la producción de biopolímeros con actividad superficial, los cuales son empleados para su aplicación como agentes emulsificantes en distintas industrias. Entre estos biopolímeros se encuentran los exopolisacáridos (EPS) de kefirán y kéfir de agua en los cuales se ha encontrado un porcentaje de proteína asociado a una fracción mayoritaria de carbohidrato, que le brindan propiedades funcionales como agentes bio-espesantes, gelificantes, estabilizadores físicos, etc. Por otra parte, se ha encontrado que la producción y estructura de este EPS depende no sólo de la concentración y tipo de microorganismos en el cultivo, sino también de la fuente de carbono empleada, la cual puede marcar la diferencia en los rendimientos y funcionalidad. Dado que los microorganismos presentes en el kéfir de agua, entre ellos las BAL, las cuales son definidas como GRAS (generalmente reconocido como seguro), permiten asegurar el uso de los EPS en aplicaciones de consumo directo. A pesar de la mayor parte de los reportes sobre aplicaciones tecnológicas de los EPS de kéfir de agua se centran en el efecto de estos sobre la textura de sus productos de fermentación, la investigación sobre las propiedades fisicoquímicas, funcionales y su relación con la estructura y composición, a través de la evaluación de sus propiedades superficiales, como lo es la carga superficial, dinámicas de adsorción para medir la capacidad que tiene el EPS de reducir la tensión interfacial, así como la capacidad que tiene para formar y estabilizar emulsiones tipo aceite-en-agua (O/W), permitirá establecer criterios para emplear y desarrollar sistemas dispersos estabilizados con este tipo de biopolímeros.

Capítulo III. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El uso de fuentes de carbono complejas como las inulinas, sobre la producción de EPS en un cultivo microbiano de kéfir de agua (tibicos), tendrá efecto sobre la estructura química y actividad superficial del EPS producido, de tal manera que se mejore la capacidad de formar y estabilizar emulsiones tipo O/W de aquellos EPS obtenidos con una fuente de carbono sencilla.

Objetivo general

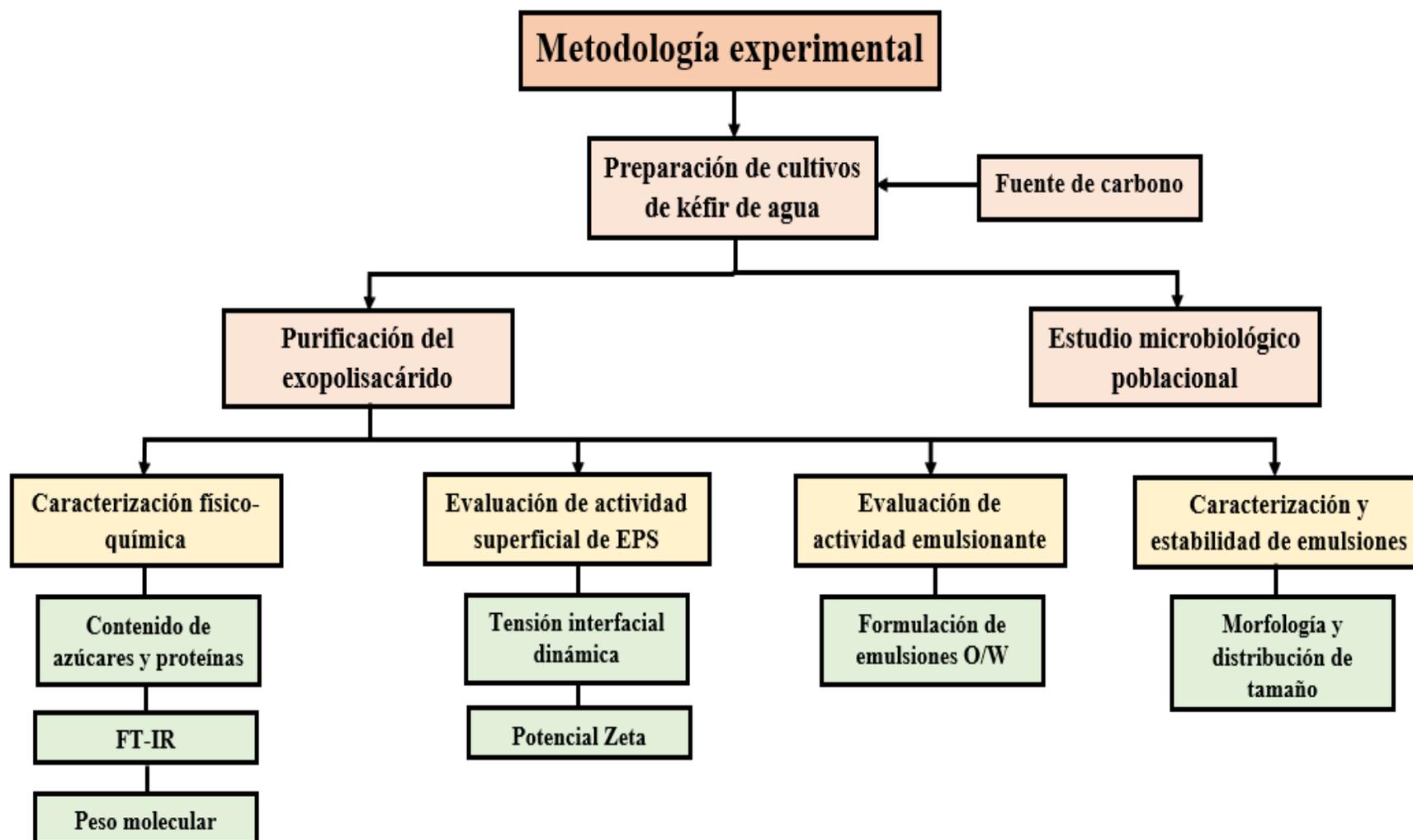
Evaluar el efecto de distintas fuentes de carbono en un cultivo de kéfir de agua (tibicos), sobre la producción del exopolisacárido (EPS) con actividad superficial para su uso potencial como agente emulsificante y estabilizante de emulsiones tipo aceite-en-agua (O/W).

Objetivos particulares

1. Establecer las condiciones de producción y purificación del EPS a partir del cultivo de kéfir de agua empleando distintas fuentes de carbono.
2. Evaluar los parámetros cinéticos del crecimiento microbiológico de la fermentación con las distintas fuentes de carbono.
3. Evaluar las metodologías que permiten caracterizar las propiedades fisicoquímicas, estructurales y superficiales del EPS de kéfir de agua.
4. Elucidar el potencial para la formación de emulsiones tipo O/W empleando los EPS de kéfir de agua como agentes emulsionantes-estabilizantes.

Capítulo IV. Materiales y métodos

A continuación, se describe la estrategia experimental empleada para la realización del presente trabajo.



Materiales y reactivos

Los granos de kéfir de agua fueron comprados a Airport ML (México). La inulina de alcachofa se obtuvo de Microingredients (EUA) y la inulina de agave se compró a Vaserco S de R.L. de C.V. (Jalisco, México). Reactivos y solventes como: sacarosa, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, safranina, azul de metileno, cristal violeta, ácido sulfúrico, y peróxido de hidrógeno fueron comprados a Reasol S.A. de C.V. (México). Los medios de cultivo agar MRS, agar extracto de levadura-glucosa (YGE) fueron comprados a FrogsLab S.A. de C.V. (México), mientras que el agar papa dextrosa (PDA), fenol y tolueno se adquirieron en Velaquin S. de R.L. de C.V. (México). Solventes como ácido tricloroacético (TCA) y etanol (96%) fueron adquiridos en Tecsiquim S.A. de C.V. (México). La solución amortiguadora de fosfatos (PBS), el reactivo de Bradford y estándar de albúmina de suero bovino (BSA) fueron adquiridos a Merck-Sigma Aldrich Química (México). En todos los experimentos se utilizó agua destilada y agua desionizada.

4.1 Preparación y acondicionamiento del cultivo de kéfir de agua.

Los gránulos de kéfir de agua se cultivaron de acuerdo con la metodología reportada por López Rojo et al. (2017). Primero, 12.5 g de granos de kéfir de agua pre-cultivados en sacarosa 5 % (p/v) sirvieron como inóculo. Los granos de kéfir de agua se agregaron en botellas Schott de 250 mL. Cada fermentación se realizó colocando 6 g de granos de kéfir en 100 mL de una solución al 5 % (p/v) de sustrato previamente esterilizado (sacarosa como control, inulina de agave (IAG) e inulina de alcachofa (IAL)). Después de 0, 24, 48, 72 y 96 h de fermentación, los contenidos de tres botellas Schott fueron analizadas.

4.2 Cuantificación de la biomasa

Después de abrir las botellas, su contenido fue filtrado para separar los granos de kéfir del licor. Los granos de kéfir de agua fueron lavados con 200 mL de solución isotónica estéril (8.5 g/L NaCl), y la masa total de los granos de kéfir de agua (biomasa húmeda) fue determinada. Posteriormente, 5 g de estos granos de kefir húmedos se secaron a 90°C durante 48 h para determinar la biomasa seca. El pH del licor del kéfir de agua se determinó con un potenciómetro.

Para la cuenta de microorganismos viables se utilizaron 5 g de granos de kéfir en 45 mL de solución salina estéril, la suspensión resultante fue utilizada para realizar las diluciones decimales correspondientes. Las suspensiones diluidas se inocularon en placas de agar MRS, GYC y PDA para enumerar BAL, BAC y levaduras respectivamente a 37 °C (Laureys y De Vuyst, 2014). Como una prueba confirmatoria para diferenciar las BAL y BAC, a los cultivos resultantes de los medios MRS y GYC se les realizó la prueba de catalasa. Se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno (30% v/v) en un portaobjetos y una gota de la suspensión de estos cultivos, debido a que las BAL carecen de la enzima catalasa y las BAC sí la presentan, el resultado positivo de esta prueba permitirá definir y diferenciar cualitativamente ambos tipos de bacterias (Carrillo & Audisio, 2007).

4.3 Obtención y purificación del EPS

Los cultivos de kéfir en las soluciones de sacarosa, IAG o IAL, fueron filtrados para remover la biomasa realizando varios lavados con agua destilada para procurar retirar el EPS de los granos. Posteriormente, 500 mL de la solución filtrada se mezclaron con 83.5 mL de TCA (80% v/v), la mezcla se dejó reposar durante 24 h a 4°C, para inducir la separación de las proteínas y favorecer la solubilización del EPS (Wang et al., 2019). Transcurrido este tiempo, la solución fue centrifugada a 6,000 rpm durante 30 min a 4 °C. La fase sobrenadante fue adicionada de NaOH 4N para ajustar el pH a 7.0. Para la purificación del EPS, la solución a pH 7.0 se mezcló con 3 volúmenes de etanol (96% v/v) frío y se dejó reposar durante 48 h a 4 °C, para inducir la precipitación del EPS. La solución resultante se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 min a 10°C. El precipitado que contenía el EPS fue dializado en membranas de nylon (MWCO 12,400 Da) contra agua desionizada. El EPS resultante fue liofilizado para su posterior caracterización.

4.4 Caracterización fisicoquímica de EPS

4.4.1 Determinación del contenido de azúcares.

La determinación de contenido de azúcares en el EPS se realizó mediante el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956). Primeramente, en tres tubos de ensayo se colocó 1 mL de EPS al 0.01% (p/v), se le agregó 1mL de una solución de fenol al 5% (p/v) y se agitó en un vórtex. Posteriormente, 5 mL de H₂SO₄ concentrado se agregaron cuidadosamente, mezclando y dejando reposar durante 10 min en un baño de agua a 20 °C. La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 2, Spectronics, USA) a una longitud de onda de 490 nm y se comparó contra una curva estándar de glucosa [10-100 µg/mL]. Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, dan un color amarillo anaranjado cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico concentrado, la reacción es simple y el color es estable.

4.4.2 Determinación del contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteína siguiendo el procedimiento descrito por Jiang et al. (2015). Diez miligramos de EPS se dispersaron en 5 mL de la solución amortiguadora PBS (10 mM, pH 7.0) con agitación magnética durante 24 h a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, 1 mL de EPS se mezcló con 1 mL del reactivo Bradford y se dejó reposar por 5 min en oscuridad, la absorbancia de la muestra fue leída en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 2, Spectronics, USA) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados obtenidos fueron comparados contra una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en un intervalo de concentración de 0 a 60 µg/mL.

4.5 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Los EPS fueron analizados por espectroscopia de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) en un espectro FT-IR Frontier (Perkin Elmer, E.U.A) acoplado a un accesorio ATR. Se leyó el espectro de 4000 hasta 400 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹, donde los principales grupos funcionales presentes en la estructura del EPS fueron elucidados (Radhouani et al., 2018).

4.6 Determinación de Peso molecular (PM)

Para la determinación del PM del EPS por la técnica de DLS se utilizó un equipo ZetaSizer NS (Malvern, Malvern Instruments, Reino Unido), siguiendo el procedimiento basado en las recomendaciones del fabricante. Se prepararon distintas concentraciones de EPS en un solvente adecuado, registrando el incremento del índice de refracción diferencia ($d\tilde{n}/dC$). Las muestras fueron colocadas en la celda de medición del equipo de acuerdo con el procedimiento de operación estándar del equipo con la finalidad de obtener el diagrama de Debye correspondiente, a partir del cual se estimó el valor del peso molecular como el inverso de la pendiente, y el segundo coeficiente virial como la ordenada al origen del gráfico.

