

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

CBS

**“SELECCIÓN Y ESTUDIO CINÉTICO DE CEPAS LÁCTICAS
DEGRADORAS DE ÁCIDO GÁLICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MÓNICA CONTRERAS DOMÍNGUEZ

Dr. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
Dra. ISABELLE GAIME PERRAUD
Dra. ARELY PRADO BARRAGÁN

DIRECTOR DE TESIS
ASESOR
ASESOR

MEXICO, D.F.

ABRIL DEL 2002



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO DE LA BECA-
CRÉDITO DE **CONACYT** CON REGISTRO NÚMERO 154904

EL POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA SE ENCUENTRA DENTRO DEL PADRÓN
DE EXCELENCIA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACyT) CON REGISTRO NÚMERO 471-0

Iztapalapa, D.F. a 23 de abril de 2002

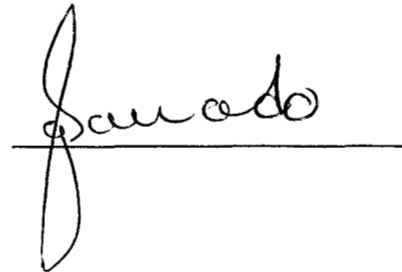
El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

“SELECCIÓN Y ESTUDIO CINÉTICO DE CEPAS LÁCTICAS
DEGRADADORAS DE ÁCIDO GÁLICO”

que presentó

Mónica Contreras Domínguez

Director: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda



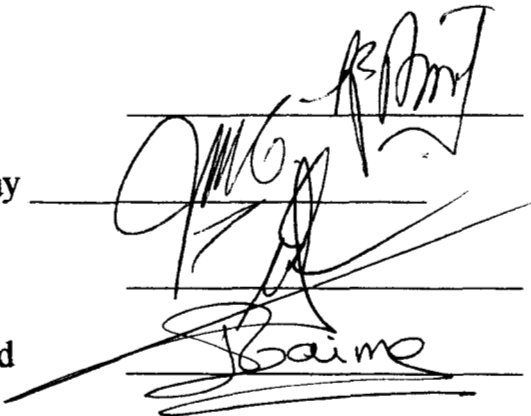
Jurado:

Sinodal: Dr. Sevastianos Roussos

Sinodal: Dr. Mariano García Garibay

Sinodal: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dra. Isabelle Gaime-Perraud



*A mis abuelos
por su amor*

*A mis padres
por darme la vida*

*A mi familia
por su apoyo y por el tiempo que no les he dado*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabelle Gaime por el gran apoyo que me ha brindado y porque en momentos difíciles de la vida me ha escuchado y aconsejado. Por su amistad.

Al Dr. Gerardo Saucedo por su apoyo en éste trabajo y sus acertados comentarios.

A la Dra. Arely Prado quien me ha ayudado en éste trabajo y sobre todo, por la infinidad de detalles que tiene con los estudiantes.

Al Dr. Ernesto Favela que sin tener un compromiso académico me dedico tiempo para aclarar dudas y permitieron que avanzara en el trabajo.

Al Dr. Alberto Ochoa por su computadora, las galletas y claro, su amistad.

A todos las personas de la planta de fermentación sólida quienes hicieron grata mi estancia en el laboratorio. A Blanca, Octavio, Pati E., Tere Flores, Lupita, Doña Mari, Soledad, Romano, Lulú, Anita, Juan León, Juan Hernández, Isaias, Tere Lo, Rocío, Citlali, Oscar, Sergio Huerta y especialmente a Jean Philippe.

A Gaby (Chabe) por lo que hemos pasado juntas y por el tiempo que no le he podido dar.

Quiero agradecer especialmente a mi madre a quien le tengo gran respeto y admiración porque ha hecho muchos sacrificios por darnos lo mejor de ella.

A mi familia: Josafat, Ramón, Dulce, Tania, Metzli, Graco y Agustín

CONTENIDO

Contenido	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Resumen	xvii

CAPÍTULO 1

1. Introducción	1
-----------------	---

CAPÍTULO 2

2. Revisión bibliográfica	5
2.1 Los compuestos fenólicos	6
2.1.1 Fenoles simples (C ₆) y sus derivados	6
2.1.1.1 Derivados del ácido benzoico (C ₆ C ₁)	7
2.1.1.2 Derivados del ácido cinámico (C ₆ C ₃)	7
2.1.2 Flavonoides (C ₆ C ₃ C ₆)	8
2.1.3 Taninos	9
2.1.3.1 Taninos hidrolizables	9
2.1.3.2 Taninos condensados	10
2.1.4 Origen de los compuestos fenólicos	10
2.1.5 Importancia de los compuestos fenólicos	12
2.1.6 Efectos antinutricionales y toxicidad de los compuestos fenólicos	12
2.1.7 Importancia a nivel industrial	14
2.2 La pulpa de café	15
2.2.1 Compuestos fenólicos en la pulpa de café	15

2.2.2. Ensilaje de la pulpa de café	17
2.3 Degradación de compuestos fenólicos por microorganismos	18
2.3.1 Defensas microbianas contra compuestos fenólicos	20
2.3.1.1 Secreción de polímeros que fijan taninos	20
2.3.1.2 Oxidación de taninos	20
2.3.1.3 Enzimas degradadoras de compuestos fenólicos	20
2.4 Bacterias lácticas	23
2.4.1 Generalidades	23
2.4.2 Degradación de compuestos fenólicos	27
2.5 Conclusión	30

CAPÍTULO 3

3. Objetivos	31
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos específicos	32

CAPÍTULO 4

4. Métodos y materiales	33
4.1 Estrategia experimental	34
4.2 Microorganismos	36
4.3 Conservación de cepas	37
4.3.1 Propagación del inóculo	37
4.4 Medio de cultivo	38
4.4.1 Medio de referencia (MRS <i>Lactobacilli</i>)	39
4.4.2 Medios sólidos (MRS-glu agar, MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar)	40

4.4.3 Medios líquidos (MRS-glu, MRS-glu-gal, MRS-gal y MRS-glu-gal 26)	40
4.5 Características de los medios de cultivo	40
4.5.1 Cultivo sólido en placa MRS con ácido tánico	41
4.5.2 Cultivo en medio líquido con ácido gálico	42
4.5.2.1 Precultivo	42
4.5.2.2 Selección de cepas	42
4.5.2.3 Estudio de la biodegradación de ácido gálico	43
4.5.2.4 Cinética de biodegradación de ácido gálico	44
4.6 Preparación de las muestras	45
4.6.1 Selección de cepas	45
4.6.2 Estudio de biodegradación de ácido gálico	46
4.7 Técnicas analíticas	47
4.7.1 pH	47
4.7.2 Crecimiento celular	47
4.7.3 Análisis de glucosa, citrato, ácido láctico y pirogalol por HPLC	47
4.7.4 Ácido gálico	47
4.8 Expresión de resultados	48
4.8.1 Ácido gálico	48
4.8.2 Glucosa	49
4.8.3 Ácido láctico	49
4.8.4 Pirogalol	49
4.8.5 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento	49
4.8.6 Cálculo de los coeficientes α , μ , β y $\alpha\beta$ del modelo de Luedeking y Piret	50

CAPÍTULO 5

5 Selección de cepas	51
5.1 Primer etapa de selección:	53
5.1.1 Crecimiento en medio sólido con ácido tánico	53
5.1.2 Formación de halos de hidrólisis	55
5.2 Segunda etapa de selección: biodegradación de ácido gálico en medio líquido	57
5.3 Conclusión	60

CAPÍTULO 6

6. Biodegradación de ácido gálico y su efecto sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico	61
6.1 Condiciones experimentales	62
6.2 Consumo de glucosa	63
6.3 Producción de ácido láctico	65
6.4 Estudio de la biodegradación de ácido gálico	70
6.5 Conclusión	80

CAPÍTULO 7

7. Estudio cinético de la biodegradación de ácido gálico: efecto del <i>precultivo</i> sobre la degradación de 9 y 26 g l ⁻¹ de ácido gálico por <i>Lactobacillus plantarum</i> (L08) y <i>Pediococcus pentosaceus</i> (L20)	81
7.1 Desarrollo experimental	83
7.2 Evaluación cinética del crecimiento celular y la producción de pirogalol por <i>Lb. plantarum</i> (L08) y <i>Pc. pentosaceus</i> (L20)	84
7.2.1 Efecto del <i>precultivo</i> sobre el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico	90

7.2.2 Resumen de los resultados observados de la degradación de ácido gálico a 9 y 26 g·L ⁻¹	93
7.2.3 Degradación de ácido gálico por células latentes	94
7.2.4 Producción de energía	96
7.3 Conclusión	100

CAPÍTULO 8

8. Conclusiones generales y perspectivas	101
--	-----

CAPÍTULO 9

9. Bibliografía	105
ANEXOS	113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 Estructuras químicas de fenoles simples: a) pirogalol; b) floroglucinol; c) catecol;
d) hidroquinona
- Figura 2.2 Moléculas químicas derivados del ácido benzóico a) ácido gálico; b) ácido elágico
- Figura 2.3 Ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido sinápico
- Figura 2.4 Estructura básica de los derivados de los flavonoides
- Figura 2.5 Estructura de un tanino hidrolizable (Lekha y Lonsane, 1997)
- Figura 2.6 Formación de taninos condensados
- Figura 2.7 Perfil de los polifenoles totales antes y después de ensilar por 30 días pulpa de café
(Gaime-Perraud, 1995)
- Figura 2.8 Actividad esterasa y dehidrogenasa de la tanasa
- Figura 2.9 Degradación de ácido gálico en pirogalol por la enzima ácido gálico descarboxilasa
- Figura 2.10 Reducción de quinato por bacterias lácticas presentes en el proceso de elaboración
de la cidra
- Figura 4.1 Estrategia experimental para probar la degradación de compuestos fenólicos por
bacterias lácticas
- Figura 4.2 Inoculación por piquete de las 45 cepas de bacterias lácticas sobre los medios
sólidos
- Figura 4.3 Estrategia experimental para la selección de cepas capaces de degradar ácido gálico
- Figura 4.4 Degradación de ácido gálico sobre los medios MRS-glu-gal y MRS-gal teniendo
como control el medio MRS-glu
- Figura 4.5 Preparación de las muestras para la selección de cepas capaces de crecer sobre
placas con ácido tánico y degradar ácido gálico
- Figura 4.6 Procedimiento para preparar las muestras y hacer los análisis de pH, biomasa,
glucosa, citrato, ácido láctico, ácido gálico y pirogalol
- Figura 5.1 Crecimiento celular sobre medio sólido con ácido tánico

Figura 6.1 Rendimiento molar (láctico/glucosa) en los medios MRS-glu y MRS-gal-glu a las 72h de cultivo

Figura 6.2 (a) Tiempo inicial de la fermentación por *Lb. plantarum* 1 en presencia de ácido gálico. (b) Desaparición de ácido gálico después de 72 h de cultivo

Figura 6.3 Cromatograma por uv del pirogalol producido por *Lb. plantarum* durante la degradación de ácido gálico a las 72 h de cultivo

Figura 6.4 Rendimiento molar (pirogalol / ácido gálico) en los medios MRS-gal y MRS- gal-glu a las 72 h de fermentación

Figura 6.5 Ruta de degradación de ácido tánico por la bacteria *Citrobacter freundii* (Ajay-Kumar *et al*, 1999)

Figura 6.6 Ruta propuesta para la degradación de estireno

Figura 6.7 Valores de pH en el inicio y final de 72 h de fermentación de las 13 cepas de bacterias lácticas

Figura 7.1 Relación lineal entre la degradación de ácido gálico y formación de pirogalol para la cepa de *Lb. plantarum* (L08) a 9 gL^{-1} sin *precultivo*

Figura 7.2 Comparación cinética de los datos experimentales del crecimiento celular y producción de pirogalol contra los datos obtenidos de la ecuación Logística para el crecimiento celular y producción de pirogalol

Figura 7.3 Efecto del *precultivo* sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico por *Lb. plantarum* (L08) en presencia de 9 y 26 gL^{-1} de ácido gálico

Figura 7.4 Transformación acoplada de aminoácidos (Janke y Fritsche, 1985)

Figura 7.5 Posible mecanismo de generación de energía debida a la descarboxilación de ácido gálico en pirogalol por bacterias lácticas

LISTA DE TABLAS

- Tabla 2.1 Compuestos fenólicos totales en frutas maduras (Hulme, 1970)
- Tabla 2.2 Composición química de la pulpa de café (Carrizales y González, 1984)
- Tabla 2.3 Composición de los polifenoles simples de la pulpa de café (Ramírez-Martínez y Clifford, 2000)
- Tabla 2.4 Otros compuestos de la pulpa de café (Elías, 1978)
- Tabla 2.5 Microorganismos capaces de crecer sobre taninos (Scalbert, 1991)
- Tabla 2.6 Principales productos producidos debido al metabolismo de las bacterias lácticas (Seale, 1986)
- Tabla 2.7 Géneros y especies de bacterias lácticas (Collins *et al*, 1993)
- Tabla 4.1 Cepas seleccionadas para probar la degradación de compuestos fenólicos
- Tabla 4.2 Composición del medio MRS *Lactobacilli* ® (De Man *et al*, 1960)
- Tabla 4.3 Composición de los medios sólidos con ácido tánico
- Tabla 4.4 Composición de los medios líquidos con ácido gálico
- Tabla 4.5 Columnas para cromatografía empleadas para el análisis de ácido gálico
- Tabla 5.1 Crecimiento de bacterias lácticas sobre los medios sólidos MRS-tan-glu *agar* y MRS-tan *agar*
- Tabla 5.2 Porcentaje de degradación de ácido gálico (9 g L^{-1}) por las 45 bacterias lácticas probadas en los medios líquidos con y sin glucosa (4.5 g L^{-1})
- Tabla 6.1 Medios de cultivo utilizados para los estudios de la biodegradación de ácido gálico
- Tabla 6.2 Valores promedio del consumo de glucosa, producción de ácido láctico y degradación de ácido gálico en los medios MRS-glu, MRS-glu-gal y MRS-gal
- Tabla 6.3 Producción de ácido láctico (mmol) por las 13 cepas de bacterias lácticas ensayadas en el medio MRS-glu, MRS-glu-gal y MRS-gal (9 g L^{-1} de ácido gálico y 4.5 g L^{-1} de glucosa)
- Tabla 6.4 Tiempos de retención de los estándares empleados en el estudio de la biodegradación de ácido gálico

Tabla 6.5. Clasificación de las enzimas oxido-reductasas (Whitaker, 1972)

Tabla 7.1 Medios de cultivos empleados para la evaluación cinética de la degradación de ácido gálico

Tabla 7.2 Parámetros cinéticos calculados para *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) en el medio MRS-glu-gal y MRS-glu-gal 26

Tabla 7.3 Efecto del *precultivo* sobre la producción de ácido láctico por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) a 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico

Tabla 7.4 Parámetros evaluados durante las cinéticas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) y los valores obtenidos cuando las cepas degradaron 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico con y sin *precultivo*

LISTA DE ABREVIATURAS

Medios de cultivo

MRS <i>Lactobacilli</i> ®	Medio MRS para el crecimiento de bacterias lácticas
MRS-glu agar	Medio sólido MRS con 5 g· L ⁻¹ de glucosa
MRS-glu-tan agar	Medio sólido MRS con 5 g· L ⁻¹ de glucosa y 5 g· L ⁻¹ de ácido tánico
MRS-tan agar	Medio sólido MRS con 5 g· L ⁻¹ de ácido tánico
MRS-glu	Medio líquido MRS con 4.5 g· L ⁻¹ de glucosa
MRS-glu-gal	Medio líquido MRS con 4.5 g· L ⁻¹ de glucosa y 9 g· L ⁻¹ de ácido gálico
MRS-gal	Medio líquido MRS con 9 g· L ⁻¹ de ácido gálico
MRS-glu-gal 26	Medio líquido MRS con 4.5 g· L ⁻¹ de glucosa y 26 g· L ⁻¹ de ácido gálico

Microorganismos

<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Pc.</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>W.</i>	<i>Weissella</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
Cl.	Clostridium
NI	No identificas

Unidades

g L ⁻¹	gramos por litro
g L ⁻¹ · h ⁻¹	gramos por litro por hora
DO	densidad óptica
h	horas
h ⁻¹	horas a la menos uno
M	molar

mmol	milimol
mL	mililitros
μ L	microlitros
mm	milímetro
μ m	micrometro
nm	nanometro
rpm	revoluciones por minuto
min	minutos
$^{\circ}$ C	grado centígrado
t	tiempo
α	coeficiente de formación de producto (pirogalol) asociado al crecimiento ($\text{g Pir}\cdot\text{DO}^{-1}$)
β	coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento ($\text{g Pir}\cdot\text{DO}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
P	concentración de pirogalol
R^2	coeficiente de correlación
qp	tasa específica de formación de producto
μ	velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
X	concentración de biomasa ($\text{DO}\cdot\text{L}^{-1}$)
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
AGD	ácido gálico descarboxilasa
ATH	ácido tánico hidrolasa (tanasa)
CPr	con <i>precultivo</i>
SPr	sin <i>precultivo</i>
Δ G	ácido gálico degradado
Δ GI	glucosa consumida
Δ L	ácido láctico producido
Δ P	pirogalol producido

RESUMEN

Este trabajo consistió en seleccionar bacterias lácticas degradadoras de ácido gálico y con capacidad de crecer sobre un medio sólido con ácido tánico.

Para la primera fase de selección se probaron 45 cepas inoculadas sobre un medio sólido con ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), tomando como criterio de selección aquellas cepas capaces de crecer en el medio y formar halos alrededor de las colonias debido posiblemente a la hidrólisis del ácido tánico. En ésta fase se seleccionaron 22 cepas.

En la segunda fase las bacterias fueron cultivadas en un medio líquido. En una primer etapa, las bacterias fueron adaptadas a un *precultivo* y después fueron inoculadas en un medio con ácido gálico con y sin glucosa; en ésta etapa se seleccionaron 23 cepas por degradar el ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Comparando los resultados de la primera y segunda fase de selección, se observó que las cepas que crecieron sobre el medio sólido con ácido tánico (medio MRS-tan *agar* y MRS-glu-tan *agar*) fueron las mismas que degradaron el ácido gálico en los medios líquidos (MRS-gal y MRS-glu-gal). Las especies degradadores de ácido gálico y capaces de crecer en presencia de ácido tánico son: *Lactobacillus plantarum* (9 cepas), *Pediococcus pentosaceus* (4 cepas) *Weissella confusa* (2 cepas) *Lactobacillus hilgardii* (1 cepa), *Lactobacillus pentosus* (1 cepa), 5 cepas no identificadas y por último, *Leuconostoc mesenteroides* (1 cepa). Ésta última cepa no creció sobre el medio sólido con ácido tánico pero si degradó ácido gálico.

Debido a que las bacterias lácticas producen ácido láctico, se evaluó el efecto del ácido gálico sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico en 11 cepas, observándose que la producción de ácido láctico ocurre aun cuando las bacterias degradan ácido gálico, obteniéndose

los mismos rendimientos en los medios con o sin 9 gL^{-1} de ácido gálico. Por otra parte, se observó que el pirogalol fue el producto de la degradación de ácido gálico y que se obtiene en una relación equimolar.

Posteriormente, se realizaron cinéticas de degradación de ácido gálico en donde se probó una concentración más alta de ácido gálico (26 gL^{-1}). Se evaluó el efecto de adaptar los cultivos bacterianos a un *precultivo* sobre el metabolismo de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) a dos concentraciones de ácido gálico (9 y 26 gL^{-1}) y se observó que el *precultivo* no tiene efecto sobre el metabolismo de ambas cepas a 9 gL^{-1} . Sin embargo, a la concentración de 26 gL^{-1} el *precultivo* tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento celular y sobre el tiempo en que los microorganismos comenzaban a degradar el ácido gálico. También se observó que disminuye el rendimiento de ácido láctico al aumentar la concentración de ácido gálico a 26 gL^{-1} .

Finalmente, se hizo un estudio sobre de la degradación de ácido gálico por las bacterias lácticas y se propuso un mecanismo de generación de energía como una explicación de la degradación del ácido gálico en pirogalol. Además, se observó que de acuerdo al modelo de Luedeking y Piret, la producción de pirogalol está asociada al crecimiento microbiano

CAPÍTULO 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son moléculas químicas que se caracterizan por poseer varios grupos hidroxilo (OH') unidos a un anillo aromático. Son llamados polifenoles cuando reaccionan con moléculas similares formando un polímero. Dentro de ésta clasificación están los taninos hidrolisables y los condensados (Waterman y Mole, 1994). Los compuestos fenólicos poseen un amplio rango de aplicaciones, como por ejemplo en el proceso del curtido de piel, en la elaboración de alimentos y bebidas y en la medicina. También tienen un importante significado en el desarrollo del color de las flores y frutos además, sirven como defensa de las plantas (Haslam, 1993).

Los polifenoles se encuentran en todo tipo de material vegetal y se caracterizan por formar uniones con las proteínas y otras moléculas lo cual disminuye su digestibilidad (Cody, 1993). Esta característica se considera antinutricional y por ello, productos agrícolas ricos en nutrientes y polifenoles no pueden ser utilizados en la alimentación animal, como por ejemplo la pulpa de café (Gaime-Perraud *et al*, 2000). También es conocido que los taninos y fenoles simples (ácido tánico y ácido gálico respectivamente) disminuyen la actividad de enzimas digestivas como son la α -amilasa y la tripsina (Chung *et al*, 1998). Sin embargo, los taninos pueden ser degradados por medio de enzimas llamadas tanasas, las cuales han sido estudiadas y purificadas a partir de hongos (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar *et al*, 2000; Ramírez, 2000) y levaduras (Aoki *et al*, 1975; Gallotou-Panayotou, *et al*, 1988). Además, estas enzimas pueden ser empleadas para la eliminación de compuestos fenólicos de aguas provenientes de las industrias curtidoras de piel, del carbón, de la pulpa y el café (Ajay-Kumar, *et al*, 1999; Kadhim, 1999).

Existen pocos reportes sobre la degradación de compuestos fenólicos por bacterias. Deschamps *et al* (1983) fueron de los primeros en aislar cepas bacterianas degradadoras de ácido tánico y compuestos relacionados. Asimismo, fue reportado que una bacteria,

Citrobacter freundii, aislada de aguas residuales de la industria curtidora de piel producía ácido gálico debido a la degradación de ácido tánico. Posteriormente, la bacteria descarboxiló el ácido gálico hasta pirogalol y metabolizó este último hasta el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ajay-Kumar *et al*, 1999). Por otra parte, la enzima ácido gálico descarboxilasa ha sido aislada y purificada de la bacteria *Pantoea agglomerans* (Zeida *et al*, 1998). Estos son los primeros reportes de enzimas bacterianas degradadoras de ácido gálico.

Las bacterias lácticas son importantes debido a que son utilizadas para los procesos de ensilaje de subproductos agrícolas como es en el ensilado de la pulpa de café. Este proceso consiste en compactar el material vegetal, lo que origina condiciones anaerobias que permite el desarrollo de bacterias lácticas que fermentan los azúcares presentes produciendo ácido láctico principalmente, y de esta manera preservar el producto. Una vez conservado el material, puede tener un uso posterior como es en la alimentación animal, la lombricultura y producción de hongos comestibles (Gaime-Perraud *et al*, 2000; Ramírez-Martínez y Clifford, 2000). Osawa *et al* (2000), realizaron una selección de bacterias lácticas capaces de crecer sobre placas de agar con ácido tánico y degradar ácido gálico en pirogalol, solo que los análisis de la presencia de la enzima ácido gálico descarboxilasa los realizaron a través de un ensayo visual y a una baja concentración de ácido gálico.

El objetivo de este trabajo fue probar la degradación de compuestos fenólicos por 45 bacterias lácticas aisladas de la pulpa de café ensilada, utilizando como moléculas modelo los ácidos tánico y gálico. Primero se realizó una selección de cepas tomando como criterio la capacidad de crecer en un medio sólido con ácido tánico y segundo, degradar ácido gálico en un medio líquido. Posteriormente, se probó el efecto del ácido gálico y su producto de degradación sobre la producción de ácido láctico, debido a que la principal característica de las bacterias lácticas es producir este compuesto. Por último, se hizo un estudio cinético de la degradación de ácido gálico a dos concentraciones (9 y 26 g·L⁻¹) y se evaluó el efecto de adaptar a los

microorganismos a un *precultivo* sobre el metabolismo de 2 bacterias, *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20).

CAPÍTULO 2

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo muestra una revisión bibliográfica de los compuestos fenólicos, así como el efecto tóxico y antinutricional que representan. También se hará una revisión sobre los microorganismos capaces de degradar compuestos fenólicos, en particular de las bacterias lácticas y su metabolismo ante la presencia de estos compuestos.

2.1 Los compuestos fenólicos

El término fenólico es usado para definir sustancias que poseen uno o más sustituyentes hidroxilo (OH) enlazados a un anillo aromático. Los compuestos que tienen varios sustituyentes hidroxilo, en ocasiones son referidos como polifenoles (Waterman y Mole, 1994). Muchos compuestos fenólicos se forman por condensación o reacciones de adición con moléculas similares (Dey y Harborne, 1997). Los compuestos fenólicos se clasifican como fenoles simples, ésteres fenólicos, derivados del ácido benzoico y cinámico, flavonoides y taninos (Ramírez-Martínez y Clifford, 2000; Ramírez, 1987)

2.1.1 Fenoles simples (C₆) y sus derivados

Los fenoles simples frecuentemente encontrados son compuestos con sustituyentes trihidroxi benceno, por ejemplo, pirogalol y floroglucinol. Es menos común encontrar sustituciones di-hidroxi; sin embargo, entre éstos se encuentran catecol, resorcinol e hidroquinona. En la Figura 2.1 se muestran las estructuras químicas de dichos compuestos (Waterman y Mole, 1997)

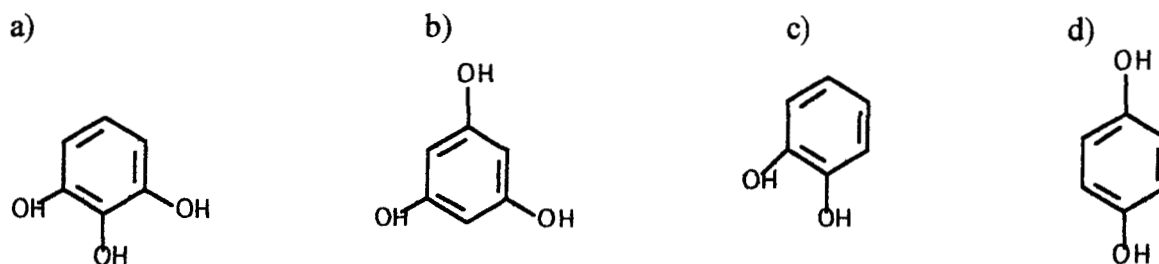


Figura 2.1 Estructuras químicas de fenoles simples: a) pirogalol, b) floroglucinol, c) catecol, d) hidroquinona

El pirogalol, floroglucinol y catecol también forman parte de moléculas más complejas como los taninos. Las estructuras de resorcinol e hidroquinona son poco comunes.

2.1.1.1 Derivados del ácido benzóico (C_6C_1)

El fenol más importante dentro de ésta clasificación es el ácido gálico el cual se caracteriza porque el carbono unido al anillo aromático es un ácido carboxílico. El ácido gálico forma dímeros formando el ácido elágico (Figura 2.2). Ambos son los componentes fenólicos comunes de los taninos hidrolizables.

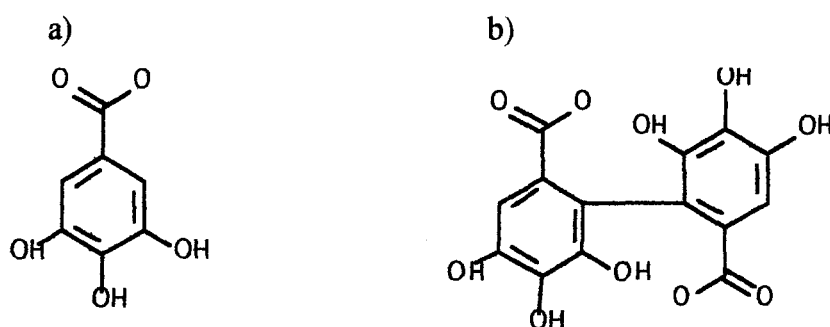


Figura 2.2 Moléculas químicas derivados del ácido benzóico: a) ácido gálico y b) ácido elágico

Por su carácter ácido, los derivados del ácido benzóico tienen la capacidad de unirse con compuestos que presentan grupos hidroxilo (fenoles y alcoholes) para formar ésteres. Dentro de esta clasificación también se encuentran el ácido protocatéquico, ácido salicílico y salicilaldehído (Waterman y Mole, 1997)

2.1.1.2 Derivados del ácido cinámico (C_6C_3)

Los ácidos hidroxicinámicos también son ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran con mayor frecuencia en forma de ésteres, dentro de éste grupo el ácido caféico es el más común, seguido de los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico (Figura 2.3)

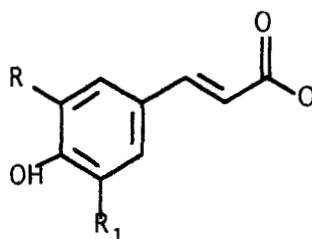


Figura 2.3 R=R1 ácido *p*-cumárico; R=OH, R1=H ácido caféico; R=OCH₃, R1=H ácido ferúlico; R=R1 ácido sinápico

Los tres últimos fenoles y sus correspondientes alcoholes (feruloil, *p*-cumaril y sinapilico), constituyen las unidades básicas de la lignina, la cual actúa como barrera mecánica de las plantas. El ácido caféico forma ésteres con grupos hidroxilo del ácido quínico, originando los compuestos llamados ácidos clorogénicos (Ramírez, 1987)

2.1.2 Flavonoides (C₆C₃C₆)

Los flavonoides se caracterizan por poseer dos anillos de benceno (A y B), unidos por una cadena de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico (C) junto con el anillo A (Figura 2.4).