4.7 Evaluación de la actividad superficial del EPS

4.7.1 Potencial Zeta (ζ)

La determinación de la carga superficial del EPS en solución fue determinada en un Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, R.U.), para ello se prepararon dispersiones al 1% (p/p) del EPS en agua desionizada, y se les ajustó el pH en un intervalo de 3.0 a 8.0. El potencial zeta (ζ) de las muestras fue registrado.

4.7.2 Tensión interfacial dinámica

La tensión interfacial dinámica se determinó usando el método descrito por Tang y Shen (2015) con ciertas modificaciones en un tensiómetro de gota pendiente OCA-20 (Dataphysics Instrument GmbH, Alemania). El montaje de la interfase agua-aceite consiste en colocar aceite filtrado en una celda de vidrio óptico. Por otra parte, la dispersión de EPS se llevó a una concentración de 1.0 % (p/p), la cual se filtró y se colocó en una jeringa de dosificación. Posteriormente la aguja de la jeringa se sumergió en la celda contenía el aceite y se procedió a formar una gota de la dispersión acuosa con un volumen 30 μL , a un determinado tiempo. Se utilizó aceite de naranja (AN).

4.8 Formulación de emulsiones O/W

Para evaluar la funcionalidad del EPS como agente emulsionante, se procedió a formular emulsiones de tipo aceite-en-agua (O/W). Brevemente, se prepararon dispersiones de EPS a una concentración del 10% (p/p), las cuales se mantuvieron bajo agitación durante 4 h a temperatura ambiente (25°C) y se almacenaron a 4°C por 12 h más para asegurar la completa hidratación.

Las emulsiones se prepararon con una fracción másica de fase dispersa de 5% ($\phi=0.05$) y 10% ($\phi=0.1$), donde la fase dispersa consistió de AN que se adicionó a la fase continua (W, dispersión de EPS) por goteo a una velocidad de homogeneización de 7, 900 rpm en un homogeneizador Ultra-Turrax T10 basic (IKA Works, Staufen, Alemania), al concluir con la adición de la fase oleosa la velocidad del homogeneizador se llevó a 11,400 rpm durante 10 min. Todo el procedimiento de mezclado se realizó colocando la muestra en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de ésta.

4.9 Morfología y distribución de tamaño de gota

La morfología de las emulsiones (O/W) se examinaron con un microscopio óptico OLYMPUS BX4S, con objetivos de 10X y 100X, el cual se encuentra acoplado a una cámara AxioCam (ERc5s). Se diluyeron las emulsiones a una razón de 1:10 en agua desionizada, fueron depositaron entre las láminas de un portaobjetos y cubreobjetos. Una vez obtenidas las micrografías de las muestras y a través del software de análisis de imágenes ZEN 2012 (Blueedition, System) se determinó el diámetro (d_{10}) de las gotas de la emulsión.

Para la distribución del tamaño de gota ($D_{4,3}$) se utilizó el analizador de tamaño de partícula por difracción de rayo láser Mastersizer 2000 (Malver Instruments, Reino Unido), se empleó un índice de refracción de 1.333 para el medio dispersante.

5.1 Análisis estadístico

Todos los tratamientos se trabajaron por lo menos por triplicado, el análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparación de media por medio de la prueba de Tuckey ($p<0.05$), empleando el software SPSS 18.0 (IBM, USA).

Capítulo V. Resultados y Discusión

En esta sección se presentarán los resultados experimentales obtenidos para las primeras secciones, y un acercamiento a las caracterizaciones que se han realizado este tipo de EPS por diferentes grupos de investigación, debido a que no fue posible concluir toda la planeación experimental que se tenía contemplada.

5.1 Cultivos de kéfir de agua

Una vez que los granos de kéfir de agua fueron acondicionados, el crecimiento de éstos se evaluó mediante la adición de sacarosa, IAG e IAL, las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 7, donde puede observarse que, a partir de las 48 h de cultivo, no hubo cambio significativo en la cantidad de biomasa, partiendo de 50 hasta 60 g en un tiempo de 48 h, con un incremento en base seca del 5%, aproximadamente. Este resultado es similar al reportado por Laureys & De Vuyst (2014). Estudios realizados por Guzel et al. (2011) referentes al crecimiento de la biomasa de granos de kéfir con distintos sustratos hacen mención al uso de inulina (2%), durante los primeros 7 días de la fermentación no se mostró un aumento significativo de la biomasa, hasta al cabo de 30 días incrementó en un 129.5%.

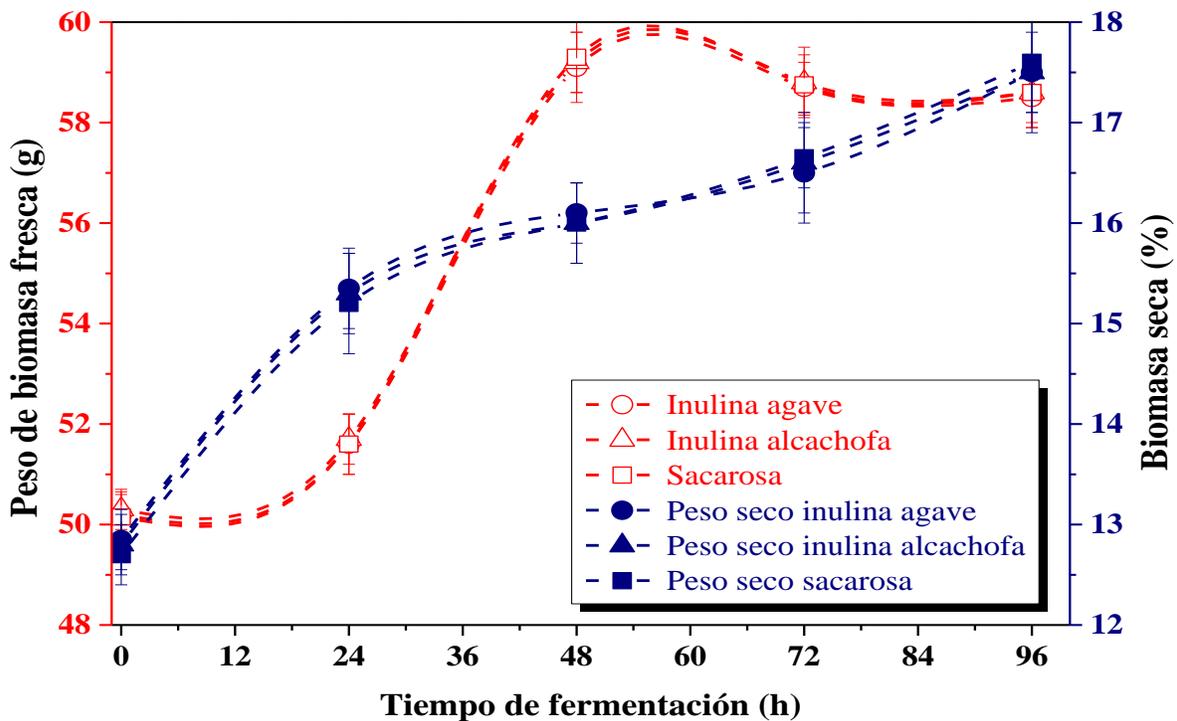


Figura 7. Producción de biomasa de granos de kéfir en peso fresco (g, - - -), y en biomasa de kéfir de agua en seco de granos de kéfir (% - - -) en función del tiempo

Asimismo, durante este crecimiento de biomasa, se realizó la cuantificación del consumo de sustrato por medio de la determinación de los azúcares totales en el medio de cultivo, el perfil normalizado de este consumo se muestra en la Figura 8.

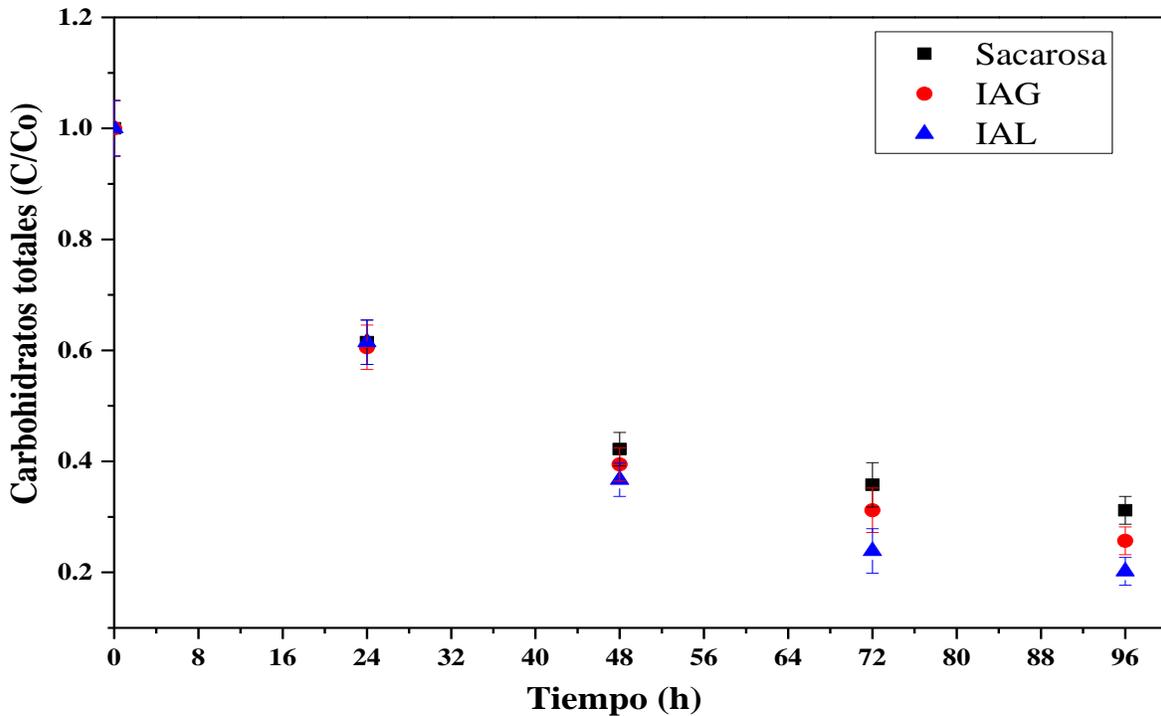


Figura 8. Consumo de sustratos en función del tiempo.

De acuerdo con estos resultados, se puede observar que la IAL presentó una menor reducción de carbohidratos totales disponibles en el medio de cultivo al cabo de las 96 h, aunque hasta las primeras 48 h no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración, seguida de IAG, y por último la sacarosa, dando un primer indicio sobre la preferencia de este último sustrato por el cultivo de kéfir de agua. Cabe mencionar que la sacarosa como fuente de carbono presentó la mayor reducción en su contenido respecto a las dos inulinas.

Para evaluar la diversidad poblacional de los microorganismos presentes en las fermentaciones de los granos de kéfir, se realizó la cuenta en placa de las UFC (unidades formadoras de colonias) en los medios MRS para BAL y PDA para levaduras, la cuenta en el medio GYE para las BAA no pudo realizarse. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diversidad poblacional microbiológica de granos de kéfir.

Microorganismos	Fuente de carbono		
	IAL	IAG	Sacarosa
BAL (log UFC/mL)	7.95 ± 0.2	7.85 ± 0.3	7.05 ± 0.2
Levaduras (log UFC/mL)	6.89 ± 0.3	6.82 ± 0.5	6.1 ± 0.4

A partir de los resultados se encontró que, al cabo de las 96 h, las BAL se encontraban en mayor proporción por sobre las levaduras con valores de entre 7.95 –7.05 log UFC/mL, mientras que para levaduras resultados de 6.89 – 6.1 log UFC/mL esto para las fermentaciones con las tres fuentes de carbono, este comportamiento coincide con lo reportado por Laureys & De Vuyst (2014), quienes reportan cuentas de levaduras y BAL viables en el licor de kéfir de agua de 6.3 ± 0.2 y 6.9 ± 0.1 log UFC/mL, e indican que las colonias de BAC sólo fueron visibles hasta un tiempo de fermentación superior a las 144 h.

Además, en estudios realizados por Teixeira et al. (2011) reportan que en cultivos con kéfir brasileño las BAL fueron el grupo de microorganismos más frecuentemente encontrado con aproximadamente 60.5 %, seguido de las levaduras con un 30.6 % y las BAA con un 8.9% en la población. Asimismo, Costa dos Santos et al. (2019) reportan que el uso de inulina en tratamientos de fermentación con granos de kéfir exhibe un mayor crecimiento de bacterias y levaduras, debido a que ayudan a mantener la viabilidad de los microorganismos en el desarrollo del producto. Cabe mencionar que como se esperaba, cuando se realizó la prueba de catalasa a los cultivos obtenidos a partir del medio MRS no mostraron actividad catalasa, lo que confirma la presencia de BAL.

5.2 Obtención del EPS

De acuerdo con los resultados mostrados anteriormente, se decidió realizar las fermentaciones con una duración de 48 h, donde los microorganismos todavía tienen sustrato suficiente y sin diferencia significativa. Al cabo de este tiempo, se realizó la separación del EPS, encontrando rendimientos de producción como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de producción del EPS con distintos sustratos

EPS	Rendimiento de producción (mg/L)
Sacarosa	122.2 ± 1.64
IAG	336.0 ± 1.46
IAL	332.0 ± 1.39

Este valor es cercano, aunque inferior, a los rendimientos reportados por Hasheminya & Dehghannya (2020), quienes reportan rendimientos desde 1.37 hasta 4.32% para muestras de kéfir de agua donde se empleó agua caliente y/o ultrasonido. Además, estos autores reportan que si bien, el uso de temperaturas elevadas puede mejorar la extracción de los EPS debido a que mejora la disolución del EPS en el medio de extracción, también puede provocar su degradación térmica estructural, provocando reducción en el rendimiento de extracción. Asimismo, se reportan datos similares por Chen et al. (2015) quienes informaron sobre rendimientos de 223.3 mg/L en un tiempo de 16 h, utilizando como sustrato leche y Fukada et al. (2010) para un EPS producido por *Lactobacillus fermentum* con diferentes fuentes de carbohidratos, con glucosa la producción fue de 69.0 mg/L en un periodo de 24-48 h, debido a que se observó una disminución del rendimiento de EPS a las 72 hr. Estudios realizados por Ayala Montaner et al. (2018) sobre el efecto prebiótico de la inulina en *Lactobacillus salivarius*, muestran resultados favorables utilizando inulina de agave para fomentar el crecimiento de bacterias probióticas. Además de ser la inulina un fructano se considera como un prebiótico, el cual ejerce un efecto benéfico a través de mecanismos directos o

indirectos, así como estimular el crecimiento de bacterias ácido lácticas responsable en su mayoría de la producción del EPS (Sosa- Herrera et al., 2016).

5.3. Caracterización del EPS

EL análisis fisicoquímico del EPS obtenido de los granos de kefir de agua mostró que éste se encuentra compuesto por carbohidratos y proteínas, el cual se presenta en la Tabla 3, el contenido de proteínas osciló entre el 1.0 – 2.2% base seca y de contenido de carbohidratos entre 200- 490 mg/g EPS. Estos resultados se encuentran dentro de los reportes para EPS de kefir de agua por Hasheminya & Dehghannya (2020), quienes indican que su EPS osciló entre el 86.23 y 89.94% para carbohidratos y de 0.12- 1.22% para proteína y por los reportados por Botelho et al. (2014) en EPS fermentado por leche de soya, que muestran 221.03 mg/L en contenido de carbohidratos y un 2% en contenido de proteína.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del EPS

Fuente de carbono	Contenido (mg/gEPS)	
	Carbohidratos	Proteína
Sacarosa	281.1 ± 21.1	24.98 ± 0.18
IAG	210.2 ± 6.1	11.30 ± 1.03
IAL	494.6 ± 9.4	15.83 ± 0.54

Cabe mencionar que el EPS de IAL mostró el mayor contenido en carbohidratos totales mientras que el EPS de IAG el menor contenido, esto se relaciona con una mejor asimilación de la fuente de carbono, el grado de polimerización (GP) y las ramificaciones de la molécula que afectan la degradación de la inulina, debido a que la IAG posee un bajo GP, esto propicia a una mayor solubilidad, lo cual favorece su degradación (Ayala et al., 2018). Debido a que la IAL tiene un alto $GP \leq 60$, presenta compuestos remanentes de alto GP, estos propician a una degradación lenta y un efecto probiótico prolongado, mientras que la IAG presenta un $GP \leq 30$ y una degradación mayor.

Además de que el EPS de IAL podría proporcionar mayor estabilidad estérica, debido a que tiene una proporción suficientemente alta para que se adsorba la proteína en la interfase, pero mayor residuo de carbohidratos proyectados en la fase continua, causando esto la repulsión estérica.

Por otra parte, la IAG mostró menor cantidad de proteínas asociadas a la molécula y la sacarosa el mayor contenido de está por sobre las otras fuentes de carbono, esto se puede relacionar con el proceso en el que proteínas que fueron parte de la secreción de los microorganismos contenidos en los granos de kéfir (lisis celular) o bien algunas células completas pudieran ser arrastradas hacia los componentes del EPS, contribuyendo al contenido de proteína.

5.4 Diámetro hidrodinámico del EPS

La determinación del diámetro hidrodinámico de los EPS se realizó para las muestras obtenidas de cada uno de los sustratos en las primeras 24 y 48 h de fermentación, los resultados se muestran en la Tabla 4 y Figura 9. A partir de los datos de la Tabla 4, se observa que el tipo de sustrato sí tuvo un efecto sobre el diámetro hidrodinámico, y que el tiempo de fermentación también influyó sobre las características de tamaño de los EPS, siendo el EPS obtenido con IAL a 24 h, el que presentó mayor diámetro hidrodinámico, sufriendo una caída drástica en las siguientes 24 h. A diferencia de las inulinas, el uso de sacarosa mostró que el EPS obtenido incrementaba su tamaño conforme el tiempo de fermentación se incrementaba, mientras que, en las inulinas, esta tendencia fue opuesta.

Tabla 4. Diámetro hidrodinámico (d_h) y valor medio de los EPS con Sacarosa, IAG e IAL

Sustrato	Tiempo (h)	d_h (nm)
Sacarosa	24	190.50 ± 21.93
	48	255.50 ± 19.07
IAG	24	109.10 ± 11.74
	48	61.86 ± 25.64
IAL	24	509.5 ± 18.33
	48	28.19 ± 12.35

De acuerdo con los gráficos mostrados en la Figura 9, en concordancia con los datos de la Tabla 4, se puede observar que los perfiles de distribución de diámetro hidrodinámico presentan cambios de acuerdo con el tiempo de fermentación, pasando de sistemas más polidispersos a sistemas con menor polidispersidad (Pdl), y en el caso de las inulinas, a EPS con menor tamaño.

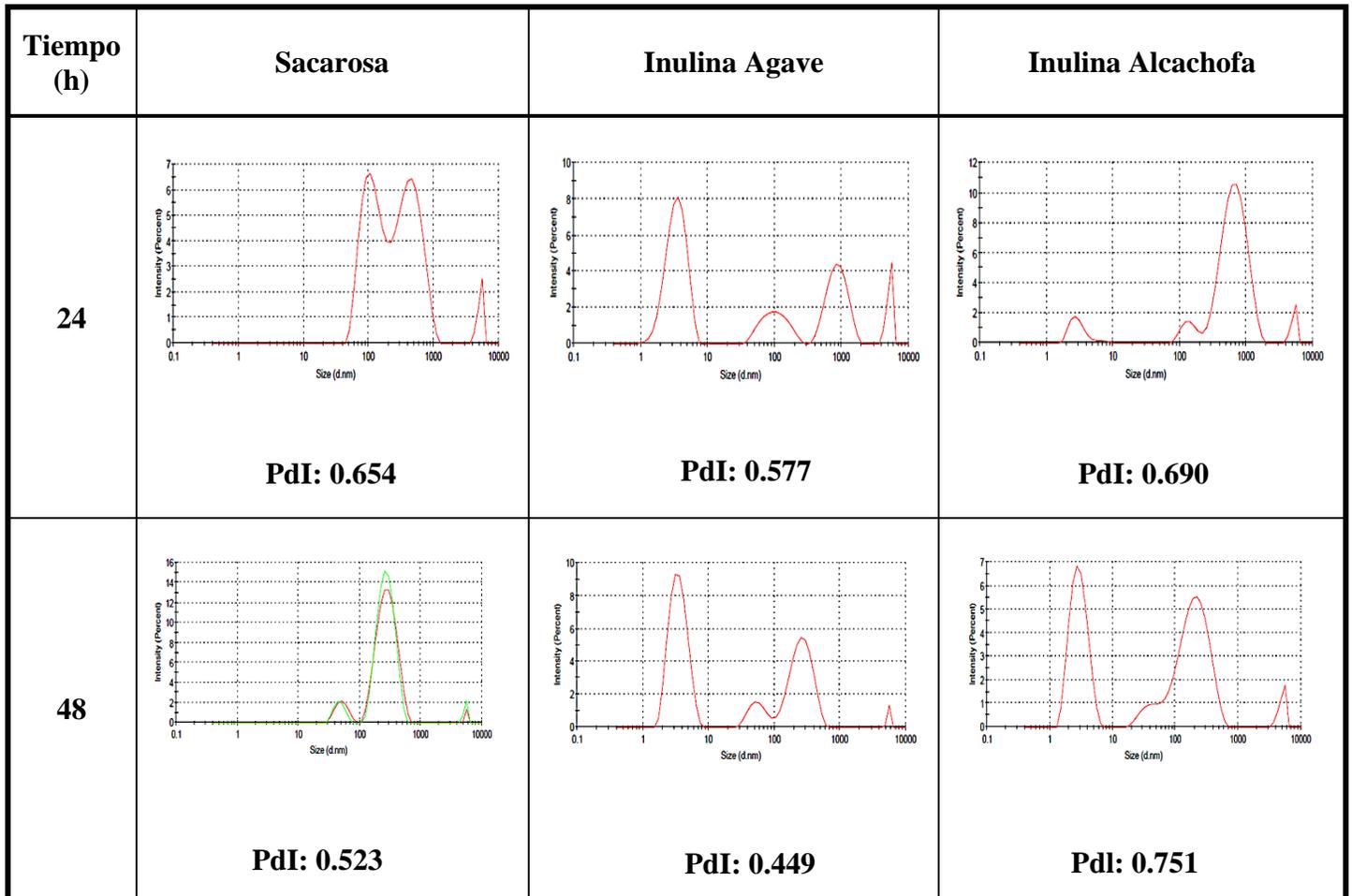


Figura 9. Perfiles de distribución de diámetro hidrodinámico de los EPS y su índice de polidispersidad (PdI)

5.5 *Peso molecular (PM)*

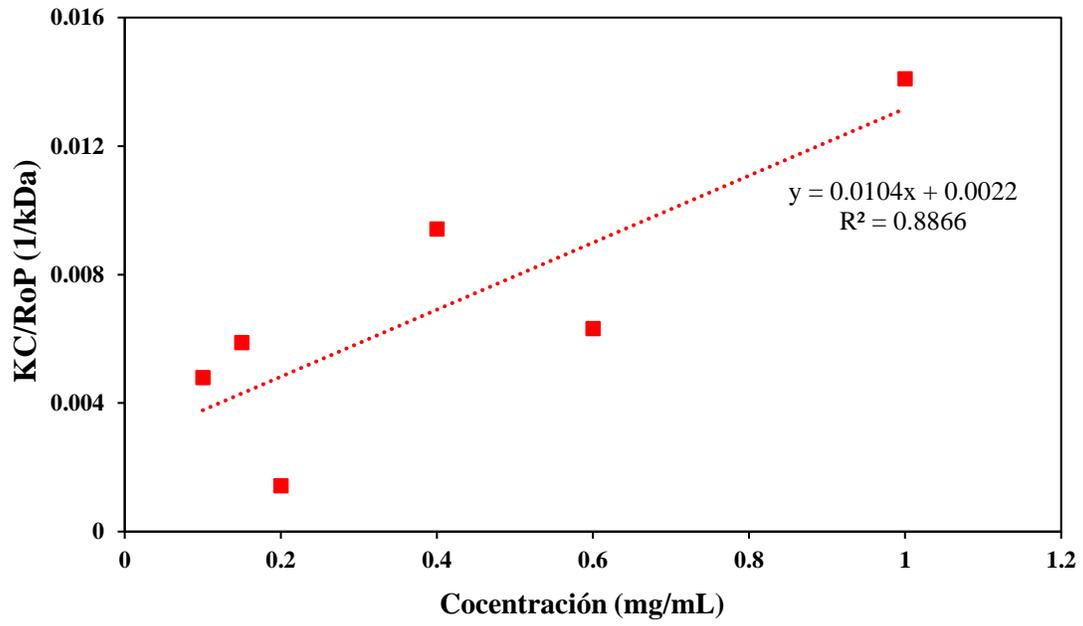
La determinación del PM de biopolímeros como lo son los EPS mediante el uso de dispersión de luz dinámica (DLS), ha sido reportado por el grupo de investigación en el trabajo realizado por De los Santos Trinidad (2020). Ésta es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión y así observar las interacciones de los polímeros a través del incremento del tamaño de los polímeros formados.

La descripción del fundamento de la técnica se centra en que cuando un haz de láser alcanza las partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles, donde los haces de luz dispersados por las distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí (Cuadros et al., 2014).