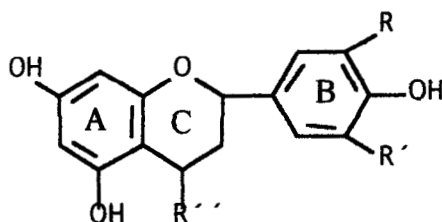


Figura 2.4 Estructura básica de los derivados de los flavonoides

Las diferentes clasificaciones dentro de los derivados de flavonoides se distinguen por el grado de oxidación del anillo C y por el número y posición de los sustituyentes hidroxílicos, metoxílicos y glicosídicos en los anillos A y B. A este grupo pertenecen las antocianidinas, catequinas, leucoantocianidinas, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas y flavononoles. Las catequinas y las leucoantocianidinas son los flavonoides que se encuentran en forma libre, el resto de los flavonoides están en forma de glicósidos (Ramírez, 1987).

2.1.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares en un rango entre 500 y 3000 Daltons. Por la gran cantidad de grupos hidroxifenólicos que presentan, tienen la propiedad de unirse con proteínas, carbohidratos, celulosa, gelatina y pectina formando complejos insolubles (Ajay-Kumar *et al*, 1999; Dey y Harborne, 1997; Lekha y Lonsane, 1997).

Los taninos se dividen en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados (Waterman y Mole, 1994).

2.1.3.1 Taninos hidrolizables

Consisten de un alcohol polihídrico, usualmente la β -D-glucopiranososa, en la que los grupos hidroxilo están esterificados con ácido gálico o derivados del ácido gálico (Figura 2.5). Los taninos hidrolizables pueden ser subdivididos en dos tipos: los galotaninos y los elagitaninos. La hidrólisis de los galotaninos produce glucosa y ácidos fenólicos, siendo el ácido gálico el compuesto fenólico predominante. Cuando elagitaninos se hidrolizan los productos son la glucosa, el ácido elágico y el ácido gálico y en ocasiones, otros ácidos relacionados con el ácido gálico (Dey y Harborne, 1997; Lekha y Lonsane, 1997).

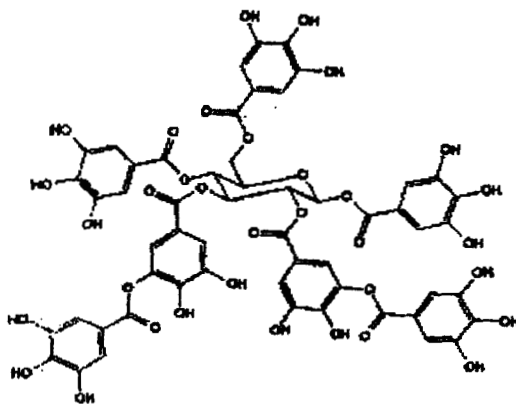


Figura 2.5 Estructura de un tanino hidrolizable (Lekha y Lonsane, 1997)

2.1.3.2 Taninos condensados

Los flavonoides, catequinas y leucoantocianidinas, originan dímeros denominados taninos condensados los cuales forman complejos insolubles con las proteínas, al igual que los taninos hidrolizables (Ramírez, 1987). Sin embargo, éstos no contienen residuos de azúcar (Lekha y Lonsane). Los taninos condensados en ocasiones son llamados proantocianidinas debido a que rinden antocianidinas en presencia de ácidos (Dey y Harborne, 1997). Normalmente las uniones con otros flavonoides ocurre entre el C4 de una unidad y el C8 de otra (Figura 2.6). Las estructuras formadas varían de acuerdo al número de monómeros que se han unido a la posición en donde ocurre la unión y de la oxigenación que pueden sufrir los anillos A y B de las unidades flavan-3-ol (Waterman y Mole, 1994)

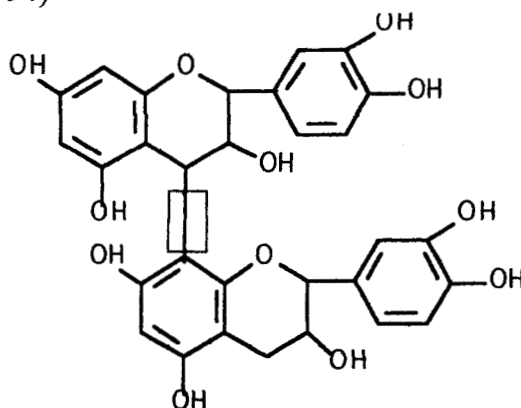


Figura 2.6 Formación de taninos condensados

2.1.4 Origen de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos forman una de las principales clases de metabolitos secundarios en las plantas (Scalbert, 1993). Particularmente, son abundantes en frutas y su presencia es determinante en el color y sabor (Hulme, 1970). El contenido fenólico de las frutas varía en función de la especie, la variedad y la ubicación de la misma. En la Tabla 2.1 se muestran algunos ejemplos del contenido fenólico de frutas:

Tabla 2.1 Compuestos fenólicos totales en frutas maduras (Hulme, 1970)

Fruta	Contenido fenólico (g / 100 g)
Manzana	0.11-0.34
Balduino	0.25
Cidra de jugo de manzana	0.11-0.34 g / 100 mL
Plátano (<i>Musa</i>)	0.53
Dátil (<i>Phoenix dactylifera</i>)	0.5
Cereza (<i>Prunus cerasus</i>)	0.2
Uva (<i>Vitis</i> spp.)	
Vino tinto	0.15-0.5 g / 100 mL
Vino blanco	0.015-0.1 g / 100 mL
Riesling, racimo	0.95
Tokey racimo	0.48
Muscat, piel	0.35
Muscat, pulpa	0.10
Muscat, semilla	4.5
Fruta pasión	0.0014
Durazno (<i>Prunus persica</i>)	
Variedades mezcladas	0.028-0.141
Elberta	0.069-0.180
Pera (<i>Pyrus communis</i>)	
Muscachet	0.4
Ciruella	
Victoria, parte carnosa	2.1
Victoria, piel	5.7

Aparentemente, los compuestos fenólicos no juegan un papel vital en el metabolismo de las plantas por ser productos del metabolismo secundario (Hulme, 1970). Están acumulados en grandes cantidades (en ocasiones más del 10% de peso seco) en órganos o tejidos, lo cual pueden estar ubicados en cualquier parte de las plantas como en madera, tallos, hojas y frutas (Scalbert, 1991)

2.1.5 Importancia de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son de gran importancia como materiales de soporte celular. Forman parte integral de las estructuras de la pared celular, principalmente en materiales poliméricos como es la lignina y suberina, que actúan como soporte mecánico y barrera contra microorganismos. Algunos compuestos fenólicos pueden ser exudados desde la raíz de algunas plantas donde pueden actuar como toxinas. Es conocido que en ciertas ocasiones, la planta del caucho exuda cinamato, el cual es tóxico para la planta misma (autotóxico) (Dey y Harborne, 1997). Algunos de estos compuestos actúan antes de que las plantas puedan ser infestadas por plagas y enfermedades, mientras que otros, lo hacen después que esto ha sucedido. La respuesta de las plantas a daños mecánicos o fisiológicos comprende la producción de niveles altos de compuestos fenólicos en el área adyacente al sitio dañado, los cuales son oxidados por la polifenoloxidasa a quinonas que a su vez se polimerizan, formando complejos con aminoácidos y proteínas (Ramírez, 1987).

Dentro de las funciones de los compuestos fenólicos en las plantas, especialmente los flavonoides, es que pueden actuar como moléculas indicadoras (substancias que reconocen al hésped) en la interacción entre bacterias fijadoras de nitrógeno y ciertas plantas de leguminosas (Dey y Harborne, 1997)

2.1.6 Efectos antinutricionales y toxicidad de los compuestos fenólicos

Los polifenoles son conocidos por tener efectos sobre la digestibilidad de la proteína debido a su habilidad de unirse con proteínas y precipitar. Asimismo, disminuyen la actividad de enzimas digestivas, produciendo un incremento en la excreción de nitrógeno en heces fecales de animales. Aunque estos efectos son más atribuidos al alto peso molecular de los taninos condensados, los polifenoles de bajo peso molecular, también pueden unirse a proteínas y reducir la actividad de enzimas digestivas. La inhibición de enzimas digestivas también afecta la

digestibilidad y/o absorción de otros constituyentes como el almidón o los lípidos, y sus productos de degradación (Bravo *et al*, 1993)

La gran cantidad de grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos forma uniones con las proteínas, incrementando la estabilidad de las proteínas, protegiendo a éstos de daños por agua, microorganismos, calor y abrasión (Ajay-Kumar *et al*, 1999). Algunos factores han sido identificados por favorecer la asociación intramolecular con los polifenoles, por ejemplo: efectos hidrofóbicos, solvatación y desolvatación en medio acuoso, puentes de hidrógeno, la presencia de co-substratos con grupos amino como la cafeína y péptidos ricos en prolina, sales inorgánicas, iones metálicos, temperatura y pH (Haslam, 1993). Chung *et al* (1998) reportaron que el ácido tánico mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias del tracto intestinal debido probablemente a la capacidad del polifenol para unirse fuertemente con el fierro.

Los animales superiores no pueden sintetizar los anillos bencénicos a partir de compuestos alifáticos excepto en algunos casos como es la síntesis de esteroides, por lo tanto: las plantas son la fuente de la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en los animales (Ramírez, 1987). Las dietas que contienen grandes cantidades de taninos disminuyen la digestibilidad de la proteína y de la materia seca en algunos mamíferos (Hagerman *et al*, 1992). La presencia de taninos condensados a valores menores al 6% en las dietas para animales mejora el rendimiento del animal. Si este porcentaje aumenta, provoca la disminución de la velocidad de crecimiento, la ganancia en peso, perturbación de la absorción mineral y la inhibición de enzimas digestivas en el animal (O'Donovan y Brooker, 2001; Chung *et al*, 1998; Bravo *et al*, 1993).

Los taninos están presentes en una variedad de frutas y vegetales y pueden servir como un agente antimicrobiano natural protegiendo productos hortofrutícolas contra la infección microbiana (Chung *et al*, 1998). Probablemente, este efecto se deba a la inhibición de ciertas

enzimas. La oxidación de fenoles sobre la inhibición de enzimas puede ser explicado por dos razones: la primera, los fenoles oxidados pueden reaccionar con grupos sulfidriilo que son parte de las enzimas formando uniones covalentes con ellos. La segunda razón es que se produce un incremento en la masa molecular a través de la polimerización oxidativa, el cual podría incrementar la eficiencia de la unión con las proteínas (Scalbert, 1991).

2.1.7 Importancia a nivel industrial

Los polifenoles son importantes en la alimentación y nutrición. Son de gran importancia en la industria de té y vinos, debido a que aportan la astringencia a estos productos. Por muchos años, plantas ricas en polifenoles fueron usadas en objetos hechos de cuero por la característica de los taninos a unirse con las proteínas (Dey y Harborne, 1997).

El ácido gálico ha sido reconocido como antioxidante, antialérgico, antiinflamatorio, antimutagénico y con actividades anticarcinogénicas (Yasuda *et al*, 2000). Es principalmente usado como un intermediario sintético para la producción de pirogalol y ésteres de ácido gálico usados en la industria de alimentos y farmacia, como es el caso del propil galato, utilizado como antioxidante de grasas y aceites y en bebidas (Lekha y Lonsane, 1997).

A pesar de que los compuestos fenólicos tienen un gran impacto en la industria, cuando éstos están presentes en residuos agroindustriales que son empleados en la alimentación de ganado se vuelven un problema debido a la afinidad que tienen de unirse a otras moléculas como las proteínas y los sacáridos, haciéndolos indisponibles para el organismo que los consume. Numerosos residuos de la industria agrícola como la pulpa de café, presentan un gran contenido en nutrientes por el cual pueden ser utilizados como alimento. Sin embargo, es importante eliminar o degradar los compuestos fenólicos presentes.

2.2 La pulpa de café

La pulpa de café es el primer subproducto que se obtiene del procesamiento húmedo de las cerezas del café y constituye alrededor del 40% del peso fresco de la fruta entera (Ramírez Martínez y Clifford, 2000). Por su composición química, es considerado un subproducto agrícola rico en nutrientes que puede ser utilizado para la alimentación de animales (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Composición química de la pulpa de café (Carrizales y González, 1984)

Base seca (% p:p)	Pulpa seca	Pulpa ensilada
Proteínas (N * 6.25)	11.57	13.55
Fibras	15.24	17.16
Lípidos	5.00	2.17
Ceniza	6.67	8.08
Carbohidratos	61.21	58.50
Cafeína	0.95	0.83

Sin embargo, la pulpa de café contiene sustancias naturales que son tóxicas y limitan su utilización para la alimentación animal. Estas sustancias son la cafeína que varía desde 0.6 a 1.3 % en base seca (Bressani *et al*, 1972), y los compuestos fenólicos (Ramírez-Martínez y Clifford, 2000). La cafeína provoca efectos antifisiológicos mientras que los compuestos fenólicos, pueden originar efectos antinutricionales cuando se destina a la alimentación de animales debido a su característica de unirse con proteínas.

2.2.1 Compuestos fenólicos en la pulpa de café

En la Tabla 2.3 se muestra la composición promedio para el total de los polifenoles simples tentativamente identificados en la pulpa de café.

Tabla 2.3 Composición de los polifenoles simples de la pulpa de café (Ramírez-Martínez y Clifford, 2000)

Compuestos fenólicos	Base seca (% p:p)
ácido 5-cafeoilquinico	42.2
epicatequina	21.6
ácido 3,4-dicafeoilquinico	5.7
ácido 3,5-dicafeoilquinico	19.3
ácido 4,5-dicafeoilquinico	4.4
catequina	2.2
rutina	2.2
ácido protocatéquico	1.6
ácido ferúlico	1.0

El ácido clorogénico (cafeoilquinico) y sus isómeros son los compuestos fenólicos que mayormente se encuentran en la pulpa de café. Por ser materia vegetal y formar parte de un fruto, la pulpa de café contiene otras sustancias, además de compuestos fenólicos (Tabla 2.4)

Tabla 2.4 Otros compuestos de la pulpa de café (Eliás, 1978)

Compuesto	Base seca (% p:p)
Taninos	1.80-8.56
Sustancias pécticas totales	6.5
Azúcares reductores	12.4
Azúcares no reductores	2.0
Cafeína	1.3
Ácido clorogénico	2.6
Ácido caféico total	1.6

La información sobre los taninos de la pulpa de café es escasa y en ocasiones contradictoria. Aunque estudios previos sugirieron la presencia de taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) en la pulpa de café, se demostró que los taninos presentes, en su mayoría son proantocianidinas. Recientemente, un trímero de proantocianidina se aisló de la pulpa de café (*C. canephora*) y se determinó que tenía actividad antioxidante (Ramírez-Martínez y Clifford, 2000).

2.2.2. Ensilaje de la pulpa de café

Una manera de conservar y almacenar las grandes cantidades de pulpa de café que se obtiene durante el beneficio del café, es por medio del ensilaje. El ensilado es un proceso fermentativo bajo condiciones anaerobias que favorece el desarrollo de bacterias capaces de producir ácido láctico, por el cual el material vegetal se conserva (Ramírez-Martínez *et al*, 2000; Gaime-Perraud *et al*, 2000). El ácido láctico o ácido α -hidroxi-propiónico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$), es el responsable de la leche agria que el hombre conoce desde hace miles de años. Es consecuencia del desarrollo de un tipo peculiar de microorganismos englobados en un grupo denominado bacterias del ácido láctico (Parés y Juárez, 1997). La rápida acidificación del medio inhibe microorganismos causantes de la descomposición y de ésta manera, se conserva el producto (Heinz, 1986). Durante el proceso del ensilaje de la pulpa de café seca, se observó que hubo una importante disminución del total de compuestos fenólicos y particularmente del ácido clorogénico (de 850 a 150 unidades de absorbancia). En la Figura 2.7 se muestran los cromatogramas de análisis de los compuestos fenólicos por HPLC de la pulpa de café después de 30 días de ensilaje (Gaime-Perraud, 1995).

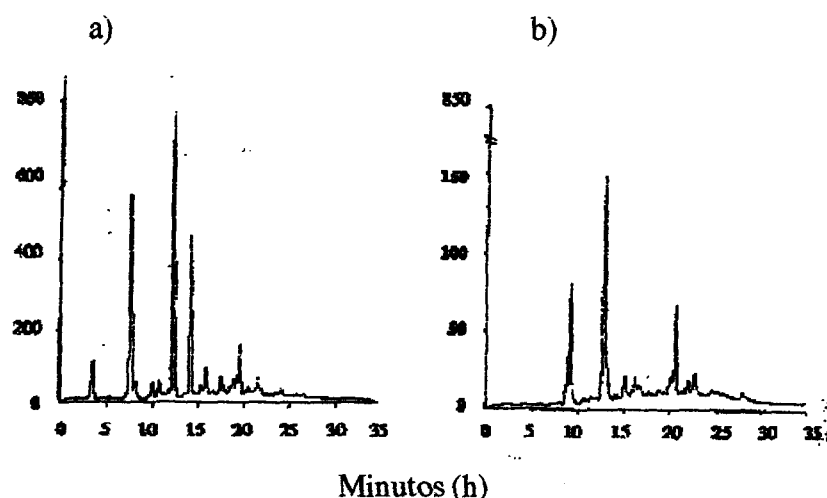


Figura 2.7 Perfil de los polifenoles totales antes (a) y después (b) de ensilar durante 30 días pulpa de café (Gaime-Perraud, 1995)

Posiblemente la disminución que se observó de los compuestos fenólicos en la pulpa ensilada fue debida a la presencia de las bacterias lácticas, pues son los principales microorganismos que están presentes a lo largo del ensilaje y que además, son los responsables de conservar el producto. Otra observación sobre la variación de los compuestos fenólicos de la pulpa de café fue también reportada por Ramírez-Martínez y Clifford (2000), quienes observaron que el contenido de taninos condensados se mantuvo constante durante las tres primeras semanas del ensilaje de la pulpa de café, pero disminuyó en más de un 40% después de un período de más de 100 días.

2.3 Degradación de compuestos fenólicos por microorganismos

Los taninos y los compuestos fenólicos en general, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son considerados como estructuras importantes por servir como defensa ante la descomposición microbiana. Esta característica de resistencia es atribuida a la habilidad de estas sustancias para inhibir el crecimiento de microorganismos por unirse fuertemente a proteínas y polisacáridos que pudieran utilizar los microorganismos como nutrientes (Galiotou y Macris, 1986). Sin embargo, se han reportado diferentes microorganismos, principalmente hongos, por su capacidad para degradar taninos. En la Tabla 2.5 se enlistan algunos microorganismos capaces de crecer sobre taninos como única fuente de carbono.

Tabla 2.5 Microorganismos capaces de crecer sobre taninos

Microorganismo	Substrato de taninos	Otros autores
Hongos filamentosos		
<i>Aspergillus niger</i>	extracto de semillas de <i>Myrtus communis</i>	Scalbert, 1991
<i>Aspergillus niger</i>		Aguilar <i>et al</i> , 2000
<i>Aspergillus oryzae</i>	ácido tánico	Lane <i>et al</i> , 1996
<i>Calvatia gigantea</i>		Scalbert, 1991
<i>Penicillium sp.</i>		Scalbert, 1991
<i>Penicillium adametzi</i>		Scalbert, 1991
<i>Trichoderma viride</i>		Scalbert, 1991
Levaduras		
<i>Candida sp.</i>	ácido tánico	Aoki <i>et al</i> , 1975
<i>Calvatia gigantea</i>	catequina	Galiotou-Panayotou <i>et al</i> , 1988
<i>Candida guilliermondii</i>		Scalbert, 1991
<i>Candida tropicalis</i>		Scalbert, 1991
<i>Torulopsis candida</i>	taninos	Otük y Deschamps, 1983
<i>Saccharomyces rouxii</i>		Scalbert, 1991
Bacterias		
<i>Achromobacter sp.</i>		Scalbert, 1991
<i>Azotobacter vinelandii</i>		Scalbert, 1991
<i>Escherichia coli</i>		Scalbert, 1991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Scalbert, 1991
<i>Corynebacterium sp.</i>		Scalbert, 1991
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ácido tánico, ácido gálico, protocatequico, catecol y catequina	Deschamps <i>et al</i> , 1980
<i>Bacillus licheniformis</i>	ácido tánico	Mondal y Pati, 2000
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	ácido tánico, ácido gálico, extracto de taninos condensados	O'Donovan y Brooker, 2001
<i>Citrobacter freundii</i>	ácido tánico y ácido gálico	Ajay-Kumar <i>et al</i> , 1999
<i>Pantoea agglomerans</i>	ácido gálico	Zeida <i>et al</i> , 1998
<i>Pelobactersp.</i>	ácido gálico, pirogalol y floroglucinol	Parés y Juárez, 1997
<i>Coprococcus sp.</i>	ácido gálico, pirogalol y floroglucinol	Parés y Juárez, 1997

2.3.1 Defensas microbianas contra compuestos fenólicos

Varios mecanismos de detoxificación pueden contribuir a la explicación del crecimiento de microorganismos sobre medios ricos en taninos. La secreción de sustancias poliméricas, la producción de enzimas que degradan compuestos fenólicos y la oxidación de los mismos son algunas de ellas.

2.3.1.1 Secreción de polímeros que fijan taninos

Algunos microorganismos pueden secretar fuera de la célula polímeros con una alta afinidad a los taninos haciendo que los taninos sean incapaces de combinarse con otras moléculas como las enzimas microbianas, las cuales son esenciales para el crecimiento de dichos microorganismos. Algunos animales como las ratas son capaces de desarrollarse en dietas ricas en taninos. Estas dietas mostraron inducir en los animales la secreción de proteínas de la saliva rica en hidroxiprolina que presenta una alta afinidad a los taninos (Scalbert, 1991).

2.3.1.2 Oxidación de taninos

Los taninos pueden ser oxidados por polifenoloxidasas transformando su estructura y de esta manera disminuir su toxicidad. Los taninos inducen la síntesis de la enzima lacasa (benzenediol oxígeno oxidoreductasa) en hongos de los géneros *Trametes hirsuta* (Scalbert, 1991) y *Phanerochaete chrysosporium* (Srinivasan *et al*, 1995). La lacasa oxida el núcleo fenólico por un electrón formando un radical libre fenoxi, el cual origina polimerización espontánea (Chafetz *et al*, 1998). También pueden inducir la co-polimerización de proteínas solubles con taninos u otros fenoles y eventualmente inactivar las enzimas fúngicas que dañan al invasor (Scalbert, 1991).

2.3.1.3 Enzimas degradadoras de compuestos fenólicos

Aunque enzimas como la α -amilasa y la tripsina son inhibidas por compuestos fenólicos (Quesada *et al*, 1995), pocas enzimas como la tanasa (Aguilar *et al*, 2000), la ácido gálico

descarboxilasa (Zeida *et al*, 1998) y enzimas que degradan taninos condensados (Otük y Deschamps, 1983; Galiotou-Panayotou y Macris, 1986) aumentan su actividad en presencia de estos compuestos. La enzima ácido tánico hidrolasa (ATH) mejor conocida como tanasa, actúa sobre los taninos hidrolizables como el ácido tánico, ácido digálico y metilgalato. La tanasa tiene actividades esterasa y depsidasa sobre taninos hidrolizables (Figura 2.8).

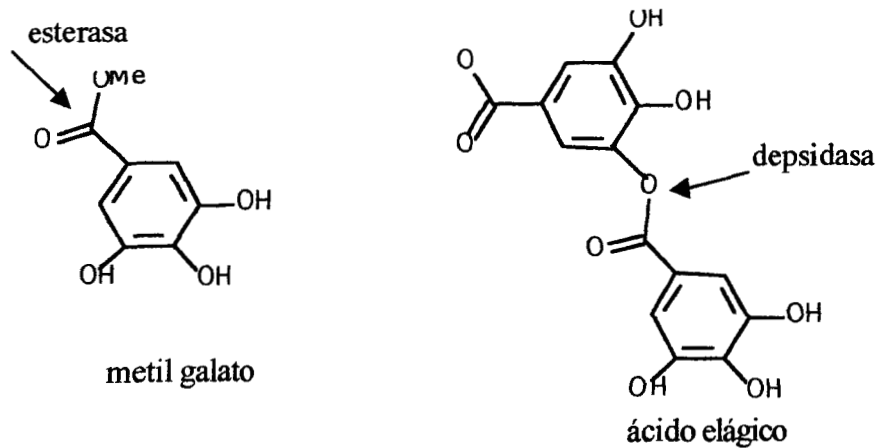


Figura 2.8 Actividad esterasa y depsidasa de la tanasa

El ácido clorogénico, un dépsido del ácido caféico y ácido quínico, es degradado por la tanasa y se reportó que fue hidrolizado en el jugo de uva, produciendo ácido caféico y ácido quínico. La tanasa también hidroliza las moléculas de (-)-epicatequina galato y de (-)-epigalocatequina-3-galato, los cuales son taninos condensados presentes en el té (Lekha y Lonsane, 1997)

Las tanasas presentes en los microorganismos que habitan en el suelo probablemente juegan un papel muy importante en la descomposición y reciclaje de materiales de plantas que contienen taninos (Lekha y Lonsane, 1997). Efluentes conteniendo fenoles son productos de la industria de carbón, tintorerías, refinadoras de aceite y durante la molienda de la pulpa y el café. Estos métodos son antiecológicos causando coloración en las aguas receptoras. Sin embargo, hay métodos de defenolización de las aguas de desecho incluyendo la extracción con solventes, adsorción con carbón activado, degradación microbiana y oxidación química. A pesar de que

estos métodos son utilizados se tienen los inconvenientes de alto costo, purificación incompleta, formación de subproductos peligrosos o restricción para aplicarlo a contaminantes. Por lo que otros métodos con tecnologías enzimáticas son necesarias para los tratamientos de degradación de compuestos fenólicos (Kadhim, 1999). Por dicha razón, es importante encontrar microorganismos con capacidad de degradar taninos y aislar las enzimas responsables.

Pocos microorganismos han sido reportados como degradadores de taninos condensados y catequinas. Sin embargo, los mecanismos de degradación de taninos condensados por microorganismos es un área que no ha sido explorada en detalle (Lekha y Lonsane, 1997). Galiotou-Panayatou *et al* (1988) aislaron un enzima de la levadura *Calvatea gigantea* que hidrolizó la catequina. Por otra parte, se encuentran enzimas que degradan los ácidos fenólicos simples como la enzima ácido gálico descarboxilasa (AGD) que cataliza la descarboxilación del ácido gálico a pirogalol (Figura 2.9).

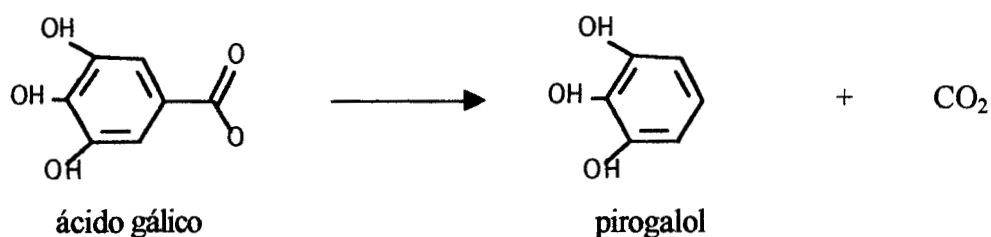


Figura 2.9 Degradación de ácido gálico en pirogalol por la enzima ácido gálico descarboxilasa

Zeida *et al* (1998) purificaron y caracterizaron la enzima producida por la bacteria *Pantoea agglomerans* y encontraron que el microorganismo también presenta la actividad tanasa capaz de hidrolizar el ácido tánico. Asimismo, O'Donovan y Brooker (2000) reportaron las unidades formadoras de colonias de *S. galloyticus* que creció sobre placas de agar con 0.75 y 3% de ácido tánico. El microorganismo creció y después se observó que presentaba la actividad AGD en presencia de 1% de ácido gálico, produciendo pirogalol en el medio de cultivo el cual no tuvo efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

Es importante encontrar nuevos microorganismos que degraden compuestos fenólicos y aislar las enzimas responsables. A continuación se describen a las bacterias lácticas debido a que son degradadoras de compuestos fenólicos.

2.4 Bacterias lácticas

2.4.1 Generalidades

Las bacterias lácticas son un grupo de bacterias Gram-positivas, inmóviles, no esporuladas que fermentan azúcares produciendo ácido láctico. Pueden crecer a diferentes temperaturas, en presencia de altas concentraciones de sal y ácido o bien, se desarrollan en hábitats anaerobios o en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno. Son microorganismos que no poseen sistema citocromo y carecen de la enzima catalasa y por lo tanto, no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. Son oxidasa negativa porque no presentan la enzima oxidasa la cual activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular. No reducen los nitratos y se clasifican como microorganismos heterofermentativos y homofermentativos. Los últimos se caracterizan por formar solo ácido láctico como producto de la fermentación mientras que los heterofermentativos, producen otros ácidos orgánicos e incluso llegan a formar gas (Tabla 2.6) (Axelson, 1993 y Heinz, 1986).

Tabla 2.6 Principales productos producidos debido al metabolismo de las bacterias lácticas (Seale, 1986)

Ruta aerobia

1. Homofermentativa

1 Glucosa (o fructosa) \longrightarrow 1 ácido láctico + 1 ácido pirúvico* + 1H₂O

2. Heterofermentativa

1 Glucosa (o fructosa) \longrightarrow 1 ácido láctico + 1 ácido acético + 1 CO₂ + 2H₂O

Ruta anaerobia

1. Homofermentativa

a). 1 glucosa (o fructosa) \longrightarrow 2 ácido láctico

b). 1 pentosa \longrightarrow 1 ácido láctico + ácido acético

2. Heterofermentativa

a). 1 glucosa \longrightarrow 1 ácido láctico + 1 etanol + 1 CO₂

b). 3 fructosa \longrightarrow 1 ácido láctico + manitol + 1 ácido acético +
1 CO₂

c). 2 fructosa + 1 glucosa \longrightarrow 1 ácido láctico + 1 ácido acético + 1 CO₂ +
2 manitol

d). 1 pentosa \longrightarrow 1 ácido láctico + 1 ácido acético

* El ácido pirúvico es oxidado a acetoina, ácido acético, ácido fórmico y CO₂

El ácido láctico es el metabolito que producen en mayor cantidad las bacterias lácticas y dependiendo del sustrato y de la cepa, éste se ha reconocido por tener un efecto antimicrobiano bueno o pobre que contribuye a la reducción del crecimiento de microorganismos patógenos y causantes de la descomposición de alimentos. El ácido acético es otro ácido orgánico que producen las bacterias lácticas. Cuando el ácido láctico y acético no están disociados, dañan la membrana celular de otros microorganismos presentes dando como resultado la inhibición del transporte de sustrato y la actividad ATPasa (Vuyst y Vandamme, 1994). En muchos casos,

las bacterias lácticas se detectan en productos alimenticios sin que ocurra descomposición, lo que hace suponer que su presencia es benéfica en función a que compiten exitosamente con microorganismos de descomposición. Las bacterias lácticas pueden antagonizar con otros microorganismos en diversas formas como es: la producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), formación de peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y por competencia por el sustrato (Mauguin y Novel, 1994). Por esta característica, las bacterias lácticas son empleadas en la conservación de productos cárnicos y pescado (Rebecchi *et al*, 1998; Lindgren y Pleje, 1983; Guerrero y Arteaga, 1990), lácteos como la leche ácida, el kefir, el yogurt (Mitsuoka, 1978; Bozoglu y Ray, 1995) y en alimentos de origen vegetal como pepinillos, aceitunas (Parés y Juárez, 1997; Bozoglu y Ray, 1995; Breidt y Fleming, 1997) y col ácida (“sauerkraut”) (Middelhoven y Klijn, 1997). También son esenciales para la obtención de mantequilla fermentada, miso, salsa de soya y sake (Mauguin y Novel, 1994). Forman parte de la fabricación de muchos quesos ya sea solas, o en conjunción con hongos y propionilbacterias (Boubekri y Otha, 1996). También son empleadas en la preparación de aditivos para la alimentación animal de forrajes ensilados (Salawu *et al*, 2001) y en la conservación de residuos agrícolas como maíz y alfalfa (Chunjian *et al*, 1992), sorgo y trigo (Lane *et al*, 1981).

Las bacterias lácticas han mostrado diferentes actividades enzimáticas como es la síntesis de amilasas por *Lb. plantarum* (Fitzsimons y O’Connell, 1986; Olympia *et al*, 1995). También han sido aisladas y caracterizadas peptidasas de *Lb. casei* (Bozoglu y Ray, 1995) y recientemente Osawa *et al* (2000) reportaron la actividad tanasa por *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*, a través de la observación de halos de hidrólisis.

Las bacterias lácticas incluyen los géneros de *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, y *Weissella*. En la Tabla 2.7 se muestran los géneros y las especies de estos microorganismos.

Tabla 2.7 Géneros y especies de bacterias lácticas (Collins *et al*, 1993)

Género	Especie
microbiano	
<i>Aerococcus</i>	<i>A. urinae</i> , <i>A. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. piscicola</i> , <i>C. mobile</i>
<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i> , <i>V. salmoninarum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. casei</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. uberis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactae</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. hamsteri</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. oris</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. hilgardii</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. oenos</i> , <i>Ln. fallax</i> , <i>Ln. carnosum</i> , <i>Ln. gelidum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Ln. citreum</i> , <i>Ln. lactis</i>
<i>Weissella</i>	<i>W. kandieri</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. minor</i> , <i>W. halotolerans</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. confusa</i>

Las bacterias lácticas que incluyen tanto cocos como bacilos, representan requerimientos nutritivos complejos. Esto lleva a la necesidad de usar medios especiales como el de agar sangre, el de Edwards, el de jugo de tomate o el de Rogosa. Las características comunes de todos éstos medios son la presencia de azúcar, la adición de productos naturales complejos en cada caso y, para el aislamiento, la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento de otros microorganismos (Parés y Juárez, 1997).

Las bacterias lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y también se encuentran en el intestino y vagina de humanos y animales, así como en productos agrícolas. Las bacterias lácticas que colonizan el intestino de humanos y animales son nativas del intestino y son diferentes de las bacterias lácticas encontradas en los alimentos. Algunas especies bacterias

lácticas como bifidobacteria y enterococci (*S. faecalis* y *S. faecium*) son de las bacterias lácticas predominantes en el intestino humano. También se encuentran lactobacilos como *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius* y *Lb. fermentum* (Mitsuoka, 1978).

2.4.2 Degradación de compuestos fenólicos

Deschamps *et al* (1980) fueron de los primeros investigadores en aislar 15 bacterias pertenecientes a los géneros de *Klebsiella* y *Bacillus* capaces de degradar ácido tánico y asimilar otros compuestos fenólicos. Whiting (1973) fue de los primeros investigadores en reportar actividad de las bacterias lácticas sobre compuestos fenólicos presentes en la fermentación de la cidra. Durante la elaboración de este producto, cuando se lleva a cabo la fermentación maloláctica, las bacterias lácticas presentes consumen ácido málico para producir ácido láctico y ácido acético con la finalidad de disminuir el nivel de acidez del producto, se observó que el quinato fue metabolizado después de completarse la fermentación maloláctica, y sus ésteres el ácido clorogénico y p-cumarilquinico, fueron metabolizados. Bacilos heterofermentativos y algunos homofermentativos, redujeron el quinato y un compuesto relacionado, el sikimato. Los bacilos heterofermentativos hidrolizaron el ácido clorogénico en dos partes metabolizables, el ácido quínico y el ácido caféico. Posteriormente, redujeron el (-) quinato a (-) dihidrosikimato mientras que los bacilos homofermentativos, lo transformaron a un estado más reducido (3,4-dihidroxiciclohexanecarboxilato). El sikimato fue reducido a algunos productos y fue un intermediario en la ruta de reducción del quinato a ácido dihidroxikimato (Figura 2.11). Una característica de esta ruta es el hecho de que ambos D y L lactatos, actuaron como donadores de hidrógenos para reducir este compuesto. También se observó que el lactato fue oxidado hasta acetato.

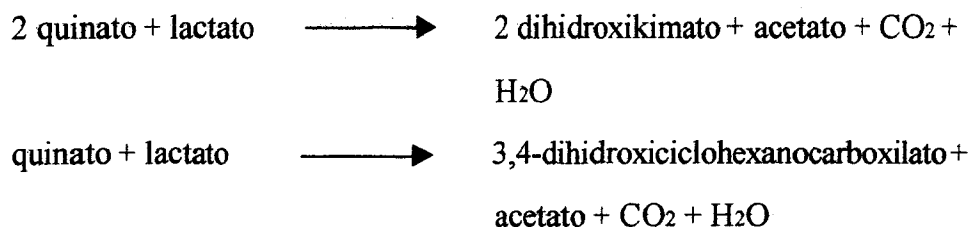


Figura 2.10 Reducción de quinato por bacterias lácticas presentes en el proceso de elaboración de la cidra (Whiting, 1973).

Las bacterias homofermentativas como *Lb. plantarum* no solo reducen el quinato, al mismo tiempo bajo condiciones anaerobias, oxidan una proporción del producto por acción de una dehidratasa y descarboxilasa a catecol. Algunos lactobacilos heterofermentativos hidrolizan el ácido clorogénico y reducen el quinato. El producto aromático junto con el ácido caféico libre presente, es reducido a ácido dehidrocaféico y descarboxilado a etil catecol. Aparentemente, el lactato actúa como donador de hidrógeno con el NAD dependiente de lactato deshidrogenasa como la enzima activa (Whiting, 1973).

Por otra parte, Bravo *et al* (1994) y Hara (1997) reportaron que durante ensayos de fermentación *in vitro*, realizando estudios del efecto de polifenoles (catequina y ácido tánico) sobre la microflora presente en el tracto intestinal de ratas, la catequina no tuvo un efecto negativo sobre las bacterias lácticas. Ambos, el ácido tánico así como la catequina, fueron degradados durante la fermentación. Posteriormente, Osawa *et al* (2000) aislaron a partir de alimentos fermentados y de heces de humanos, 25 bacterias lácticas de los géneros *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. paraplantarum* con capacidad de crecer sobre placas de agar con ácido tánico como única fuente de carbono y degradar ácido gálico en pirogalol. Sin embargo, no estudiaron el efecto que presentaban los compuestos fenólicos sobre la producción de ácido láctico por las bacterias reportadas. O'Donovan y Brooker (2001) realizaron un estudio del efecto del ácido tánico sobre la producción de ácido láctico por las bacterias ruminales *S. gallolyticus* y *S. bovis* y encontraron que producen la misma cantidad de ácido

lático en presencia o ausencia de ácido gálico y además, lo degradan completamente hasta pirogalol.

2.5 Conclusión

En ésta revisión bibliográfica se estudió la clasificación y la importancia que tienen los compuestos fenólicos como parte integral del metabolismo de las plantas puesto que actúan como soporte mecánico y barrera contra microorganismos. La principal característica de los polifenoles es la afinidad a las proteínas, carbohidratos y enzimas por lo que se consideran compuestos antinutricionales. Por ésta razón, materiales agrícolas ricos en nutrientes y polifenoles como es la pulpa de café, no pueden ser destinados a la alimentación de ganado debido a que los polifenoles se encuentran unidos a las proteínas y el animal no puede asimilarla. No obstante, se hizo una revisión de los mecanismos de degradación de polifenoles a través de enzimas o de la secreción de polimeros que fijan taninos y la oxidación de taninos.

También fue importante detallar que hay medios químicos a través de los cuales se pueden degradar los polifenoles; sin embargo, éstos procesos son costosos por lo que una alternativa es la degradación por vía enzimática. Hay diversos reportes de microorganismos que poseen las enzimas adecuadas para degradar compuestos fenólicos y en la mayoría de los casos, se reportan a los hongos como principales degradadores de polifenoles. Existen pocos reportes sobre bacterias. Sin embargo, las bacterias lácticas han tomado un papel muy importante como degradadoras de compuestos fenólicos. Por ésta razón, se hizo una revisión de las bacterias lácticas, sus características y la importancia de utilizar estos microorganismos para la conservación de subproductos agrícolas como en el ensilaje de pulpa de café. Algunas de éstas bacterias pueden degradar los compuestos fenólicos presentes en desechos agrícolas o bien, éstos microorganismos pueden ser utilizados para degradar polifenoles de aguas residuales o de cualquier otro substrato que contenga polifenoles y que sean indeseables.

CAPÍTULO 3

Objetivos

227614

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la degradación de compuestos fenólicos (ácido gálico y ácido tánico) por bacterias lácticas aisladas del ensilaje de la pulpa de café

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Seleccionar cepas de bacterias lácticas capaces de crecer en medio sólido con ácido tánico y degradar ácido gálico en un medio líquido

3.2.2 Evaluar el efecto del ácido gálico sobre el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico

3.2.3 Evaluar el efecto del *precultivo* sobre la biodegradación de ácido gálico por *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20) en presencia 9 y 26 g·L⁻¹ de ácido gálico

3.2.4 Obtener el patrón de producción de pirogalol por las cepas *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20)

CAPÍTULO 4

Métodos y Materiales

4. MÉTODOS Y MATERIALES

En este capítulo se describen los métodos y materiales empleados para la selección de bacterias lácticas degradadoras de compuestos fenólicos. También se presentan las técnicas analíticas empleadas para hacer la selección de bacterias basándose en su capacidad de crecer sobre agar con ácido tánico como fuente de carbono, así mismo las técnicas empleadas para el estudio de la biodegradación de ácido gálico.

4.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental para la selección de cepas bacterianas y el estudio de la biodegradación de ácido gálico se muestran en la Figura 4.1

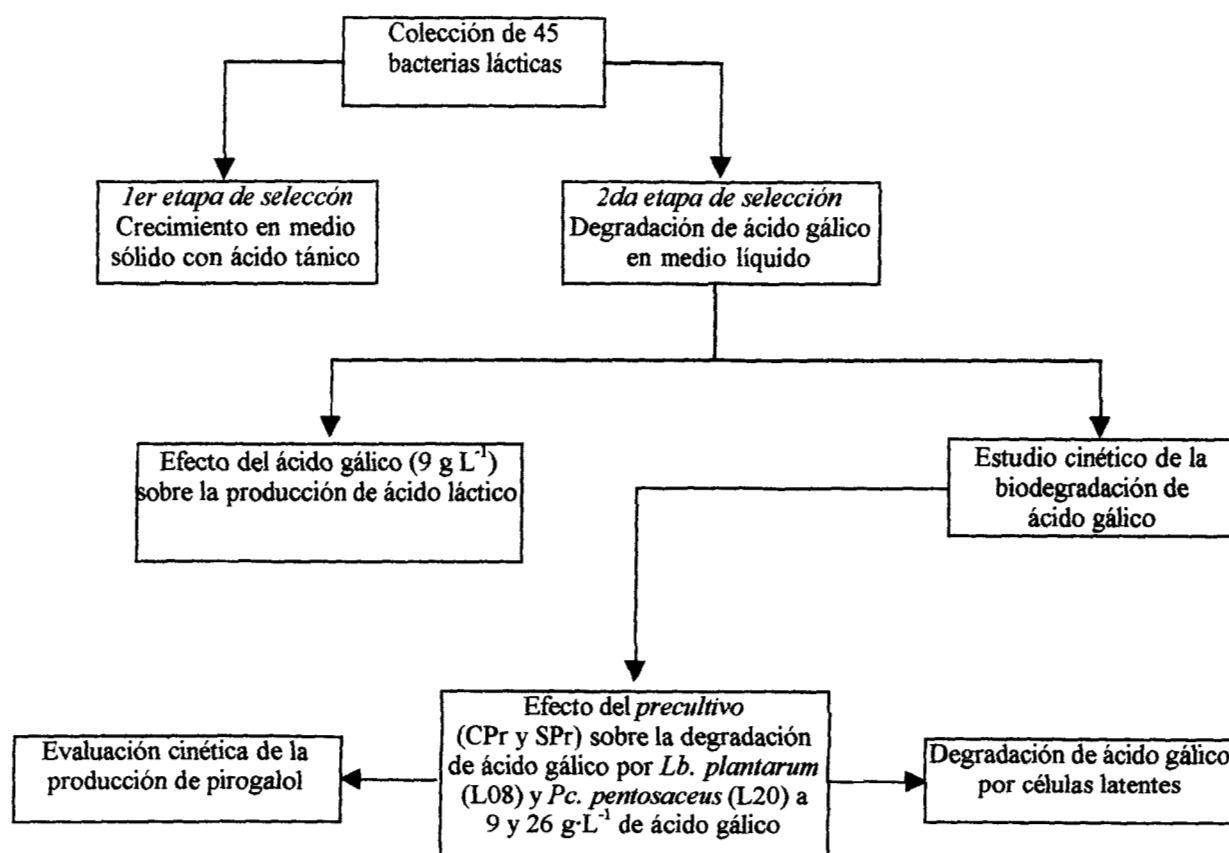


Figura 4.1 Estrategia experimental para probar la degradación de compuestos fenólicos por bacterias lácticas

Lo primero que se realizó fue una selección de cepas de bacterias lácticas que mostraran una actividad sobre compuestos fenólicos para ello, se consideraron 2 criterios; el primero, de la colección de 45 bacterias lácticas se seleccionaron las cepas capaces de crecer en medio sólido con ácido tánico (5 gL^{-1}) en los medios MRS-tan *agar* y MRS-glu-tan *agar*. El segundo criterio consistió en la selección de bacterias degradadoras de ácido gálico (9 gL^{-1}) en los medios MRS-glu-gal y MRS-gal. Posteriormente, se realizó un estudio de la biodegradación de ácido gálico donde se evaluó su efecto sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico a las 72 h de cultivo en microaerobiosis. Así mismo, se hizo un estudio cinético de la biodegradación de 9 gL^{-1} de ácido gálico y se evaluó el efecto a una concentración más alta (26 gL^{-1}) sobre el metabolismo de las cepas ensayadas, *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20). Las cinéticas se llevaron a cabo debido a que se estaban manejando tiempos muy prolongados de fermentación (72 h), además de que los cultivos bacterianos fueron adaptados al ácido gálico, es decir, a un *precultivo* (sección 4.4.2.1). También se hizo una cinética de la degradación de ácido gálico después de que las cepas fueron inoculadas sobre una solución fisiológica con ácido gálico (9 gL^{-1}).

Se cuantificó la producción de biomasa, consumo de glucosa, producción de ácido láctico, consumo de citrato, consumo de ácido gálico y producción de pirogalol para todos los casos. Las muestras se monitorearon a intervalos de 12 h hasta las 72 h. Se observó que desde las 12 h de fermentación, el ácido gálico había sido consumido totalmete por lo tanto, se hicieron nuevamente cinéticas y se monitorearon muestras desde las 2 h de incubación hasta las 16 h, y un último análisis a las 24 h para la cinética de 9 gL^{-1} mientras que para la cinética con 26 gL^{-1} de ácido gálico, se tomaron muestras hasta las 72 h. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Cada tubo correspondía a un tiempo determinado de la cinética y fue analizado de manera independiente. Los tubos con el medio de cultivo fueron preparados con medio MRS de la misma manera como se describe en la sección 4.3.3, con la adición de ácido gálico (9 ó 26 gL^{-1}) y con o sin glucosa, además del *precultivo* (CPr y SPr).

4.2 Microorganismos

Las cepas de bacterias lácticas empleadas en el estudio de la degradación de compuestos fenólicos pertenecen a la colección IRD-UAMI, que cuenta con un total de 99 cepas identificadas como bacterias lácticas. Las cepas fueron aisladas a partir del ensilaje (30 días) de pulpa de café. Ésta pulpa es un subproducto que se obtiene durante la obtención del grano de café en Xalapa, Veracruz (Gaiame-Perraud, 1995, Suzuki, 1999). Para probar la degradación de compuestos fenólicos, se eligieron 45 cepas tomando en cuenta dos puntos. El primero, se escogieron las bacterias basándose en la diversidad de géneros microbianos y especies con los que contaba la colección. El segundo punto a considerar fue el coeficiente de identificación que presentaron las cepas al haber sido analizadas a través del sistema de identificación microbiana. Ésta técnica consiste en analizar y cuantificar la concentración de ácidos grasos bacterianos, comparándola con un patrón de referencia (MIDI, 1997).

El coeficiente de identificación es un valor numérico que se encuentra dentro de un rango entre 0 y 1 y representa la cercanía o igualdad de la cepa que se desea identificar con respecto a los géneros bacterianos conocidos que se encuentran dentro de una base de datos (MIDI, 1997). Las cepas con una similaridad arriba de 0.600 y con una separación de 0.100 entre el primer valor y el segundo de la identificación de la cepa son consideradas buenas identificaciones. En la Tabla 4.1 se muestran los géneros bacterianos y el número de cepas que fueron ensayadas junto con su coeficiente de identificación empleadas para probar el crecimiento sobre medio sólido en con ácido tánico y la degradación de ácido gálico em medio líquido.

Tabla 4.1 Cepas seleccionadas para probar la degradación de compuestos fenólicos

Género microbiano	No. de cepas probadas	Coefficiente de identificación
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	0.61-0.85
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	4	0.55-0.64
<i>Lactobacillus casei</i>	1	0.76
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	4	0.41-0.93
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	0.31-0.44
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	0.84
<i>Lactobacillus bif fermentens</i>	1	0.43
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	0.71
<i>Weissella confusa</i>	3	0.69-0.79
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	0.53-0.79
NI	15	-

NI: cepas no identificadas dentro de la base de datos del laboratorio donde fueron identificadas (MIDI, 1997)

4.3 Conservación de cepas

Las cepas fueron conservadas en el medio de referencia MRS *Lactobacilli* (sección 4.3). Después de esterilizados los tubos con el medio de cultivo y una vez que estuvieron a temperatura ambiente, fue adicionado el 10% de inóculo. Se incubaron a 30°C por 48 h. Posteriormente, 1 mL del medio de cultivo con bacterias fue inoculado en criotubos de 2 mL de volumen y adicionados con 30% de glicerol. Los criotubos fueron conservados a - 30°C.

4.3.1 Propagación del inóculo

Un mL del cultivo bacteriano de cada una de las 45 cepas fueron inoculados por duplicado en tubos con 9 mL de medio MRS *Lactobacilli* estéril (120°C / 15 min) e incubados a 30°C por 48 h. Posteriormente, fueron refrigerados a 4°C para su conservación realizándose resiembras 1 vez cada 30 días.

4.4 Medio de cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el medio de cultivo MRS (De Man *et al*, 1960) que es uno de los medios empleados para el crecimiento de Lactobacilos y otras bacterias lácticas. En la Tabla 4.2 se muestra su composición.

Tabla 4.2 Composición del medio MRS *Lactobacilli* (De Man *et al*, 1960)

Compuesto	g·L ⁻¹
Glucosa	20
Polipeptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
(NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	2
CH ₃ CO ₂ Na·3H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
pH	6.8

Para los estudios de la degradación de compuestos fenólicos por bacterias lácticas fueron preparados diferentes medios teniendo como “base” en cada uno de ellos los componentes del medio MRS. Solo fue variada la concentración de glucosa y se adicionó el compuesto fenólico. En la tabla 4.3 y 4.4 se muestra la composición de los medios sólidos con ácido tánico y los medios líquidos con ácido gálico, respectivamente.

Tabla 4.3 Composición de los medios sólidos con ácido tánico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Compuesto	MRS-glu agar	MRS-glu-tan agar	MRS-tan agar
Glucosa	5	5	-
Tánico	-	5	5
Polipeptona	10	10	10
Extracto de carne	10	10	10
Extracto de levadura	5	5	5
$(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	2	2	2
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5	5	5
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.1	0.1
$\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.05	0.05
K_2HPO_4	2	2	2
Tween 80	1	1	1
Agar	10	10	10
pH	6.87	4.45	4.45

Tabla 4.4 Composición de los medios líquidos con ácido gálico ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Compuesto	MRS-glu	MRS-glu-gal	MRS-gal	MRS-glu-gal 26
Glucosa	4.5	4.5	-	4.5
Gálico	-	9	9	26
Polipeptona	10	10	10	10
Extracto de carne	10	10	10	10
Extracto de levadura	5	5	5	5
$(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$	2	2	2	2
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5	5	5	5
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.1	0.1	0.1
$\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.05	0.05	0.05
K_2HPO_4	2	2	2	2
Tween 80	1	1	1	1
pH	6.57	4.87	4.87	4.67

4.4.1 Medio de referencia (MRS *Lactobacilli*)

Se disolvió 55 g de medio de cultivo MRS *Lactobacilli* en 1 litro de agua destilada. Tubos de ensaye (con tapón y capacidad de 15 mL) se llenaron con 9 mL de medio y fueron esterilizados a 120°C por 15 min.

4.4.2 Medios sólidos (MRS-glu agar, MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar)

Se prepararon dos medios. En una primera etapa, fueron disueltos la “base” del medio MRS en agua destilada. Se adicionó glucosa y agar y fue esterilizado a 120°C por 15 min. Posteriormente, éste medio fue dividido en dos partes y a una de ellas se le adicionó ácido tánico previamente esterilizado a través de una membrana *Millipore*® de 0.22 micras. Estos medios fueron denominados medios sólidos con glucosa (MRS-glu agar) y glucosa + ácido tánico (MRS-glu-tan agar), respectivamente. En la segunda etapa, se disolvió la “base” del medio y se adicionó solamente agar y se calentó hasta ebullición. Después el medio fue esterilizado (120°C por 15 min) y el ácido tánico fue adicionado de la misma manera que se describió anteriormente. Éste último medio fue denominado MRS-tan agar (Tabla 4.3). Por último, los tres medios fueron vaciados en cajas Petri estériles y se dejaron reposar hasta solidificar.

4.4.3 Medios líquidos (MRS-glu, MRS-glu-gal, MRS-gal y MRS-glu-gal 26)

En ésta parte también se prepararon dos medios. En el primero, fueron disueltos los componentes de la “base” del medio MRS más la glucosa (4.5 gL⁻¹). El medio se repartió en tres partes. En una de ellas, se adicionó ácido gálico a una concentración de 9 gL⁻¹ y en la segunda, 26 gL⁻¹. En la tercera parte no se adicionó ácido gálico. Estos medios fueron denominados MRS-glu-gal, MRS-glu-gal 26 y MRS-glu, respectivamente. En la segunda fase, se disolvió la “base” del medio MRS y se adicionó ácido gálico (9 gL⁻¹) sin glucosa, a éste medio se le llamó MRS-gal (Tabla 4.4). Se prepararon tubos de ensaye con 9 mL de cada uno de los medios y fueron esterilizados a 120°C por 15 min.

4.5 Características de los medios de cultivo

Con la finalidad de evaluar la capacidad de las bacterias lácticas para degradar compuestos fenólicos, los microorganismos fueron propagados en el medio MRS *Lactobacilli* y posteriormente, fueron inoculados en el mismo medio disminuyendo la concentración de

glucosa hasta $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MRS-glu agar y MRS-glu agar) y se agregó $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido tánico (MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar) o $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MRS-glu-gal, MRS-gal) y $26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido gálico (MRS-glu-gal 26).

4.5.1 Cultivo sólido en placa MRS con ácido tánico

A partir de los cultivos crecidos en el medio de referencia MRS *Lactobacilli*, las bacterias fueron inoculados por piquete sobre placas de agar con medio MRS con o sin glucosa y ácido tánico, como fuentes de carbono (Suzuki, 1999). Se incubaron a 30°C durante 3-5 días. Las placas fueron cuadrículadas y se inoculó una cepa en cada pequeño cuadro de tal manera que en cada caja había 10 cepas inoculadas por duplicado (Figura 4.2)

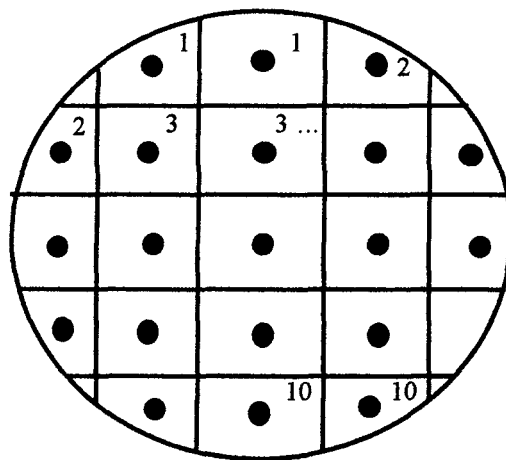


Figura 4.2 Inoculación por piquete de las 45 cepas de bacterias lácticas sobre los medios MRS-glu agar, MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar a 30°C por 3-5 días

Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento celular sobre las placas de los medios MRS-glu agar, MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar, así como la formación de zonas claras alrededor de las colonias de bacterias lácticas inoculadas por piquete en los medios con ácido tánico (halos de hidrólisis de ácido tánico). El medio MRS-glu agar fue utilizado como control del crecimiento celular en ausencia de ácido tánico.