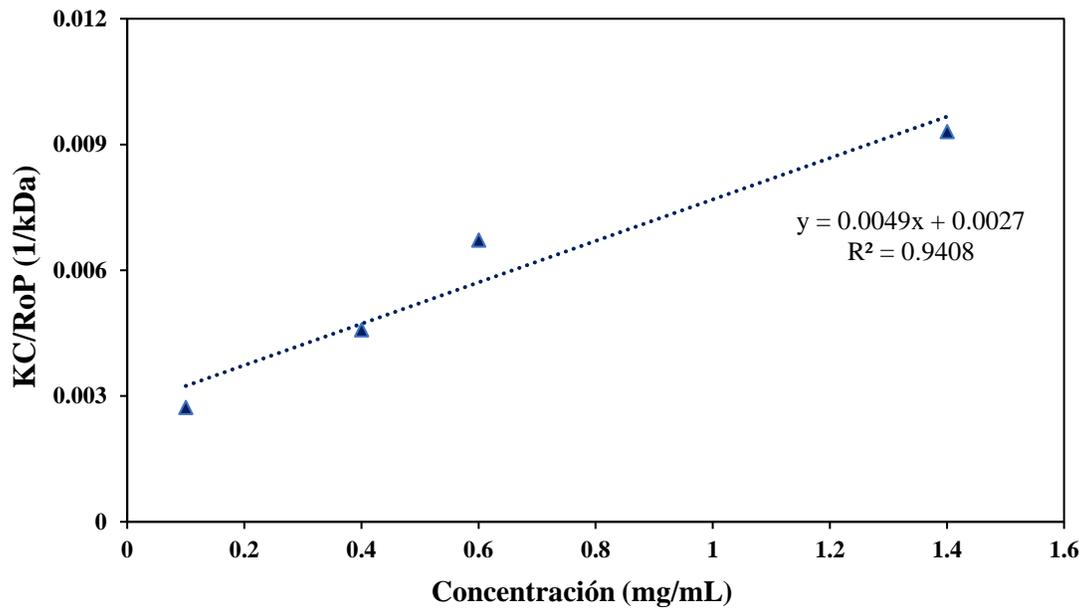
A partir de las mediciones en la suspensión de EPS se utilizó la expresión de Rayleigh la cual genera el gráfico de Debye, que es un ajuste lineal de KC/R_{θ} vs Concentración, la cual a través de una regresión lineal de los datos proporcionados, permite calcular los valores del PM a través del inverso de la intersección de la curva, mientras que la pendiente estará relacionada con el 2do coeficiente virial (A_2) como se muestra en la ecuación 1 (Zetasizer Nano Application Note MRK528-01)

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \frac{1}{PM} + 2A_2 \quad (1)$$

Por lo que el PM estimado para el EPS a partir de los datos de regresión de la Figura 10 fueron de 454.54 ± 16 (a) y 370.37 ± 3.45 (b) kDa, con un valor A_2 de 0.0052 y 0.00245 mL mol/g² para IAG e IAL, respectivamente. Cabe mencionar que el valor de A_2 representa la fuerza con la que las moléculas del EPS interactúan y se ha relacionado con la solubilidad de la muestra, es decir, valores de A_2 negativos indican que la molécula de estudio tendería hacia la agregación y no a la solvatación. Es preciso mencionar que estos valores son cercanos pero inferiores a los reportados por autores como Marangori Júnior et al. (2020) y Exarhopoulos et al. (2018), quienes reportan para EPS de kéfir de agua 614.4 kDa, además Wang & Bi (2008) quienes indican valores de 150 kDa para EPS kefiran utilizando maltosa como fuente de carbono y los encontrados por De los Santos Trinidad (2020) para el EPS de kéfir de leche, son de 491.89 ± 23 kDa, y que las diferencias pueden estar relacionadas con factores como el tipo de sustrato que se suministra para el cultivo microbiano, además de las condiciones de extracción del EPS de la biomasa de los granos de kéfir.



(a)



(b)

Figura 10. Gráficos de Debye para el EPS obtenido con IAG e IAL.

Es importante mencionar que las secciones que a continuación se describirán, no pudieron concretarse completamente de forma experimental, debido a la situación de emergencia sanitaria por COVID-19, sin embargo, debido a que es importante describir y discutir estas características, la presentación y discusión de las mismas tendrá una base teórica, de acuerdo con la información encontrada en la bibliografía.

5.6. Espectroscopía de FT-IR.

La espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) es una técnica que permite evaluar de forma cualitativa la presencia de grupos principales en una molécula, siendo de gran importancia para obtener un primer acercamiento sobre la estructura de biopolímeros como los EPS.

De los espectros obtenidos, en el que proporciona mayor información fue el de sacarosa comparado con el de IAG e IAL. Respecto a los EPS de kéfir de agua, los espectros de infrarrojo presentados en la Figura 11 han mostrado que este tipo de biopolímeros presentan señales amplias y redondeadas alrededor de los 3300 cm^{-1} , el cual ha sido asociado con la presencia de grupos -OH intramolecular o intermolecular de los polisacáridos; también se han observado grupos metilenos (2924 cm^{-1}) dicha banda se asoció con la vibración de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo alifático (CH_2); las bandas en el rango entre 1660 y 1220 cm^{-1} son características asimétricas y simétricas que se extienden de los enlaces C=O, específicamente amida I (1643 cm^{-1}); y la región característica de los carbohidratos entre los 1200 - 900 cm^{-1} , y la banda correspondiente a los 1030 cm^{-1} es característica a los compuestos de polisacáridos, además, los pico encontrados alrededor de los 900 cm^{-1} se han señalado como indicativos de la presencia de modos de vibración de la glucosa, galactosa y de las configuraciones β -glicósidos en la estructura del kefirán. Estos perfiles de IR resultan ser similares para a los espectros de kefiran en leches fermentadas como el mostrado en la Figura 11 (Wang et al., 2010; Zajsek et al., 2011; Feng et al., 2012; Botelho et al., 2014; Esnaashari et al., 2014; Pop et al., 2016; De los Santos Trinidad, 2020; Hasheminya y Dehghannya, 2020; Marangori Júnior et al., 2020).

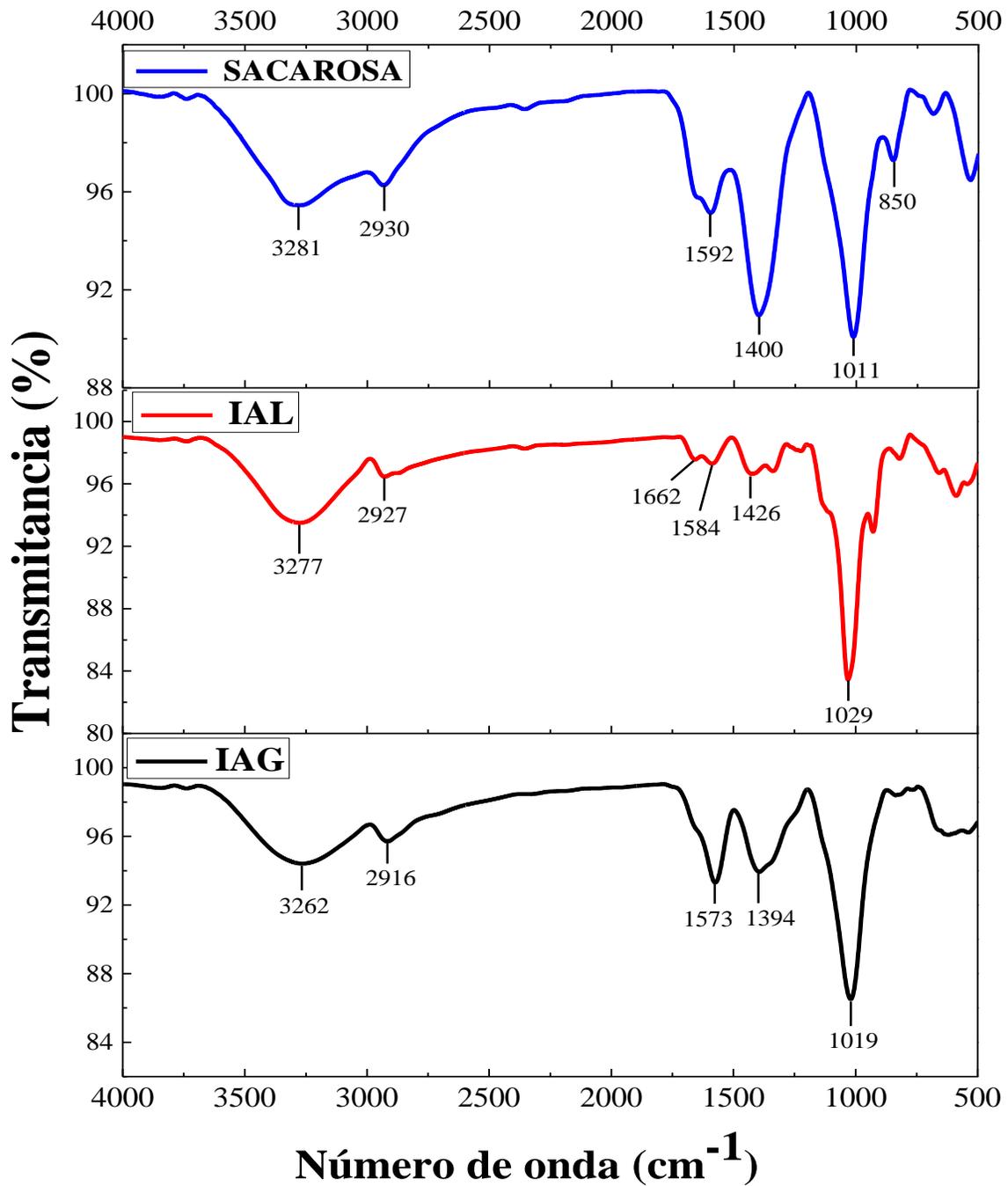


Figura 11 . Espectros IR de EPS de kéfir de agua obtenidos con las distintas fuentes de carbono.

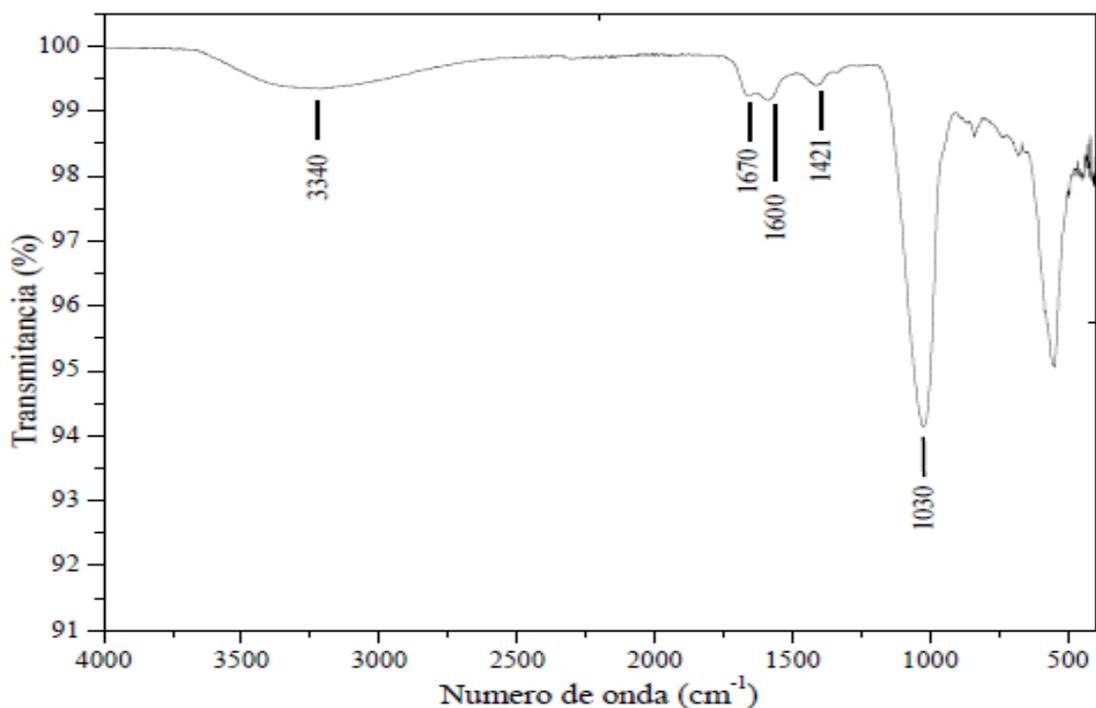


Figura 12. Espectro IR de EPS de kéfir de leche. Tomada De los Santos Trinidad (2020)

Se tomo de referencia el espectro IR del EPS de kéfir de leche (Figura 12) para identificar cuáles de estos grupos funcionales se encuentran en el EPS de kéfir de agua obtenido de distintas fuentes de carbono, se puede observar que en ambas figuras la señal de alrededor de los 3330 cm^{-1} se encuentra presente, se asocia a los grupos hidroxilo, se puede observar que en el EPS de kéfir de agua (Figura 11) las señales debidas a la vibración del estiramiento O-H tuvieron una mayor intensidad que la obtenida por el kefiran estas señales también se asocian a moléculas de agua presentes, asimismo se exhibe una señal adicional de 2925 cm^{-1} que se relaciona con la vibración del estiramiento simétrico y asimétrico del grupo alifático (CH_2), la cual está presente en los EPS de kéfir de agua, en sacarosa se encuentra con mayor intensidad y en el kéfir de leche está ausente. Posteriormente se muestran similitud en las señales del EPS de IAL con el kefiran en la región de 1660 a 1400 cm^{-1} , alrededor de 1660 cm^{-1} es un indicativo de vibración de estiramiento de $\text{C} = \text{O}$ (amida I), 1580 cm^{-1} indicativo de flexión $\text{N} - \text{H}$ (amida II) y estiramiento $\text{C} - \text{N}$ correspondiente a moléculas de proteínas, y para 1420 cm^{-1} indicativo de aniones del grupo carboxilo COO^- , por el contrario, el EPS de IAG y sacarosa no mostraron la señal de 1660 cm^{-1} .

Por último, la señal que se encuentra con mayor intensidad correspondiente a los polisacáridos es la de alrededor de 1030 cm^{-1} (indicativo de estiramiento de -OH), presente en ambas figuras (Feng et al., 2012; Botelho et al., 2014; Pop et al., 2016).

5.7 Actividad superficial del EPS

5.7.1. Potencial zeta.

El potencial zeta representa una propiedad que determina la magnitud de la carga superficial de la molécula. De acuerdo con los resultados reportados por Exarhopoulos et al. (2018), el potencial zeta de las dispersiones de kefiran fue de -7.26 mV a un pH de 6.63, disminuyendo su carácter aniónico conforme el pH se reducía.