4.5.2 Cultivo en medio líquido con ácido gálico

4.5.2.1 Precultivo

Se preparó el *precultivo* para todos los experimentos. Después de haber propagado los cultivos microbianos en el medio de referencia MRS *Lactobacilli*, 10% del cultivo fue inoculado en tubos con medio estéril MRS-glu-gal (4.5 gL⁻¹ de glucosa y 9gL⁻¹ de ácido gálico) e incubados a 30°C por 72 h.

4.5.2.2 Selección de cepas

Para confirmar la selección de cepas de bacterias lácticas que tuvieran la capacidad de degradar compuestos fenólicos y en este caso, degradar ácido gálico; se preparó medio MRS-glu-gal y MRS-gal y se distribuyeron en tubos y se esterilizaron. Posteriormente, fueron inoculados con 10% de los cultivos bacterianos que provenían del *precultivo* e incubados a 30°C por 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el ácido gálico por HPLC (columna ODS Phenomex C18). En la Figura 4.3 se describe la estrategia experimental para realizar la selección de cepas bacterianas capaces de degradar ácido gálico.

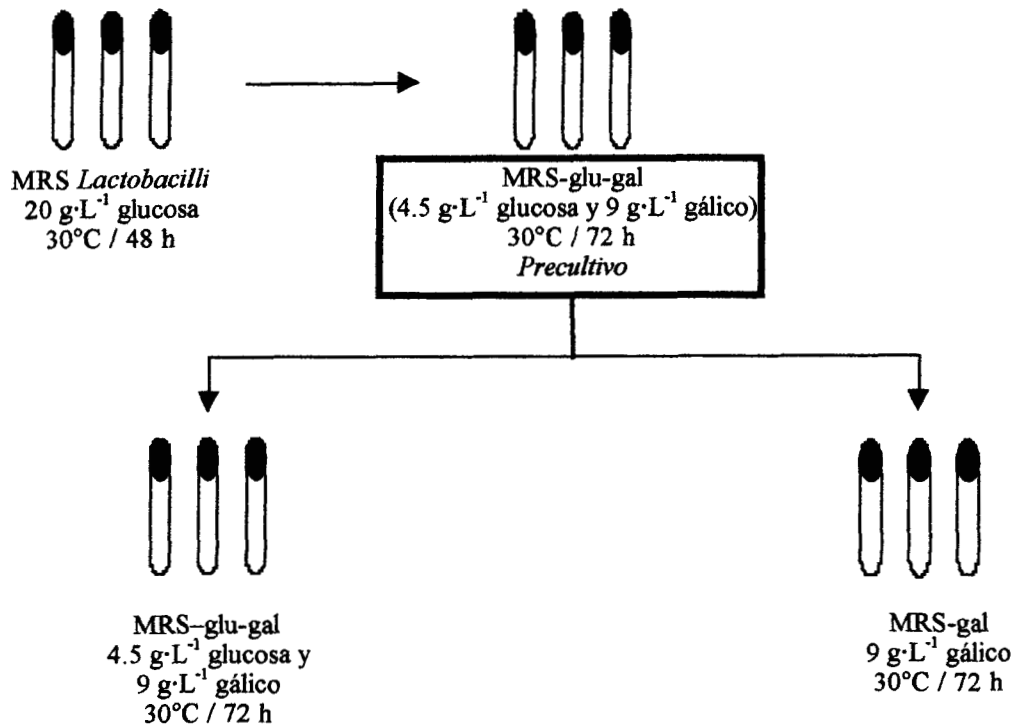


Figura 4.3 Estrategia experimental para la selección de cepas capaces de degradar ácido gálico

4.5.2.3 Estudio de la biodegradación de ácido gálico

Después del *precultivo*, el 10% de cada uno de los 45 cultivos bacterianos, fueron inoculados sobre tubos por duplicado con los medios estériles MRS-glu (control), MRS-gal y MRS-glu-gal (Tabla 4.4). Después de inocular todos los tubos, fueron incubados a 30°C por 72 h. A partir de estos últimos medios fue que se llevó a cabo los análisis de consumo de glucosa, producción de ácido láctico y degradación de ácido gálico por HPLC (columna para el análisis de ácidos orgánicos *BioRad*®). En la Figura 4.4 se muestra el esquema seguido para evaluar la degradación de ácido gálico.

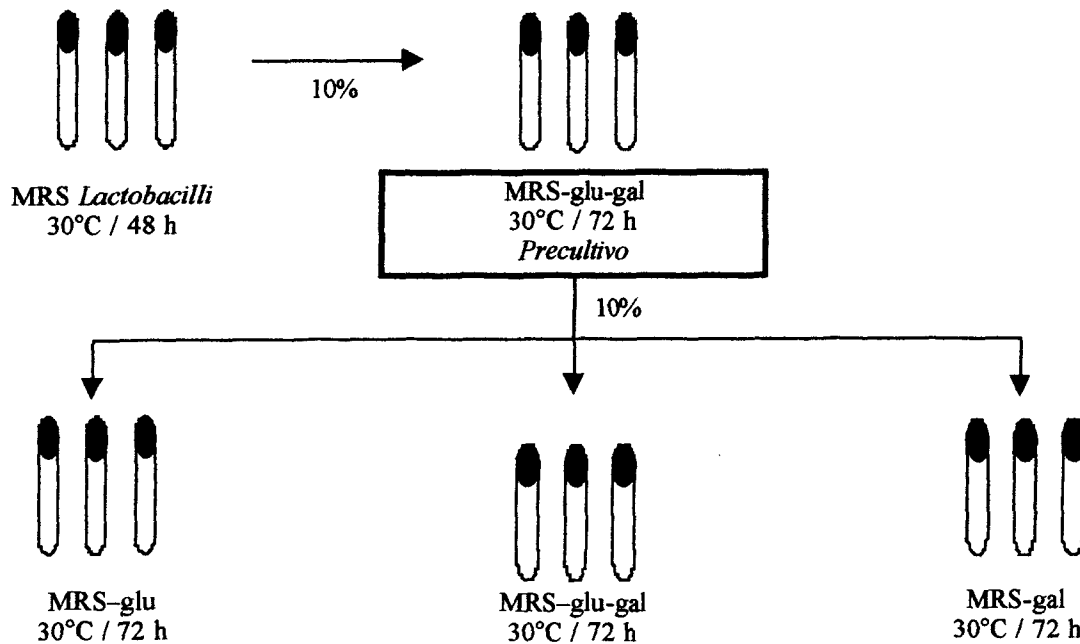


Figura 4.4 Degradación de ácido gálico sobre los medios MRS-glu-gal y MRS-gal teniendo como control el medio MRS-glu

4.5.2.4 Cinética de biodegradación de ácido gálico

Para el estudio cinético de la biodegradación de ácido gálico las cepas fueron inoculadas en tubos con medios estériles ($120^{\circ}\text{C}/15$ min) de medio MRS-glu-gal y MRS-glu-gal 26 (Tabla 4.4). En un caso, el inóculo provenía del *precultivo* (CPr) mientras que en el otro, provenía del medio MRS *Lactobacilli* (SPr).

También se elaboró una cinética sobre medio MRS-gal (SPr). Por último se prepararon tubos con 9 mL de solución fisiológica (0.9% de NaCl en agua) y se adicionó ácido gálico (9 gL^{-1}). Los tubos fueron esterilizados ($120^{\circ}\text{C}/15$ min). Una vez que estuvieron a temperatura ambiente, se inocularon con 10% de inóculo proveniente del medio MRS *Lactobacilli*. Las muestras que corresponden a los medios MRS-glu-gal (CPr y SPr) y MRS-gal (SPr), así como

los tubos preparados con solución fisiológica y ácido gálico fueron monitoreadas desde las 2 h de incubación hasta las 16 h y un último análisis a las 24 h, mientras que las muestras de MRS-glu-gal 26 (CPr y SPr), fueron analizadas hasta las 72 h de fermentación.

4.6 Preparación de las muestras

4.6.1 Para la selección de cepas

En la Figura 4.5 se muestra el tratamiento de las muestras para la selección de las cepas con capacidad de crecer en ácido tánico y degradar ácido gálico

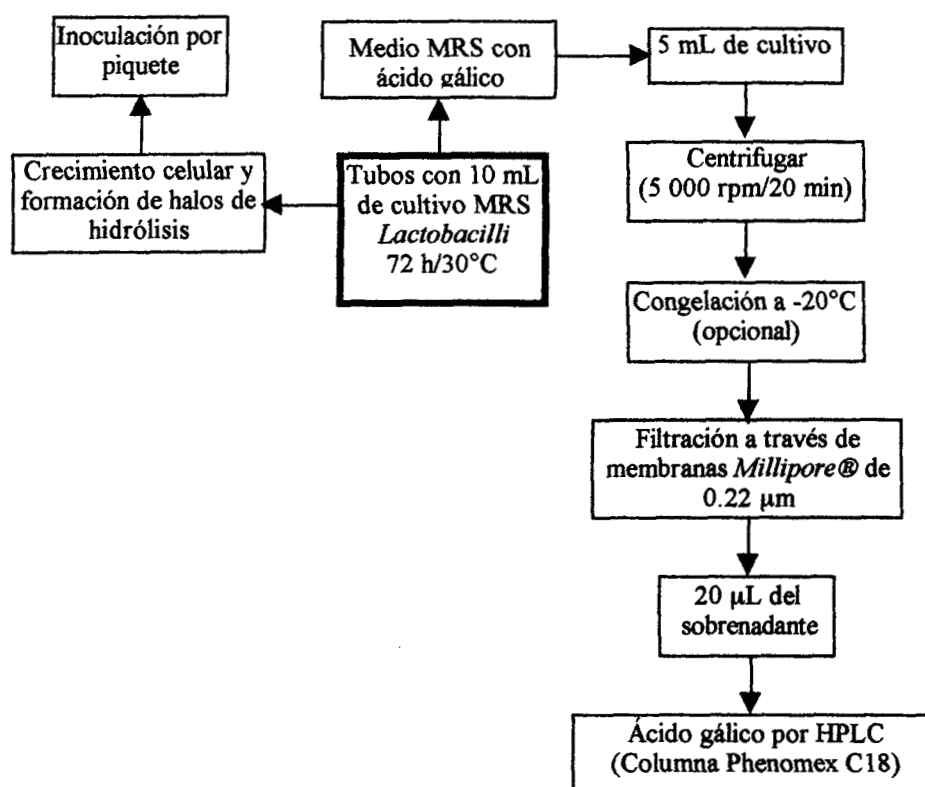


Figura 4.5 Preparación de las muestras para la selección de cepas capaces de crecer sobre placas con ácido tánico y degradar ácido gálico

4.6.2 Estudio de la biodegradación de ácido gálico

El procedimiento seguido para preparar las muestras y analizar biomasa, glucosa, citrato, ácido láctico, degradación de ácido gálico y pirogalol en los cultivos de bacterias lácticas se muestra en la Figura 4.6.

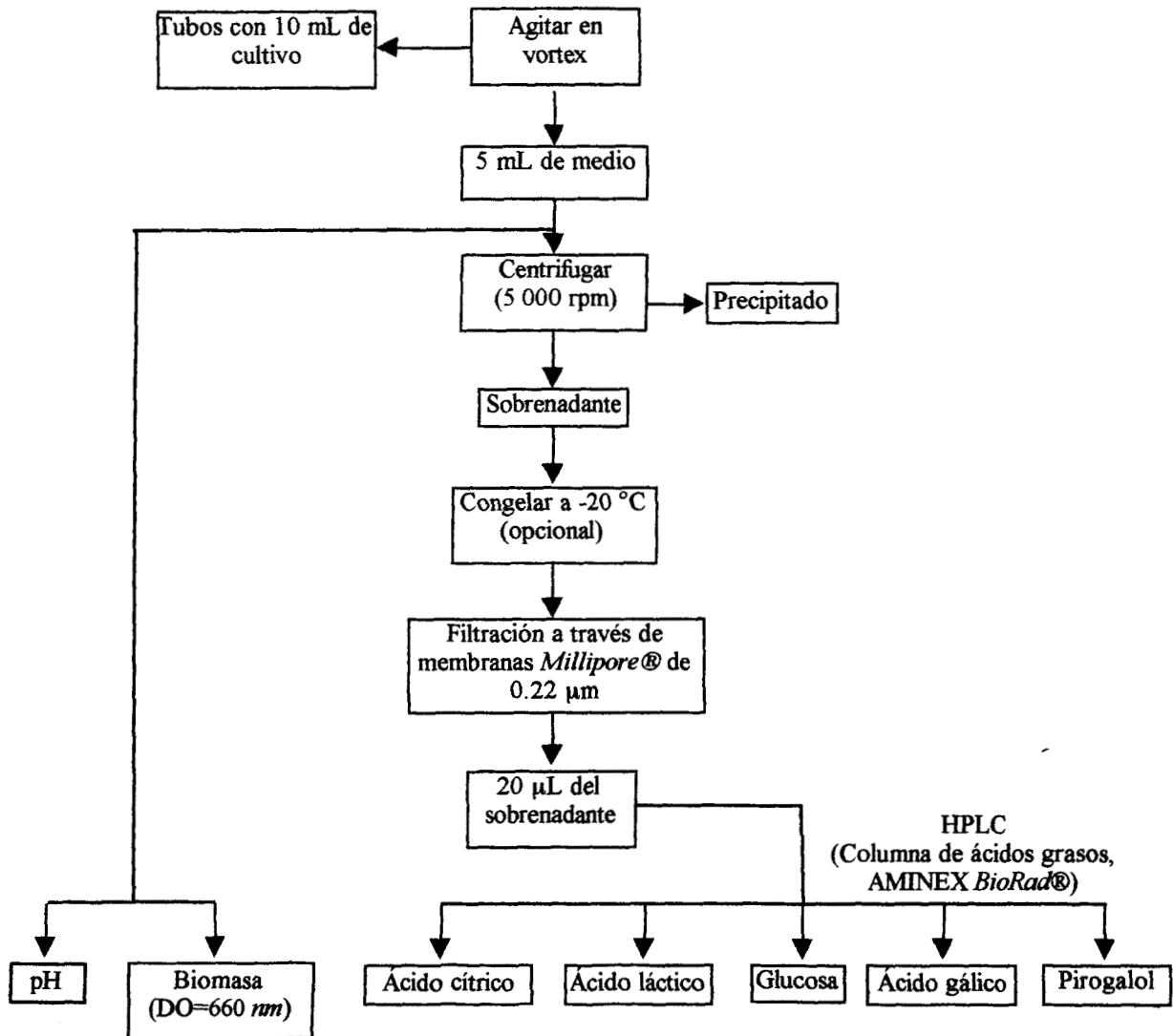


Figura 4.6 Procedimiento para preparar las muestras y hacer los análisis de pH, biomasa, glucosa, citrato, ácido láctico, ácido gálico y pirogalol

4.7 Técnicas analíticas

4.7.1 pH

El pH de los cultivos bacterianos se midió directamente sobre el medio de cultivo después del tiempo de incubación. La medición se realizó con un potenciómetro marca *Conductronic*®, calibrando con solución buffer pH 4 y 7.

4.7.2 Crecimiento celular

Dos mL del cultivo bacteriano fue colocado en una celda espectrofotométrica. Por otra parte, 2 mL de medio del cultivo de bacterias fue centrifugado a 5 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue filtrado a través de membranas *Millipore*® con poros de 2 µm y colocado dentro de la celda del espectrofotómetro. Este filtrado fue utilizado como blanco para la medición de biomasa. Las celdas se colocaron en un espectrofotómetro marca *Shimadzu*® modelo UV-160A. La biomasa se midió por DO a 660 nm (Chung *et al*, 1998).

4.7.3 Análisis de glucosa, citrato, ácido láctico y pirogalol por HPLC

Después del tiempo de fermentación, 2 mL del cultivo de bacterias fue centrifugado a 5 000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se filtró el sobrenadante por medio de membranas *Millipore*® de 2 µm y se analizó por HPLC. En la Tabla 4.5 se muestran las características de la columna para el análisis de ácidos orgánicos y glucosa (*Aminex HPX 87H BioRad*®). Los tiempos de retención del citrato, glucosa, ácido láctico y pirogalol fueron 8.8, 9.6, 13.5 y 26.7 minutos, respectivamente.

4.7.4 Ácido gálico

En la Tabla 4.5 se enlistan las características de las columnas empleadas para el análisis de ácido gálico.

Tabla 4.5 Columnas para cromatografía empleadas para el análisis de ácido gálico

	Columna <i>Phenomex</i> ® ODS	Columna Aminex HPX 87H <i>Bio-Rad</i> ® Organic acid analysis
Medida	400 mm x 7.8 mm	300 mm x 7.8 mm
Detector	uv, Beckman modelo 168	Índice de refracción LC-30 RI
Temperatura	40°C	50°C
Bomba	Binary LC pump 250	Binary LC pump 250
Flujo	1.6 mL min ⁻¹	0.6 mL min ⁻¹
Fase móvil	1% (v/v) HCOOH·H ₂ O	5 mM H ₂ SO ₄ /H ₂ O
Absorbancia	280 nm	
Sonicador	Branzon 2 200	Branzon 2 200

Para la primera parte de la selección de cepas capaces de degradar ácido gálico las muestras fueron centrifugadas, filtradas (sección 4.6.3) y analizadas por HPLC. El tiempo de retención del ácido gálico en ésta primer etapa fue 6.8 min, empleando la columna *Phenomex*® ODS. Para evaluar el efecto del ácido gálico sobre la producción de ácido láctico así como su estudio cinético de la biodegradación y se realizaron por HPLC utilizando la columna Aminex HPX 87H *Bio-Rad*®. El ácido gálico presentó un tiempo de retención de 29.52 min.

4.8 Expresión de resultados

4.8.1 Ácido gálico

La expresión del ácido gálico (G) se realizó después de la medición por HPLC de los cultivos bacterianos de la siguiente forma:

$$\Delta G = (G_{\text{inicial}} - G_{\text{final}}) * D$$

ΔG = ácido gálico degradado (g·L⁻¹)

D = factor de dilución de la muestra durante el análisis por HPLC

4.8.2 Glucosa

La expresión de la glucosa se realizó después de la medición por HPLC de los cultivos bacterianos de la siguiente forma:

$$\Delta G_l = (G_{\text{inicial}} - G_{\text{final}}) * D$$

ΔG_l = glucosa consumida ($g \cdot L^{-1}$)

D = factor de dilución de la muestra durante el análisis por HPLC

4.8.3 Ácido láctico

La expresión del ácido láctico producido se realizó después de la medición por HPLC de los cultivos bacterianos de la siguiente forma:

$$\Delta L = (L_{\text{inicial}} - L_{\text{final}}) * D$$

ΔL = ácido láctico producido ($g \cdot L^{-1}$)

D = factor de dilución de la muestra durante el análisis por HPLC

4.8.4 Pirogalol

La expresión del pirogalol producido se realizó después de la medición por HPLC de los cultivos bacterianos de la siguiente forma:

$$\Delta P = (P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}) * D$$

ΔP = pirogalol producido ($g \cdot L^{-1}$)

D = factor de dilución de la muestra durante el análisis por HPLC

4.8.5 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) se evaluó el modelo logístico

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{\text{max}}} \right] X \quad (1)$$

Donde μ , es la máxima velocidad de crecimiento específico, X_{max} es el valor máximo de X. La

solución a la ecuación de la logística es la siguiente:

$$X = \frac{X_{max}}{\left[1 + \frac{(X_{max} - X_0)}{X_0} e^{-\mu t}\right]} \quad (2)$$

En donde X_0 representa el valor de X cuando $t = 0$.

4.8.6 Cálculos de los coeficientes α , β y $\alpha \cdot \mu$ del modelo de Luedeking y Piret

Para conocer si la producción de pirogalol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) estaba asociada al crecimiento fue utilizado el modelo de Luedeking y Piret (1959)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

Si la ecuación (3) es dividida entre la biomasa (X), se puede expresar de la siguiente manera

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (4)$$

En donde q_p y μ son definidas como

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Si se substituye la ecuación (3) en (4), tenemos

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (6)$$

en donde q_p = producción de pirogalol, $\alpha \mu$ es el término asociado y β el no asociado al crecimiento. Al graficar los valores de q_p y μ en la fase exponencial, la pendiente será α y la ordenada al origen será β .

CAPÍTULO 5

Selección de cepas

227614

5. SELECCIÓN DE CEPAS

Una de las aplicaciones potenciales de las bacterias lácticas para la conservación de subproductos agrícolas es el ensilaje de la pulpa de café (Gaime-Perraud *et al*, 2000). La pulpa de café es el principal producto que se obtiene durante el beneficio del café y contiene un alto valor nutrimental. Su utilización se ve limitada cuando es destinada a la alimentación de animales por su alto contenido de polifenoles como el ácido clorogénico y los taninos (Zuluaga, 1989; Ramírez-Martínez y Clifford, 2000). Estos compuestos son indeseables ya que se unen con las proteínas, convirtiendo a la pulpa de café en un producto no apto para la alimentación de animales. Con el objetivo de aprovechar la pulpa de café, en este trabajo se propone la utilización de bacterias lácticas capaces de metabolizar los compuestos antinutricionales como son los compuestos fenólicos y conservarla para su posterior utilización en nutrición animal.

En éste capítulo se muestra la selección de cepas de bacterias lácticas con capacidad de degradar compuestos fenólicos. Dichas cepas podrían ser utilizadas en el ensilaje de la pulpa de café para preservarla y al mismo tiempo, degradar los compuestos que son indeseables y que están presentes en el producto.

Para realizar la selección de bacterias lácticas que degradaran compuestos fenólicos se utilizó como substrato los ácidos tánico y gálico. El ácido tánico es el tanino hidrolizable más conocido y se compone de una molécula de glucosa esterificada con 9 unidades de ácido gálico. Puede ser hidrolizado por una vía ácida o bien, a través de una hidrólisis enzimática de tanasas producidas por microorganismos como hongos (Lekha y Lonsane, 1997; Aguilar *et al*, 2000) levaduras (Aoki *et al*, 1976) y bacterias (Deschamps, 1983; Mondal y Pati, 2000).

La principal característica del ácido tánico es precipitar proteínas (Hagerman *et al*, 1992). Por otra parte, el ácido gálico es un fenol simple y a diferencia del ácido tánico, éste no interactúa con las proteínas. Se han realizado estudios sobre la degradación de ácido tánico por bacterias y se observó que *Bacillus licheniformis* lo transforma hasta ácido gálico (Mondal y Pati, 2000). Ajay-Kumar *et al* (1999) también reportaron que la bacteria *Citrobacter freundii*

produjo ácido gálico al hidrolizar ácido tánico y que posteriormente, el ácido gálico fue transformado a pirogalol e incorporado al ciclo de Krebs para obtener energía. Osawa *et al* (2000) reportaron que las bacterias lácticas *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus* crecieron en medio sólido con ácido tánico y degradaron ácido gálico. Además, ha sido reportado que el ácido tánico así como el ácido gálico, inhibieron la producción de enzimas digestivas como son la tripsina y la α -amilasa (Quesada *et al*, 1995)

Para realizar la selección de cepas como primer punto se probaron 45 cepas de bacterias lácticas aisladas del ensilaje de la pulpa de café, basándose en su capacidad de crecer en un medio sólido en presencia de ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), seleccionando aquellas cepas que crecieron sobre el medio y formaron halos alrededor de las colonias. En una segunda etapa se evaluaron las 45 cepas por su capacidad de degradar ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en un medio líquido con y sin glucosa ($4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Dentro de la colección de las 45 cepas que se probaron se encontraban 4 géneros microbianos. Éstos géneros son los microorganismos representativos del ensilaje de la pulpa de café (Gaime-Perraud *et al*, 2001) y que corresponden a *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. bif fermentens*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, *Lb. coryniformis* y *Lb. paracasei*), *Pediococcus* (*Pc. pentosaceus*), *Weissella* (*W. confusa*), *Leuconostoc* (*Lc. mesenteroides*) y un grupo de bacterias lácticas que no se han identificado.

5.1 Primer etapa de selección

5.1.1. Crecimiento en medio sólido con ácido tánico

La primer etapa de selección consistió en crecer las bacterias en medio sólido MRS con glucosa ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se utilizaron 3 medios de cultivo (sección 4.3.2). El primer medio MRS-glu agar, se utilizó como control positivo de crecimiento de las bacterias. El segundo y tercer medio, MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar, se emplearon para evaluar la toxicidad del ácido tánico sobre el crecimiento de las bacterias y la capacidad de los microorganismos para degradar el polifenol. Los estudios se realizaron en cajas Petri inoculando por piquete. La selección se basó en la capacidad de las bacterias lácticas de crecer

en el medio sólido con ácido tánico, así como la formación de halos debida a la hidrólisis de ácido tánico en los medios MRS-glu-tan agar y MRS-tan agar.

Las 45 cepas ensayadas crecieron en el medio MRS-glu agar (control) y solamente 22 crecieron en los medios que contenían ácido tánico (Tabla 5.1). Las observaciones se hicieron a las 72 h de cultivo.

Tabla 5.1 Crecimiento de bacterias lácticas sobre los medios sólidos MRS-tan-glu agar y MRS-tan agar (ácido tánico 5 g·L⁻¹ y glucosa 5 g·L⁻¹)

Géneros microbianos	No. cepas	MRS-glu agar	MRS-glu-tan agar	MRS-tan agar
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	+	+	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	+	+	+
<i>Weissella confusa</i>	2	+	+	+
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1	+	+	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	+	+	+
No Identificadas	5	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	1	+	-	-
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	4	+	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	+	-	-
<i>Lactobacillus bif fermentens</i>	1	+	-	-
<i>Weissella confusa</i>	1	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	+	-	-
No Identificadas	13	+	-	-

(+) = crecimiento; (-) = no hay crecimiento;

Las bacterias que crecieron fueron cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, *Pc. pentosaceus*, *W. confusa* y 5 cepas no identificadas. Las colonias crecieron de forma circular, cóncava y presentaron una consistencia cremosa. El diámetro de las colonias crecidas en el medio MRS-glu-tan agar fue el mismo que en el medio MRS-glu agar (control). Sin embargo, las cepas crecidas en el medio MRS-glu-tan agar mostraron un diámetro mayor de la colonia (2-3 mm) a diferencia del crecimiento en el medio MRS-tan agar (1-1.5 mm). Es importante recordar que el medio MRS-glu-tan agar tenía 5 g·L⁻¹ de glucosa y que por ésta razón, las colonias fueron más grandes que en el medio MRS-tan agar donde no había una fuente de

carbono de fácil asimilación y solo estaban los componentes del medio MRS (sección 4.3) y el ácido tánico.

5.1.2 Formación de halos de hidrólisis

Las 22 cepas que crecieron en los medios MRS-glu-tan *agar* y MRS-tan *agar* después de 72 h, habían formado halos de hidrólisis alrededor de la colonia (Figura 5.1). La formación de los halos se debe posiblemente a la presencia de enzimas tanasas las cuales hidrolizan el ácido tánico. Por lo que el crecimiento y la formación de halos que fueron observados en el medio sólido son un indicativo de que las 22 bacterias lácticas seleccionadas poseen la (s) enzima (s) tanasa (s) para hidrolizar el ácido tánico y obtener carbono y energía a partir de los productos hidrolizados (en este caso, la glucosa y el ácido gálico).