Por otra parte, se reportó un comportamiento semejante para el EPS de kéfir de agua, con una potencial zeta alrededor de -13 mV para un pH de 7 y de -3 mV para un pH de 3. Este comportamiento fue semejante en los tres EPS de kéfir de agua obtenidos con sacarosa, IAG e IAL que se presentaron bajo el mismo intervalo de pH. Este comportamiento indica que los EPS en valores de pH cercanos a la neutralidad exhiben fuerzas de repulsión electrostática coloidal que contribuye a su estabilidad en la dispersión, y que conforme el pH se acidifica, éstos son más propensos a exhibir fuerzas atractivas de Van der Waals dominantes respecto a las fuerzas de repulsión electrostática, debido a que reducen su carga superficial (Exarhopoulos et al., 2018).

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de potencial zeta para el EPS de kéfir de agua, con las distintas fuentes de carbono empleadas. En donde se puede observar el comportamiento de los EPS con en el aumento del pH, si bien entre las cadenas que conforman los EPS se encuentran grupos de ácidos carboxílicos que además tiene una pequeña cantidad de proteína covalentemente ligada, la parte que se ionizará será el grupo carboxilo, cuando el pH es 3 el medio se encuentra protonado dicho grupo no se ionizará debido a que existen muchos contraiones $[\text{H}^+]$ es decir los grupos funcionales están “saturados”, pocos serán los grupos ionizados de tal forma que prácticamente no se tiene cargas. Mientras que, a medida que el pH se va neutralizando el medio adquiere carácter básico y en este punto más grupos carboxilos se ionizarán por ende incrementará el valor negativo del potencial zeta, de esta forma habrá más grupos que se repelen principalmente por el efecto de la doble capa eléctrica. Es por ello que bajas cantidades de potencial zeta generalmente indican inestabilidad (Celis et al., 2015).

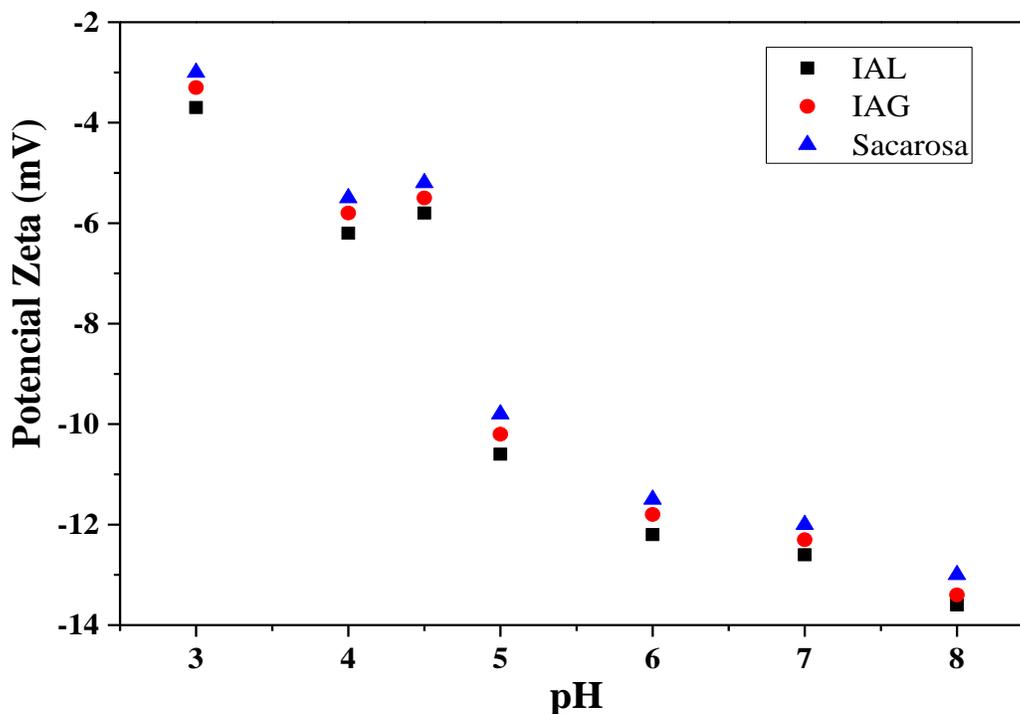


Figura 13. Perfil de potencial zeta en función del pH para EPS de kéfir de agua.

5.7.2. Tensión interfacial dinámica

La reducción de la tensión superficial o interfacial es una propiedad que exhiben las moléculas anfifílicas en soluciones acuosas, como los EPS, lo cual puede atribuirse a la composición fisicoquímica (contenido de proteína y carbohidrato), donde las moléculas con actividad superficial tienen dentro de su estructura, fracciones o residuos tanto hidrofílicos como lipofílicos y que le permite tener la capacidad para reducir las fuerzas de cohesión de las fases agua y aceite, permitiendo que la interacción entre éstas se favorezca (Pilotzi, 2015).

Este tipo de pruebas no es muy frecuente en la caracterización que se realiza para las propiedades funcionales de los EPS, sin embargo, este tipo de técnicas permite establecer los usos potenciales de macromoléculas (gomas, proteínas, almidones, EPS, entre otros), como agentes con actividad superficial con capacidad para formar y estabilizar sistemas dispersos (hidrogeles, emulgeles, emulsiones, espumas, etc.).

De acuerdo con la información reportada en el grupo de investigación, en EPS obtenidos de kéfir de leche, la tensión interfacial entre una dispersión de EPS al 1% en aceite de naranja (AN) era de 7.5 mN/m, cuando se presentó la modificación del EPS de IAG e IAL la tensión interfacial

disminuyo hasta 2.8 mN/m al cabo de 20 min, representando un 58.3% de reducción, respecto al valor inicial en la película interfacial recién formada.

A diferencia de cuando se empleó el EPS obtenido de kéfir de leche, como se muestra en la Figura 14. Estos cambios se pueden atribuir a menores tamaños de las moléculas tanto del EPS de IAG como IAL, porque moléculas más grandes y con ramificaciones mayores tendrían una tendencia a migrar a la interfase más lentamente, en cambio con moléculas de menor tamaño y que tienen este carácter anfifílico con una fracción de proteína y carbohidrato, pueden difundirse más rápidamente en la interfase y esto contribuye con una reducción de la tensión interfacial más rápido, y se puede observar que en los primeros minutos existe una reducción de hasta 5 mN/m y después de tiempo de 10 minutos permanece constante.

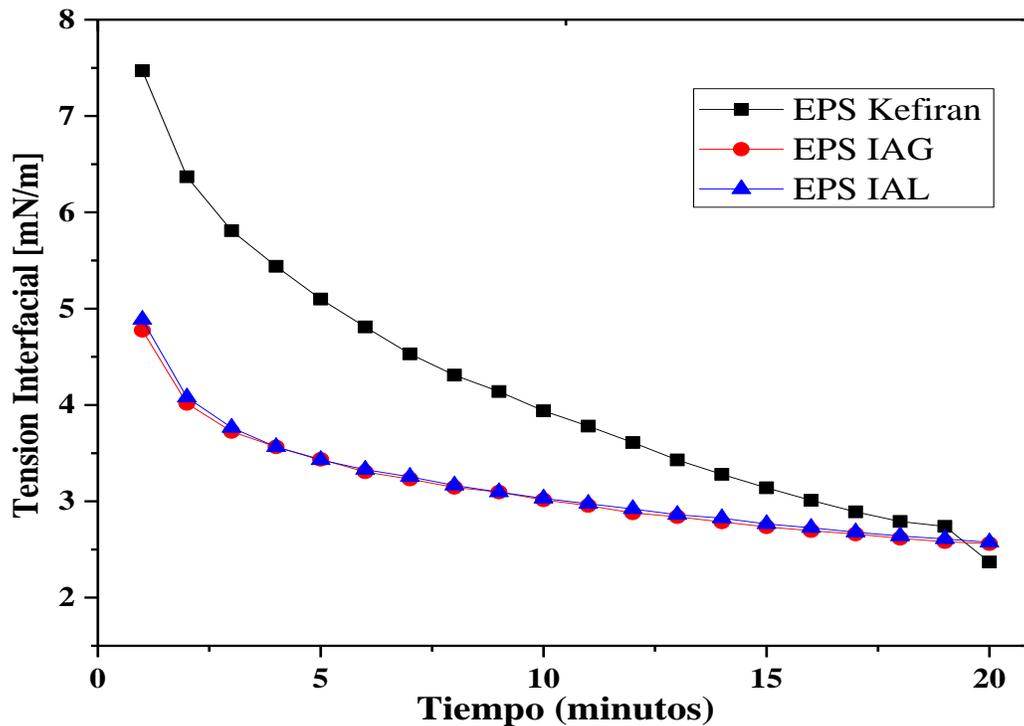


Figura 14. Perfil de tensión interfacial para *EPS de kéfir de leche y EPS de kéfir de agua.

(*Tomado de: De los Santos Trinidad, 2020)

5.8 Caracterización y estabilidad de emulsiones

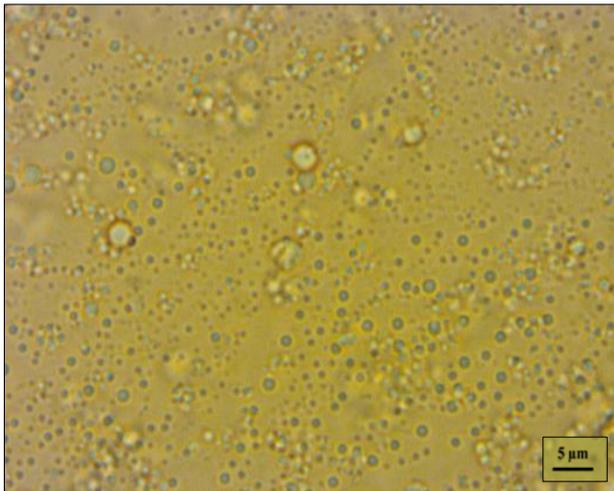
Para realizar la caracterización de las emulsiones, se evaluó la distribución y tamaño de gota, morfología y la estabilidad.

5.8.1 Morfología y distribución de tamaño de gota

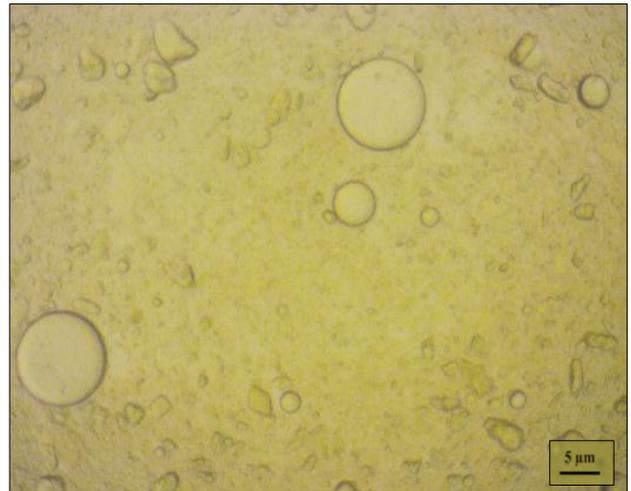
Las emulsiones formadas por el EPS de sacarosa fueron observadas en un microscopio óptico para evaluar la morfología de los sistemas dispersos y mediante la técnica basada en difracción de rayo láser se obtuvo el tamaño de gota promedio.

Las micrografías que fueron tomadas de las emulsiones, se captaron con objetivos de 10X y 100X, los resultados se muestran en la Figura 15.