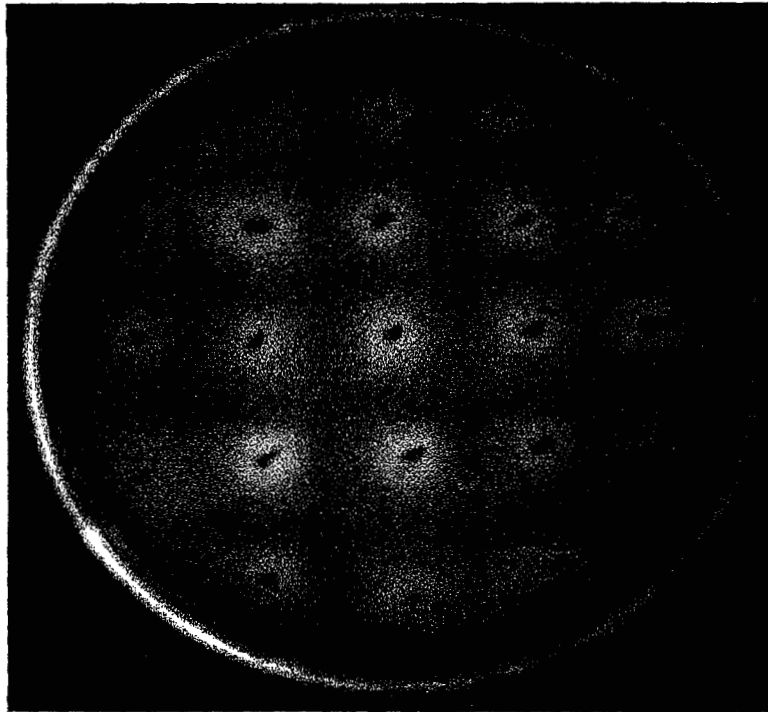


Figura 5.1 Crecimiento celular y formación de halos de hidrólisis sobre el medio sólido con ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Esta técnica de medir halos de hidrólisis para evaluar la actividad enzimática, ha sido empleada para la selección de hongos filamentosos productores de fitasa (Bae *et al*, 1999;

Howson y Davis, 1983) y de enzimas fúngicas degradadoras de lignina (Srinivasan *et al*, 1995; Chefetz *et al*, 1998). De manera similar a este trabajo que se presenta sobre la selección de bacterias lácticas que crecen sobre medio sólido con ácido tánico, se han seleccionado otras bacterias degradadoras de ácido tánico basándose en su capacidad de crecer sobre placas con ácido tánico y formar halos alrededor de las colonias. De las bacterias reportadas se incluye *Citrobacter freundii*, quien fue crecida en el medio sólido con 5 g·L⁻¹ de ácido tánico (Ajay-Kumar *et al*, 1999) y *Bacillus licheniformis* que creció en 10 g·L⁻¹ de ácido tánico (Mondal y Pati 2000). También han sido reportadas las bacterias lácticas *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus*, que crecieron sobre placas con ácido tánico formando zonas claras y transparentes alrededor de las colonias (Osawa *et al*, 2000).

Por otra parte, los resultados obtenidos prueban que el ácido tánico a una concentración de 5 g·L⁻¹ tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las 23 cepas de bacterias lácticas restantes debido a que hubo ausencia total del crecimiento. Las bacterias lácticas inhibidas por el ácido tánico fueron las cepas de *Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. bif fermentens*, *W. confusa*, *Ln. mesenteroides* y 13 cepas no identificadas (Tabla 5.1). Especies de *Lactobacillus* fueron inhibidas como las 4 cepas de *Lb. coryniformis*. Sin embargo, 9 cepas de *Lb. plantarum* que fueron probadas crecieron y formaron halos de hidrólisis. También se probaron cepas del género de *Weissella* que es un género relativamente reciente (Collins *et al*, 1993). De 3 cepas ensayadas de *W. confusa* se observó que una no creció en el medio, esto posiblemente se debió a que la cepa pertenece a una subespecie distinta de las otras 2 cepas de *W. confusa*.

Ruiz-Barba *et al* (1992) reportaron que el crecimiento de *Lb. plantarum* fue inhibido en la presencia de oleuropeina y verbascoside (fenoles derivados del ácido cinámico) en la salmuera de aceitunas. Sin embargo, Hara (1997) reportó que las catequinas son consideradas compuestos antimicrobianos y que durante estudios de la ingestión de polifenoles en ratas se observó que en el tracto digestivo de estos animales, las bacterias lácticas no fueron afectadas por dichos compuestos. Chung *et al* (1998) observaron que el ácido tánico (1 g·L⁻¹) podía

inhibir el crecimiento microbiano de bacterias gastrointestinales por su capacidad de unirse al hierro, pero no inhibió a las bacterias lácticas *Lb. acidophilus* y *Bifodobacterium infantis*.

El efecto negativo del ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre el crecimiento de las 23 cepas se puede explicar en términos de la composición de la pared celular del microorganismo. La pared celular bacteriana está compuesta de polisacáridos y proteínas en donde el ácido tánico puede interactuar con estos compuestos y fijarse, incrementando la concentración mínima que puede inhibir el crecimiento bacteriano (Scalbert, 1991). Otra explicación que podemos atribuir al efecto tóxico del ácido tánico, es el estado de oxidación, la oxidación de polifenoles incrementa la inhibición de ciertas enzimas fúngicas como las celulasas o pectinasas debido a que pueden reaccionar con grupos sulfidrilo de aminoácidos formando enlaces covalente (Scalbert, 1991). El efecto tóxico que se observó del ácido tánico sobre el crecimiento de las 23 bacterias también pudo deberse a que éste polifenol inhibió la síntesis de enzimas involucradas en la degradación de la glucosa (glucólisis) o bien, el ácido tánico provocó una polimerización oxidativa junto con residuos de aminoácidos y esto quizá ocasionó auxotrofia en los cultivos bacterianos donde no se observó crecimiento.

5.2 Segunda etapa de selección: biodegradación de ácido gálico en medio líquido

El bioensayo en un medio sólido permitió seleccionar las cepas de bacterias lácticas capaces de crecer en presencia de ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y formar halos de hidrólisis. Sin embargo, no fue posible evaluar el crecimiento de los microorganismos cuantitativamente ni la biodegradación del ácido tánico en el medio MRS líquido debido a que éste polifenol reaccionó con los componentes del medio produciendo compuestos insolubles en el sistema.

Con el objetivo de confirmar la selección anterior de las cepas crecidas sobre ácido tánico, las 45 bacterias fueron cultivadas en el medio líquido con ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) que es un fenol simple y además, es el componente principal del ácido tánico. Los cultivos bacterianos fueron propagados en un *precultivo* por 72 h (sección 4.4.2.1) con el fin de adaptar a los microorganismos al ácido gálico. Posteriormente, para evaluar la biodegradación de ácido gálico las bacterias fueron cultivadas en los medios líquidos con $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido gálico con y

sin glucosa ($4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (medios MRS-glu-gal y MRS-gal, respectivamente). Se observó que las 45 cepas ensayadas crecieron en ambos medios. Sin embargo, al igual que la selección de cepas que crecieron en presencia de ácido tánico se observaron 2 grupos de microorganismos: bacterias que degradaron 100% de ácido gálico a las 72 h (23 cepas) y bacterias que no degradaron (22 cepas). Éstas cepas fueron: *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, *Pc. pentosaceus*, *W. confusa*, *Lc. mesenteroides* y 5 cepas no identificadas de bacterias lácticas (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Porcentaje de degradación de ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) por las 45 bacterias lácticas probadas en los medios líquidos con y sin glucosa ($4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Géneros microbianos	No. de cepas	MRS-gal	MRS-gal-glu
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	100	100
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	100	100
<i>Weissella confusa</i>	2	100	100
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1	100	100
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	100	100
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	100	100
No Identificadas	5	100	100
<i>Lactobacillus casei</i>	1	0	0
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	4	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	0	0
<i>Lactobacillus bif fermentens</i>	1	0	0
<i>Weissella confusa</i>	1	0	0
No Identificadas	13	0	0

A diferencia del ácido tánico, el ácido gálico a la concentración ensayada de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no inhibió el crecimiento de las 45 bacterias probadas ya que en los dos medios de cultivo (MRS-glu-gal y MRS-gal) se observó biomasa. Sin embargo, solo 23 cepas degradaron el ácido gálico (Tabla 5.2). Lo interesante de estos estudios es que las 22 cepas que crecieron en ácido tánico a una concentración de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla 5.1) son las mismas cepas que degradaron el ácido gálico. Adicionalmente una cepa *Ln. mesenteroides*, capaz de degradar el ácido gálico pero no de crecer en ácido tánico.

Osawa *et al* (2000) reportaron la degradación del ácido gálico por bacterias lácticas. Ellos identificaron 25 cepas bacterianas aisladas de alimentos fermentados y de humanos pertenecientes a los géneros *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus*, quienes presentaron la actividad tanasa al degradar metil galato ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, éste compuesto es la unión del ácido gálico (que es un fenol simple) a un metilo por lo que es una molécula sencilla para ser considerada un tanino (sección 2.1.3). También fue reportado que las bacterias degradaron el ácido gálico en pirogalol. Asimismo, reportaron los géneros microbianos entre los cuales se encuentra *Lb. casei*.

En éste trabajo se adiciona una lista más extensa de bacterias lácticas que degradan compuestos fenólicos, éstos microorganismos fueron aislados del ensilaje de la pulpa de café y seleccionadas por su capacidad de crecer en medio sólido con ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y degradar ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (*Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, *Pc. pentosaceus*, *W. confusa*, *Ln. mesenteroides* y 5 cepas no identificadas). De la misma manera, se identificaron los géneros microbianos que fueron inhibidos en presencia de ácido tánico, mismos que no degradaron ácido gálico (*Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. bif fermentens*, *W. confusa*) (Tabla 5.1 y 5.2).

Por otra parte, Chung *et al* (1998) reportaron que el ácido tánico inhibió el crecimiento de bacterias intestinales mientras que el ácido gálico, no presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de éstos microorganismos. Deschamps *et al* (1980) reportaron que cepas de los géneros *Bacillus* sp y *Klebsiella* sp. degradaron ácido tánico en medio líquido y crecieron en un medio sólido con ácido gálico. Sin embargo, no hubo crecimiento de cepas como *Staphylococcus* sp. En los ensayos con bacterias lácticas, el ácido gálico a 9 g L^{-1} no fue tóxico al crecimiento. Esto puede deberse a que el ácido gálico es un fenol simple que no interactúa con las proteínas y además, no forma complejos con el hierro, como ocurre con el ácido tánico (Chung *et al*, 1998), lo cual puede favorecer la producción de la enzima ácido gálico descarboxilasa encargada en degradar el ácido gálico en pirogalol, reportada sensible al oxígeno y teniendo como cofactor al hierro (Zeida *et al*, 1998).

5.3 Conclusión

Los taninos han demostrado ser tóxicos a diversos microorganismos. Sin embargo, fueron identificadas y seleccionadas 22 de 45 cepas de bacterias lácticas aisladas del ensilaje de la pulpa de café. Estas cepas pertenecen a 3 géneros microbianos: *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. hilgardii*), *Pediococcus* (*Pc. pentosaceus*), *Weissella* (*W. confusa*) y un grupo de 5 bacterias no identificadas (sección 4.1). Todas las bacterias (22 cepas) crecieron sobre medio sólido con ácido tánico ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y formaron zonas claras alrededor de las colonias microbianas debido posiblemente a la hidrólisis del ácido tánico en glucosa y ácido gálico. El ácido tánico inhibió totalmente el crecimiento de las 23 cepas restantes.

Por otra parte, se observó que las 45 bacterias lácticas ensayadas crecieron en un medio líquido con ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y solo 23 lo degradaron completamente. Las 22 restantes no degradaron ácido gálico pero si crecieron en el medio lo que indica que el ácido gálico a la concentración de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no es un compuesto tóxico para el crecimiento de estas bacterias lácticas. Además, las 23 cepas que degradaron el ácido gálico fueron las mismas cepas que crecieron en medio sólido con ácido tánico a excepción de la cepa de *Ln. mesenteroides*, que degradó el ácido gálico pero no creció en presencia de ácido tánico.

CAPÍTULO 6

Biodegradación de ácido gálico y su efecto sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico

6. BIODEGRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO Y SU EFECTO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En este capítulo se estudiará la degradación de ácido gálico por 13 cepas de bacterias lácticas basándose en la selección realizada en el capítulo 5. Se estudiaron 11 cepas positivas (llamadas así por haber degradado el ácido gálico y crecer en medio sólido con ácido tánico).

La bibliografía reporta que el ácido gálico puede ser degradado hasta pirogalol por las bacterias *Streptococcus galololyticus* y *Pantoea agglomerans* (O'Donovan y Brooker, 2001; Zeida *et al*, 1998) mientras que en el caso de la bacteria *Citrobacter freundii*, el ácido gálico es metabolizado hasta piruvato e incorporado al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ajay-Kumar *et al*, 1999). Las bacterias lácticas *Lb. plantarum* y *Lb. pentosus*, también fueron reportadas por degradar ácido gálico en pirogalol (Osawa *et al*, 2000). Sin embargo, no fue reportada la relación de ácido gálico degradado en pirogalol como producto de degradación en el caso de las bacterias lácticas.

En este capítulo se estudiará si el ácido gálico es utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido láctico ya que su principal característica de las bacterias lácticas es producir éste compuesto que actúa como un conservador de productos alimenticios. Por lo tanto, se evaluó el efecto tanto del ácido gálico como de su producto de degradación sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico.

6.1 Condiciones experimentales

Para evaluar el efecto del ácido gálico sobre el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico que son parámetros importantes del metabolismo de las bacterias lácticas y que pueden ser afectados en presencia de compuestos fenólicos, se eligieron 13 cepas; 11 de las cuales degradaron ácido gálico (*Lb. plantarum* 1, *Lb. plantarum* 2, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*,

W. confusa 1, *W. confusa* 2, *Lc. mesenteroides*, *Pc. pentosaceus* NI1, NI2 y NI3) y 2 cepas que no degradaron (*Lb. casei* y *W. confusa* 3) y que fueron elegidas como control negativo (sección 5.2).

Los 13 cultivos fueron propagados en el medio MRS adicionado con ácido gálico (9 gL^{-1}) y glucosa (4.5 gL^{-1}) denominado *precultivo* (sección 4.4.2.1). Posteriormente, el 10% de los cultivos bacterianos de las 13 cepas fueron inoculados en 3 medios diferentes (Tabla 6.1), teniendo como base los componentes del medio MRS y adicionando glucosa (4.5 gL^{-1}) y ácido gálico (9 gL^{-1}) como fuentes de carbono. El medio MRS-glu fue considerado como control. Los análisis de glucosa residual, ácido láctico, ácido gálico y su producto de degradación, así como la evolución de pH fueron realizados al inicio y después de 72 h de incubación a 30°C .

Tabla 6.1 Medios de cultivo utilizados para los estudios de biodegradación de ácido gálico

Medio	Glucosa gL^{-1}	Gálico gL^{-1}
MRS-glu	4.5	-
MRS-glu-gal	4.5	9
MRS-gal	-	9

6.2 Consumo de glucosa

Las bacterias lácticas necesitan de una fuente de carbono fácilmente asimilable como son los carbohidratos, para la obtención de carbono y energía (Stryer, 1993). Durante el desarrollo de este experimento se evaluaron 2 parámetros: la capacidad de las 13 cepas para consumir glucosa y producir ácido láctico en presencia de ácido gálico (9 gL^{-1}). Los resultados que se obtuvieron en este experimento muestran que el ácido gálico a una concentración de 9 gL^{-1} no inhibió el consumo de glucosa por las 13 cepas y además, produjeron ácido láctico y degradaron el ácido gálico en los medios de cultivo. En la Tabla 6.2 se muestra el promedio del

consumo de glucosa y producción de ácido láctico de las 13 cepas asimismo, se presenta el porcentaje de degradación de ácido gálico por las 11 cepas positivas.

Tabla 6.2 Valores promedio del consumo de glucosa, producción de ácido láctico y degradación de ácido gálico en los medios MRS-glu, MRS-glu-gal y MRS-gal (4.5 gL⁻¹ de glucosa y 9 gL⁻¹ de ácido gálico)

Medio	Consumo de glucosa (%)	Producción de ácido láctico (g·L ⁻¹)	Degradación de ácido gálico (%)
MRS-glu	100	7-8	-
MRS-glu-gal	100	7-8	100
MRS-gal	-	1-2	100

Los valores del % de degradación de ácido gálico es de las 11 cepas positivas

Las 13 cepas consumieron completamente la glucosa a las 72 h en el medio control (MRS-glu) y también fue consumida en el medio con ácido gálico (9 gL⁻¹). El ácido láctico producido en el medio MRS-glu-gal fue similar al que se obtuvo en el medio control (MRS-glu). Además, las 11 bacterias degradaron el ácido gálico en los medios con y sin glucosa (sección 5.2) es decir, en el medio donde no había glucosa (MRS-gal) las 11 cepas también degradaron el ácido gálico y produjeron poco ácido láctico (1-2 gL⁻¹) debido a que consumieron los otros compuestos como la polipeptona, extracto de carne y extracto de levadura que están presentes en el medio de cultivo.

La glucosa es el sustrato mayormente empleado por los organismos vivos y las bacterias lácticas la consumen para la producción de ácido láctico y biomasa, principalmente. Mondal y Pati (2000) observaron que en un medio mínimo con ácido tánico, el consumo de glucosa por la bacteria *Bacillus licheniformis* no fue inhibido por el polifenol y además, la presencia de la glucosa favoreció la producción de la enzima tanasa, responsable de hidrolizar el ácido tánico.

Lo que se observó con las 11 bacterias lácticas es que en los medios donde había ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con y sin glucosa ($4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), el ácido gálico fue degradado.

6.3 Producción de ácido láctico

La característica principal de las bacterias lácticas es producir ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Este metabolito es empleado para la preservación de productos alimenticios debido a que desciende rápidamente el pH del medio, inhibiendo microorganismos causantes de la descomposición de estos productos (Bozoglu y Ray, 1995). Por ésta razón, fue importante evaluar el efecto del ácido gálico sobre la producción de ácido láctico por las bacterias lácticas ensayadas. De ésta manera, fue viable conocer si el ácido gálico era utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido láctico o bien, si tenía un efecto negativo sobre la producción de dicho metabolito. En la Figura 6.1 se muestran los rendimientos molares de la producción de ácido láctico a partir del consumo de glucosa en los medios MRS-glu y MRS-glu-gal por las 13 cepas probadas.

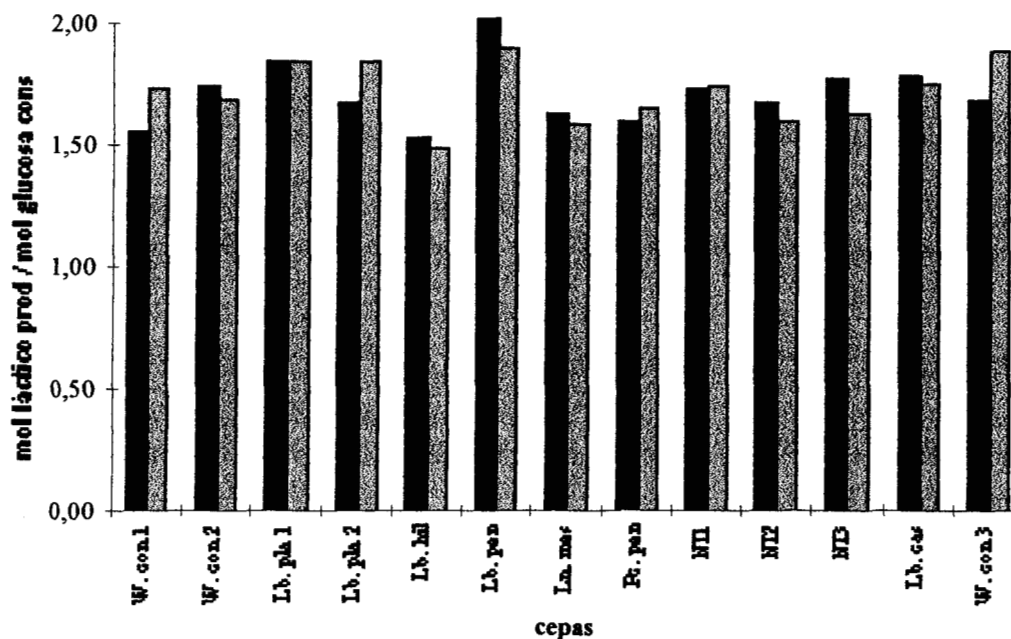


Figura 6.1 Rendimiento molar (láctico producido/glucosa consumida) en los medios MRS-glu (■) y MRS-gal-glu (▨) a las 72 h de cultivo

Se expresan los resultados del rendimiento molar de ácido láctico por consumo de glucosa debido a que se puede considerar que el ácido láctico que se produce por la fermentación de otros compuestos del medio de cultivo, es el mismo en ambos medios.

Las primeras 11 cepas (positivas) que se muestran en la Figura 6.1 corresponden al grupo de bacterias que degradaron ácido gálico; las dos restantes, fueron seleccionadas como cepas controles; es decir, como cepas que no degradaron ácido gálico (sección 5.4). La producción de ácido láctico se observó en el medio MRS-glu (4.5 gL^{-1} de glucosa) sin ácido gálico y en el medio con glucosa (4.5 gL^{-1}) y ácido gálico (9 gL^{-1}), en donde el ácido gálico fue degradado completamente (sección 6.4). Los análisis se realizaron a las 72 h de cultivo por las cepas que degradaron ácido gálico (*W. confusa* 1, *W. confusa* 2, *Lb. plantarum* 1, *Lb. plantarum* 2, *Ln. mesenteroides*, *Pc. pentosaceus*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, NI1, NI2 y NI3), así como por

aquellas cepas que no lo degradaron (*Lb. casei* y *W. confusa* 3). Se eligieron las 13 cepas de bacterias lácticas para estos estudios con el fin de tener representantes de cada género y especie de las 23 cepas seleccionadas por degradar ácido gálico (sección 5.2)

Las 13 cepas ensayadas consumieron la glucosa en los medios MRS-glu y MRS-glu-gal y produjeron entre 1.56 y 1.8 moles ácido láctico por mol de glucosa consumida, no habiendo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$) entre el ácido láctico producido en los medios con ácido gálico y en los medios sin ácido gálico. Fitzsimons (1994) reportó que las bacterias lácticas producen alrededor de 1.7 moles de lactato por mol de hexosa bajo condiciones anaerobias. Los valores experimentales de ácido láctico producidos por las 13 cepas de bacterias lácticas están dentro de los valores reportados en la bibliografía. Esto significa que los rendimientos de ácido láctico no fueron afectados a la concentración de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido gálico.

Los estudios con las 13 cepas de bacterias lácticas mostraron que el ácido gálico a una concentración de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no inhibió las actividades enzimáticas responsables de la degradación de la glucosa, necesaria para el crecimiento del microorganismo y producción de ácido láctico. Además, la concentración de ácido láctico no aumentó en el medio donde había glucosa y ácido gálico (MRS-glu-gal). Este resultado indica que el ácido gálico no fue utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido láctico debido a que los microorganismos degradaron el 100% de ácido gálico (sección 5.4) y produjeron rendimientos similares de ácido láctico en los medios con y sin ácido gálico (MRS-glu-gal y MRS-glu).

Bravo *et al* (1993) observaron que los polifenoles inhibieron actividades metabólicas en la flora intestinal de ratones y tuvieron un efecto negativo sobre la digestibilidad o absorción de constituyentes metabólicos, como es el caso del almidón y los lípidos. También se reportó que las enzimas digestivas, tripsina y α -amilasa, fueron inhibidas en presencia de ácido tánico y gálico (Chung *et al*, 1998). Por otra parte, hay reportes de que los compuestos fenólicos no tienen un efecto negativo sobre el metabolismo de otros microorganismos, resultados que

concuerdan con los datos obtenidos en éste trabajo cuando las bacterias lácticas degradaron 9 gL⁻¹ de ácido gálico. Por ejemplo, Chung *et al* (1998) observaron que el ácido gálico no inhibió significativamente el crecimiento de *Cl. perfringens* a concentraciones arriba de 1 gL⁻¹. O'Donovan y Brooker (2001) reportaron que las bacterias ruminales *S. bovis* y *S. gallolyticus* producen ácido láctico en presencia de 5 y 20 gL⁻¹ de ácido tánico y las concentraciones molares de lactato producidas, no fueron significativamente diferentes en presencia o ausencia del polifenol. Con los resultados obtenidos de las 13 cepas se puede decir que la degradación de ácido gálico y la producción de ácido láctico son dos rutas metabólicas de las bacterias lácticas totalmente independientes.

Por otra parte, las bacterias lácticas ensayadas también produjeron ácido láctico en el medio donde solo había ácido gálico como principal fuente de carbono (MRS-gal). En la Tabla 6.3 se presentan los resultados de producción de ácido láctico en los medios MRS-glu, MRS-glu-gal y MRS-gal.

Tabla 6.3 Producción de ácido láctico (mmol) por las 13 cepas de bacterias lácticas ensayadas en el medio MRS-glu, MRS-glu-gal y MRS-gal (9 gL⁻¹ de ácido gálico y 4.5 gL⁻¹ de glucosa)

Cepa	Ácido láctico MRS-glu (mmol)	Ácido láctico MRS-glu-gal (mmol)	Ácido láctico MRS-gal (mmol)
<i>Lb. plantarum</i> 1	82.18	83.10	7.25
<i>Lb. plantarum</i> 2	75.02	83.05	8.47
<i>Lb. hilgardii</i>	68.48	66.92	16.30
<i>Lb. pentosus</i>	90.28	85.60	8.72
<i>W. confusa</i> 2	86.32	84.48	16.38
<i>W. confusa</i> 1	82.18	83.10	7.16
<i>Ln. mesenteroides</i>	72.83	71.38	2.03
<i>Pc.pentosaceus</i>	71.19	74.43	10.79
NI1	77.27	78.71	6.35
NI2	74.05	72.02	6.85
NI3	79.16	73.45	4.21
<i>Lb. casei</i>	84.74	83.83	14.64
<i>W. confusa</i> 3	75.57	85.37	8.67

NI = no identificada

En el medio MRS-gal no hay glucosa y aún así las 13 cepas produjeron de 2.03 a 16.38 mmol de ácido láctico mientras en el medio con glucosa y ácido gálico (MRS-glu-gal), así como en el control (MRS-glu), producen entre 66.92 a 90.28 mmol de ácido láctico (Tabla 6.3). El medio de cultivo empleado para todos los bioensayos realizados fue el medio MRS que es un medio muy complejo en el que sus componentes pueden ser utilizados como fuentes de carbono (sección 4.2) tal es el caso del extracto de carne, extracto de levadura, polipeptona y citrato de amonio. Como se observa (Tabla 6.3), las bacterias produjeron ácido láctico en un porcentaje muy bajo en el medio MRS-gal (2.30 a 18.68%), comparado con el medio donde había glucosa y ácido gálico (MRS-glu-gal). El ácido láctico probablemente se produjo debido a la fermentación de los componentes del medio, siendo el citrato de amonio el compuesto que se pudo cuantificar en forma de ácido cítrico consumido.

Posiblemente, las cepas que degradaron el ácido gálico en el medio sin glucosa consumieron el citrato de amonio y otros componentes del medio para la producción de biomasa y ácido láctico ya que no había una fuente de carbono fácilmente fermentable. El citrato fue consumido en los tres medios sin embargo, se observó que *Weissella confusa* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus pentosus* y NI2 consumieron aproximadamente el 16% de ácido cítrico en el medio MRS-glu mientras que en el medio MRS-glu-gal y MRS-gal, consumieron entre el 35 y 45%. Solo las cepas *Weissella confusa* 3, *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, NI1 y NI3 consumieron el mismo porcentaje de citrato en los tres medios (35-45%). Otra característica que se observó fue que las cepas *Lactobacillus casei* y *Weissella confusa* 3 que no degradaron ácido gálico (sección 5.2) tampoco consumieron citrato en los medios donde había ácido gálico. El ácido láctico que se produjo en éste medio fue a partir de la fermentación de los otros compuestos en el medio.

Es importante mencionar que en los cultivos con glucosa (4.5 gL^{-1}) y ácido gálico (9 gL^{-1}) las bacterias tuvieron un rendimiento de hasta 1.8 moles de ácido láctico por mol de hexosa

mientras que en el medio sin glucosa, produjeron entre 0.08 y 0.37. Sin embargo, las 11 cepas positivas degradaron el ácido gálico completamente.

6.4 Estudio de la biodegradación de ácido gálico

Anteriormente se mostró que el ácido gálico no fue degradado hasta ácido láctico por las bacterias lácticas por lo tanto; fue importante determinar cual era la ruta de degradación que seguía el ácido gálico. La técnica empleada para el análisis de la degradación de ácido gálico fue por HPLC, empleando una columna para la cuantificación de ácidos grasos volátiles (Aminex HPX 87H, *Bio-Rad*®) y un detector de índice de refracción (sección 4.6.4). Se utilizaron estándares para la identificación de los compuestos. Los estándares empleados, así como los tiempos de retención, se presentan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Tiempos de retención de los estándares empleados en el estudio de la biodegradación de ácido gálico

Estándar	Tiempo de retención (min)
Ácido cítrico	8.7
Glucosa	9.7
Ácido acético	13.6
Ácido láctico	16.5
Pirogalol	24.3
Ácido gálico	26.7

Al inicio de la fermentación de los cultivos bacterianos, los compuestos identificados fueron: glucosa, ácido cítrico, pirogalol y ácido gálico. Al finalizar las 72 h de incubación, la glucosa fue consumida completamente con la correspondiente producción de ácido láctico. Solo algunas cepas consumieron un porcentaje mínimo de ácido cítrico mientras que el acetato de sodio, expresado como ácido acético, no fue consumido. El ácido gálico desapareció y se observó la aparición de un producto que correspondió con el tiempo de retención del pirogalol (Tabla 6.4).

La Figura 6.2 presenta los cromatogramas del perfil de fermentación de la cepa de *Lb. plantarum* 1 al inicio y al final de la fermentación. Los cromatogramas que se muestran son representativos del resto de las bacterias que degradaron ácido gálico.

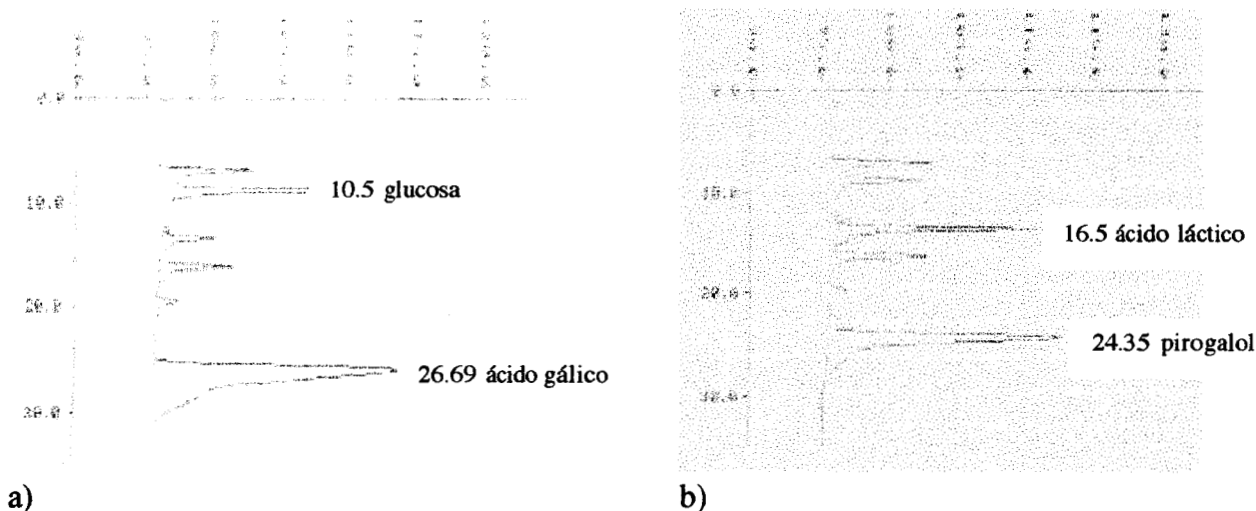


Figura 6.2 (a) Tiempo inicial de fermentación por *Lb. plantarum* 1 en presencia de ácido gálico. (b) Desaparición de ácido gálico después de 72 h de fermentación

La muestra fue analizada nuevamente por HPLC cambiando el detector de índice de refracción por un detector de *uv*. El análisis se hizo debido a que en éste tipo de detectores pueden identificar compuestos aromáticos que es el caso del ácido gálico y moléculas afines. Lo importante era conocer si el compuesto que se identificó al final de la fermentación y que correspondió con el tiempo de retención del pirogalol, contenía en su estructura un anillo aromático. En la Figura 6.3 se presenta el cromatograma de la muestra a las 72 h y analizada por *uv*.

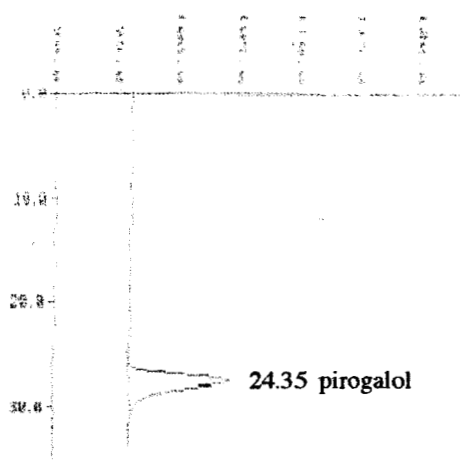


Figura 6.3 Cromatograma por *uv* del pirogalol producido por *Lb. plantarum* 1 durante la degradación de ácido gálico a las 72 h de cultivo

Después de las 72 h de fermentación, se detectó por *uv* la presencia de una molécula con un anillo aromático y que correspondió al pirogalol que se produce durante la degradación del ácido gálico. Por otra parte, por cada 9 gL^{-1} de ácido gálico que degradan las bacterias lácticas, producen alrededor de 6.2 gL^{-1} de pirogalol. Estos valores corresponden a una relación equimolar de ácido gálico degradado y pirogalol formado. En la Figura 6.4 se presentan los resultados del pirogalol producido a las 72 h de fermentación de las 11 cepas de bacterias lácticas que degradaron ácido gálico en los medios con y sin glucosa (MRS-glu-gal y MRS-gal).

medio mínimo, hidrolizando ácido tánico hasta glucosa y ácido gálico. Durante estos estudios también se reportó que la bacteria degradó el ácido gálico (tri-hidroxibenzoico) debido a la descarboxilación del ácido carboxílico por medio de la actividad enzimática denominada ácido gálico descarboxilasa (AGD), produciendo pirogalol (tri-hidroxibenceno). Posteriormente, el anillo fenólico (pirogalol) fue hidrolizado por medio de la enzima pirogalol 1,2-dioxigenasa, obteniendo un intermediario metabólico (ácido 2-hidroximucónico) que por medio de una vía desconocida, fue metabolizado hasta piruvato e incorporado al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Figura 6.5)

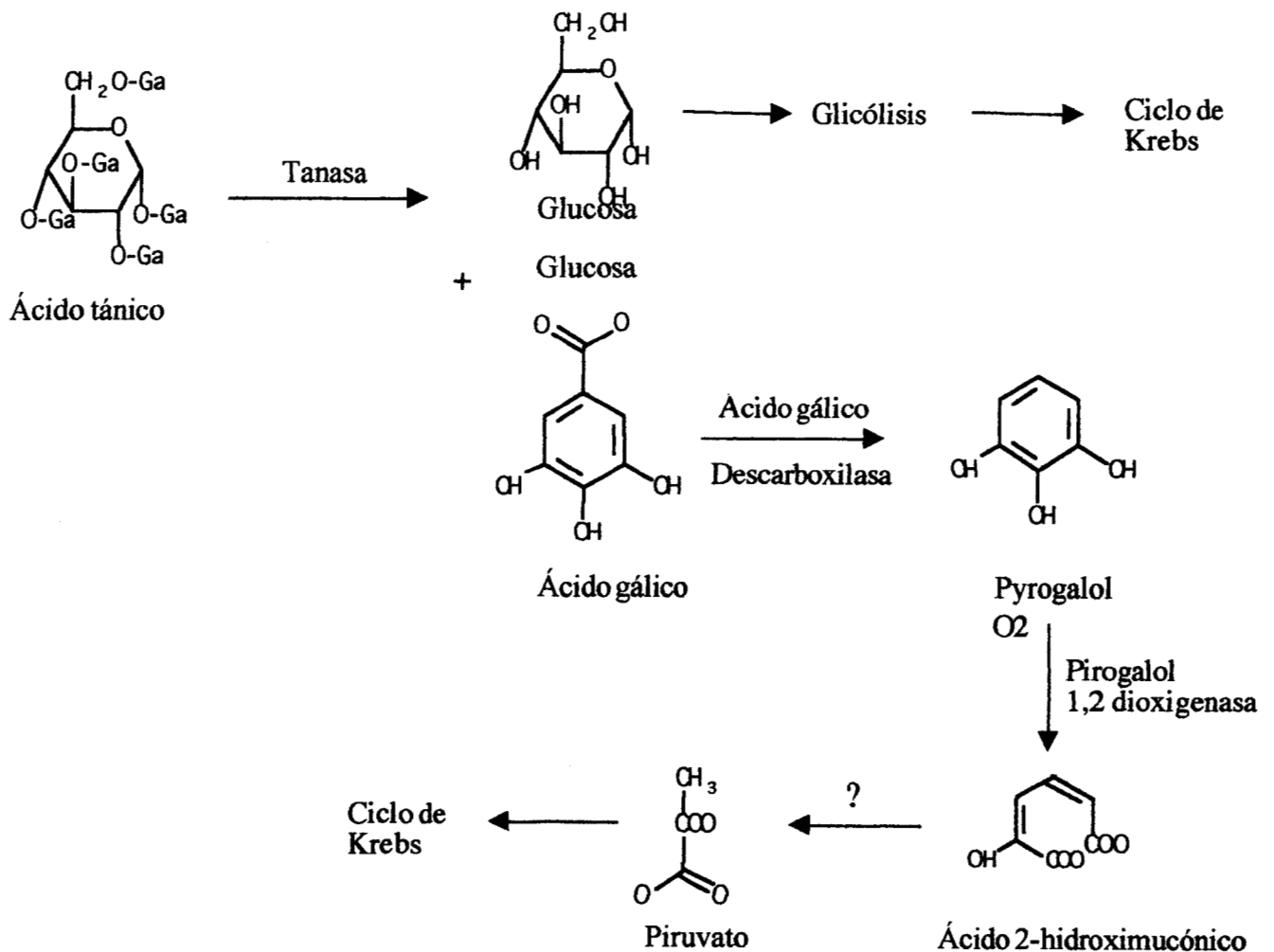


Figura 6.5 Ruta de degradación de ácido tánico por la bacteria *Citrobacter freundii* (Ajay-Kumar *et al*, 1999)

227614

Es importante mencionar que hay microorganismos anaerobios que degradan compuestos fenólicos. Grbic-Galic *et al* (1990) proponen la ruta de degradación para la degradación del estireno por un consorcio microbiano (Figura 6.6). La ruta de degradación es iniciada por reacciones de oxido-reducción en donde el estireno es convertido hasta ácido benzoico. Posteriormente, éste último es descarboxilado (formando benceno) y en la misma reacción puede ser oxidado por medio del oxígeno que forma parte del agua, obteniendo una molécula de fenol. La molécula de fenol es reducida hasta ciclohexanol que finalmente es degradado hasta los ácidos butírico y acético

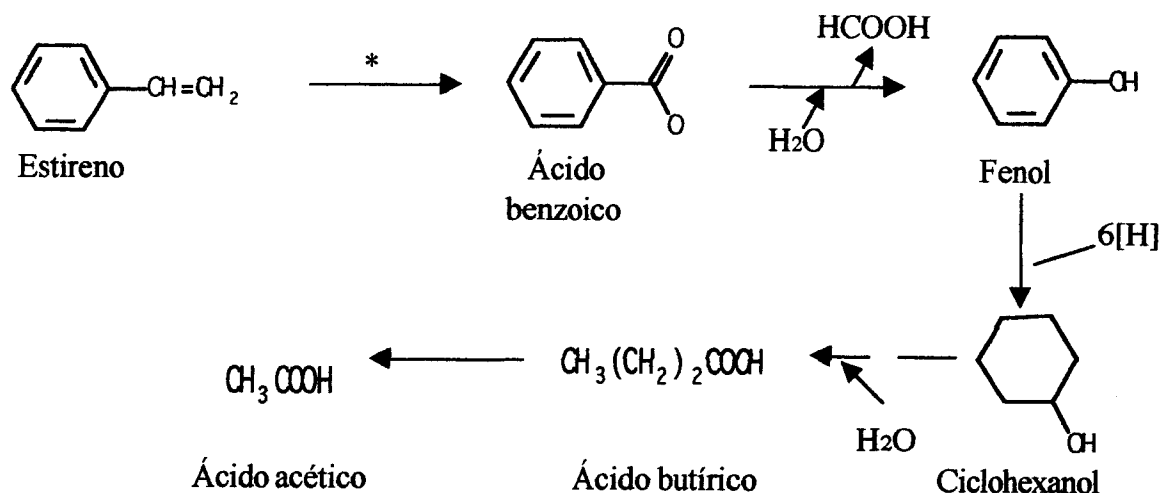
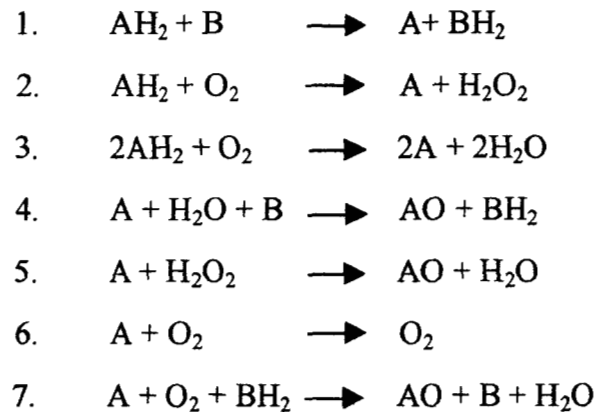


Figura 6.6 Ruta propuesta para la degradación de estireno (Grbic-Galic, 1990). *A partir de una serie de reacciones de óxido reducción, el estireno es degradado hasta ácido benzoico.

La ruta de degradación anaerobia del estireno descrita anteriormente fue explicado como reacciones de óxido-reducción en donde ocurre la descarboxilación de compuestos fenólicos.

Whitaker (1972) definió a las enzimas oxidoreductasas como aquellas enzimas que catalizan la oxidación o reducción de substratos. La oxidación o reducción de un substrato puede ocurrir en diferentes caminos, en base al aceptor de electrones y del producto formado (Tabla 6.5)

Tabla 6.5 Clasificación de las enzimas oxido-reductasas (Whitaker, 1972)



En condiciones anaerobias las reacciones del tipo 2, 3, 6 y 7 (Tabla 6.5) no se pueden llevar a cabo debido a que son microorganismos anaerobios facultativos (Axelsson, 1993) y en dichas reacciones, se necesitaría la presencia de oxígeno molecular para romper el anillo aromático, así como lo describe Ajay-Kumar *et al* (1999) en la ruta de degradación del ácido gálico por la cepa de *Citrobacter freundii* (Figura 6.5). Se piensa que estos microorganismos podrían degradar el anillo que forma parte del pirogalol por medio de la reacción 4 ó 5 (Tabla 6.5) es decir, oxigenando el anillo de pirogalol de manera similar a la reacción que ocurre con la degradación del estireno que se presenta en la Figura 6.6 (Grbic-Galic *et al*, 1990). Sin embargo, en este estudio se observó que las bacterias lácticas ensayadas solamente degradaron el ácido gálico en pirogalol probablemente porque no tienen un sistema enzimático que permita incorporar el oxígeno de la molécula de agua y de ésta manera, romper el anillo aromático que forma parte del pirogalol.

Tomando en cuenta los reportes anteriores (Ajay-Kumar *et al*, 1999 y Grbic-Galic *et al*, 1990), en ambos casos hay una descarboxilación del anillo aromático. Por lo tanto, en el caso de las bacterias lácticas estudiadas podría suceder una reacción similar de descarboxilación. Los resultados con las cepas lácticas que fueron probadas en este trabajo prueban que pueden incluir la actividad ácido gálico descarboxilasa dentro de su sistema enzimático y ser inducida en presencia de ácido gálico.

Los resultados de la degradación de ácido gálico en pirogalol por cepas de bacterias lácticas confirman el reporte de Osawa *et al* (2000), quienes aislaron 23 cepas de bacterias lácticas a partir de alimentos fermentados y heces de humanos pertenecientes a los géneros *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus* que mostraron la actividad ácido gálico descarboxilasa después de 3 días de incubación con 3 gL⁻¹ de ácido gálico en el medio. No obstante, en estos reportes solamente fue identificado el producto de degradación pero no fue cuantificada la cantidad de pirogalol y ácido láctico producidos por las cepas reportadas.

Durante la realización de este trabajo se encontró que las cepas de bacterias lácticas estudiadas descarboxilaron completamente 9 gL⁻¹ de ácido gálico produciendo un mol de pirogalol por cada mol de ácido gálico consumido incluso, producen los mismos rendimientos en el medio sin glucosa (MRS-gal). Además, la concentración de ácido gálico ensayada (9 gL⁻¹) no mostró un efecto sobre el consumo de glucosa ni sobre la producción de ácido láctico. Sin embargo, la adición de ácido gálico en el medio modificó el pH de la fermentación.

El descenso del pH es un indicativo de la producción de ácido láctico en los cultivos de bacterias lácticas. En el medio MRS-glu, la glucosa fue consumida totalmente produciendo ácido láctico, disminuyendo el pH de un valor inicial de 6.57 hasta un valor promedio de 4.70 a las 72 h en todos los cultivos de las cepas estudiadas. La literatura reporta que las bacterias lácticas son consideradas como microorganismos ácido tolerantes que pueden crecer en un rango amplio de pH (Axelsson, 1993). En los resultados se obtuvo que el medio MRS-glu-gal

donde hay glucosa ($4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido gálico ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), el pH inicial es 4.87 y se mantiene en un valor promedio de 4.64 al término de la fermentación. Con esto se indica que el descenso de pH en los cultivos no afecta el metabolismo de las bacterias debido a que se consumió totalmente la glucosa y se produjo ácido láctico en las 72 h de cultivo. Sin embargo, en el medio MRS-gal con ácido gálico como principal fuente de carbono, se observó que en los cultivos donde las cepas lo degradaron, el pH aumento de 4.87 hasta 5.58 (como valor promedio para todas las cepas) (Figura 6.7).

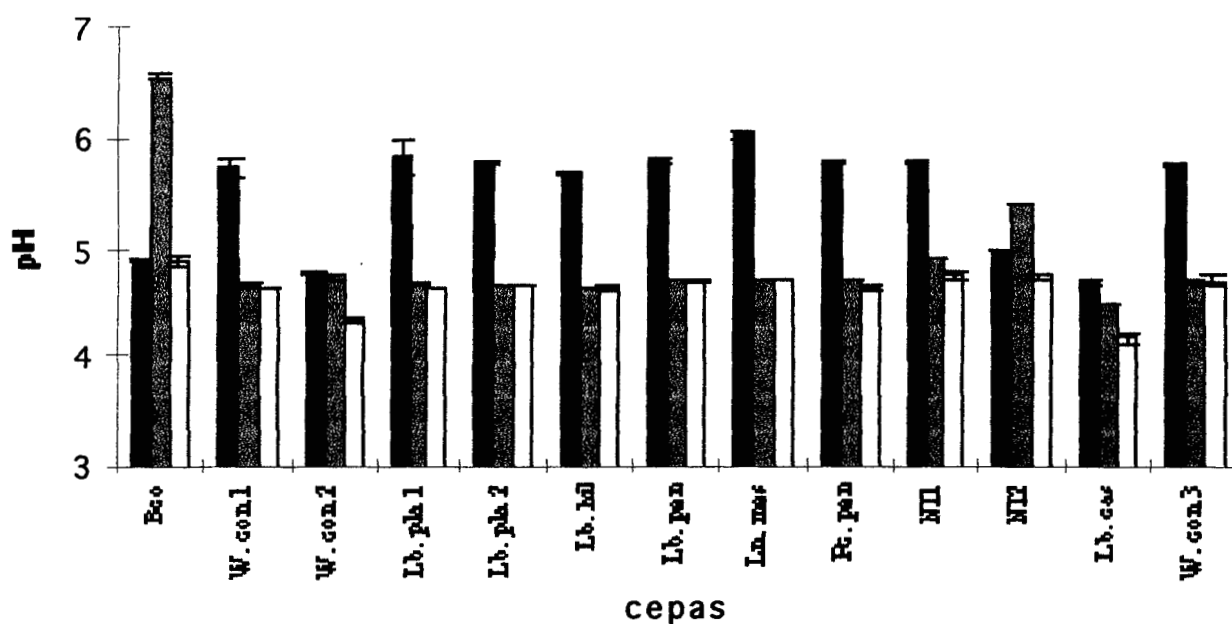


Figura 6.7 Valores de pH en el inicio y final de 72 h de fermentación de las 13 cepas de bacterias lácticas en los medios MRS-gal (■), MRS-glu (▨) y MRS-glu-gal (□)

La variación de pH en los medios de cultivo se puede explicar en función de la descarboxilación de ácido gálico en pirogalol (sección 6.4) que se lleva a cabo en el medio de cultivo, además de la producción de ácido láctico. En el medio MRS-glu descendió el pH por la producción de ácido láctico mientras que en el medio MRS-glu-gal, se produce CO_2 debido a la posible

descarboxilación de ácido gálico, de tal manera que el pH baja a los mismos niveles (semejante) en todos los cultivos (Figura 6.7). El dióxido de carbono al estar disuelto en líquido forma ácido carbónico, el cual puede disociarse para formar bicarbonato y/o iones de carbonato (Aiba, 1990). Si se considera la relación molar de 0.97 y 0.02 para el HCO_3^- y H_2CO_3 respectivamente ($\text{pH} = 4.67$ y $\text{pKa} = 6.37$), se observa que el carbonato es mayor que el ácido carbónico por lo que, probablemente, se esté formando el HCO_3^- que a su vez, puede interactuar con el ácido láctico y formar el ion lactato originando un poder amortiguador en el medio y así mantener el pH. Por otro lado, en el medio MRS-gal se incrementa el pH por la formación de CO_2 debida a la descarboxilación del ácido gálico y la presencia de poco ácido láctico.

6.5 Conclusión

Las 11 cepas de bacterias lácticas que degradaron ácido gálico así como las 2 cepas que no lo degradaron, produjeron rendimientos de ácido láctico similares tanto en el medio MRS-glu como en el medio MRS-glu-gal. Esto indica que el metabolismo de la producción de ácido láctico no fue afectado por la presencia de ácido gálico (9 gL^{-1}).

Se observó una producción de ácido láctico como resultado de la fermentación de la glucosa y al mismo tiempo una descarboxilación del ácido gálico, dando como resultado una molécula de pirogalol con un rendimiento equimolar de pirogalol formado por ácido gálico degradado. Incluso, la degradación de ácido gálico se observó en ambos medios, MRS-glu-gal y MRS-gal. Esto significa que las bacterias no necesitan glucosa como fuente de carbono para poder degradar el ácido gálico en pirogalol. Por lo tanto, la producción de ácido láctico y la degradación de ácido gálico son dos rutas totalmente independientes en el metabolismo de las bacterias lácticas.

CAPÍTULO 7

*Estudio cinético de la biodegradación de ácido gálico: efecto del precultivo sobre la degradación de 9 y 26 g/L de ácido gálico por *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20)*

7. ESTUDIO CINÉTICO DE LA BIODEGRADACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO: EFECTO DEL *PRECULTIVO* SOBRE LA DEGRADACIÓN DE 9 y 26 g·L⁻¹ DE ÁCIDO GÁLICO POR *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20)

En el capítulo anterior se cuantificó la degradación de ácido gálico por 13 cepas de bacterias lácticas. Los análisis fueron hechos en el medio MRS-glu-gal con glucosa (4.5 g·L⁻¹) y ácido gálico (9 g·L⁻¹), así como en el medio donde solo había ácido gálico en ausencia de glucosa (MRS-gal). Debido a que la concentración de ácido gálico se determinó a las 72 h y después de haber adaptado los cultivos al *precultivo* (sección 4.5.2.1), los resultados sugirieron que posiblemente la transformación del ácido gálico en pirogalol solo se debió al hecho de que los cultivos bacterianos fueron sometidos al *precultivo*. Por ésta razón, fue importante probar el efecto del *precultivo* sobre la degradación de ácido gálico a 9 g·L⁻¹. Para esto, se eligieron 2 cepas de las que degradaron ácido gálico, *Lactobacillus plantarum* (L08) y *Pediococcus pentosaceus* (L20). Además estas cepas han sido utilizadas en los ensilajes de la pulpa de café a nivel laboratorio (Gaime-Perraud *et al*, 2001; Carralot *et al*, 2000). También fue ensayada la concentración de 26 g·L⁻¹ de ácido gálico con la finalidad de probar si las bacterias lácticas estudiadas podían degradar una concentración más elevada de ácido gálico.

Osawa *et al* (2000) reportaron haber aislado cepas de bacterias lácticas (*Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus*) que degradaron ácido gálico (3 g·L⁻¹) en pirogalol a las 72 h de cultivo. Sin embargo, no reportaron la relación cuantitativa de ácido gálico degradado en pirogalol. Tampoco ha sido reportado un estudio cinético de la degradación de ácido gálico por bacterias lácticas. En este capítulo se presenta un estudio de la degradación de ácido gálico en pirogalol por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) a dos concentraciones de ácido gálico (9 y 26 g·L⁻¹) con y sin *precultivo*, así como el efecto que tienen éstos parámetros sobre el crecimiento celular, consumo de glucosa, producción de ácido láctico y pirogalol. Por último,

se plantea una propuesta para explicar el mecanismo de la degradación de ácido gálico en pirogalol por las bacterias lácticas estudiadas.

7.1 Desarrollo experimental

En esta parte experimental se realizaron ensayos a $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y a $26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido gálico, que fue la máxima concentración de ácido gálico que pudo disolverse en el medio de cultivo. Estos ensayos se realizaron para conocer si el *precultivo* tenía un efecto sobre la degradación de ácido gálico por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) en presencia de 9 y $26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para estos estudios se utilizaron 3 medios de cultivo. En la Tabla 7.1 se presentan los 3 medios con la concentración de glucosa y ácido gálico empleada (en la sección 4.3 se muestra la composición completa de los medios).

Tabla 7.1 Medios de cultivos empleados para la evaluación cinética de la degradación de ácido gálico

Medio	Glucosa $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Ácido gálico $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
MRS-glu-gal	4.5	9
MRS-glu-gal 26	4.5	26
MRS-gal	-	9

Es importante mencionar que en los experimentos anteriores la medición de ácido gálico se había hecho a las 72 h. Por ésta razón, fue importante hacer un estudio cinético para conocer el tiempo en el cual se estaba biodegradando el ácido gálico en pirogalol. Se planearon cinéticas analizándose muestras a diferentes tiempos (0, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 h) y se observó que a partir de las 12 h, el ácido gálico desaparecía completamente. Nuevamente se elaboraron cinéticas analizando muestras de 0 a 16 h con intervalos de 2 h entre muestras, y un último muestreo a las 24 h para la concentración de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mientras que para el medio con $26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido gálico, se analizaron muestras hasta las 72 h.

7.2 Evaluación cinética del crecimiento celular y la producción de pirogalol por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20)

Se observó la degradación de ácido gálico a 9 y 26 gL⁻¹ por las cepas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) que fueron cultivadas en el medio MRS-glu-gal y MRS-glu-gal 26. En un caso, los cultivos bacterianos provenían del *precultivo* con ácido gálico (72 h) mientras que en el otro, del medio MRS *Lactobacilli* (48 h). En la Figura 7.1 se muestra que la producción de pirogalol esta asociada con la degradación de ácido gálico en una relación lineal con un coeficiente de correlación de 0.9972 (el mismo comportamiento se muestra para las 2 cepas con y sin *precultivo*).

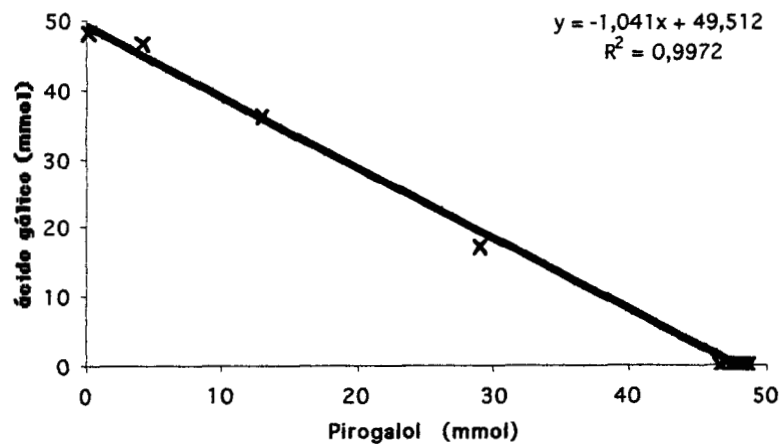


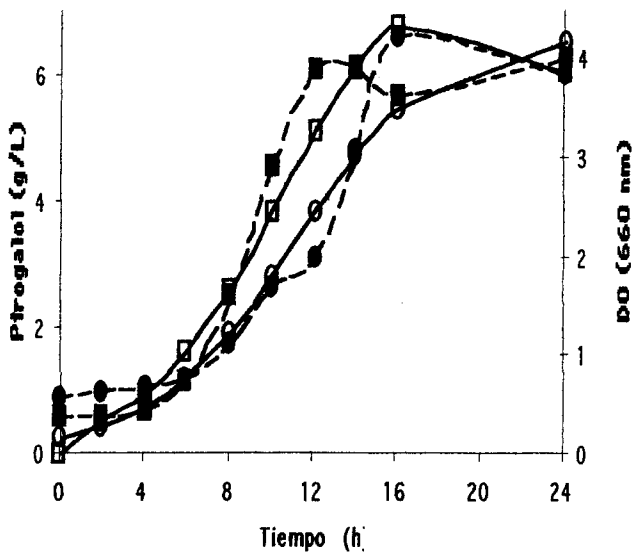
Figura 7.1 Relación lineal entre la degradación de ácido gálico y formación de pirogalol para la cepa de *Lb. plantarum* (L08) a 9 gL⁻¹ sin *precultivo*

Los cultivos con bacterias lácticas en presencia de ácido gálico mostraron que la degradación de ácido gálico y la producción de pirogalol ocurren juntas y en una relación *equimolar*. Este comportamiento fue observado por las dos cepas crecidas en el medio con glucosa (4.5 gL⁻¹) y ácido gálico (9 gL⁻¹) con y sin *precultivo*, así como en el medio donde solo había ácido gálico (9 gL⁻¹) sin glucosa. En las cinéticas de 26 gL⁻¹ el comportamiento fue el mismo aunque las bacterias que no fueron adaptadas al *precultivo*, degradaron menor cantidad de ácido gálico.

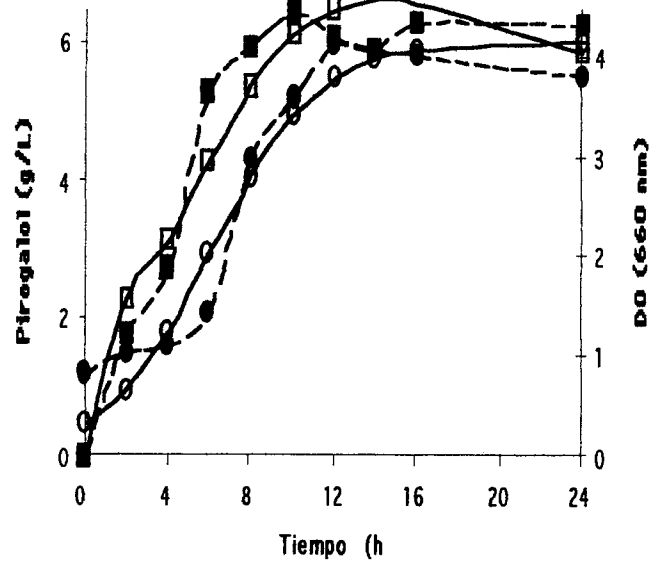
O'Donovan y Brooker (2001) también reportaron que la bacteriana ruminal *S. gallolyticus* realizó una conversión estequiométrica de 50 mmol·ml⁻¹ de ácido gálico en 47 mmol·ml⁻¹ de pirogalol.

En la Figura 7.2 se presentan las cinéticas de la cepa *Lb. plantarum* (L08) donde se evaluó el efecto del *precultivo* sobre el crecimiento celular y la producción de pirogalol. Para mostrar los resultados de una manera más clara solo se presentan las cinéticas de *Lb. plantarum* (L08). Sin embargo, la cepa *Pc. pentosaceus* (L20) presentó el mismo comportamiento.

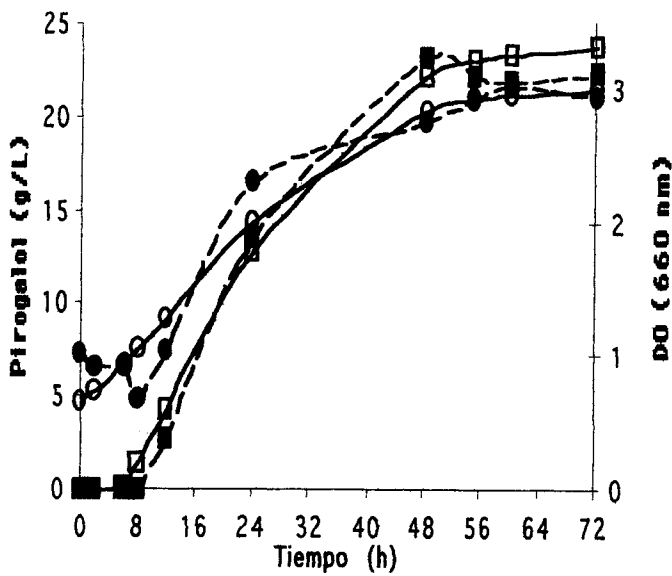
9 g·L⁻¹ de ácido gálico con *precultivo*



26 g·L⁻¹ de ácido gálico con *precultivo*



9 g·L⁻¹ de ácido gálico sin *precultivo*



26 g·L⁻¹ de ácido gálico sin *precultivo*

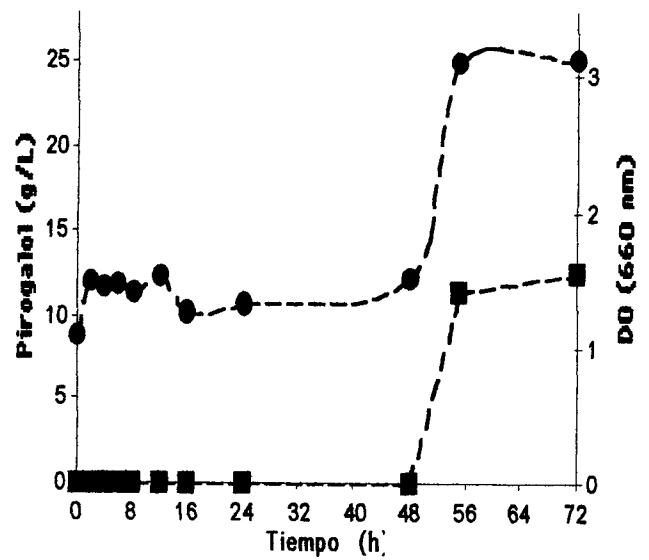


Figura 7.2 Comparación cinética de los datos experimentales del crecimiento celular (---●---) y producción de pirogalol (---■---) contra los datos obtenidos de la ecuación Logística para el crecimiento celular (—○—) y producción de pirogalol (—□—)

Se observa que en el medio con 9 gL^{-1} de ácido gálico y sin *precultivo*, la fase *lag* del crecimiento celular tiene un periodo de 2 h y cuando las cepas bacterianas fueron adaptadas al *precultivo* aumenta a 4 h. También se observa que las bacterias sin *precultivo* crecen más rápido a diferencia de cuando fueron adaptadas al *precultivo*. Sin embargo, la cantidad de biomasa con y sin *precultivo* a 9 gL^{-1} de ácido gálico es prácticamente la misma al final de la fermentación (24 h).

Por otra parte, se observa que al aumentar la concentración de ácido gálico a 26 gL^{-1} y sin el *precultivo*, la fase *lag* del crecimiento microbiano se prolonga hasta las 48 h y se presenta una reducción del 52% en la producción de biomasa comparado con la producción que se obtiene con 9 gL^{-1} de ácido gálico (en ésta cinética no se pudieron ajustar los datos a la ecuación logística debido a que los análisis se hicieron hasta las 72 h y el crecimiento microbiano comienza a las 48 h). De lo contrario, adaptando los cultivos bacterianos al *precultivo* y aumentando la concentración de ácido gálico a 26 gL^{-1} la fase *lag* del crecimiento celular se reduce a 16 h y se produce solo el 47% de la biomasa de la que se forma cuando las bacterias crecen en presencia de 9 gL^{-1} de ácido gálico. Éstos resultados muestran que el ácido gálico a 26 gL^{-1} , retrasó el crecimiento celular de las bacterias lácticas *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) y disminuyó la producción de biomasa.

Graficamente se observa que la producción de pirogalol está asociada al crecimiento celular (Figura 7.2). Para probar ésta hipótesis fue estimada la producción de biomasa expresada como X (DO) en base a la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X \quad (1)$$

Donde μ , es la máxima velocidad de crecimiento específico, X_{max} es el valor de X en el equilibrio y $dX/dt = 0$. La solución de la ecuación de la logística es la siguiente:

$$X = \frac{X_{max}}{\left[1 + \frac{(X_{max} - X_0)}{X_0} e^{-\mu t}\right]} \quad (2)$$

En donde X_0 representa el valor de X cuando $t = 0$.

Para conocer si la producción de pirogalol ($g \cdot L^{-1}$) estaba asociada al crecimiento, fue utilizado el modelo de Luedeking y Piret (1959)

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

Si la ecuación (3) es dividida entre la biomasa (X), se puede expresar de la siguiente manera

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (4)$$

En donde q_p y μ son definidas como:

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Si se substituye la ecuación (4) en (5), tenemos

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (6)$$

La solución de la ecuación (4) se expresa de la siguiente forma,

$$P = P_0 + \alpha(X - X_0) + \frac{\beta X_{max}}{\mu} \ln \left[\frac{(X_{max} - X_0)}{(X - X_0)} \right] \quad (7)$$

El valor de P_0 es el valor de P , cuando $X = X_0$.

Substituyendo el valor de X de la ecuación (2) en la (7) se puede obtener P (pirogalol producido) estimando los parámetros y minimizando la suma de cuadrados del error con la ayuda de Solver del programa *Microsoft Excel*. El parámetro α , fue estimado de la correlación lineal entre la producción de pirogalol y la concentración de biomasa en la fase de crecimiento exponencial.

A pesar que todos los casos presentaron crecimiento y producción de pirogalol, la velocidad de crecimiento del microorganismo y la velocidad de producción de pirogalol fue diferente para cada caso. En la Tabla 7.2 se presentan los valores de los parámetros calculados para *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) crecidas en el medio MRS-glu-gal (CPr) y MRS-glu-gal(SPr).

Tabla 7.2 Parámetros cinéticos calculados para *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) en el medio MRS-glu-gal y MRS-glu-gal 26

Cepa	Precultivo	Biomasa DO=660 nm	Ác. gálico (%)	μ h^{-1}	α g Pir·DO ⁻¹	β g Pir· DO ⁻¹ ·h ⁻¹	$\alpha \mu$ g Pir· DO ⁻¹ ·h ⁻¹
<i>Lb. plantarum</i> ^a	CPr	4.3	100	0.300	2.10	0.08	0.63
<i>Lb. plantarum</i> ^b	CPr	3.0	100	0.082	11.67	0.01	0.95
<i>Lb. plantarum</i> ^a	SPr	4.2	100	0.395	1.35	0.02	0.53
<i>Lb. plantarum</i> ^b	SPr	3.0	60	-	-	-	-
<i>Pc. pentosaceus</i> ^a	CPr	4.2	100	0.268	2.15	0.07	0.57
<i>Pc. pentosaceus</i> ^b	CPr	2.6	100	0.083	13.57	0.05	1.12
<i>Pc. pentosaceus</i> ^a	SPr	4.3	100	0.370	1.84	0.03	0.68
<i>Pc. pentosaceus</i> ^b	SPr	2.5	48	-	-	-	-

^a 9 g·L⁻¹ y ^b 26 g·L⁻¹ de ácido gálico. CPr = con *precultivo*, SPr = sin *precultivo*. El coeficiente α fue calculado a partir de la correlación lineal entre la producción de pirogalol y la concentración de biomasa, obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0.95

Las bacterias cultivadas en el medio con 9 g·L⁻¹ de ácido gálico presentaron una cantidad mayor de biomasa (DO = 4.2 y 4.3) y una máxima velocidad de crecimiento en los medios sin *precultivo*, siendo *Lb. plantarum* (L08) el microorganismo que mostró el máximo valor (0.395 h⁻¹) y la velocidad de crecimiento celular de las 2 cepas fue menor en medio con 26 g·L⁻¹. Sin embargo, no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$) entre la velocidad de crecimiento de las 2 cepas estudiadas (*Lb. plantarum* y *Pc. pentosaceus*) a la concentración de 9 g·L⁻¹ de ácido gálico con y sin *precultivo*. Tampoco hubo diferencia significativa ($\alpha=0.01$) entre la velocidad de producción de pirogalol en el medio con *precultivo* y en el medio sin *precultivo* cuando las

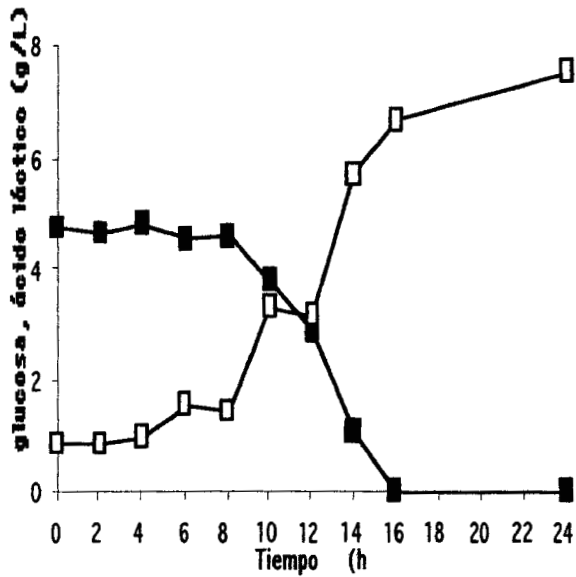
cepas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) degradaron 9 gL⁻¹ de ácido gálico. O'Donovan y Brooker reportaron que la adición de ácido tánico o de extracto de taninos condensados de acacia a concentraciones de 10 gL⁻¹ no presentó un efecto sobre la velocidad de crecimiento exponencial de la bacteria ruminal *S. gallolyticus* mientras que arriba de ésta concentración, las velocidades de crecimiento fueron significativamente reducidas.

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) con la ayuda del programa SPSS®, se obtiene que el término β de la ecuación (3) no es estadísticamente significativo a la concentración de 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico para las dos cepas. Por lo tanto, se confirma la hipótesis de que la formación de pirogalol debida a la descarboxilación de ácido gálico por las bacterias lácticas *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) está asociada al crecimiento celular.

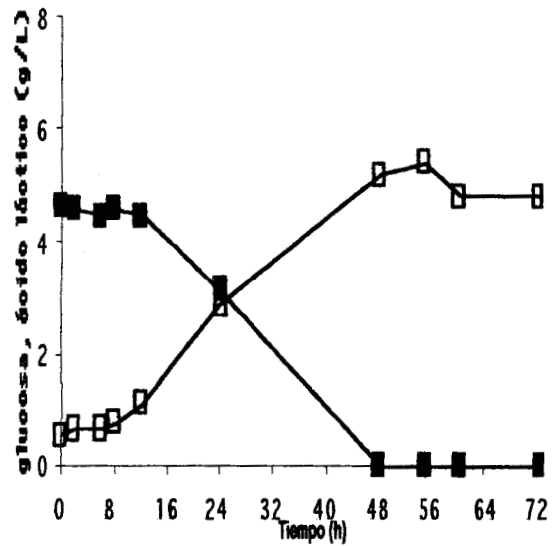
7.2.1 Efecto del *precultivo* sobre el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico

En la Figura 7.3 se presentan las cinéticas que muestran el efecto del *precultivo* sobre el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico en presencia de 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico. Para presentar los resultados con claridad solo se muestran las cinéticas de *Lb. plantarum* (L08). Sin embargo, la cepa de *Pc. pentosaceus* (L20) presentó el mismo comportamiento.

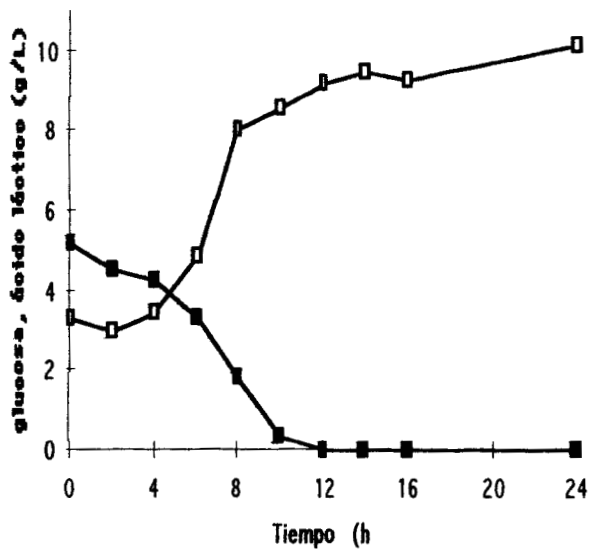
9 gL⁻¹ de ácido gálico con *precultivo*



26 gL⁻¹ de ácido gálico con *precultivo*



9 gL⁻¹ de ácido gálico sin *precultivo*



26 gL⁻¹ de ácido gálico sin *precultivo*

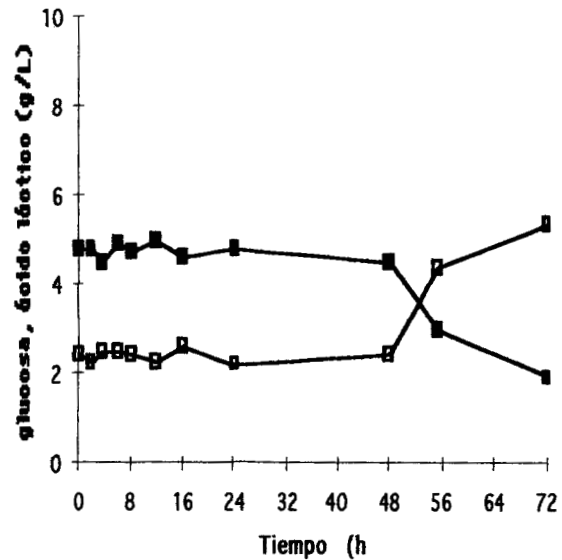


Figura 7.3 Efecto del *precultivo* sobre el consumo de glucosa (■) y producción de ácido láctico (□) por *Lb. plantarum* (L08) en presencia de 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico

Se observa que para los 4 casos el consumo de glucosa y producción de ácido láctico están asociados al crecimiento celular como lo reporta Parés y Juárez (1997). En los cultivos con 9 gL⁻¹ de ácido gálico y *precultivo*, la glucosa se consume totalmente a las 16 h de cultivo mientras que sin *precultivo*, se consume completamente a las 12 h. Por otro lado, se observó que al aumentar la concentración de ácido gálico a 26 gL⁻¹ con *precultivo*, la glucosa comienza a tener un consumo importante a partir de las 16 h (tiempo que corresponde con la fase *lag* del crecimiento celular). Sin *precultivo* y a 26 gL⁻¹ de ácido gálico, la glucosa es consumida después de las 48 h.

En todos los casos (a 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico) la producción de ácido láctico es proporcional al consumo de glucosa observándose que el *precultivo* no mostró un efecto sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico a 9 gL⁻¹ de ácido gálico debido ya que se observó que se produce la misma cantidad de ácido láctico con y sin *precultivo*. Sin embargo, la concentración de 26 gL⁻¹ de ácido gálico presentó un efecto negativo sobre el consumo de glucosa (72 h) en las 2 cepas estudiadas y de la misma manera que en el consumo de glucosa, el ácido láctico producido fue menor. Ésta producción de ácido láctico (48-63%) fue aún menor (27-41%) cuando los cultivos microbianos no fueron adaptados al *precultivo*, siendo *Pc. pentosaceus* (L20) la bacteria con menor producción de ácido láctico (Tabla 7.3).

Tabla 7.3 Efecto del *precultivo* sobre la producción de ácido láctico por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) a 9 y 26 gL⁻¹ de ácido gálico

Cepa	<i>Precultivo</i>	Producción de ácido láctico (g·L ⁻¹) a 9 g·L ⁻¹ de ácido gálico	Producción de ácido láctico (g·L ⁻¹) a 26 g·L ⁻¹ de ácido gálico
<i>Lb. plantarum</i>	CPr	6.66	4.23
<i>Lb. plantarum</i>	SPr	6.83	2.77
<i>Pc. pentosaceus</i>	CPr	6.73	3.26
<i>Pc. pentosaceus</i>	SPr	6.87	1.83

Glucosa = 4.5 gL⁻¹; CPr = con *precultivo*; SPr = sin *precultivo*

Durante el estudio con las bacterias *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) se probó que cuando degradan 9 g·L⁻¹ de ácido gálico no tiene efecto sobre el crecimiento de los microorganismos ni sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico. Sin embargo, al aumentar la concentración a 26 g·L⁻¹, el metabolismo bacteriano cambia. O'Donovan y Brooker (2001) reportaron que la bacteria *S. galloyticus* modificó su metabolismo y que su crecimiento fue inhibido a concentraciones mayores a 40 g·L⁻¹ de ácido gálico.

7.2.2 Resumen de los resultados observados de la degradación de ácido gálico a 9 y 26 g·L⁻¹

En la Tabla 7.4 se presentan los parámetros evaluados y los valores obtenidos al estudiar el efecto del *precultivo* sobre el metabolismo de las cepas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) cuando degradan 9 y 26 g·L⁻¹ de ácido gálico.

Tabla 7.4 Parámetros evaluados durante las cinéticas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) y los valores obtenidos cuando las cepas degradaron 9 y 26 g·L⁻¹ de ácido gálico con y sin *precultivo*

	Concentración de ácido gálico			
	9 g·L ⁻¹ con <i>precultivo</i>	9 g·L ⁻¹ sin <i>precultivo</i>	26 g·L ⁻¹ con <i>precultivo</i>	26 g·L ⁻¹ sin <i>precultivo</i>
Fase <i>lag</i> del crecimiento celular (h)	2	4	16	48
Crecimiento celular (DO=660 nm)	3.7-3.8	3.8-4.2	2.4-2.8	3.0-3.1
Crecimiento celular (%)	100	100	66	78
Tiempo que dura el período inicial del consumo de glucosa (h)	6-8	2-4	12	48
Consumo de glucosa (%)	100	100	100	60-70
Tiempo que dura el período inicial de la producción de ác. láctico (h)	6	2-4	12	48
Producción de ác. láctico (%)	100	100	48-63	27-41
Biodegradación de ác. gálico (%)	100	100	100	48-60
Tiempo que dura el período inicial de degradación de ác. gálico (h)	2	4	16	48

7.2.3 Degradación de ácido gálico por células latentes

Como se describió anteriormente, el *precultivo* no presentó un efecto positivo sobre la degradación de ácido gálico a 9 g·L⁻¹. Además, la degradación del fenol comenzó antes de ser consumida la glucosa por las bacterias lácticas estudiadas. Por ésta razón, fue importante observar si la glucosa tenía un efecto positivo sobre la degradación de ácido gálico a 9 g·L⁻¹ para ello, se realizó una cinética de degradación de ácido gálico por *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) en medio sin glucosa (MRS-gal) y sin *precultivo*, observándose que la

producción de pirogalol ocurre en el mismo tiempo que cuando hay glucosa además de ácido gálico en el medio (MRS-glu-gal).

Esto indica que la glucosa (4.5 gL^{-1}) al igual que la adaptación al *precultivo* no tienen un efecto positivo sobre la degradación de ácido gálico a una concentración de 9 gL^{-1} . Para probar esta hipótesis se realizó un experimento en donde los cultivos bacterianos después de ser crecidos en el medio MRS *Lactobacilli* ® fueron inoculados en solución fisiológica (0.9% de NaCl) adicionado con 9 gL^{-1} de ácido gálico como única fuente de carbono. Éste experimento se realizó con la finalidad de observar si las bacterias lácticas podían degradar ácido gálico aún en la ausencia de glucosa y de cualquier otro tipo de fuente de carbono, en éste caso, los demás nutrientes del medio MRS (polipeptona, extracto de carne, extracto de levadura, citrato de amonio y acetato de sodio). Se elaboró una cinética tomando muestras a los mismos tiempos que las cinéticas anteriores (0 a 16 y 24 h) y se observó que los microorganismos no crecieron ni degradaron el ácido gálico.

Por ésta razón, se pensó que las bacterias lácticas estudiadas necesitaban de una fuente de carbono que pudieran utilizar para su crecimiento y después poder degradar el ácido gálico. Mondal y Pati (1999) reportaron que al adicionar 10 gL^{-1} de glucosa a un medio mínimo con ácido tánico, la glucosa favoreció la actividad de la enzima responsable en degradar el ácido tánico (tanasa) presente en la bacteria *Bacillus licheniformis*. Por otra parte, las bacterias lácticas estudiadas (*Lb. plantarum* y *Pc. pentosaceus*) aunque no necesitaron la glucosa para degradar ácido gálico, posiblemente si necesitan de otra fuente de carbono para crecer y poder degradar dicho compuesto bajo un fenómeno *cometabólico*. Janke y Fritsche (1985) definieron *cometabolismo* como “la transformación de un sustrato que no es utilizado para el crecimiento en la presencia obligada de un sustrato necesario para el crecimiento u otro compuesto transformable”. En este caso, la degradación de ácido gálico por bacterias lácticas posiblemente es un proceso *cometabólico* debido a que las bacterias ensayadas degradaron ácido gálico solo

en la presencia de los nutrientes del medio que pudieran utilizar como fuente de carbono para sus funciones metabólicas.

7.2.4 Producción de energía

No es clara la razón por la cual las bacterias lácticas estudiadas no utilizaron el ácido gálico como fuente de carbono para la producción de ácido láctico y solo descarboxilaron el ácido gálico (tri-hidroxibenzoico) en pirogalol (tri-hidroxibenceno). Es posible que el pirogalol sea un compuesto menos tóxico para la bacteria que el ácido gálico, o que su producción fue favorable para el microorganismo debido a la generación de energía. Janke y Fritsche (1985) reportaron que bacterias como los clostridios obtienen su energía de la fermentación de aminoácidos al hidrolizar proteínas. Durante ésta fermentación el aminoácido (ejemplo: alanina, leucina o isoleucina) es oxidado. Los electrones que se generan durante el proceso son transferidos a través de una secuencia de electrones hasta enzimas reductasas en el cual transfieren estos electrones a otros aminoácidos (glicina o prolina) que actúan como aceptores de H^+ (Figura 7.4).

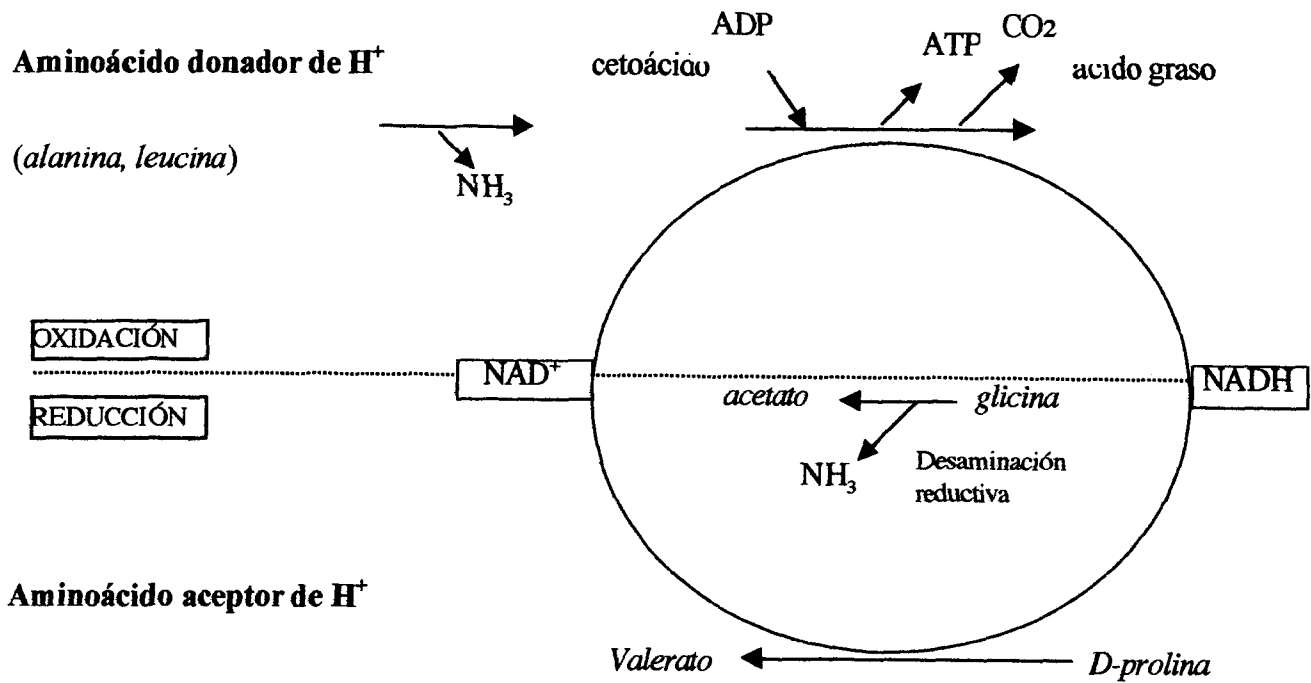


Figura 7.4 Transformación acoplada de aminoácidos (Janke y Fritsche, 1985)

El aminoácido (alanina o leucina) es descarboxilado generando poder reductor en forma de $NADH$ que después es utilizado por el propio microorganismo para convertir D-prolina en valerato.

En éste trabajo se propone el mecanismo de la degradación de ácido gálico en pirogalol por las bacterias lácticas estudiadas, reacción semejante a la que realizan los clostridios para obtener energía (Figura 7.5).

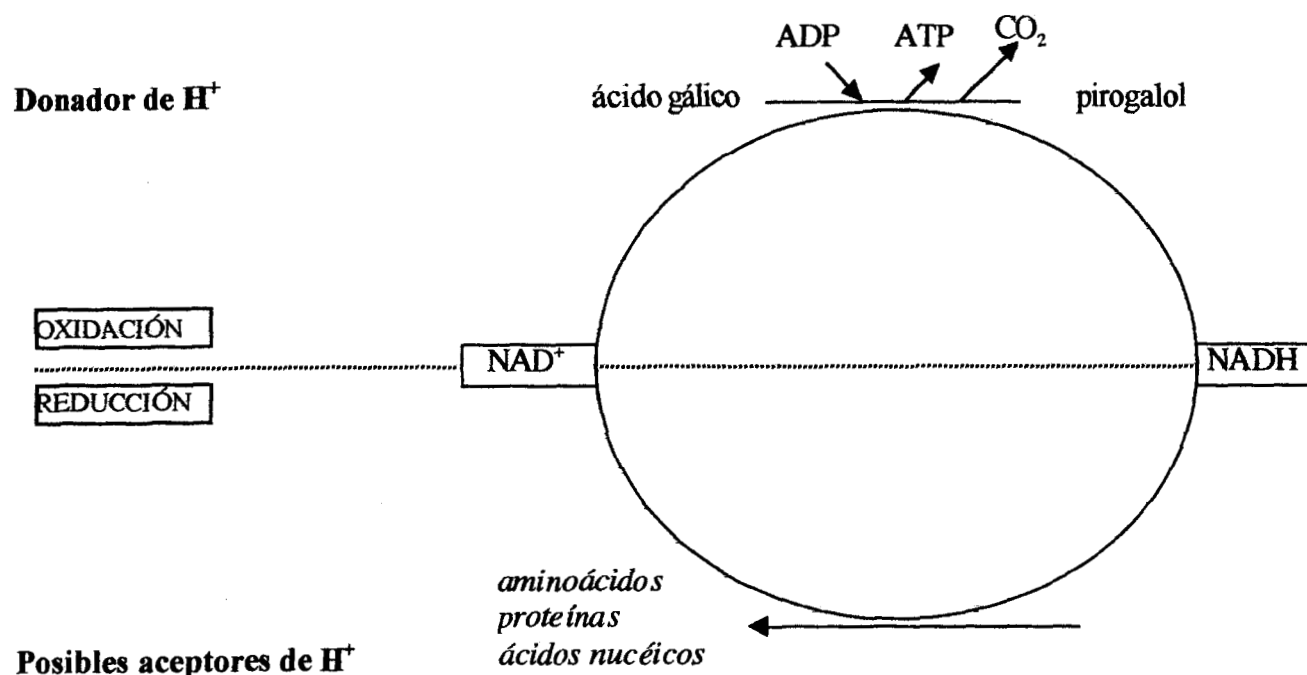


Figura 7.5 Posible mecanismo de generación de energía debida a la descarboxilación de ácido gálico en pirogalol por bacterias lácticas

Las bacterias lácticas al formar pirogalol posiblemente generan energía durante la descarboxilación que puede ser utilizada para producir otras biomoléculas (aminoácidos, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos) que pueden ser empleadas por el propio microorganismo.

Por otro lado, Voet y Voet (1992) reportaron que la descarboxilación de moléculas químicas conlleva a la producción de poder reductor en forma de NADH, como es el caso de la descarboxilación de ácido pirúvico en acetil-CoA o bien, la descarboxilación de isocitrato a oxoglutarato que ocurre en el ciclo de Krebs por diversos microorganismos. Parés y Juárez (1997) reportaron que es posible que bacterias anaerobias como *Pelobacter* sp. y *Coprococcus* sp. durante la etapa inicial de la fermentación del floroglucinol (tri-hidroxibenzóico), molécula

semejante al ácido gálico, realizan una reducción a dihidrofloroglucinol, siendo una reacción dependiente del NADH y H^+ . Se han aislado diferentes microorganismos que pueden obtener energía a partir de la fermentación de otros compuestos orgánicos, como es el caso de las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas* sp. que obtienen carbono y energía al metabolizar tolueno y n-alcanos, respectivamente (Newman y Wackett, 1995; Setti *et al*, 1993). O'Donovan y Brooker (2001) reportaron que la cepa bacteriana ruminal *S. gallolyticus* cataliza la descarboxilación de ácido gálico en pirogalol generando probablemente energía a través de un bombeo de protones, misma reacción que realizaron las bacterias lácticas que fueron estudiadas.

7.3 Conclusión

Se estudiaron las cepas de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) donde se evaluó el efecto del *precultivo* sobre el metabolismo de ambas bacterias. Se observó que el adaptar los microorganismos a un *precultivo* que contiene 9 gL^{-1} de ácido gálico y 4.5 gL^{-1} de glucosa, no tiene un efecto sobre el crecimiento celular, la velocidad de producción de pirogalol, ni sobre el consumo de glucosa y producción de ácido láctico cuando las bacterias degradan 9 gL^{-1} de ácido gálico. Sin embargo, el *precultivo* si tiene un efecto positivo cuando las bacterias degradan 26 gL^{-1} de ácido gálico debido a que disminuyen los tiempos de degradación de ácido gálico, producción de pirogalol, crecimiento delular, consumo de glucosa y producción de ácido láctico. Además, cuando no hay *precultivo* y las bacterias son cultivadas en 26 gL^{-1} solo pueden degradar entre el 48% (*Lb. plantarum*, L08) y 60% (*Pc. pentosaceus*, L20) del ácido gálico a las 72 h.

Por otra parte, se desconoce la razón por la cual las bacterias lácticas no utilizan el ácido gálico como fuente de carbono y solo lo descarboxilan en pirogalol. En este trabajo se propone que posiblemente éste proceso lo realicen bajo un fenómeno *cometábólico* en el cual requieren de una fuente de carbono (como son los propios nutrientes del medio) para crecer y así degradar el ácido gálico para que quizá de ésta manera, obtengan energía. Además, se observó que la producción de pirogalol está asociada al crecimiento celular de las bacterias lácticas.

CAPÍTULO 8

Conclusiones generales y perspectivas

8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

De la selección de cepas capaces de degradar compuestos fenólicos se encontró que de 45 cepas de bacterias lácticas probadas, 22 crecieron en medio sólido con ácido tánico (5 gL^{-1}) y 23 son capaces de degradar el ácido gálico (9 gL^{-1}). Además, las cepas que crecieron sobre placas con ácido tánico fueron las mismas cepas que degradaron el ácido gálico, más una cepa. Los géneros bacterianos son: *Lb. plantarum* (9 cepas), *Lb. pentosus* (1 cepa), *Lb. hilgardii* (1 cepa), *Pc. pentosaceus* (4 cepas), *W. confusa* (3 cepas) y *Ln. mesenteroides* quien no crece sobre el medio sólido con ácido tánico pero si degrada el ácido gálico en medio líquido. Y por último, un grupo de 5 cepas que no tienen una identificación pero son bacterias lácticas.

Los análisis cuantitativos se hicieron sobre el medio líquido con 9 gL^{-1} de ácido gálico a las 72 h de cultivo y después de adaptar los cultivos bacterianos a un *precultivo* con 9 gL^{-1} de ácido gálico y 4.5 gL^{-1} de glucosa, se observó que las bacterias lácticas estudiadas degradaron el ácido gálico en pirogalol y que se produce en una relación equimolar. Además, la degradación de ácido gálico no presentó un efecto sobre la producción de ácido láctico puesto que las bacterias al crecer en un medio con o sin ácido gálico (9 gL^{-1}), producen los mismos rendimientos de ácido láctico.

Los estudios cinéticos donde se evaluó el efecto del *precultivo* sobre el metabolismo de *Lb. plantarum* (L08) y *Pc. pentosaceus* (L20) mostraron que a 9 gL^{-1} de ácido gálico, el *precultivo* no tuvo un efecto sobre el metabolismo de ambas cepas ya que las bacterias que fueron crecidas con y sin *precultivo* tuvieron las mismas velocidades de crecimiento y producción de pirogalol, así como los mismos rendimientos de producción de ácido láctico. Por otra parte, al aumentar la concentración de ácido gálico a 26 gL^{-1} sin *precultivo* la fase lag del crecimiento celular se incrementa 11 veces más ya que se prolonga hasta las 48 h de cultivo a diferencia de 4 h que se tiene cuando las bacterias degradaron 9 gL^{-1} de ácido gálico. Sin embargo, a ésta concentración (26 gL^{-1}) el *precultivo* si tiene un efecto positivo sobre el

metabolismo de las bacterias debido a que disminuye hasta 8 veces (48 h a 16 h) la fase lag del crecimiento celular. Por otra parte, los tiempos iniciales del consumo de la glucosa, de la producción de ácido láctico y de la degradación de ácido gálico están asociados con el tiempo que dura la fase *lag* del crecimiento celular es decir, las bacterias necesitan crecer para después llevar a cabo sus actividades metabólicas por lo que la producción de pirogalol está asociada al crecimiento celular. A pesar de que el *precultivo* presentó un efecto positivo sobre la degradación de 26 gL⁻¹ de ácido gálico, ésta concentración tuvo un efecto negativo sobre la producción de ácido láctico debido a que se disminuyó de 27-41% en los cultivos sin *precultivo* y de 48-63% en los cultivos con *precultivo*.

La degradación de ácido gálico en pirogalol por las cepas de bacterias lácticas ensayadas se plantea como un proceso *cometabólico* debido a que el ácido gálico no fue utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido láctico. Además, las bacterias produjeron pirogalol aún cuando no había glucosa, utilizando los otros compuestos para la obtención de carbono y que están presentes en el medio de cultivo. Por otra parte, el porqué las bacterias descarboxilaron el ácido gálico hasta pirogalol que se acumula en el medio se debe posiblemente a que los microorganismos obtienen energía a partir de ésta reacción ya que el ácido gálico no es utilizado para la producción de ácido láctico.

Este trabajo consistió en hacer un estudio de la degradación de compuestos fenólicos, teniendo como modelo de estudio el ácido gálico. Si bien, éste compuesto no presenta el problema de formar complejos con las proteínas sin embargo, sirvió para realizar una selección de cepas y hacer un estudio fisiológico de la degradación de dicho compuesto. Ahora que se cuenta con una selección de bacterias lácticas que degradan ácido gálico y que crecen en presencia de ácido tánico es importante para estudios posteriores, probar la degradación de moléculas más complejas como son los taninos y en especial, introducirse en el estudio de la degradación de taninos condensados puesto que no hay información suficiente de microorganismos que

degraden éstas moléculas. En el momento que se tengan resultados favorables de la degradación de taninos por tanasas de bacterias lácticas, se podría aislar, caracterizar y purificar la enzima y realizar un estudio de cómo es que actúa. Una vez que se purifique la enzima, se podría comparar la actividad con la de tanasas fúngicas. Posteriormente, se aislaría el gen que regula la síntesis de la tanasa con el fin de hacer microorganismos sobreproductores de la enzima.

CAPÍTULO 9

Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C.N.,** Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra-González, G. (2000) Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36: 565-570
- Aiba, F.** (1990) *Química general*. Editorial Omega S.A.
- Ajay-Kumar, R.,** Gunasekaran, P. and Lakshmanan, M. (1999) Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. *J. Basic Microbiology* 39: 101-108
- Axelsson, H.** (1993) Lactics bacterias. *J. Food Sci.* 3:1-20
- Aoki, K.,** Shinke, R. and Nishira, H. (1975) Purification and some properties of yeast tannase. *Agr. Biol. Chem.*, 40 (1): 79-85
- Bae, H.D.,** Yanke, L.J., Cheng, K.J. and Selinger, L.B. (1999) A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Meth.*, 39: 17-22
- Boubekri, K.** and Ohta, Y. (1996) Antimutagenicity of lactic acid bacteria from el-klila cheese. *J. Sci. Food Agric.* 72(4) december, pp-397-402
- Bozoglu, F.** and Ray, B. (1995) Lactics bacterias. *FEMS Microbiology Letters*, 116: 112-125
- Bravo, L.** (1993) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11): 317-333
- Bravo, L.,** Abia, R., Eastwood, M.A. and Saur-Calixto, F. (1994) Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *British Journal of Nutrition*, 71: 933-946
- Bressani, R.,** Estrada, E. and Jarquín, R. (1972) Pulpa y pergamino de café. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. *Turrialba*, 22 (3): 299-304
- Breidt, F.** and Fleming, H.P. (1997) Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technology*, 51(9)
- Carralot, JP.,** Aranda, E., Saucedo-Castañeda, G. and Gaimé-Perraud, I. (2000) Feasibility of coffee pulp silage: a large scale study. *Simposium Internacional de Biotecnología UPIBI-IPN*, México

- Carrizales, V. y González, J.** (1984) Aprovechamiento de la pulpa de café. *Estudio experimental. Reporte final*. Fundación. CIEPE, San Felipe Venezuela
- Chefetz, B.,** Chen, Y. and Hadar, Y. (1998) Purification and Characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*, 9: 3175-3179
- Chung, K.T.,** Lu, Z. and Chou, M.W. (1998) Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36: 1053-1060
- Chunjian, L.,** Bolsen, K.K., Brent, B.E. and Fung, D.Y.C. (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl. Bacter.*, 73 375-387
- Cody, V.** (1993) Molecular conformation of flavonoids and their protein binding interactions *Polyphenolic Phenomena*. Editor: A. Scalbert, ediciones INRA, 33-39
- Collins, M.D.,** Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. (1993) Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacter.*, 75: 595-603
- De Man, J.C.,** Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacter.*, 23: 130-135
- Deschamps, A.M.,** Mahoudeau, G., Conti, M. and Lebeault, J.M. (1980) Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol.*, 58 (2): 93-97
- Dey, P.M.** and Harborne, J.B. (1997) *Plant Biochemistry*. Academic Press
- Elías, L.G.** (1978) Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. *Pulpa de café*. Braham y Bressani (Edi)
- Fitzsimons, A.** and O'Connell, M. (1994) Comparative analysis of amylolytic lactobacilli and *Lb. plantarum* as potential silage inoculants. *FEMS Microbiology Letters*, 116: 137-146

- Gaime-Perraud, I.** (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. *Thèse de doctorat*, Université de Montpellier II, France. 210 p
- Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G., Augur, C. and Roussos, S.** (2000) Adding value to coffee solid by-products through biotechnology in: *Coffee Biotechnology and Quality*. T. Sera, CR Soccol, A. Pandey and S. Roussos Eds. Kluwer Academic Press, 437-446
- Gaime-Perraud, I., Carralot, JP. and Saucedo-Castañeda, G.** (2001) Conservación de la pulpa de café por ensilaje: del aislamiento de las bacterias lácticas a la factibilidad en el campo. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Boca del Río, Veracruz, México
- Galiotou-Panayotou, M. and Macris, B.J.** (1988) Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 502-506
- Grbic-Galic, D., Churchman-Eiselm N. and Iskra** (1990) Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 247-260
- Guerrero, I. and Arteaga, R.** (1990) Elaboración y preservación de productos cárnicos. Editorial Trillas. 97 p
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C. and McArthur, C.** (1992) Tannin chemistry in relation to digestion. *J. Range Manag.*, 45 (1)
- Hara, Y.** (1997) Influence of tea catechins on the digestive tract. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 27: 52-58
- Harbone, J.B.** (1993) New naturally occurring plant polyphenols. *Polyphenolic Phenomena*. Editor: A. Scalbert, ediciones INRA, 19-22
- Haslam, E.** (1993) Polyphenol complexation *Polyphenolic Phenomena*. Editor: A. Scalbert ediciones INRA, 23-31
- Heinz, K.** (1986) Gram-positive cocci. *Bergeys's manual of systematic bacteriology*, Sneath P., Murray R., Williams & Wilkins, Los Angeles, 2: 999-1230
- Howson S.J. and Davis, R.P.** (1983) Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enz. Microbiol. Technol.*, 5(9): 377-382

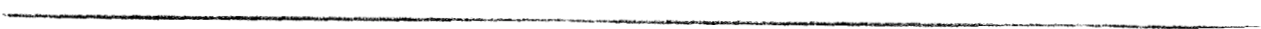
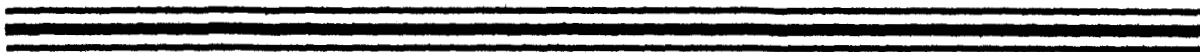
- Hulme, M** (1970) Polyphenols *Polyphenolic Phenomena*. Editor: A. Scalbert ediciones INRA, pp 52-62
- Janke, D.** and Fritsche W. (1985) Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J. Basic Microbiol.* 25 (9): 603-619
- Kadhim, H.,** Graham, C., Barratt, P., Evans, C.S. and Rastall R.A (1999) Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enz. Microb. Techn.* 24: 303-307
- Ko, S.H.** and Lebeault, J.M. (1999) Effect of a mixed culture on co-oxidation during the degradation of saturated hydrocarbon mixture. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 72-79
- Lane, O.E.,** E. Sudweeks, M. and Moon, N.J. (1981) Inoculation with *Lactobacillus plantarum* of alfalfa, corn, sorghum and wheat silages *J. Dairy Sci.*, 64: 2378-2387
- Lane, R.W.,** Yamakoshi, J., Kikuchi, M., Mizusawa, K., Henderson, L. and Smith, M. (1997) Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. *F. Chem. Toxicol.* 35: 207-212
- Lekha, P.K.** and Lonsane, B.K. (1996) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.*, 44
- Lindgren S.** and Pleje M. (1983) Silagefermentation of fish or fish waste. Products with lactic acid bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 34: 1057-1067
- Luedeking, R.** and Piret, E.L. (1959) Transient and steady states in continuous fermentation, theory and experiment. *J. Biochem. Microbiolo. Tech. Eng.*, 1: 431-459
- Mauguin, S.** and Novel, G. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from sea food. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 616-625
- Middelhoven, W.J.** and Klijn, N. (1997) *Leuconostoc fallax*, an acid and ethanol tolerant lactic acid bacterium. *J. Sci. Food Agric.* 75 (9): 57-60
- Midi** (1997) Microbial ID, fatty acid analysis and microbial identification. Laboratorio de identificación de microorganismos. U.S.A

- Mitsuoka, T.** (1978) Intestinal Bacteria and Health. *An introductory narrative* Harcourt Brace Jovanovich Japan INC. 158 p
- Mondal, K.C.** and Pati, B.R. (2000) Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6. *J. Basic Microbiol.*, 40 (4): 223-232
- Newman, L.M.** and Wackett, L.P. (1995) Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry*, 34: 14066-14076
- O'Donovan, L.** and Brooker, J.D. (2001) Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147: 1025-1033
- Olympia, M.,** Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. and Tokano, M. (1995) Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, 'Burong Isda' and its amylolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (2): 124-130
- Osawa, R.O.,** Kuroiso, K., Goto, S. and Shimizu, A. (2000) Isolation of tannin-degrading Lactobacilli from humans and fermented foods. *Appl. Environm. Microbiol.*, 7: 3093-3097
- Otuk, G.,** Deschamps, A.M. and Lebeault, J.M. (1983) Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 61: 55-59
- Parés, R.** and Juárez, A. (1997) *Bioquímica de los microorganismos* Editorial Reverté
- Pirt, J.** (1975) *Principles of microbe and cell cultivation.* Blackwell Scientific Publications. London
- Quesada, C.,** Bartolomé, B., Nieto, O., Gómez-Cordovés, C., Hernández, T. and Estrella, I. (1995) Phenolic inhibitors of α -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils and cocoa. *J. Food Protect.*, 59 (2): 185-192
- Ramírez, J.** (1987) Compuestos fenólicos en la pulpa de café: cromatografía de papel de pulpa fresca de 12 cultivares de *Coffea arabica*. *Turrialba*, 37 (4): 317-323
- Ramírez-Coronel, M.A.** (2000) Purificación y caracterización de una tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20, producida por fermentación en medio sólido. *Tesis de Maestría.* Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

- Ramírez-Martínez, J.R.** and Clifford, M. (2000) Pulpa de café ensilada: producción, caracterización y utilización en alimentación animal. Editor, Ramírez-Martínez, J.R.
- Rebecchi, A.,** Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S. (1998) Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1043-1049
- Ruiz-Barba, J.L.,** Brenes-Balbuena, M., Jiménez-Díaz, R., García-García, P. and Garrido-Fernández, A. (1993) Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 15-19
- Salawu, M.B.,** Warren, E.H. and Adesogan, A.T. (2001) Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *J. Sci. Food Agric.*, 81:1263-1268
- Scalbert, A.** (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 (12): 3875-3883
- Seale, D.R.** (1986) Bacterial inoculants as silage additives. *J. Appl. Bacteriol.* Symposium Supplement, 9S-26S
- Setti, L.,** Lanzarini, G., Pifferi, P.G. and Spagna, G. (1993) Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. *Chemosphere.* 26 (6): 1151-1157
- Srinivasan, C.,** D'Souza, T.M., Boominathan, K. and Reddy, C.A. (1995) Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.*, 12: 4274-4277
- Styer, L.** (1990) Bioquímica. Tercera edición, Tomo 1. Editorial Reverté S.A.
- Suzuki, A.,** (1999) Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas aisladas para la conservación de pulpa de café por ensilaje. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
- Vuyst, L.** and Vandamme, E. (1994) Bacteriocins of lactic bacteria; microbiology, genetics and applications. Blackie Academic Professional
- Voet, D.** and Voet, J.G. (1992) Bioquímica. Ediciones Omega S.A.

- Waterman, P.G.** and Mole, S. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications Editorial Offices, Oxford
- Whiting., G.C.** (1973) Fourth Long Ashton Symposium. Lactic acid bacteria in beverages and food. Academic Press, 75-78
- Whitaker, J.W.** (1972) Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel
- Yasuda, T.,** Inaba, A., Ohmori, M., Endo, T., Kubo, S. and Osawa, K. (2000) Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *J. Nat. Prod.*, 63: 1444-1446
- Zeida, M.,** Wieser, M., Yoshida, T., Sugio, T. and Nagasawa, T. (1998) Purification and Characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. *Appl. Environ. Microbiol.* 12: 4743-4747
- Zuluaga, J.** (1989) Utilización integral de los subproductos del café. In Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC) Roussos, Licono, y Gutierrez (Eds), Xalapa, México, 63-76

Anexos



SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS CAPACES DE DEGRADAR ÁCIDO GÁLICO

Contreras-Domínguez¹ M., Prado-Barragán¹ L.A., Saucedo-Castañeda¹ G. y Gaime-Perraud^{1,2} I.

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Av. Michoacán y La Purísima s/n, Col. Vicentina MEXICO, D.F. 09340

²Institut de Recherche pour le Développement
tel. : 58-04-65-54 ; mcontrerasd@hotmail.com ; isa@xanum.uam.mx

Palabras clave: bacterias lácticas, ácido gálico, ácido tánico y pirogalol

Introducción. Los taninos son compuestos que se encuentran en las plantas y presentan la característica de unirse a proteínas (1) disminuyendo el valor nutritivo de productos agrícolas. Algunos hongos, levaduras y bacterias son reportados para tener la capacidad de degradar taninos (1,2 y 3). Dentro del grupo de bacterias se ha reportado que *Lb. plantarum* puede degradar el ácido tánico y gálico hasta pirogalol como producto final (4). Las bacterias lácticas son los microorganismos responsables de conservar productos agrícolas (tal es el caso de la pulpa de café) por medio del ensilaje (5).

Este trabajo presenta una selección de distintos géneros de bacterias lácticas aisladas de la pulpa de café con capacidad de degradar ácido gálico en pirogalol y crecer en placas con tánico.

Metodología. 45 cepas de bacterias lácticas aisladas de la pulpa de café fueron propagadas en medio MRS con 20 g l⁻¹ de glucosa durante 48 h a 30°C. Posteriormente fueron inoculadas sobre placas de agar MRS con 5 g l⁻¹ de ácido tánico como única fuente de carbono, y en 3 diferentes medios líquidos adicionando gálico y glucosa a diferente concentración (tabla 1). Los cultivos fueron mantenidos a 30°C por un tiempo de 72 h y 120 h para las placas con tánico. Se observó el crecimiento y formación de halos de hidrólisis sobre las placas con tánico y se cuantificó el gálico, glucosa, pirogalol y láctico en los medios líquidos.

Tabla 1. Concentración de gálico y glucosa

Medio (g l ⁻¹)	Glucosa	Gálico
1	4.5	-
2	4.5	9
3	-	9

Resultados y Discusión. Las 45 bacterias (colección aislada de la pulpa de café ensilada) crecieron en presencia de ácido gálico (medio 2 y 3) pero solo 23 cepas lo degradaron hasta pirogalol. Entre los géneros microbianos que degradan ácido gálico a pirogalol tenemos: *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. pentosus*, *Ws. confusa*, *Pc. pentosaceus*, *Ln. mesenteroides* y un grupo de bacterias que no han sido identificadas. Los géneros que no actuaron sobre el gálico son:

• *Lb.* = *Lactobacillus*; *Pc.* = *Pediococcus*; *Ws.* = *Weissella*;
Ln. = *Leuconostoc*

Lb. coryniformis, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. bif fermentens*, *Ws. confusa* y un grupo no identificadas. Las mismas 45 cepas fueron inoculadas sobre placas de MRS con 5 g l⁻¹ de ácido tánico como única fuente de carbono. Solamente 22 cepas crecieron y formaron halos de hidrólisis debida a la acción de las bacterias sobre el tánico. Estas cepas son las mismas que actuaron sobre el gálico excepto el género *Ln. mesenteroides*.

El rendimiento de la producción del ácido láctico frente al consumo de la glucosa en el medio 1 (sin gálico) es similar al que se obtiene en el medio 2 (con gálico), es decir; el consumo de glucosa y la producción de láctico no son inhibidos por la presencia de gálico a la concentración de 9 g l⁻¹. Por otra parte, cuando el medio MRS no contiene glucosa y solamente gálico a 9 g l⁻¹ como fuente de carbono (medio 3), las bacterias consiguen degradar el 100% de gálico hasta pirogalol dentro de las 72 h.

Conclusiones. De las 45 cepas de bacterias lácticas se seleccionaron 23 que pueden degradar el 100% de ácido gálico en pirogalol en una relación equimolar, en presencia o ausencia de glucosa. Estas bacterias pertenecen a 4 géneros conocidos; *Lb.*, *Pc.*, *Ln.*, *Ws.* y un grupo de bacterias no identificadas. Las mismas bacterias crecen sobre medio con tánico a una concentración de 5 g l⁻¹, a excepción de una cepa (*Ln*). El gálico a 9 g l⁻¹ no fue inhibitorio para la producción de ácido láctico.

Bibliografía

1. Lekha P.K. & Lonsane B.K. (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. in App Microb.*, Vol. 44
2. Deschamps A.M., Mahoudeau G., Conti M. y Lebeault J-M (1980) Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol.*, Vol. 58, No. 2
3. Ajay K.R., Gunasekaran y Lakshmanan (1999) Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from tannery effluent. *J. Basic Mic.*, vol. 39, No.3
4. Osawa R., Kuroiso K., Goto S. & Shimizu A. (2000) Isolation of tannin-degrading Lactobacilli from humans and fermented foods. *Appl and Envir Microb.* Vol 66, No. 7
5. Gaime-Perraud I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bacteries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de café. These Doctorat

PIROGALOL *Lb. plantarum* (L08) CPr

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.443	.702		.631	.546
	BIOMASA DE L08 CON ADAPTACION	1.596	.308	.877	5.175	.001

a. Dependent Variable: PYROGALOL L08 CON ADAPTACION

PIROGALOL *Lb. plantarum* (L08) SPr

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.903	.877		1.030	.333
	BIOMASA DE L08 SIN ADAPTACION	1.394	.290	.862	4.806	.001

a. Dependent Variable: PYROGALOL L08 SIN ADAPTACION

Analizando las pendientes:

Determinamos si las pendientes son significativamente diferentes, para lo cual planteamos una prueba de diferencia de medias de dos poblaciones, donde:

X_1 .- Pendiente de la biomasa con adaptación para L08

X_2 .- Pendiente de la biomasa sin adaptación para L08

Hipótesis nula: $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alterna: $H_a = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Estadística de prueba:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{S_p^2}{n_1}\right) + \left(\frac{S_p^2}{n_2}\right)}}$$

ya que conocemos en error estándar de cada pendiente

$$\text{Error estándar} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

por lo tanto

X_1	1.596
X_2	1.394
$\frac{S}{\sqrt{n_1}}$	0.308
$\frac{S}{\sqrt{n_2}}$	0.29

$$t = \frac{(1.596 - 1.394)}{\sqrt{(0.308)^2 + (0.29)^2}}$$

$$t_c = 0.477495$$

y la t de tablas para: $t_{\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2}$, fijando $\alpha=0.01$

$$t_{\frac{\alpha}{2}, n_1+n_2-2} = 2.8784$$

y como $t_c < t_{\text{tablas}}$, entonces podemos concluir que las pendientes no son significativamente diferentes.

Como las dos curvas parten del origen (ya que la ordenada de cada curva no es significativa), y las pendientes no son significativamente diferentes, podemos concluir que se trata de la misma curva. Por lo tanto, no hay diferencia significativa entre la producción de pirogalol con y sin *precultivo*