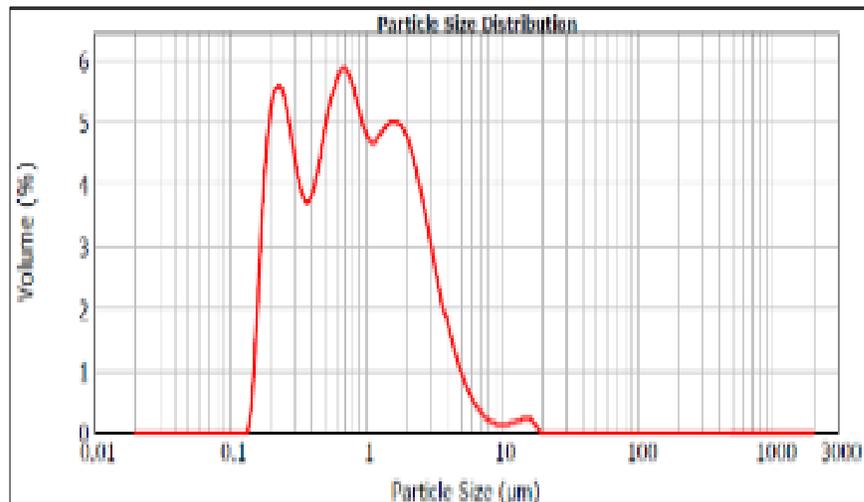
Micrografía 10 X



Micrografía 100 X

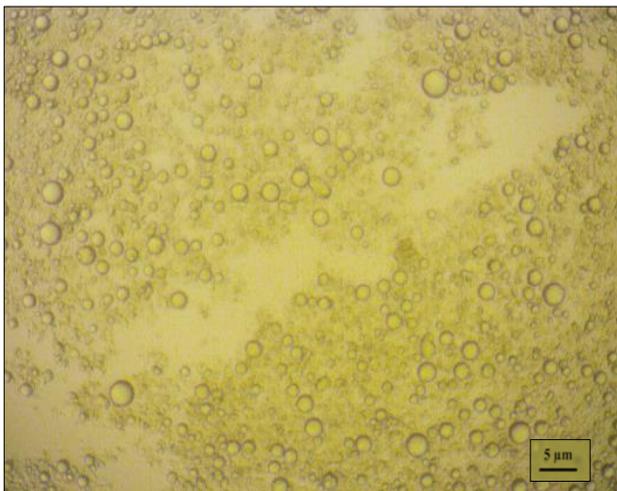


PSD

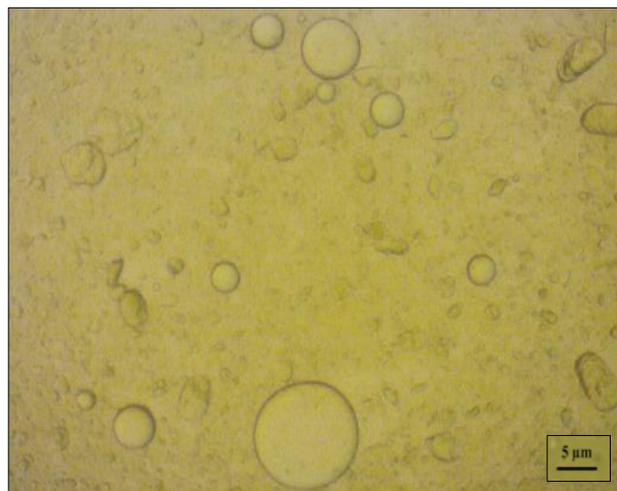


a

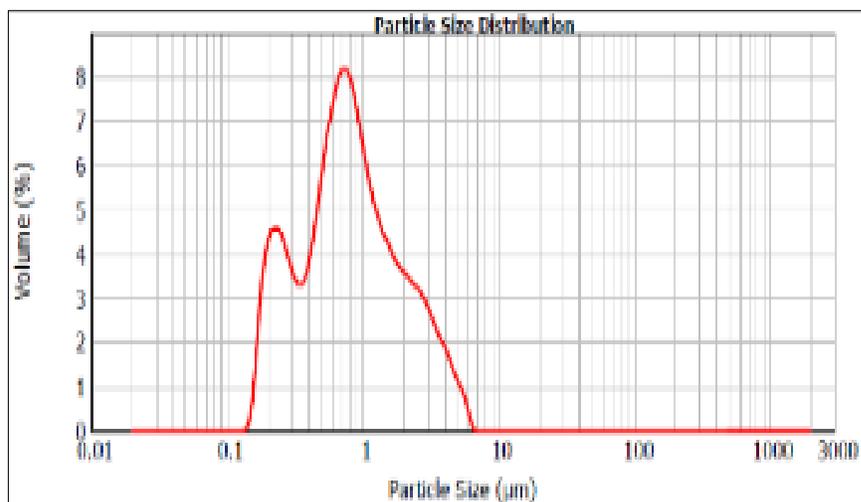
Micrografía 10 X



Micrografía 100 X



PSD



b

Figura 15. Micrografías de emulsiones O/W con EPS de sacarosa observadas a 10X y 100X para: a) EPS de sacarosa AN (5%), b) EPS sacarosa AN (10%).

Tabla 5. Diámetro volumétrico de momento (D_{43})

Muestra	D_{43} (μm)
EPS AN (5%)	1.242 ± 0.032
EPS AN (10%)	1.177 ± 0.027

Los tamaños de gota que las emulsiones exhibieron demuestran que los sistemas presentan cierta polidispersidad, debido a que el tamaño de estas no fue totalmente homogéneo, en el caso de las muestras con objetivo 100X la homogeneidad de las partículas no se pudo observar adecuadamente, esto se asocia con porciones de EPS que no se solubilizaron.

La Figura 15 presenta las micrografías de las emulsiones a 10X y 100X, así como la curva de distribución de tamaño de gota (PSD), y en la Tabla 5 los valores del diámetro volumétrico de momento (D_{43}) a un tiempo= 0 h, estabilizadas con el EPS de sacarosa empleando dos diferentes porcentajes de aceite de naranja (AN).

Asimismo, las imágenes de las emulsiones con AN al 5% mostraron un tamaño de gota con menor homogeneidad dando así un PSD multimodal y con AN (10%) un PSD bimodal. Sin embargo, las emulsiones con mayor contenido de AN mostraron valores del diámetro D_{43} menores, esto se asocia con la concentración de aceite dado que la viscosidad de la emulsión será mayor y la movilidad de las gotas será menor, por lo tanto, la estabilidad es mayor.

5.8.2 Estabilidad de las emulsiones O/W

La estabilidad de una emulsión se asocia a la persistencia o decaimiento del sistema disperso bajo ciertas condiciones. Una emulsión puede permanecer sin cambios bajo ciertas circunstancias y romperse fácilmente frente a otras; son de importancia los cambios eventuales en la temperatura, los procesos de ruptura que involucran efectos físicos como gravedad artificial, movimiento Browniano o agitación, pero es más común el estudio de una emulsión almacenada a temperatura constante y bajo condiciones de gravedad normales. Para determinar la ruptura de la emulsión como función del tiempo una medida válida es la determinación de la distribución de tamaños (Salager , 2000).

El tamaño de partícula es uno de los factores ligados a la funcionalidad de los sistemas dispersos como las emulsiones (Damodaran, 2008), puesto que se encuentra relacionado con la estabilidad física de estos sistemas, esta característica fue monitoreada para conocer la velocidad de coalescencia y conocer la estabilidad que se tiene en emulsiones tipo O/W empleando EPS de sacarosa.

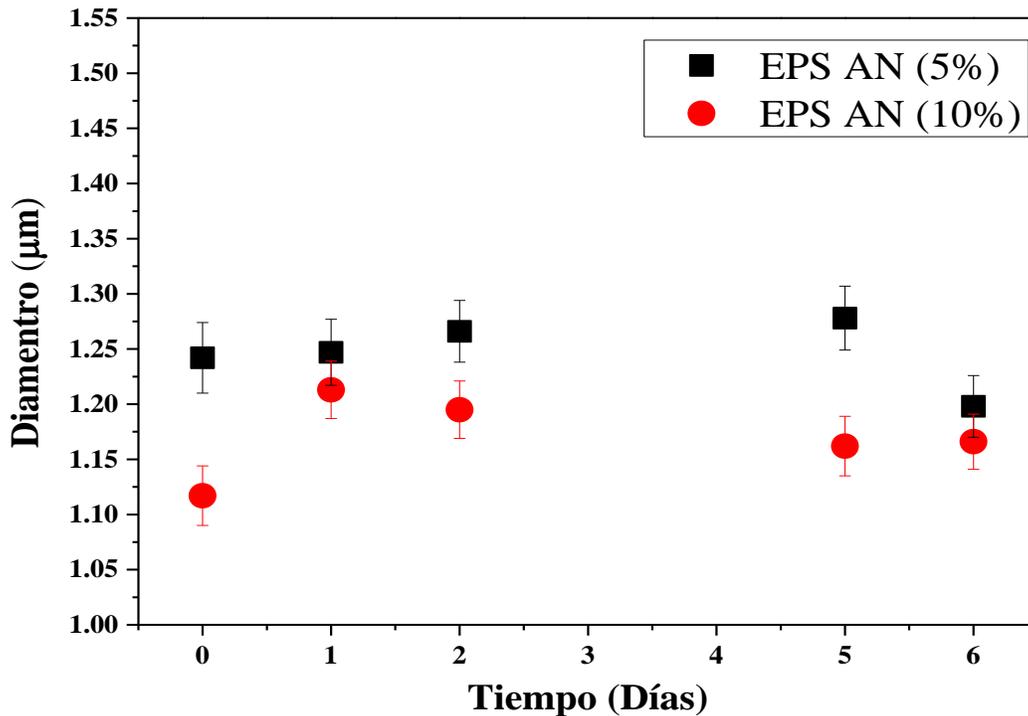


Figura 16. Evaluación de estabilidad de las emulsiones de EPS de sacarosa formuladas con AN.

La evaluación del cambio en el tamaño de gota durante el almacenamiento de las emulsiones no mostró cambios significativos al término del almacenamiento, se sabe que un menor cambio en el tamaño de gota indica mayor estabilidad en la emulsión. La Figura 16 muestra el diámetro de las emulsiones estabilizadas con el EPS de sacarosa a diferentes porcentajes de contenido de aceite de naranja (AN), si bien durante el tiempo de almacenamiento se presentó cierto aumento y disminución del diámetro (μm) de las gotitas, se puede atribuir a los arreglos estructurales del EPS en la interfase y que estos arreglos de compactación generen fenómenos de aglomeración, floculación, incluso de coalescencia y permita el aumento de tamaños de gota. En conclusión, los tamaños de gota de las emulsiones no presentaron cambios considerables al cabo de 6 días.

Si bien el estudio de EPS provenientes de BAL ha recibido un gran interés debido a las propiedades que presentan como lo son alta estabilidad térmica y solubilidad las cuales se pueden utilizar como aditivos alimentarios, además de presentar características como agentes viscosificantes o gelificantes, se ha demostrado que el EPS que se produce de varias especies de bacterias como las encontradas en los cultivos de kéfir de agua y de leche mostradas anteriormente, poseen mayores actividades de viscosidad, espesamiento, estabilización, gelificación y emulsión que algunos otros polímeros utilizados comercialmente (Yang et al., 2018; Prasanna et al., 2012).

Debido a esto, diversos autores han realizado estudios empleando EPS como agentes emulsificantes. Prasanna et al. (2012) emplearon el uso de EPS con BAL del género *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CCUG 52486 y *Bifidobacterium infantis* NCIM 702205, las cuales se compararon con emulsiones preparadas con dos EPS, goma xantana y goma guar a una concentración de 1 mg/ mL usando diferentes aceites, ambos EPS *Bifidobacterium* presentaron mayor actividad de emulsificación con los distintos aceites comparado con las gommas, además de las emulsiones preparadas con aceite de semilla de girasol fueron estables durante 7 días a 25°C. También, evaluaron los posibles efectos en la concentración de EPS en la estabilidad de la emulsión, usaron de 0.25 – 1.5 mg/mL, pero el uso de 1 mg/mL es la concentración optima, debido a que no hay una mejora en la actividad de emulsificación a concentraciones más altas.

En el caso de Wang et al. (2008) utilizaron EPS producidos por *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 el cual se aisló de granos de kefir empleando como medio leche cultivada del Cáucaso. La estabilidad de la emulsión del EPS de *L. kefiranofaciens* ZW3 se comparó con, goma xantana, goma guar y goma acacia. El EPS retuvo 91.25% y 88.09% de la actividad de emulsificación después de 30 y 60 min, comparando este resultado con la goma xantana la cual produjo 92.66% y un 81.10% de actividad en 30 y 60 min respectivamente.

Yang et al. (2018) purificaron, aislaron y caracterizaron el EPS producido por *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 de pasta de soya, en la caracterización se obtuvo una solubilidad del dextrano de 90.5% (81.15 g/L), se conoce a partir de la literatura que, a mayor solubilidad, más beneficioso como biosurfactantes y estabilizadores. Una emulsión eficaz debe tener la capacidad de mantener al menos el 50% del volumen primario de emulsión hasta las primeras 24 h.

La estabilidad de las emulsiones se evaluó con 1 mg/mL del dextrano y aceite de girasol, el EPS *L. pseudomesenteroides* YF32 poseía una actividad emulsionante del 67.25 % después de 1 h y presento una disminución del 64.36% a las 24 h. En comparación con otros EPS, como el presentado por Prasanna et al. (2012), el EPS *L. pseudomesenteroides* tuvo una propiedad emulsionante más alta.

En los estudios antes mencionados se mostró la estabilidad que posee el EPS proveniente de diversas bacterias ácido lácticas, en el caso de Prasanna et al. (2012) las emulsiones que realizaron con aceite de girasol permanecieron estables hasta 7 días, como lo mostrado en el presente trabajo en el que no se exhibió cambios significativos en el diámetro del tamaño de gota de las emulsiones.

Capítulo VI. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó el comportamiento microbiológico de cultivos de kéfir de agua con tres distintas fuentes de carbono, sacarosa, inulina de agave (IAG) e inulina de alcachofa (IAL), mostrando que la presencia de las BAL se encuentra en mayor proporción por sobre las levaduras al cabo de un tiempo de 96 h, pero en cultivos con la presencia de las inulinas hubo un aumento de un 12% más esto debido a que la inulina tiene un efecto prebiótico que ayuda con la viabilidad de los microorganismos, el crecimiento de los cultivos no mostró cambios significativos. Al realizar la cinética de crecimiento se encontró el mayor rendimiento de producción de EPS a las 48 h, con valores de 330 mg/L para las inulinas y de 120 mg/L en el EPS de sacarosa, esto debido a la mayor presencia de BAL asociadas en su mayoría a la producción del EPS.

Se realizó el análisis fisicoquímico que consistió en análisis de proteínas y carbohidratos totales, debido a que la presencia de ambos puede tener efecto en la estabilidad de las emulsiones, obteniendo el mayor contenido de proteínas en el EPS de sacarosa con 24.98 ± 0.18 mg/g_{EPS}, dicho resultado se relaciona con el proceso en el que proteínas que fueron parte de la secreción de los microorganismos contenidos en los granos de kéfir se desprendan y se arrastren hacia los componentes del EPS, y mayor contenido de carbohidratos el EPS de IAL con 494.6 ± 9.4 mg/g_{EPS} esto relacionado con el grado de polimerización (GP) de las inulinas. En la evaluación del peso molecular (PM) de los EPS se encontraron valores que oscilaban de 370 a 450 kDa, dichos datos corresponden a los reportados en la literatura. También se realizó espectroscopia de FT-IR, mostrando señales amplias y redondeadas en 3330 cm^{-1} asociadas a la presencia de grupos -OH, presencia de grupos metilenos que se asocia a la vibración de estiramiento del grupo alifático en 2924 cm^{-1} , bandas en el rango de 1660 y 1220 cm^{-1} características asimétricas y simétricas que se extienden de los enlaces C-O, específicamente amida I (1643 cm^{-1}), región característica de los carbohidratos entre los $1200-900\text{ cm}^{-1}$ así como bandas en 1030 cm^{-1} características de los polisacáridos (indicativo de estiramiento de -OH).

La caracterización de evaluación del potencial zeta exhibió que los tres EPS mostraban un comportamiento de polielectrolitos aniónicos, con potenciales zeta con carga negativa variando de -3 mV a -14 mV en pH de 3 a 8. La evaluación de la tensión interfacial de los EPS obtenidos de las inulinas se comparó con el EPS de kéfir de leche (kefiran), se halló que los EPS de kéfir de agua poseen la capacidad de reducir la tensión superficial hasta en un 58.3 % y se mostró que fue mejor que el EPS kefiran, por lo tanto, funcionarían como buenos agentes emulsificantes. Para reforzar estos resultados se formularon emulsiones aceite en agua (O/W) empleando aceite de naranja (AN) con el EPS de sacarosa, las emulsiones que se formaron presentaban diámetros de gota, con contenidos de 5% y 10% de AN, de entre 1.177 – 1.242 μm , al cabo de 6 días de almacenamiento se evaluó la estabilidad de estas emulsiones, el diámetro de gota no presentó cambios significativos, lo que demostró que este EPS de sacarosa posee buena actividad superficial.

Perspectivas

A pesar de ser estos resultados prometedores, algunas caracterizaciones no alcanzaron a cubrirse debido a la situación sanitaria que se presenta en la actualidad por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19), pero de acuerdo con las propiedades previas a la formación de las emulsiones se puede estimar que los EPS formados por IAG e IAL también van a tener una buena actividad superficial, por lo que en caso de ser posible en un futuro, la conclusión de estas pruebas experimentales pueda realizarse, se esperaría que los resultados condujeran a la comprobación de dicha suposición sobre la actividad superficial de los EPS.

Nomenclatura

Nomenclatura	Descripción	Unidad
AN	Aceite esencial de naranja	
BAA	Bacterias ácido acéticas	
BAL	Bacterias ácido lácticas	
EPS	Exopolisacárido	
FTIR	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier	
IAG	Inulina de agave	
IAL	Inulina de alcachofa	
MRS	Agar Man, Rogosa y Sharpe	
PDA	Agar papa dextrosa	
PdI	Índice de polidispersidad	
PM	Peso molecular	g mol^{-1} , kDa, Da
O/W	Emulsión aceite-en-agua	
W/O	Emulsión agua-en-aceite	

Referencias

- Açik, M., Çakiroglu, F. P., Altan, M., & Baybo, T. (2019). Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. *Food Science and Technology*, 40(3), 523-531. doi:https://doi.org/10.1590/fst.27919
- Alves de Oliveira, S. (2013). *Dextrana: Revisao sobre uso e possíveis aplicacoes industriais*. Tesis, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190
- Anwar, M. A., Kralj, S., Van der Maarel, M. J., & Dijkhuizen, L. (2008). The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Journal Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3426-3433. doi:10.1128/AEM.00377-08
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. (Agosto de 2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211-231.
- Ayala Montaner, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, R., González Muñoz, S. S., Bárcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., & Torres Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 346-361.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 54-66. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.011
- Barraza Garza, G., A. de la Rosa, L., Martínez Martínez, A., & Castillo Michel, H. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Latinoamericana Química*, 41(3), 126-148.
- Botelho, P. S., S. Maciel, M. I., A. Bueno, L., F. Marques, M., N. Marques, D., & Sarmiento Silva, T. M. (2014). Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk. *Carbohydrate Polymers*, 107, 1-6.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 359-378.
- Carrillo, L., & Audisio, M. C. (2007). Bacterias. En *Manual de microbiología de los alimentos* (1era ed., págs. 19-31). San Salvador de Jujuy, Argentina: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.
- Celis, M. T., O'Callaghan, J., Fergiarini, A., Resenzweig, L., & García Rubio, L. H. (2015). Efecto de partículas nanométricas sobre las propiedades de suspensiones. *Ciencia e Ingeniería*, 36(1), 19-30.

- Chen, Y. T., Lin, Y. C., Lin, J. S., Yang, N. S., & Chen, M. J. (2018). Sugary Kefir Strain *Lactobacillus mali* APS1 Ameliorated Hepatic Steatosis by Regulation of SIRT-1/Nrf-2 and Gut Microbiota in Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(8), 1-24. doi:10.1002/mnfr.201700903
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15-21.
- Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120, 109234. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109234
- Costa dos Santos, D., Goncalves de Oliveira Filho, J., Araújo Santana, A. C., Silva Morais de Freitas, B., & Guimaraes Silva, F. (Enero de 2019). Optimization of soymilk fermentation with kefir and the addition of inulin: Physicochemical, sensory and technological characteristics. *LWT- Food Science and Technology*, 104, 30-37.
- Cuadros Moreno, A., Casañas, P. R., San Martín Martínez, E., & Yañes Fernandez, J. (13 de Diciembre de 2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin American Journal of Physics Education*, 8(4).
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). Amino acids, Peptides and Proteins. En *Fennema's Food Chemistry* (Cuarta ed.). Advisory Board.
- Davidović, S. Z., Miljković, M. G., Antonović, D. G., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2015). Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska industrija*, 69(6), 595-604. doi:10.2298/HEMIND140925083D
- De Belder, A. N. (2003). Dextran. En *Handbook, Amersham Biosciences*.
- De los Santos Trinidad, J. (2020). *Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre las propiedades superficiales de un exopolisacáridos obtenido de kefiranos*. Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana, Biotecnología, Ciudad de México.
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. A., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Esnaashari, S. S., Rezaei, S., Mirzaei, E., Afshari, H., Rezayat, S. M., & Faridi Majidi, R. (2014). Preparation and characterization of kefiran electrospun nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 50-56. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.014
- Espinoza Chancay, P., & Pincay Porras, S. (2012). *Estudio experimental sobre la "Elaboracion de una bebida probiótica con cultivos de tíficos"*. Tesis, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química, Guayaquil.
- Exarhopoulos, S., Raphaelides, S. N., & Kontominas, M. G. (2018). Conformational studies and molecular characterization of the polysaccharide kefiran. *Food Hydrocolloids*, 77, 247-256. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.10.011
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology*, 2(1), 1-17. doi:10.1616/1476-2137.13938

- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, *189*, 296-303. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037
- Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., & Dong, M. (2012). Isolation and identification of an Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strain from Chinese Paocai and Biosorption of Pb (II) by its Exopolysaccharide. *Journal Food Science*, *77*(6), 111-116. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02734.x
- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, *24*(3), 52-57.
- Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., . . . Urashima, T. (2010). Carbohydrate Polymers. *Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by Lactobacillus fermentum TDS030603 in a chemically defined medium*, *79*(4), 1040-1045. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.037
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011a). Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefiran and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*, 378-384. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.05.013
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011b). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, *127*(4), 1496-1502.
- Guzel Seydim, Z., Kok Tas, T., Ertekin Filiz, B., & Seydim, C. (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, *94*(3), 1239-1242.
- Hasheminya, S. M., & Dehghannya, J. (2020). Novel ultrasound- assisted extraction of kefiran biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Materials Chemistry and Physics*, *243*, 122645. doi:10.1016/j.matchemphys.2020.122645
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotic and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews*, *11*(8), 506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- Jiang, Z. Q., Sontag Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., & Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*, *64*, 126-132.
- Jiménez Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, *28*(5), 1413-1421.
- Jindal, N., & Singh Khattar, J. (2018). Microbial Polysaccharides in Food Industry. *Biopolymers for Food Design*.

- Laureys, D., & De Vuyst, L. (Febrero de 2014). Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of water kefir fermentation. *Journals ASM*, 80(8), 2564-2572.
- Liu, J. R., Chen, M. J., & Lin, C. W. (2002). Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *Journal of Food Science*, 67(1), 104-108. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb11367.x
- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J. A., Quesada, E., & Béjar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic Bacterium *Halomonas almeriensis*. *Journal Molecules*, 17, 7103-7120. doi:doi:10.3390/molecules17067103
- López Catejón, M. L. (2007). *Estudio del comportamiento interfacial de películas de proteínas de interés alimentario: adsorción y caracterización reológica*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Ingeniería Química.
- López Rojo, J. P. (2016). *Efecto de la formulación del kéfir de agua en algunos productos de fermentación con tибicos*. Tesis, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Ciudad de México.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387-396.
- Maeda, H., Zhu, X., & Mitsouka, T. (2004). Effects of an Exopolysaccharide (Kefiran) from *Lactobacillus kefirifaciens* on Blood Glucose in KKA y Mice and Constipation in SD Rats Induced by a Low-Fiber Diet. *Bioscience Microflora*, 23(4), 149-153. doi:10.12938/BIFIDUS.23.149
- Marangoni Júnior, L., Pioli Vieira, R., & Rodrigues Anjos, C. A. (2020). Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116609. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116609
- McClements, D. J. (2016). General characteristics of food emulsions. En D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques* (Tercera ed.). CRC Press.
- Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 1-7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.046
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C., & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of aropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 69-74.
- Moinas, M., Horisberger, M., & Bauer, H. (1980). The Structural Organization of the Tibi Grain as Revealed by Light, Scanning and Transmission Microscopy. *Archives of Microbiology*, 128, 157-161.
- (s.f.). *Molecular weight measurements with the Zetasizer Nano system*. Instructivo, Malvern instruments.
- Monroy Aragón, A. R., Lechón Carvajal, G. P., & Mejía Romo, D. L. (2017). *Evaluación del kéfir de agua (tибicos) en sustratos de melaza y panela para la producción de etanol*. Universidad de Los Andes, Biotecnología agroambiental.

- Moradi, Z., & Kalanpour, N. (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115100.
- Murofushi, M., Shiomi, M., & Albara, K. (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 36(1), 49-53. doi:10.7883/yoken1952.36.49
- París Ripoll, X. (2009). *Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Microbiología.
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 684-690. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.05.003
- Pilotzi Xahuentitla, A. (2015). *Comportamiento de la tensión superficial en la interfase agua-aceite y su influencia sobre la estabilidad de emulsiones*. Tesis , Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Puebla.
- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. *Fermentation*, 3(1), 1-10. doi:10.3390/fermentation3010001
- Pop, C. R., Salanta, L., M. Rotar, A., A. Semeniuc, C., Socaciu, C., & Sindic, M. (2016). Influence of extraction conditions on characteristics of microbial polysaccharide kefir isolated from kefir grains biomass. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55, 121-130.
- Prasanna, P., Bell, A., Grandison, A., & Charalampopoulos, D. (2012). Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. *Carbohydrate Polymers*, 90, 533-540.
- Radhouani, H., Bicho, D., Goncalves, C., Maia, F. R., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2019). Kefiran cryogels as potential scaffolds for drug delivery and tissue engineering applications. *Materials Today Communications*, 20, 100554. doi:10.1016/j.mtcomm.2019.100554
- Radhouani, H., Goncalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(5), 461-478. doi:10.1177/0883911518793914
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2006). Kefiran improves rheological properties of glucono-d-lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, 16(1), 33-39.
- Rodrigues, K. L., Gaudino Caputo, L. R., Tavares Carvalho, J. C., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404-408. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020
- Rodríguez Figueroa, J. C., Noriega Rodríguez, J., Lucero Cuña, A., & Tejeda Mansir, A. (Junio de 2017). Avances en el estudio de la bioactividad del kéfir. *Interciencia*, 42(6), 347-354.
- Sabatino, M. A., Pavia, F. C., Rigogliuso, S., Giacomazza, D., Ghersi, G., La Carrubba, V., & Dispenza, C. (2020). Development of injectable and durable kefir hydroalcoholic gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 309-319. doi:doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.244

- Salager, J. L. (2000). Formulation Concepts for the Emulsion Maker. En *Pharmaceutical Emulsion and Suspensions* (págs. 19-72). Mérida, Venezuela.
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>
- Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Khodaiyan, F., & Mousavi, M. (2015). Green bionanocomposite based on kefiran and cellulose nanocrystals produced from beer industrial residues. *International Journal of Biological Macromolecules*, *77*, 85-91.
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salei, M., Bagheri, M., & Sheikhi, A. (2017). Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical Oncology*, *34*(183), 1-7. doi:10.1007/s12032-017-1044-9
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- A review. *Appetite*, *51*, 456-467.
- Sosa Herrera, M. G., & Delgado Reyes, V. A. (2016). Propiedades funcionales y aplicaciones tecnológicas de fructanos. En R. O. M.E., *Alimentos funcionales de hoy* (págs. 97-116). Barcelona: OmniaScience.
- Tan, K. X., Chamundeswari, V. N., & Joachim Loo, S. C. (2020). Prospects of kefiran as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. *Royal Society of Chemistry*, *10*, 25339-25351. doi:10.1039/d0ra02810j
- Tang, C.-H., & Shen, L. (2015). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, *43*, 388-399.
- Teixeira Magalhaes, K., Vinícius de Melo Pereira, G., Campos, C. R., Dragone, G., & Freitas Schwan, R. (2011). Brazilian Kefir: Structure, microbial, communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 693-702.
- Terrazas Casildo, R. D. (2005). *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache*. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciencias Biológicas y de la Salud, Ciudad de México.
- Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R. F., & Ganzle, M. G. (2005). Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, *99*, 692-702. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02638.x
- Wang, L., Wang, Y., Li, Q., & Tian, K. (09 de Mayo de 2019). Exopolysaccharide, isolated from a novel strain *Bifidobacterium breve* LW01 possess an anticancer effect on head and neck cancer-genetic and biochemical evidences. *Frontiers in Microbiology*, *10*(1044). doi:10.3389/fmicb.2019.01044
- Wang, M., & Bi, J. (2008). Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 763-769. doi:10.1002/jsfa.3136
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet

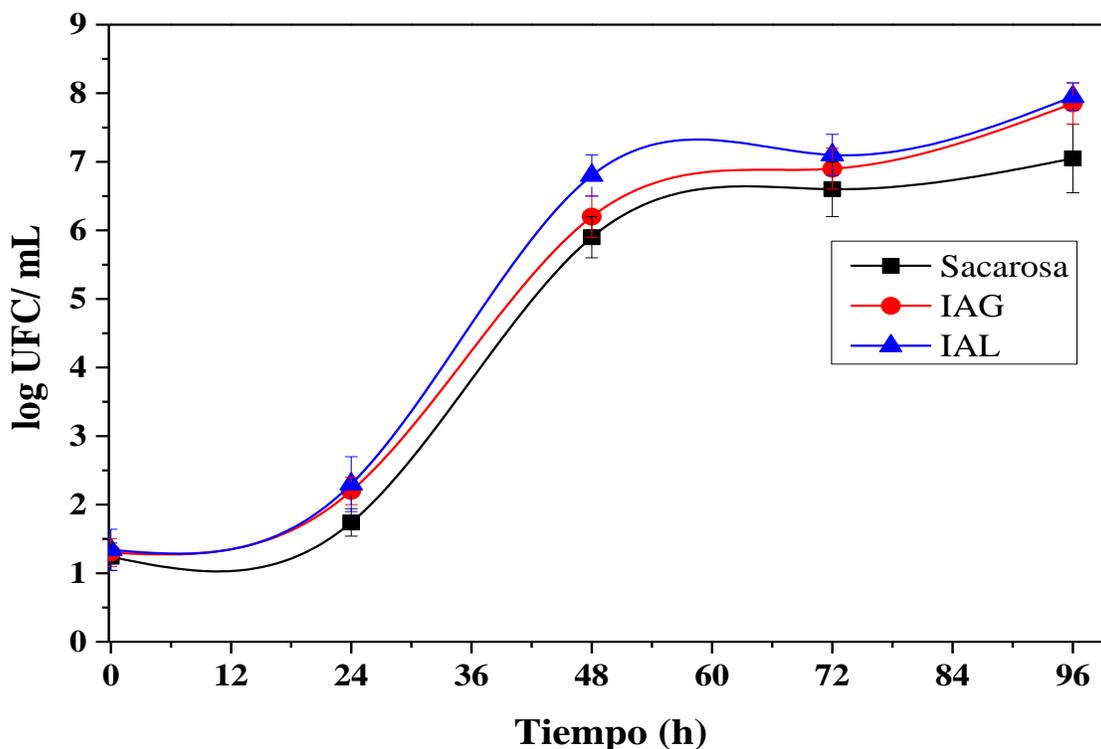
- kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 283-288. doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903. doi:10.1016 / j.carbpol.2010.06.013
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274. doi:10.1016/S0167-7799(03)00107-0
- Yang, Y., Feng, F., Zhou, Q., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 529-535. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.162
- Zajsek, K., Kolar, M., & Gorsek, A. (2011). Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 64(4).

ANEXOS

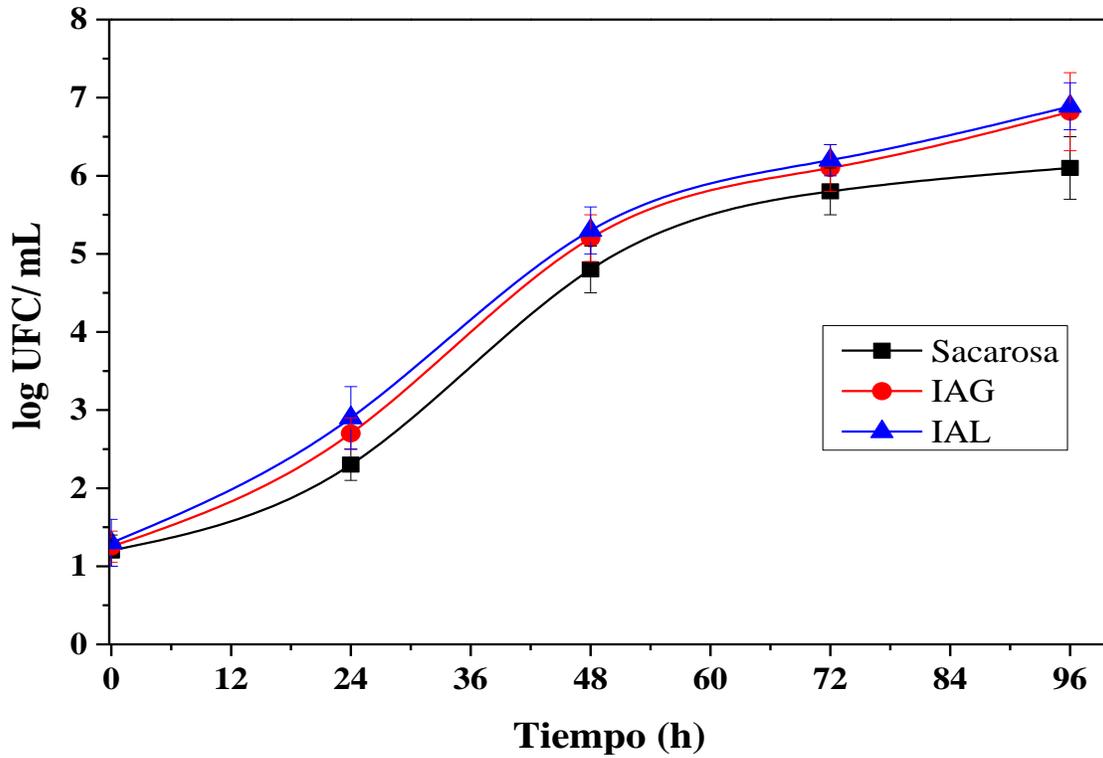
A. Equipos

1. ZetaSizer NS (Malvern Instruments, Reino Unido)
2. Microscopio óptico OLYMPUS BX4S
3. Espectrofotómetro UV-vis (Genesys 2, Spectronics, USA)
4. Homogeneizador Ultra-Turrax T10 basic (IKA Works, Staufen, Alemania)
5. Espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) Frontier (Perkin Elmer, E.U.A)
6. Centrifugadora
7. Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido)
8. Tensiómetro de gota pendiente OCA-20 (Dataphysics Instrument GmbH, Alemania)

B. Diversidad microbiológica en cultivos de kéfir de agua

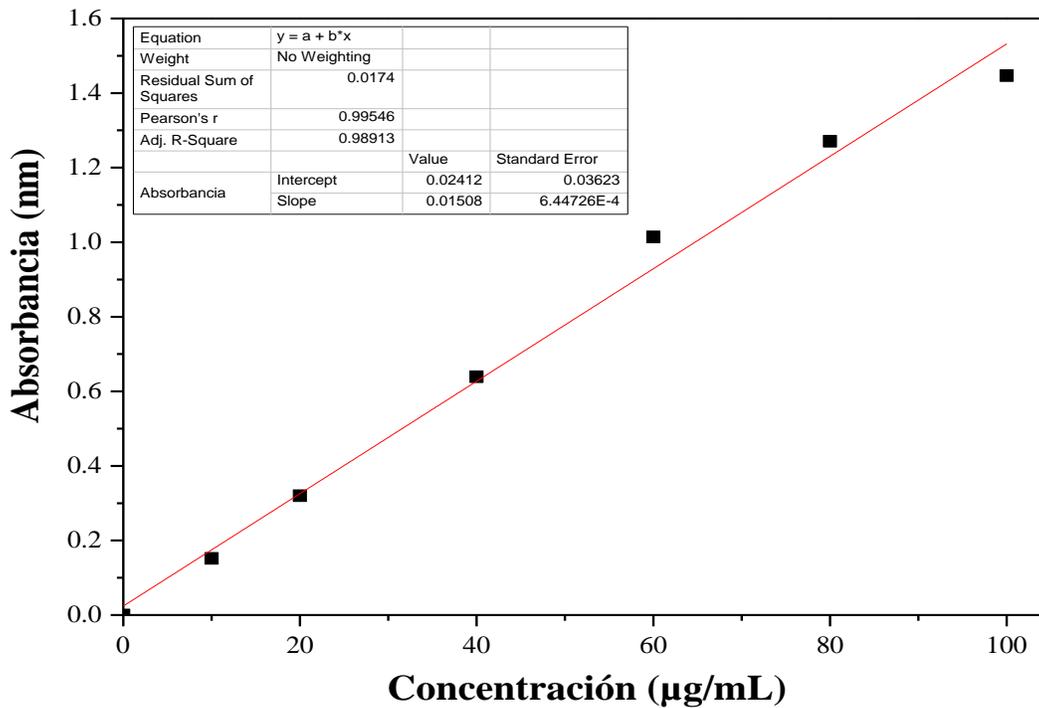


Curva de log UFC/mL para bacterias ácido lácticas (BAL) en granos de kéfir con tres fuentes de carbono.



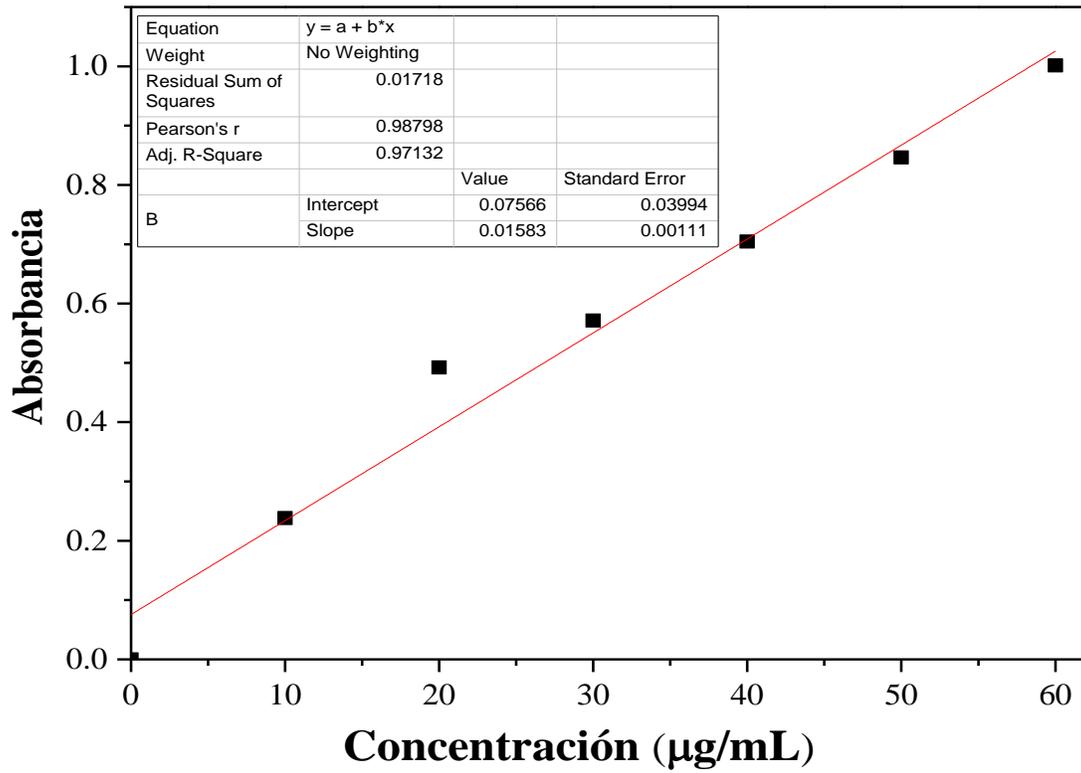
Curva de log UFC/mL para levaduras en granos de kéfir con tres fuentes de carbono.

C. Curva de calibración de determinación de carbohidratos



Curva de calibración para determinación de carbohidratos por el método de Fenol-Sulfúrico

D. Curva de calibración de determinación de proteínas



Curva de calibración para determinación de proteínas por el método de Bradford



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00143

Matricula: 2183802442

Evaluación del efecto del sustrato en cultivos de tiburicos para la producción de exopolisacáridos como agentes emulsificantes

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER
DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA QUIMICA)

DE: BRENDA VARGAS MUÑIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

BRENDA VARGAS MUÑIZ
ALUMNA

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

VOCAL

DRA. ANA GUADALUPE ESTRADA
FERNANDEZ

SECRETARIO

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella