

1168024



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES  
CUAUTITLAN

EVALUACION DE PRODUCCION Y  
CARACTERIZACION DE UN BIOPOLIMERO  
NATURAL EN FERMENTACION EN LOTE  
EN UNA CEPA DE *Rhizobium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS  
(AREA: MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A:  
STELLA MARIS REGINENSI RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME KELLER TORRES

ASESORES DE TESIS:  
DR. JOAQUIN PALACIOS ALQUISIRA  
DRA. PATRICIA MARTINEZ PADILLA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **COMITÉ TUTORAL**

**DR. JAIME KELLER TORRES  
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN  
DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA  
DR. JOAQUIN PALACIOS ALQUISIRA  
DRA. LAURA PATRICIA MARTINEZ PADILLA**

## **SINODALES**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>DR. JAIME KELLER TORRES</b>
<b>PRIMER VOCAL</b>	<b>DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN</b>
<b>SEGUNDO VOCAL:</b>	<b>DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA</b>
<b>TERCER VOCAL:</b>	<b>DR. JOAQUIN ALQUISIRA</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>DRA. LAURA PATRICIA MARTINEZ PADILLA</b>
<b>PRIMER SUPLENTE:</b>	<b>DR. SERGIO JIMENEZ AMBRIZ</b>
<b>SEGUNDO SUPLENTE:</b>	<b>DRA ROSA MARIA NAVARRETE MAYA</b>

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA BAJO LA DIRECCION DEL DR JAIME KELLER TORRES DE LA COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EN EL LABORATORIO DE REOLOGIA DEL AREA DE INGENIERIA Y TECNOLOGIA, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA LAURA PATRICIA MARTINEZ PADILLA, EN LA FES-CUAUTITLAN EN EL LABORATORIO DE FISICOQUIMICA MACROMOLECULAR DE LA FACULTAD DE QUIMICA, BAJO LA DIRECCION DEL DR JOAQUIN PALACIOS ALQUINIRA Y EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA ENEP-IZTACALA CON EL APOYO DE LA QFB ROCIO CASTRO Y DEL CINVESTAV EN COLABORACION CON LA QFB ELVIRA RIOS

**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR:**

**PROYECTOS PADEP-DOCTORADO 100-302, 100-303.  
BECARIA DE DGAPA 1994-1996  
CATEDRA: RHIZOBIOLOGIA**

## **Dedicatoria**

**Esta tesis se la dedico con gran cariño a mis padres, a Coca y Chiche<sup>†</sup>, a mis hijos Jimi y Rodri, a Jorge quién constantemente me ha apoyado y motivado para la finalización de la tesis y sobretodo a México.**

## **Agradecimientos**

**A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, por mi preparación académica y por las facilidades brindadas**

**Al Dr. Jaime Keller por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por su amistad y apoyo profesional en todo momento permitieron la culminación de esta tesis, mil gracias.**

**Al Dr. Joaquín Palacios y la Dra. Patricia Martínez por su amistad e invaluable aporte de conocimientos y sugerencias en el área que lograron mejorar la presente tesis**

**Al Dr. Eliseo Hernández por su paciencia y comprensión, así como los buenos consejos, enseñanzas que me ha aportado durante la realización de mi posgrado**

**En especial a la Dra. Susana Mendoza por ser mi amiga durante tantos años y por su apoyo desinteresado en las diferentes etapas de este trabajo y también en parte de mi vida en México.**

**Al Dr. Abel Ciprián por permitir que pudiera concluir mi tesis Doctoral, gracias**

**Al pM C. Natahíel Soto, Br. Carlos Quezada, Rogelio M. y Rigoberto Nolasco por su gran amistad, comprensión y gran ayuda en los momentos que los necesitaba**

**Al M.C Ennque Angeles por su amistad, por sus consejos y recomendaciones profesionales en el área de química**

**Al M.C Juan Burguero por su invaluable asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados como también por su gran amistad**

**A las Q. F. B. Rocío Castro y Elvira Ríos por su desinteresada ayuda para poder finalizar los estudios en HPLC.**

**A la M.C Carolina Moreno por la amistad brindada y por su apoyo cuando era necesario.**

**A los técnicos Rodolfo Robles, Gabino Sánchez (Gabinete) e Ignacio por su amistad y apoyo en las partes fotográficas y bibliográficas de la tesis.**

**A Rosy, David y Minerva por su comprensión y amabilidad en los momentos requeridos.**

**A Dr. Adolfo Obaya por su amistad, comprensión y desinteresada colaboración**

**A todas aquellas personas que en este momento escapan de mi memoria, pero que de alguna manera u otra contribuyeron a la realización de esta tesis, GRACIAS.**

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue diseñar un medio de cultivo óptimo para la producción de exopolisacáridos liberados por *Rhizobium phaseoli* FES-C1 y la caracterización química y reológica de este biopolímero. Se aisló una cepa nativa desde nódulos de raíces de frijol y se seleccionó de acuerdo a sus características relacionadas con la producción de exopolisacárido. La optimización del medio de cultivo se desarrolló por medio de un diseño experimental en bloques incompletos con arreglo factorial de tratamientos de acuerdo a Box y Behnken (1960). Se evaluaron 3 niveles: (-1, 0, +1) para cada uno de los componentes: manitol (10, 20, 30 g/l) extracto de levadura (0,37, 0,75, 1,5 g/l), carbonato de calcio (0,15, 3 g/l) sulfato de magnesio (0,33, 0,67, 1,01 g/l), sulfato de aluminio (0,50, 100 µM/l), cloruro férrico (0,50, 100 µM/l) sulfato manganoso (0,200, 400 µM/l), biotina (0,10, 20 µg/l), penicilina (0,15, 3 mg/l). Se trabajó con matraces de 1000 ml con 300 ml de medio de cultivo, a pH inicial de 7, incubando a 30° C y a 200 rpm. La cinética de producción se prolongó por 10 días y se tomaron muestras en forma periódica, se centrifugaron a 17000 g por 30 min, varias veces hasta obtener un sobrenadante transparente. Se procedió a la precipitación del exopolisacárido y a la evaluación de producción mediante secado a 80° C por peso constante. Posteriormente a la optimización del medio de cultivo se procedió a evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono (manitol, sacarosa, glucosa) la variación del pH inicial (6, 7, 8) y la temperatura de incubación (30, 34°C) sobre la producción del polisacárido. La cinética a nivel de fermentador se desarrolló a partir de 8 l del medio de cultivo optimizado, agitado a 400 rpm, pH=8 regulado en forma automática, temperatura de 30°C, aereación de 1 VVM con una duración de 100 horas. En el fermentador se evaluó la sacarosa remanente en el medio de cultivo y se realizaron mediciones reológicas del fluido para determinar las curvas de flujo en un Reómetro Physica MC100 con geometría de cono y plato. En el exopolisacárido aislado y purificado se determinó la viscosidad intrínseca (viscosímetro capilar Ubbelohde) y se realizaron pruebas de flujo y viscoelásticas (Reómetro Physica MC 100 geometría cono y plato). En estas determinaciones se trabajó con concentraciones al 1% del polisacárido en soluciones, determinando el efecto de los cationes (manganeso, calcio y sodio) al 0,5% ,tratamiento térmico y la refrigeración sobre el comportamiento reológico y se comparó el polímero obtenido con dos gomas de xantana comerciales de uso industrial. La caracterización química se realizó para determinar la composición y peso molecular por diferentes metodologías como: espectroscopia infrarroja, cromatografía en capa fina y HPLC. Los resultados obtenidos en el periodo de optimización del medio de cultivo en matriz indicaron la importancia de la relación C/N sobre la producción del exopolisacárido logrando la máxima producción con 25 g/l de sacarosa y 0,76 g/l de extracto de levadura. Las relaciones elevadas entre estas dos fuentes favorecerían la producción del biopolímero. Los iones aportados al medio de cultivo presentaron efectos positivos en la producción de polisacárido como las sales de manganeso y de hierro, mientras que las de magnesio, potasio y calcio afectan esencialmente la producción de biomasa. La biotina y la penicilina mostraron efectos positivos en el rendimiento de polisacárido. La producción en el fermentador por 100 horas fue de 10,76 g/l y se constituyó en su mayor proporción por el polisacárido de alto peso molecular ( $\mu = 0,106 \text{ h}^{-1}$ ) con una producción máxima de biomasa de 3,1 g/l. La máxima producción celular coincide con la liberación del exopolisacárido de bajo peso molecular y probablemente se asocia a la muerte celular. La utilización de sacarosa para la producción de polisacárido estuvo relacionada con la biomasa instantánea más que con el crecimiento microbiano. La caracterización reológica en el medio de cultivo de fermentación demostró en las pruebas de flujo un aumento del índice de consistencia (K) a la vez que disminuye el índice de flujo (n) y el cambio es apreciable a partir de las 40 horas de crecimiento. El comportamiento es pseudoplástico reofluidizante, y al avanzar el tiempo de fermentación K aumenta hasta 10,1 Pa s<sup>n</sup> con un descenso de n hasta 0,19. La viscosidad intrínseca del polisacárido aislado y purificado fue de 3,730 dl/g. El tratamiento térmico a 96° C y 10 minutos de exposición produjo una marcada reducción de K (5,1 Pa s<sup>n</sup>) en relación al control no tratado (6,9 Pa s<sup>n</sup>). Los resultados de las pruebas viscoelásticas nos indican que los módulos elástico (G') y viscoso (G'') disminuyeron en relación al control (G'=38,43 Pa y G''= 13,90 Pa). El efecto de las sales en las pruebas de flujo condujo a una reducción de K, que fue dependiente del catión adicionado, obteniendo una reducción mayor con sales de Ca<sup>++</sup> (3,4 Pa s<sup>n</sup>), intermedia para



el  $Mg^{++}$  (6 Pa s<sup>2</sup>) y  $Mn^{++}$  (5.1 Pa s<sup>2</sup>), y mínima para el  $Na^+$  (6.4 Pa s<sup>2</sup>). Las pruebas viscoelásticas revelaron que la adición de iones conduce a una reducción de la dependencia de  $G'$  (tendiendo a un comportamiento de un sólido viscoelástico). Los estudios del efecto de la refrigeración en el biopolímero luego de un tratamiento térmico (los iones de sodio (6.62 Pa s<sup>2</sup>) y manganeso (5.76 Pa s<sup>2</sup>)) conducen a un aumento de  $K'$  en comparación al no refrigerado (6.4 Pa s<sup>2</sup> y 5.1 Pa s<sup>2</sup>, respectivamente). La variación de pH no interfirió en el comportamiento en las pruebas de flujo. La comparación del exopolisacárido obtenido en esta cepa bacteriana fue comparado con dos gomas de xantana comerciales mostrando valores promedio de  $K'$  de 6.9 Pa s<sup>2</sup> y  $d_n$  de 0.20 que superaron a las comerciales con las que se compararon. Las pruebas viscoelásticas indicaron un comportamiento del módulo viscoso típico de un material viscoelástico similar a un gel débil. Los resultados de la caracterización química por HPLC del polímero purificado indicaron la presencia de dos fracciones, una de alto peso molecular de 878000 d y otra de bajo peso molecular de 5200 d. Los estudios por HPLC y Cromatografía en Capa Fina de los productos de hidrolizado por ácido, mostró indica que el polisacárido de alto peso molecular está compuesto de glucosa, ácido glucurónico y galactosa, mientras que la fracción de bajo peso molecular se encuentra integrado por 15 a 17 unidades de glucosa. Los grupos sustituyentes son ácido pirúvico y acetilo, y los grupos reactivos por espectroscopia infrarroja indican como componentes importantes grupos de metilos y carboxilos. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que el exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* FES-C1 puede ser considerado como posible polímero alternativo a los comerciales dada sus propiedades viscoelásticas y su alta producción, en la medida que las cepas muestran alta producción.

## ABSTRACT

The main aim of this work was to design a formulation for the production of exopolysaccharide from *Rhizobium phaseoli* FES-C1, and the chemical and rheological characterization of this biopolymer. The optimization of the reaction was reached by a factorial experimental design. The kinetic study was followed in a fermentator on the optimized formulation. The intrinsic viscosity of dilute solution plus viscoelastic behavior of the biopolymer is reported here. Chemical characterization was obtained by IR, HPLC, TLC. The in vitro results shown the importance of the relation C/N upon the production of the exopolysaccharide. The best production is reported as 16 g/l with 25 g/l of saccharose and 0.76 g/l of yeast. The rheological test on the fermentation product indicated an increase in the consistency, K parameter, at the same time the flux index (n) decreases, in this case the difference was evident after 40 hr. of reaction. The intrinsic viscosity of purified polymer was 3730 dl/g. The values of the elastic module  $G'$  y viscous module  $G''$  decrease when compare with the controls. The reduction in the K values is dependent on the specific cation added to the polymeric solution. The presence of salt in the biopolymer solution causes or reduction on the  $G'$  dependence and viscoelastic behavior was reported. Our rheological study included to xanthan commercial gums. The exopolysaccharide shown one high molecular weight fraction  $87.4 \times 10^4$  D and second fractions of molecular weight  $0.5 \times 10^4$  D. The composition of the high molecular weight fractions of the polymeric material is composed of: glucose, glucouronic acid and galactose. 15 to 17 glucose units form the low molecular weight fractions. Purvic acid, acetyl and methyl groups were identified by IR spectroscopy and HPLC.

## INDICE

Resumen	I
1) Introduccion	1
2) Revision Bibliografica	3
2 1 Polisacandos bacterianos	3
2 2 Seleccion y mantenimiento de microorganismos	7
2 3 Produccion de polisacandos en el genero <i>Rhizobium</i>	11
2 3 1 Polisacando capsular	12
2 3 2 $\beta$ -1-2-glicanos	16
2 3 3 Polisacandos anionicos solubles de alto peso molecular	20
2 4 Biosintesis del exopolisacando	27
2 5 Caracteristicas reologicas de los polisacandos	33
3) Objetivos del trabajo	36
4) Materiales y metodos	37
4 1 Microorganismo	37
4 2 Optimizacion del medio de cultivo y condiciones de cultivo en matraz	38
4 3 Estudio de la produccion del exopolisacando en fermentador	40
4 4 Caracterizacion reologica del medio de cultivo y del exopolisacando	42
4 5 Caracterizacion quimica	44
4 5 1 Aislamiento y purificacion del polisacando	44
4 5 2 Analisis del exopolisacando por cromatografia de capa fina	45
4 5 3 Extraccion de las diferentes fracciones en el medio de cultivo por HPLC	46
4 5 4 Estudio de la composicion monosacarido de las diferentes fracciones por HPLC	46
4 5 5 Determinacion de la temperatura de degradacion	47
5) Resultados y discusion	48
5 1 Produccion de exopolisacandos en fermentacion en lote	48
5 1 1 Optimizacion del medio de cultivo en matraz	48
5 1 1 1 Efecto de los nutrientes en el medio	48
5 1 1 2 Efecto del pH inicial del medio	62
5 1 1 3 Efecto de la fuente de carbono y nitrogeno utilizada	63
5 1 1 4 Efecto de la temperatura del cultivo	64
5 1 1 5 Produccion de exopolisacandos en matraz con el medio optimizado	65
5 1 2 Produccion de exopolisacando en el fermentador	69

5.2. Caracterización reológica del exopolisacárido proveniente de la cepa de <i>Rhizobium phaseoli</i> FES-C1	74
5.2.1 Determinación de la viscosidad intrínseca	74
5.2.2 Determinación de curvas de flujo en el medio de cultivo en el transcurso de la fermentación	80
5.2.3 Efecto del tratamiento térmico y diferentes sales en el comportamiento reológico del exopolisacárido	85
5.2.3.1 Efecto del tratamiento térmico	85
5.2.3.1.1 Pruebas de flujo	85
5.2.3.1.2 Pruebas viscoelásticas	88
5.2.3.2 Efecto de la adición de sales	91
5.2.3.2.1 Pruebas de flujo	91
5.2.3.2.2 Pruebas viscoelásticas	95
5.2.4 Determinación de los índices de consistencia y de flujo a diferente pH	103
5.2.4.1 Pruebas de flujo	103
5.2.5 Comparación del polisacárido de <i>R. phaseoli</i> con soluciones de xantanas comerciales	103
5.2.5.1 Pruebas de flujo	103
5.2.5.2 Pruebas viscoelásticas	106
5.3. Caracterización química del exopolisacárido proveniente de la cepa de <i>Rhizobium phaseoli</i> FES-C1	109
5.3.1. Aislamiento y purificación del biopolímero	109
5.3.2. Estudio de la estabilidad del exopolisacárido al calor	109
5.3.3. Espectroscopia infrarroja	110
5.3.4. Determinación del peso molecular del exopolisacárido por HPLC	110
5.3.5. Estudio de los componentes químicos del polisacárido	118
5.3.6. Estudio del exopolisacárido por HPLC	123
5.3.7. Estudio por RMNH	126
6) Conclusiones	129
7) Referencias	136

## 1) INTRODUCCION.

Los polisacáridos son polímeros de importancia por sus aplicaciones en la industria alimentaria, química, médica, de tratamiento de residuos y del petróleo. El papel que juegan estos polímeros en los sistemas biológicos y en la naturaleza hacen evidente que los polisacáridos poseen propiedades químicas y físicas particulares que les proveen de una amplia variedad de funciones (Sinskey *et al.*, 1986)

La habilidad de los polisacáridos para disolverse o dispersarse en agua, conducen a un cambio sustancial en el ambiente acuoso y unido a su baja toxicidad es responsable de la mayoría de sus usos como hidrocoloides en las industrias alimentaria y de la salud. Estos hidrocoloides son normalmente espesantes y viscosantes. Estas propiedades funcionales, que de hecho son efectos reológicos, son condicionados principalmente por la estructura molecular del polisacárido (Sinskey *et al.*, 1986)

El origen de estas gomas de uso industrial es normalmente de plantas o de microorganismos. Estos polisacáridos interactúan con moléculas de naturaleza química variada dependiendo de las materias primas utilizadas en la fabricación de diferentes productos (Whistler, 1993)

De acuerdo a su origen las gomas pueden ser clasificadas como: 1) naturales, 2) modificadas o semisintéticas y 3) sintéticas. Las *gomas naturales* pueden provenir de exudados de árboles (arábigo, tragacanto), extractos de plantas (pectinas), extractos de semillas (guar, algarrobo), algas marinas (agar, alginatos, carragenina), almidones de cereales (maíz, sorgo), almidones de tubérculos (papa, tapioca), almidones animales (glucógeno), proteínas animales (gelatina, caseína), proteínas vegetales (soya) y gomas

microbianas (dextrana, xantana) Dentro de las *gomas modificadas* o *semisintéticas* se encuentran los derivados de celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa), almidones (dextrinas, acetatos de almidón) y otros (metoxipectinas, alginato de propilenglicol) Entre las *gomas sintéticas* se encuentran los derivados de petroquímicos tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, policarboxivinil, sales del ácido poliacrílico, polímeros de óxido de etileno (Galindo, 1985)

Los polisacáridos de origen microbiano constituyen en la actualidad una fracción pequeña del mercado de biopolímeros, pero ofrece un amplio potencial de desarrollo de productos nuevos o mejorados con la aplicación adecuada de tecnologías de ingeniería genética (Sinskey *et al.*, 1986) Una gran variedad de gomas de uso industrial son productos del crecimiento bacteriano (dextranas, alginatos, curdlan, pullulanas, quitosanos y xantana) y tienen la potencialidad de poder obtenerse a bajo costo (Whistler, 1993) La industria alimentaria constituye un usuario dinámico de estos productos y normalmente se enfrenta a la necesidad de nuevas características organolépticas particulares para satisfacer los requerimientos del consumidor. Estos polisacáridos además de producir geles o actuar como estabilizadores de emulsiones, pueden ser floculantes, formadores de películas, lubricantes y reductores de fricción (Sandford y Baird, 1983) Los polisacáridos de interés comercial son utilizados para modificar y controlar las propiedades reológicas de sistemas acuosos. Entre otros usos potenciales de estos polisacáridos se han propuesto como materiales matrices para técnicas de separación, cromatografía e inmovilización de enzimas (Mittal, 1992)

## **2) REVISION BIBLIOGRAFICA.**

La investigación sobre la producción de polisacáridos microbianos extracelulares comenzó alrededor de 1940 con el desarrollo de las dextranas para su uso en plasma sanguíneo y fue ampliamente estimulado por los trabajos de producción de xantana alrededor de 1950. Desde ese entonces muchos grupos y compañías se han involucrado en programas de búsqueda y desarrollo de microorganismos capaces de producir exopolisacáridos, pero hasta el momento actual los dos primeros polímeros desarrollados son todavía en muchos aspectos los más exitosos. Los polisacáridos microbianos aún no suplantán a las fuentes tradicionales provenientes de plantas o algas, pero están establecidas en el mercado (McNeil y Harvey 1993).

### **2.1. POLISACARIDOS BACTERIANOS**

Los microorganismos producen polisacáridos como componentes de su estructura de pared y también, en muchos casos, como macromoléculas extracelulares. La habilidad de los microorganismos para producir exopolisacáridos se desarrolla como respuesta directa a las presiones selectivas del ambiente (Dudman, 1977). La mayoría de las funciones que se le asignan a estos polisacáridos se relacionan a medios de protección del microorganismo (Whitfield, 1988). La distinción entre polisacáridos de pared y extracelulares puede ser solamente aproximada. Muchos de los polímeros de pared pueden ser excretados o separarse de la superficie celular a medida que la edad del cultivo aumenta.

Los polisacáridos microbianos extracelulares o exopolisacáridos pueden presentar, desde el punto de vista de su estructura química, diversos grados de complejidad. Este rango incluye homopolisacáridos con uno o más tipos de uniones glucosídicas hasta heteropolisacáridos conteniendo diferentes monosacáridos y tipos de uniones entre los mismos. En forma adicional vanos grupos acilos pueden estar presentes en la estructura, en particular grupos O-acetilos y piruvato que se asocian a los azúcares neutros del polisacárido y raramente a los ácidos urónicos (Sutherland, 1979).

Desde un punto de vista práctico, los estudios de interés industrial se concentran principalmente en aquellos polisacáridos que se liberan desde la célula bacteriana hacia el medio de cultivo líquido. Solo este tipo de productos pueden ser obtenidos con rendimientos suficientemente altos para ser considerados por la producción industrial. Sin embargo, existe un amplio sector de la bibliografía que describe los polisacáridos que 1) pueden ser extraídos de los complejos de pared celular no mucosa de la célula bacteriana, por medio de tratamientos químicos o enzimáticos o 2) pueden presentarse como discretas capsulas que rodean la célula (Sodki y Cadmus, 1978). Los polisacáridos extracelulares aparecen formando una capsula íntimamente asociada a la superficie celular por medio de enlaces o como polisacáridos pobremente asociados con la superficie celular que se liberan al medio circundante. Las diferencias entre los dos son frecuentemente operacionales y definidas por el grado de asociación posterior a un proceso de centrifugación. La diferenciación entre ambas formas puede ser difícil, desde que las células que producen altas cantidades de polisacárido capsular pueden liberar algo de material hacia la periferia, dando la impresión de una producción hacia el medio circundante. Se conocen mutaciones de organismos productores de polisacáridos capsulares que transforman su producción en exopolisacáridos liberados al medio. La mayoría de las bacterias muestran preferencias hacia una u otra



forma de polisacárido extracelular, aunque algunas cepas de *Klebsiella* sp. pueden producir polisacáridos idénticos en las dos formas. Varias bacterias incluyendo *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp. y *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* son capaces de sintetizar más de un exopolímero químicamente distinto (Sutherland, 1985, Whitfield, 1988).

Frecuentemente, dependiendo de las condiciones de crecimiento, pequeñas cantidades de este material capsular es encontrado libre en el medio de cultivo. Estos materiales capsulares o unidos a la pared celular pueden contener cantidades importantes de péptidos unidos covalentemente, mientras que los exopolisacáridos formados y liberados al medio de cultivo pueden ser obtenidos virtualmente libres de proteínas por procedimientos sencillos de purificación. En base a esto, algunos autores han especulado que la ausencia de péptidos covalentemente unidos a los polisacáridos es una condicionante de la presencia de los exopolisacáridos en el medio de cultivo más que formando parte de la envoltura capsular (Slodki y Cadmus, 1978). Esto parece ser apoyado por otros trabajos en que se han encontrado similitudes entre los polisacáridos capsulares y los exopolisacáridos. Dudman (1976, 1978) trabajando con 10 cepas de *Rhizobium japonicum* analizó polisacáridos capsulares y exopolisacáridos producido en el medio, encontrando en 5 de ellas composiciones similares entre ambos polisacáridos. Mort y Bauer (1980) trabajando con dos cepas *R. japonicum* encontraron composiciones similares entre ambos tipos de polisacáridos producidos por estas cepas en medios líquidos.

La presencia de EPS asociados con el crecimiento de las células microbianas sobre medios de cultivo sólidos es frecuentemente reconocido en la morfología mucóide de la colonia. En medios de cultivo líquidos su producción conduce a un aumento de la viscosidad y algunas veces tiende a comportarse como un gel (Sutherland, 1990). Los exopolisacáridos

bacterianos son usados ampliamente como agentes espesantes y gelificantes en un amplio rango de procesos y productos industriales (Kang y Cottrell, 1979), pero las cepas utilizadas para la producción industrial de gomas pertenecen a un número sorprendentemente pequeño de bacterias, tales como *Agrobacterium radiobacter*, *Rhizobium* spp., *Xanthomonas campestris*, *Bacillus* spp., *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* (Whitefield, 1988). Varios de estas especies son capaces de sintetizar más de un tipo de polisacáridos (Sutherland, 1985).

Los exopolisacáridos son compuestos de carbohidratos, los cuales pueden presentar sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Los carbohidratos de los exopolisacáridos microbianos son extremadamente diversos. Frecuentemente se encuentran como componentes principales D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en las formas piranosas, como 6-deoxyhexosas, L-fucosa y L-ramnosa. En las células eucarióticas los PLS pueden contener pentosas tales como D-ribosa o D-xilosa, son de menor importancia en las células procarionóticas (las cianobacterias son la excepción). Aminoazúcares están presentes en especies de *Escherichia coli*, mientras que son ausentes para especies de *Xanthomonas* o *Klebsiella*. Los aminoazúcares más comunes son N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. La presencia de ácidos urónicos, como D-glucurónico o D-galacturónico, son comunes en especies de *Rhizobium*. Bacterias anaerobias como *Butyrivibrio fibrisolvens* presentan ácido L-idurónico. Otro azúcar inusual hallado en los exopolisacáridos es el ácido cetodeoxioctanoico (KDO) (Sutherland, 1990).

Los exopolisacáridos bacterianos pueden ser heteropolisacáridos y algunos homopolisacáridos generalmente están compuestos de estructuras repetitivas y la mayoría

son aniónicos. En el Cuadro 1 se presentan algunos polisacáridos de origen microbiano indicando la especie que lo produce.

Cuadro 1 Producción de polisacáridos extracelulares por diferentes microorganismos y sus posibilidades industriales

TIPO	ORIGEN MICROBIANO	COMERCIALIZACION	
		actual	propuesta
<b>Neutros</b>			
Dextrinas	<i>Leuconostoc spp</i>	+	
Escleroglucanos	<i>Sclerotium spp</i>	+	
Curdian	<i>Agrobacterium spp</i>		+
	<i>Alcaligenes faecalis</i>		
Pululan	<i>Aureobasidium pullulans</i>		+
Levadura de cerveza	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		+
<b>Aniónicos</b>			
Xantana	<i>Xantomonas campestris</i>	+	
PS-7	<i>Azotobacter indicus</i>	+	
ZANFLO -*10	bacterias del suelo	+	
ZANFLO -*21	bacterias del suelo		+
Alginato bacteriano	<i>Azotobacter vinelandii</i>		+

Sandford (1979)

## 2.2. SELECCION Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Desde el punto de vista de la producción industrial de gomas por medios microbianos, se debe lograr que el producto obtenido cumpla con los siguientes requisitos mínimos: 1) disolverse rápidamente en agua, 2) mantener constantes las mejores propiedades funcionales que presentan las gomas tradicionales y 3) obtenerse en una forma abundante partiendo de una base microbiana estable. Las gomas tradicionales de origen vegetal pueden sufrir pérdidas en la reproducibilidad de sus propiedades, variaciones en el grado de

pureza, presentar cambios en la producción obtenida y en el suministro a los mercados por efectos climáticos y en los costos del producto, mientras que las de origen microbiano pueden ser producidas bajo condiciones controladas que eviten estas deficiencias (Sandford, 1979)

Un microorganismo puede presentar interés industrial cuando sus productos disponen de características apropiadas. Por lo tanto, en una etapa inicial se debe disponer de información por medio de relevamientos de una serie de microorganismos, evaluando su capacidad de producción, características de composición química y propiedades reológicas del producto (Galindo, 1985). La fuente de microorganismos útiles con estos fines es principalmente el suelo y otros nichos naturales. En esta búsqueda es frecuentemente posible emplear condiciones inusuales o extremas como agente selectivo para obtener microorganismos con habilidades especiales. Los principios empleados para aislamiento es por medio del uso de caldos de cultivo enriquecidos y/o en presencia de inhibidores de posibles contaminantes. Los requerimientos nutricionales conocidos o sospechados del material colectado y las características fisiológicas del microorganismo dictan los procedimientos a utilizar (Kidby, 1977).

En el caso de la selección por organismos productores de polisacáridos puede ser importante las características mucoides de la colonia. Los procedimientos selectivos pueden basarse en la explotación de alguna característica específica del polisacárido deseado o por medios indirectos a través de otras propiedades asociadas de la característica de interés. Torrestiana *et al.* (1990) utilizaron diferentes características como los atributos morfológicos del cultivo en placas de agar, el contenido de ácido pirúvico en el exopolisacárido y la resistencia a antibióticos para correlacionar con características de importancia como

producción de goma y habilidad espesante de xantana. Trabajaron con 7 aislamientos y una cepa de colección de *Xantomonas campestris*, estudiando las características mucoides de las colonias por medio de evaluación visual. No encontraron correlaciones entre el grado mucoso del cultivo con la producción de goma ( $r^2=0.1$ ). Sandford *et al.* (1977) plantearon que la concentración de piruvato en la goma producida puede ser un indicador adecuado de la calidad del producto. Sin embargo, las Ramírez *et al.* (1988) y Torrestiana *et al.* (1990) consideran esta forma indirecta como inadecuada por sus bajas correlaciones con la habilidad espesante ( $r^2=0.50$ ). En cambio, el comportamiento de resistencia a antibióticos, particularmente penicilina ( $r^2=0.80$ ) y ampicilina ( $r^2=0.72$ ) pueden ser índices muy precisos en la evaluación preliminar de la calidad de goma producida por diferentes cepas o aislamientos.

En el caso específico de los polisacáridos microbianos los procedimientos para la evaluación de producción, sus características químicas y propiedades reológicas requieren del aislamiento del producto. Los procedimientos de aislamiento del polisacárido dependen del organismo que lo produce, de tipo de polisacárido producido y del grado de pureza requerido. Cuando se requieren productos con bajo grado de pureza pueden ser obtenidos por secado del caldo de cultivo. Otros métodos de separación del exopolisacárido pueden utilizar la centrifugación y el filtrado, que normalmente son utilizados cuando el caldo presenta una baja viscosidad. Con mayor grado de viscosidad se utiliza normalmente la centrifugación y precipitación del biopolímero por medio de diferentes solventes (isopropanol, acetona, metanol o etanol). Esta última forma de separación es normalmente usada a nivel industrial para obtener el polímero concentrado (Sutherland, 1982; Sandford, 1979; Vashitz y Sheintuch, 1990). El isopropanol es el alcohol más usado, principalmente debido a su relativa facilidad de recuperación y su aceptación en productos de grado alimenticio. La

recuperación del solvente utilizado juega un papel fundamental en los costos del proceso industrial (Galindo, 1985)

A nivel industrial, deben considerarse otros aspectos adicionales posteriores a la fermentación que deben considerar uno o más de los siguientes puntos 1) concentración del caldo o extracto de fermentación a una forma, usualmente sólida, que es microbiológicamente estable, fácil de manejar, transportar y almacenar, y que pueda volverse a disolver o diluir para una aplicación, 2) la purificación reduce el nivel de sólidos no poliméricos, tales como células o sales, y mejora el comportamiento funcional, color olor o sabor del producto, 3) desactivación de enzimas contaminantes indeseables, tales como celulasas, pectinasas etc. y 4) modificación de las propiedades químicas del polímero para alterar las propiedades funcionales, las propiedades de manejo del producto seco o la tasa de dispersión y solución del polímero (Smith y Pace, 1982)

Posteriormente a la detección de los materiales de interés es necesario el mantenimiento de las cepas con las características originalmente encontradas. La pérdida de las características deseadas de un microorganismo pueden deberse a que : 1) los microorganismos son inherentemente inestables y 2) no existe ningún método para la completa preservación del genotipo. La inestabilidad de las cepas se debe a que todas las regiones de información genética pueden ser mutables, aunque algunas regiones del gen tienen mayores probabilidades de presentar una mutación. Evans *et al* (1979) plantea que mantener cultivos en medios mínimos permite disminuir la variabilidad genética de una población microbiana. Dentro de los métodos actuales la liofilización parece ser el método más adecuado para mantener cepas por períodos prolongados (Galindo, 1985). Las razones para la elección de este método se basa en que ha sido utilizado con éxito en la preservación por largos

periodos, el producto liofilizado tiene una apariencia adecuada, se evitan daños por la concentración de solutos de un medio líquido, lo cual conduce a considerarlo ventajoso por evitar daños en el proceso de secado por este método (Kidby, 1977)

Se utilizan diferentes métodos para reconocer la aparición de mutantes en el cultivo, los cuales pueden presentar variadas características en relación a la producción, composición y comportamiento reológico del polisacárido. En cepas de *Rhizobium* la utilización de cultivos de agar-rojo Congo ha sido recomendada (Kneen y La Rue, 1983). Bajo estas condiciones de cultivo las colonias que se desarrollan pueden presentar variaciones morfológicas o propiedades de tinción que se desvían del comportamiento de las cepas parentales. En *Rhizobium lotii* TA1, se presentan mutantes espontáneos (TA1-1 y TA1-R) cuya frecuencia es baja y su tinción con el colorante le transfiere un color rojo oscuro bajo estas condiciones de cultivo. La colonia nativa no presenta coloración en este medio. La presencia de estos tipos de mutaciones se vuelve más común cuando la cepa ha sido sometida a periodos prolongados de crecimiento en quimiostato. El crecimiento de estas diferentes cepas en cultivos líquidos permitieron detectar diferencias en la síntesis de polisacárido (Zevenhuizen, 1984). Otros autores (Ghai *et al.*, 1981) han utilizado agar-azul de anilina para diferenciar colonias mutantes en *R. lotii* J60V.

### **2.3. PRODUCCION DE POLISACARIDOS EN EL GENERO *RHIZOBIUM*.**

La mayoría de los taxa que son habitantes del suelo o se asocian con plantas por sus características diazotróficas, son capaces de producir exopolisacáridos. La habilidad de estas especies para fijar nitrógeno *in vitro* o en asociación con plantas, está relacionado a su

habilidad de producir cantidades importantes de polisacáridos. Esta habilidad ha sido demostrada en rizobacterias que forman colonias lisas y mucoides que presentan alta capacidad de fijar nitrógeno, respecto a aquellas con colonias rugosas y no mucoides que no lo fijan. La explicación se asocia a que la enzima nitrogenasa es sensible al oxígeno y los polisacáridos extracelulares actúan contra la difusión del mismo, condicionando bajas  $pO_2$  que son óptimas para crecimiento bacteriano y la fijación de nitrógeno (Hebbar *et al.*, 1992). La especificidad de la relación simbiótica entre una especie particular de *Rhizobium* con una leguminosa determinada es por el reconocimiento por parte de las lectinas (glicoproteínas) secretados por la planta y el polisacárido particular de la superficie celular del *Rhizobium* que interviene en la simbiosis (Dudman, 1977; Whitfield, 1988).

La familia *Rhizobiaceae* es notable por los patrones complejos de producción de polisacáridos, en la forma de un exopolisacárido extracelular viscoso, polisacárido capsular insoluble,  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos y unidades estructurales (octasacáridos) aisladas que por unión posterior forman las cadenas de EPS (Zevenhuizen, 1986). Las diferentes especies del género *Rhizobium*, particularmente aquellas de crecimiento rápido, producen 3 tipos diferentes de exopolisacáridos: 1) polisacárido capsular neutro e insoluble, 2)  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos y 3) Exopolisacárido (EPS) de alto peso molecular.

### **2.3.1. Polisacárido capsular.**

Un polisacárido neutro e insoluble es producido a nivel capsular (PSC), el cual es depositado en forma masiva alrededor de la célula bacteriana. En algunos casos, se ha reportado la formación de microfibrillas celulósicas en *Rhizobium* (Zevenhuizen *et al.*, 1986). La producción de polisacáridos capsulares es una característica común de muchas bacterias.



Estas estructuras juegan un papel particularmente importante en la interacción de la bacteria con su medio ambiente (Boulinois y Jann, 1989) Cuando se realiza la centrifugación de un medio de cultivo de *Rhizobium* luego de varios días de crecimiento, los paquetes celulares formados contienen una alta proporción de carbohidratos Estas concentraciones son particularmente altas cuando el medio de crecimiento dispone de niveles elevados de una fuente de carbono El análisis de estos carbohidratos demuestran la presencia de glucógeno, poli- $\beta$ -hidroxibutirato y  $\beta$ -1-2-glicanos extraídos en alcohol (Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979, Zevenhuizen, 1981) En algunas circunstancias, en cultivos en fase estacionaria, se encuentra una masa capsular con material adherido que no es utilizado como fuente de carbono y puede ser extraído del paquete celular con NaOH normal o con agua caliente Los componentes de esta fracción detectados en *Rhizobium trifolii* TA-1 son D-manosa D-galactosa D-glucosa en proporciones molares 1:4:1 (Zevenhuizen y Van Neerven, 1983b)

Zevenhuizen (1984) estudió la producción de diferentes polisacáridos en el curso de las diferentes fases del cultivo en *R. trifolii* TA-1. La producción de PSC comienza al final de la fase logarítmica de crecimiento, alrededor del tercer día, con un descenso simultáneo del contenido de glucógeno La extensión de la síntesis de PSC es dependiente de la presencia de una fuente disponible de carbono En el medio de cultivo con 5 g de manitol/l, la producción de polisacárido capsular fue de 0.5 g/l de cultivo al sexto día de crecimiento y con 10 g manitol/l la producción alcanzó 1.5 g PSC/l en 10 días de crecimiento cuando la fuente de carbono externa fue totalmente utilizada En esta etapa, el glucógeno y poli- $\beta$ -hidroxibutirato funcionan como reservas y son utilizadas en la producción Estas fuentes de reserva se acumulan al final de la fase logarítmica de crecimiento y son utilizadas en la fase estacionaria cuando las reservas de carbono del medio se van agotando Otro de los

productos que se acumula en la fase exponencial es el  $\beta$ -1-2-glucano. Esta molécula no es usada como fuente de carbono, pero gradualmente se va liberando al medio de cultivo durante la fase estacionaria (Zevenhuizen, 1984).

Algunas cepas presentan mutaciones que afectan el tipo de exopolisacárido producido. Ghai *et al.* (1981) trabajaron con la cepa J60W de *R. tnfalii*, que al ser cultivada en medio sólido con azul de anilina presentaron colonias atípicas azules en una proporción de 1/380. Las restantes colonias presentaron el comportamiento normal con una coloración blanca en este medio que corresponde a la cepa J60W. Las cepas de coloración azul fueron purificadas por aislamiento y se denominaron J60B1 y J60B2. Estas cepas mutaron espontáneamente debido a las condiciones de almacenamiento prolongado (2 meses) en medio sólido de agar-manitol. La tinción azul de la cepa en el medio con azul de anilina y el análisis posterior del polisacárido obtenido en la cepa J60B1 permitió determinar por primera vez en *Rhizobium* la producción de curdlan, similar al obtenido en *Alicyogenes faecalis* var. *myxogenes*.

Ghai *et al.* (1981) reportan en forma adicional la producción de exopolisacáridos capsulares insolubles en diferentes cepas de *R. meliloti*, *R. tnfalii* y *R. japonicum*, logrando concentraciones entre 0.2 y 0.9 g/l de medio de cultivo precipitado, aunque en *R. tnfalii* mutantes (J60B1 y J60B2) la producción de polisacárido capsular fue de 1.2 g/l de medio de cultivo precipitado.

Los poli- $\beta$ -hidroxibutiratos (PBH) constituyen otro de los polisacáridos producidos por *Rhizobium* que han despertado el interés científico y tecnológico. Los PBH están involucrados en el aporte de energía en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Este polisacárido se acumula en el bacterioide llegando a

representar el 50% del peso celular y tienen un papel regulador de la actividad de la nitrogenasa (Wong y Evans, 1971) Desde el punto de vista industrial el interés se concentra en la posibilidad de utilizarlos en la producción de materiales termoplásticos biodegradables La atención actual a la contaminación causada por plásticos descartables de la industria petroquímica han dado un gran impulso a la investigación en PBH en estas bacterias (Anderson y Dawes, 1990) Estudios en *R. meliloti* indicaron la presencia de copolímeros constituidos por 3-hidroxi-butarato que contenían un 22% molar de 3-hidroxi-valerato que bajo diferentes condiciones de crecimiento pueden representar hasta el 58% del peso celular obtenido del cultivo bacteriano (Tombolini y Nuti, 1989)

En algunas cepas de *Rhizobium* se ha establecido una clara relación entre el polisacárido capsular y el exopolisacárido liberado al medio Mort y Bauer (1980) trabajando con dos cepas de *Rhizobium japonicum* (311b-138 y 311b-110) encontraron una estrecha similitud en la composición de ambos exopolisacáridos El análisis de los exopolisacáridos reveló la presencia de glucosa, manosa, ácido galacturónico, galactosa y un azúcar desconocido que posteriormente fue identificado como 4-O-metil-galactosa La proporción de glucosa, manosa y ácido galacturónico fueron de 2:1:1, con menos de una mol de galactosa y 4-O-metil-galactosa En forma adicional, el polisacárido contenía dos grupos acetilos por cada una de estas unidades pentasacáridas No se encontraron evidencias de la presencia de ácido pirúvico que es comúnmente reportado en otros polisacáridos de *Rhizobium* En forma adicional se encontró la presencia de 2% de proteína en el polisacárido capsular/EPS

Dudman (1976, 1978) estudió 10 cepas de *R. japonicum*, cinco de las cuales presentaron composiciones similares entre los dos tipos de polisacáridos Las cepas restantes presentaron composiciones diferentes Por lo tanto, estos trabajos permiten concluir que en

algunas cepas de *R japonicum* el polisacárido liberado al medio de cultivo proviene del exopolisacárido capsular a través de una pérdida mecánica o por la acción enzimática (Mort y Bauer, 1980). La composición del exopolisacárido capsular puede variar en las diferentes fases del cultivo y por lo tanto el exopolisacárido del medio refleja un promedio de estos cambios. Por esta razón, normalmente se detectan pequeñas diferencias en la composición de ambos polisacáridos (Mort y Bauer, 1980).

### 2.3.2. $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos.

Los  $\beta$ -1-2-glicanos son moléculas únicas que se presentan en la familia *Rhizobiaceae* que son acumulados a nivel celular y posteriormente podrían ser liberados de alguna forma hacia el medio de cultivo (Zevenhuizen, 1986). Bajo ciertas condiciones de cultivo entre un 5 al 20% del peso celular producido corresponde a  $\beta$ -glicanos cíclicos. Estas moléculas están constituidas por glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1-2-glucosídicos y el grado de polimerización puede ser variable entre 17 y 40 glucosas en cepas de *Rhizobium meliloti*.

La localización de los glicanos cíclicos es en la zona periplásmica (Abe *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1986) aunque cantidades importantes de los mismos han sido aislados del medio de cultivo (Arémura *et al.*, 1983; Batley *et al.*, 1987; York *et al.*, 1980; Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979). No es conocido si los glicanos cíclicos son excretados al medio por mecanismos específicos o simplemente son lavados hacia el mismo durante la fase estacionaria. Sin embargo, se conoce que determinadas mutaciones (locus *ndvA*) interfieren en la normal nodulación al evitar la excreción de glicanos cíclicos (Stanfield *et al.*, 1988), apoyando la hipótesis de que el proceso de excreción es específico y funcionalmente

importante. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de la existencia de transporte activo, dado que en *Rhizobium meliloti* se aisló una proteína involucrada en la exportación de  $\beta$ -1-2-glicanos (Stanfield *et al.*, 1988). Las cantidades totales de  $\beta$ -1-2-glicanos producidos, así como las cantidades excretadas hacia el medio, son altamente dependientes de la especie bacteriana utilizada y de la composición del medio de cultivo. La detección de altos niveles de  $\beta$ -glicanos extracelulares se encuentran normalmente asociados a la fase estacionaria del cultivo. La composición del medio de cultivo ejerce un papel decisivo en la excreción de este exopolisacárido al mismo y a altas temperaturas de incubación (Breedveld y Miller, 1994).

La regulación de la síntesis de este polisacárido durante la fase de crecimiento parece estar asociada a condiciones de baja osmolaridad en el periplasma (Coronado *et al.*, 1996). Este mecanismo fue primeramente reportado en *Agrobacterium tumefaciens* y se propuso que puede actuar como mecanismo de adaptación hipo-osmótica. En estudios realizados con diferentes cepas mutantes de *Rhizobium* y *Agrobacterium* que son deficientes en la producción de  $\beta$ -glicanos presentan una marcada disminución de crecimiento en medio hipo-osmótico.

No se conocen bien las funciones que cumplen los  $\beta$ -glicanos cíclicos a nivel celular, pero pueden intervenir en el volumen periplásmico bacteriano, la fuerza osmótica periplásmica y la presión ejercida sobre la membrana citoplasmática. En mutantes deficientes en la producción de  $\beta$ -glicanos se han detectado una serie de alteraciones en las propiedades superficiales de la célula. Entre estas se pueden mencionar la pérdida de motilidad con reducido número de flagelos, la mayor resistencia a bacteriófagos, un aumento en la sensibilidad a antibióticos, aumento en la producción de EPS extracelular y modificaciones

en la composición proteica de las envolturas celulares (Breedveld *et al.*, 1995, Batley *et al.*, 1987). El papel que juegan estos compuestos se asemejan a los que cumplen los oligosacáridos de membrana de *Escherichia coli* durante la adaptación hipotónica (Kennedy y Rumley, 1988; Miller *et al.*, 1986). Por otra parte, se ha sugerido que los  $\beta$ -1-2-glicanos pueden ser de importancia durante el proceso de infección de los pelos radiculares de la leguminosa huésped. Mutantes de *R. meliloti* incapaces de formar  $\beta$ -1-2-glicanos indujeron solo la presencia de pseudonódulos en alfalfa (Geremia *et al.*, 1987).

Durante las primeras etapas de estudio de los  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, se consideraba que estas moléculas no presentaban sustituyentes. Estudios posteriores revelaron la presencia de  $\beta$ -1-2-glicanos sustituidos con residuos *sn*-1-fosfoglicerol (Batley *et al.*, 1987; Miller *et al.* 1987) y ácido metilmalónico ó *O*-succinil-ésteres (Miller *et al.*, 1988). Una gran proporción de los glicanos presentes en *R. meliloti* y *A. tumefaciens* (50-90%) contiene entre uno y cuatro sustituyentes *sn*-1-fosfoglicerol por cada glicano (Miller *et al.*, 1987, 1988). El proceso de sustitución puede ser influido por la etapa de crecimiento del cultivo. Geiger *et al.* (1991) estudiaron el proceso de formación de los  $\beta$ -1-2-glicanos en *Rhizobium meliloti* 1021 a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento. Este estudio indicó que en las etapas iniciales del crecimiento celular la mayoría de los  $\beta$ -1-2-glicanos presentes eran neutros y posteriormente su extracción disminuía por conversión a sustituyentes aniónicos. Los resultados de este trabajo permiten concluir que la fracción neutra de  $\beta$ -1-2-glicanos es precursor de las fracciones aniónicas y que existe una conversión continua de estos componentes durante la fase de crecimiento exponencial, siendo reducida en la fase estacionaria. Este proceso de sustitución, sin embargo, parece

en la composición proteica de las envolturas celulares (Breedveld *et al.*, 1995, Batley *et al.*, 1987). El papel que juegan estos compuestos se asemejan a los que cumplen los oligosacándos derivados de membrana de *Eschenchia coli* durante la adaptación hiposmótica (Kennedy y Rumley, 1988; Miller *et al.*, 1986). Por otra parte, se ha sugerido que los  $\beta$ -1-2-glicanos pueden ser de importancia durante el proceso de infección de los pelos radiculares de la leguminosa huésped. Mutantes de *R. meliloti* incapaces de formar  $\beta$ -1-2-glicanos indujeron solo la presencia de pseudonódulos en alfalfa (Geremia *et al.*, 1987).

Durante las primeras etapas de estudio de los  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, se consideraba que estas moléculas no presentaban sustituyentes. Estudios posteriores revelaron la presencia de  $\beta$ -1-2-glicanos sustituidos con residuos sn-1-fosfoglicerol (Batley *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1987) y ácido metilmalónico ó O-succinil-ésteres (Miller *et al.*, 1988). Una gran proporción de los glicanos presentes en *R. meliloti* y *A. tumefaciens* (50-90%) contiene entre uno y cuatro sustituyentes sn-1-fosfoglicerol por cada glicano (Miller *et al.*, 1987, 1988). El proceso de sustitución puede ser influido por la etapa de crecimiento del cultivo. Geiger *et al.* (1991) estudiaron el proceso de formación de los  $\beta$ -1-2-glicanos en *Rhizobium meliloti* 1021 a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento. Este estudio indicó que en las etapas iniciales del crecimiento celular la mayoría de los  $\beta$ -1-2-glicanos presentes eran neutros y posteriormente su extracción disminuía por conversión a sustituyentes aniónicos. Los resultados de este trabajo permiten concluir que la fracción neutra de  $\beta$ -1-2-glicanos es precursor de las fracciones aniónicas y que existe una conversión continua de estos componentes durante la fase de crecimiento exponencial, siendo reducida en la fase estacionaria. Este proceso de sustitución, sin embargo, parece

no ser generalizado a todas las cepas de *Rhizobium*, puesto que en *R. trifolii* TA-1 los  $\beta$ -1-2-glicanos son exclusivamente neutros (Breedveld *et al.*, 1990)

Beedveld *et al.* (1990) estudiaron la producción de  $\beta$ -1-2-glicanos en *R. trifolii* TA-1, buscando incrementar la producción de estos compuestos. La producción fue incrementada notablemente utilizando temperaturas superiores a las óptimas para el crecimiento de la cepa y en medios que promueven un alta densidad microbiana. En este trabajo se utilizaron temperaturas entre 25 y 33 C para el crecimiento del medio de cultivo. En el extremo inferior de este rango, la producción de  $\beta$ -glicanos fue de 0.04 g/l de medio que se libero durante la fase estacionaria de crecimiento. En temperatura de 33° C se encontro una reducción sensible en el tiempo de generación (12-13 h), las células microbianas presentaron forma irregular y mayor tamaño que en temperaturas bajas. La liberación de  $\beta$ -glicanos se inició en la fase estacionana temprana y alcanzo 3.9 g/l de medio, con una reducción sensible de la producción de EPS (0.04 g/l) y PSC (0.01 g/l). Los efectos de la temperatura sobre la producción de  $\beta$ -glicanos también se han encontrado en otras cepas de *Rhizobium*.

En medios de alto crecimiento celular Zevenhuizen *et al.* (1986) reportaron una producción de 4 g/l de  $\beta$ -1-2-glicanos. Trabajando con esta misma cepa de *Rhizobium*, Breedveld *et al.* (1990) incrementaron los niveles de manitol hasta 50 g/l de medio manteniendo el aporte nitrogenado como ácido glutámico en una relación constante (20% del aporte de manitol). Estos cambios en el medio se manifestaron en efectos positivos en la producción de  $\beta$ -1-2-glicanos, llegando a una producción de 10.9 g/l de medio de cultivo. Cambios marcados en la producción de  $\beta$ -1-2-glicanos en el medio de cultivo con modificaciones de los nutrientes han sido reportados por Geiger *et al.* (1991).



Los  $\beta$ -1-2 glicanos son moléculas potencialmente útiles debido a su espacio interno relativamente hidrofóbico. Esto permite características de agente de inclusión, comparable a las ciclodextrinas que contienen 6-8 residuos de glucosa con enlaces  $\alpha$ -1-4. El espacio interno de estos dos tipos de moléculas es similar, pero la solubilidad de los  $\beta$ -1-2-glicanos es mayor (Breedveld *et al.*, 1990). Aunque mucho ha sido publicado sobre la inclusión de compuestos en ciclodextrinas, poco es conocido de  $\beta$ -1-2-glicanos como transportadores (Koisumi *et al.*, 1984).

### **2.3.3. Polisacáridos aniónicos solubles de alto peso molecular**

Los exopolisacáridos bacterianos pueden ser divididos en grupos sobre la base de su composición química y las condiciones bajo las cuales es sintetizado. Los heteropolisacáridos, y en algunos casos los homopolisacáridos, están compuestos por estructuras básicas repetidas y en su mayoría son aniónicos. La estructura del polisacárido está compuesta por una cadena principal a la cual se une una cadena lateral. La diversidad estructural proviene del amplio rango de componentes monosacáridos y es aún incrementada por la presencia de sustituyentes no carbohidratados potenciales y por el tipo de enlace (Kenne y Lindberg, 1983).

Las proporciones de glicanos de las unidades monosacáridas estructurales, que se repiten en la molécula, son consideradas invariables. Leigh *et al.* (1987) consideran que estas unidades estructurales del polisacárido juegan un papel importante en el proceso de nodulación de la bacteria en la leguminosa huésped específica. Sin embargo, *Xantomonas*

*campestris* y *Rhizobium tnfolii* aportan evidencias que sugieren alguna flexibilidad en la estructura, particularmente con respecto a aquellas unidades laterales de la cadena (Sutherland, 1982). Los sustituyentes no carbohidratados, en cambio, están frecuentemente presentes en cantidades no estequiométricas y pueden variar dependiendo de las condiciones de crecimiento o de la fase del cultivo (Sherwood *et al.* 1984, Sutherland, 1982)

El EPS producido por las diferentes cepas de *Rhizobium* ha sido dividido en dos grandes tipos. El EPS de tipo-I es excretado por cepas de *Rhizobium meliloti* y por Agrobacterias relacionadas. Estos polisacáridos no presentan ácidos urónicos y tienen en su composición D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico y ácido succínico en relaciones molares de 7 1 1 1. Los polisacáridos de Tipo-II son excretados por cepas de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tnfolii* y *Rhizobium phaseoli*, y están compuestos por D-glucosa, D-galactosa, D-glucurónico y ácido pirúvico en relaciones molares de 5 1 2 2 (Zevenhuizen 1971, 1973). Por otra parte en los filtrados de cultivo se puede apreciar la presencia de  $\beta$ -1-2-glicanos de bajo peso molecular y oligosacáridos ácidos, los cuales son considerados como unidades de los exopolisacáridos de alto peso molecular (Amemura *et al.* 1983, Zevenhuizen y van Neerven 1983a).

La composición química de los polisacáridos solubles de *Rhizobium* no es homogénea. En el Cuadro 2 se presenta un resumen de la composición reportada por diferentes autores. Los primeros trabajos que reportaron la composición de estos polímeros indicaban la presencia de glucosa, galactosa, manosa y algunas veces ácido glucurónico (De Leizaola y Dedonder, 1955). Posteriormente, diferentes autores (Amemura *et al.* 1983; Dudman, 1978, Harada *et al.*, 1979) indicaron que los polisacáridos de *Rhizobium* están formados por unidades repetidas de monosacáridos que no contienen manosa, pero en algunas ocasiones estas

unidades pueden unirse a ácido pirúvico, acético o succínico en diferentes proporciones. Humphrey *et al* (1974) trabajando con *Rhizobium tnfolii* TAI y *Rhizobium meliloti* SU47 encontraron que el polisacárido extraído del medio y no purificado presentó manosa, pero esta fue completamente eliminada luego de la purificación. La presencia de extracto de levadura en el medio de cultivo probablemente contribuyó a la detección de manosa y fue extraída junto a los polisacáridos solubles. Sin embargo, posteriormente se han publicado reportes de investigación que han detectado manosa como constituyente de polisacárido soluble en el medio en *R. meliloti* (Ghai *et al.*, 1981), en el polisacárido capsular de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium tnfolii* (Zevenhuizen, 1984) y en polisacáridos capsulares y solubles en el medio de cultivo de *Rhizobium* de diferentes tipos de leguminosas estudiadas (Courtois *et al.*, 1986).

Cuadro 2. Composición de exopolisacáridos solubles en diferentes especies de *Rhizobium*

CEPA	Constituyentes del exopolisacárido	Sustituyente	Referencia
<i>Rhizobium japonicum</i> (311b-138 y 311b-110)	Glucosa-manosa-ácido galacturónico (2 1 1) <sup>a</sup> Galactosa y 4-O-metilgalactosa		Mori y Bauer (1960)
<i>Rhizobium meliloti</i> (J7017, 2020, 204, 207, 209 y U27)	Glucosa-galactosa-ácido pirúvico (7 1 1)	acético, pirúvico y succínico	Harada <i>et al</i> (1979), Jansson <i>et al.</i> (1977)
<i>Rhizobium meliloti</i>	Glucosa-galactosa-pirúvico-succínico-acético (70-74, 8 2-10, 6 1-7 2, 7 9-8 2 y 2 5-2 7%) <sup>b</sup>	acético-pirúvico y succínico	Courtois <i>et al</i> (1986)
<i>Rhizobium sp</i> (NGR 234)	Glucosa-galactosa-ácido galacturónico (5 2 2)	pirúvico y acético	Djordjevic (1986)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Glucosa-ácido glucurónico-galactosa (5 2 1)	pirúvico	Bredvold <i>et al</i> (1993)
<i>Rhizobium tnfolii</i>	Glucosa-galactosa-ácido glucurónico (5 1 2)	ácido pirúvico y O-acetilo	Zevenhuizen (1973)
<i>Rhizobium phaseolae</i> 127-K38	Glucosa-ácido glucurónico-galactosa (6 3 1)	acetilo	Kenne y Lindberg (1963)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>R. tnfolii</i> y <i>R. Phaseolae</i>	Glucosa-galactosa-ácido pirúvico (5 1 2 2)	glucurónico-ácido pirúvico	Zevenhuizen (1971, 1976)

a y b: proporción o porcentaje de los constituyentes

El exopolisacárido producido por *R. meliloti* es diferente al sintetizado por otros *Rhizobium* por la ausencia de ácido glucurónico en sus estructuras básicas monosacáridas (mayor porcentaje de azúcares neutros) y la presencia de ácido succínico lo cual los caracteriza como succinoglucanos. Los sustituyentes que se encuentran en este polisacárido son ácido acético, pirúvico y succínico. Estas diferencias han conducido a proponer a *R. meliloti* y *Agrobacterium* sp. como un grupo diferente a los otros *Rhizobium*, así como caracterizar a *R. meliloti* como un género diferente (Harada *et al.*, 1979; Courtois *et al.*, 1986). Los polisacáridos de *R. meliloti* de las cepas J7017, 2020, 204, 207 y 209 presentaron una relación molar de glucosa, galactosa y ácido pirúvico (7:1:1). Esta relación es idéntica a la encontrada en *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3, diferentes cepas de *Agrobacterium* evaluadas por Hisamatsu *et al.* (1979, 1980) y *R. meliloti* U27 (Jansson *et al.*, 1977). Diferentes cepas de *R. meliloti* estudiadas por Courtois *et al.* (1986) contenían 70-74% de glucosa, 8.2-10% de galactosa, 6.1-7.2 ácido pirúvico, 7.9-8.2 de ácido succínico y 2.5-2.7 de ácido acético. Las estructuras de *R. meliloti* presentan regiones del polisacárido similares en composición a *Rhizobium* sp. NGR234 que nodula a *Leucaena leucocephala*. Sin embargo, este último secreta un polisacárido con una unidad estructural de 9 monosacáridos que está constituida por 5 glucosas, 2 galactosas y 2 ácidos galacturónicos unidos por enlaces de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , presentando además una molécula de ácido pirúvico y una de acético como sustituyentes (Djordjevic, 1986). Gray *et al.* (1991) manipularon genéticamente la cepa NGR234 introduciendo genes de *R. meliloti* conduciendo a una cepa mutante con producción de succinoglucanos característicos de *R. meliloti*. Con estos cambios introducidos a la cepa NGR234 se mantuvieron las características de formación de nódulos en *Leucaena leucocephala* pero se perdió la capacidad de fijación de nitrógeno en la misma.

Courtois *et al* (1986) encontraron que la composición de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli* y *R. tnfolii* presentaron características similares, presentando entre 52-64.6% de glucosa, 8.9-14.4% de galactosa, 14-23% de ácido glucurónico, 0.7-2.2 de ácido pirúvico y ácido acético. Breedveld *et al* (1993) consideran que la estructura básica de *Rhizobium leguminosarum* es un octasacárido compuesta por glucosa, ácido glucurónico y galactosa en proporciones molares de 5:2:1 unidas por enlaces  $\beta$  y presentando dos sustituyentes piruvato. Zevenhuizen (1973) reporta la composición química del polisacárido extracelular liberado al medio de cultivo por *Rhizobium tnfolii*, con una estructura básica octasacárida con glucosa, galactosa y ácido glucurónico en proporciones molares de 5:1:2, presentando dos sustituyentes piruvato y tres O-acetilo. Por otra parte, Zevenhuizen (1973) y Somme (1974) plantean una estrecha similitud de composición entre *R. tnfolii* y *R. phaseoli*, en incluso la posibilidad de que sean idénticas. Estudios estructurales realizados por Somme (1974) y posteriormente Jansson y Lindberg (1993) plantean una estructura heptasacárida constituida por glucosa, galactosa y ácido glucurónico en proporciones molares 5:1:1, con dos pirúvicos y 4 O-acetilos como sustituyentes. Sin embargo, estos autores consideran que las unidades estructurales que se repiten deben tener por lo menos 14 azúcares. Para *Rhizobium phaseoli* cepa 127-K38, Kenne y Lindberg (1983) reportan una estructura básica de 10 monosacáridos, las cuales están constituidas por 6 glucosas, 3 ácido glucurónico y una galactosa unidas a un sustituyente acetilo. Las uniones entre polisacáridos son de tipo  $\beta$ -1-4 y  $\beta$ -1-6, restringiéndose los enlaces de tipo  $\alpha$  a la unión con galactosa y las uniones de las unidades estructurales entre sí.

Zevenhuizen (1986) probó diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium tnfolii* para determinar la producción del polisacárido extracelular en condiciones de cultivo con ácido glutámico (0.1%), manitol (1%) y sales, en matraces a 25 °C. La mayoría de las cepas

produjeron principalmente el polisacárido extracelular y solo pequeñas cantidades de polisacárido capsular, encontrando que la cepa de *R. trifolii* TA-1 revertía estas proporciones con alta producción de polisacárido capsular y pequeñas cantidades de polisacárido extracelular bajo las condiciones de cultivo impuestas.

El polisacárido extracelular es producido por la bacteria es excretado hacia el medio de cultivo y conduce a que este se vuelva altamente viscoso. Las condiciones de cultivo del microorganismo puede conducir a cambios en la producción y composición del polisacárido extracelular. La producción del polisacárido extracelular se inicia en la fase de crecimiento del cultivo y se prolonga en la fase estacionaria en condiciones limitantes de nitrógeno y es favorecido por el aporte de carbohidratos hacia el final de la fase de logarítmica, sin embargo esta estrategia puede favorecer aun más la producción de exopolisacárido capsular. Bajo condiciones de alta aereación puede favorecerse la producción de polisacárido extracelular con bajas producciones de polisacárido capsular. En cambio condiciones de alto contenido de nitrógeno hacia el final de la fase logarítmica puede favorecer la producción de  $\beta$ -1-2-glicanos. Por lo tanto dependiendo del modo de manejo del medio de cultivo puede dirigirse la síntesis hacia uno u otro producto de acuerdo al interés particular. Zevenhuizen (1986) considera que las mayores producciones de polisacárido extracelular pueden lograrse bajo condiciones de cultivo con saturación de aire, la producción de polisacárido capsular con limitación de nitrógeno y un aporte moderado de oxígeno y los  $\beta$ -1-2-glicanos en un medio con 4 veces el aporte normal de nitrógeno lo cual por el alto crecimiento crearía limitaciones en el aporte de oxígeno. En base a esta información concluye que el oxígeno presenta un efecto principal sobre la naturaleza del producto principal.

El control del pH puede ser importante en la producción del exopolisacárido. Bajo condiciones de cultivo en sales-manitol-ácido glutámico el pH se mantiene entre 6 y 8. Normalmente cuando se presenta la fase exponencial de crecimiento el pH tiende a decrecer de condiciones neutras hasta pH 6, pero en fases posteriores tiende a incrementarse hasta niveles de pH entre 7 y 8. En algunas cepas la fase de descenso puede conducir a pH menor a 6 y en estos casos normalmente no hay un incremento posterior y la producción de exopolisacárido se detiene (Courtois *et al.*, 1979).

La fuente de carbono normalmente usada es manitol, pero otras formas carbonadas pueden ser utilizadas como glicerol, glucosa, manosa y sacarosa con igual eficiencia en el crecimiento y en algunos casos con mayores rendimientos del producto deseado (Zevenhuizen, 1984).

Zhan *et al.* (1991) reportaron que *Rhizobium meliloti* SU47 produce un exopolisacárido alternativo (EPSb) bajo condiciones limitantes de fosfato en el medio de cultivo, mientras que en medios limitantes de nitrógeno o azufre no existieron cambios en el EPS normal de esta cepa. Zevenhuizen (1984) reporta que la producción y excreción del EPS al medio se inicia durante la fase exponencial de crecimiento y continúa durante la fase estacionaria. En cultivos de diferentes cepas con 5 y 10 g manitol/l de medio, la producción de EPS fue de 0.6-0.7 g/l de cultivo en 3 días de crecimiento.

La producción de EPS se ha determinado bajo diferentes medios y condiciones de cultivo. En el Cuadro 3 se presentan los niveles de producción obtenidos para diferentes especies y cepas de *Rhizobium*.

**Cuadro 3. Producción de exopolisacáridos solubles en agua de alto peso molecular por diferentes especies y cepas de Rhizobium**

Cepa	Carbohidratos solubles en agua (g/l)	Referencia
<i>R. meliloti</i>		
IFO 13336	8.40	Ghai et al (1981)
J7017	2.20	Ghai et al (1981)
201	2.60	Ghai et al (1981)
202	3.30	Ghai et al (1981)
204	3.60	Ghai et al (1981)
206	4.50	Ghai et al (1981)
207	3.40	Ghai et al (1981)
209	0.90	Ghai et al (1981)
<i>R. trifolii</i>		
IFO 13337	1.50	Ghai et al (1981)
J60W	5.80	Ghai et al (1981)
J60B1	0	Ghai et al (1981)
J60B2	0.20	Ghai et al (1981)
TA1	1.90	Zevenhuizen (1984)
TA1	3.10	Zevenhuizen (1984)
<i>R. japonicum</i>		
IFO 13338	6.00	Ghai et al (1981)

#### 2.4. BIOSÍNTESIS DEL EXOPOLISACÁRIDO.

La mayoría de las gomas comerciales de origen microbiano son formadas en procesos intracelulares microbianos y en diferentes fases de crecimiento bajo una variada gama de condiciones dependiendo del microorganismo en estudio. La biosíntesis involucra dos aspectos principales de interés que son el sitio de síntesis del polisacárido y la naturaleza del precursor (Sutherland, 1982, 1985). En algunos géneros bacterianos como *Acetobacter xylinum* la síntesis de celulosa ocurre en la membrana citoplasmática y utiliza como



precursores azúcares nucleótidos, y no están involucrados lípidos intermedios como en la mayoría de las bacterias que producen otro tipo de exopolisacárido (Whitfield, 1988)

El inicio de la biosíntesis del exopolisacárido involucra una serie de procesos que a través de los cuales el sustrato entra a la célula microbiana, es posteriormente modificado por reacciones enzimáticas y finalmente es excretado en forma polimérica desde la superficie microbiana. El sustrato puede entrar a la célula a través de difusión facilitada, transporte activo o translocación de grupo. Los dos últimos son procesos que requieren de un aporte de energía. En el transporte activo el sustrato entra a la célula en forma inalterada, en cambio si el mecanismo involucra translocación de grupo el sustrato es fosforilado utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) que es transformado en piruvato. En este último caso, no existen evidencias que indiquen que el uso de PEP para la translocación de grupo pueda interferir o afectar otros procesos metabólicos de importancia para la bacteria. Si existiera algún grado de interferencia podría ser detectado por bajas proporciones de ácido pirúvico en el polisacárido sintetizado. En algunos casos, más de un mecanismo puede estar involucrado en la entrada del sustrato a la célula bacteriana (*E. Coli*). La entrada del sustrato aparece como la primera limitante potencial en la producción del exopolisacárido microbiano (Sutherland, 1977).

Posteriormente a la entrada del sustrato a la célula microbiana y a su fosforilación por el mecanismo de translocación de grupos o por una hexoquinasa utilizando ATP, el sustrato puede ser utilizado para procesos anabólicos o catabólicos celulares. La entrada del sustrato hacia procesos catabólicos celulares hacen que esta parte de la energía no sea utilizada en los procesos de síntesis de polisacáridos extracelulares, aunque una parte de los productos

intermedios del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ácido pirúvico y ácido acético) pueden ser incorporados en las últimas etapas de la síntesis del polisacárido aportando los sustituyentes que lo integran. En el caso en que el sustrato sea usado para procesos anabólicos y la especie es una bacteria Gram negativa productora de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y glucógeno, diferentes proporciones del mismo pueden ser destinados a estas vías de síntesis. Durante las etapas de crecimiento bacteriano la síntesis de glucógeno por la célula bacteriana es limitada, pero su producción se diferencia claramente de la síntesis de polímeros de pared y extracelulares puesto que no involucra a lípidos isoprenoides. El control de la síntesis de glucógeno es ejercida a través de la regulación alostérica de la síntesis de ADP-glucosa. Aquellas cepas mutantes que carecen de la enzima ADP-glucosa-pirofosforilasa pueden ser interesantes cuando se desea que el sustrato no sea desviado a este producto de síntesis y sea utilizado en la síntesis de los productos de interés. El valor de estas mutaciones deben ser consideradas en aquellos organismos en que los carbohidratos de reserva son  $\text{poly-}\beta\text{-hidroxibutirato}$  y trehalosa (Sutherland, 1977).

El siguiente precursor sobre el cual puede ejercerse el control es UDP-glucosa y la enzima UDP-glucosa-pirofosforilasa que están involucrados en la síntesis de polímeros de la pared bacteriana y polisacáridos extracelulares. Por otra parte, en la Figura 1 se presentan diferentes tipos de interconversiones que ocurren normalmente para los azúcares nucleotídicos más comúnmente utilizados en la síntesis de exopolisacáridos. En microorganismos que producen polisacáridos que contienen ramnosa, la enzima TDP-pirofosforilasa está presente junto a la UDP-glucosa-pirofosforilasa y muestran inhibición cruzada ante la presencia de los precursores sobre los que actúan. Una forma similar de control se presenta en organismos que producen UDP-fucosa y UDP manosa. Esto fue estudiado en bacterias que contienen: 1) D-manosa en sus polisacáridos, 2) contienen L-

fucosa y 3) contienen ambos polisacáridos (L-fucosa y D-manosa). En el primer caso el control de la síntesis de GDP-manosa es realizado por GDP-manosa-pirofosforilasa. En aquellas bacterias en que GDP-manosa es el único precursor de la síntesis de fucosa, GDP-fucosa controla la GDP-manosa-pirofosforilasa y la GDP-manosa-hidrolasa a través de inhibición retroalimentada. Cuando el polisacárido presenta manosa y fucosa en su composición cada azúcar-nucleótido controla su propia síntesis.

En el proceso de síntesis de polisacáridos se requiere de transportadores lipídicos que se encuentran en la parte externa de la membrana celular y son formados dentro de la misma. Los lípidos isoprenoides intervienen en la formación de lipopolisacáridos, peptidoglicanos y exopolisacáridos. El lípido funcional es bactoprenol en forma de monofosfato lipídico. Uno de los factores críticos que afectan la síntesis de exopolisacáridos es la disponibilidad de lípidos isoprenoides fosfato. Algunas mutaciones que afectan la síntesis de este último y por lo tanto afectan la producción de los exopolisacáridos. Por otra parte, algunas mutantes defectivas en la síntesis de peptidoglicano requieren menos lípidos isoprenoides que el tipo silvestre y por lo tanto la liberación de los exopolisacáridos se incrementa. Una mutante de este tipo ha sido detectada en *E. coli* (Sutherland, 1990).

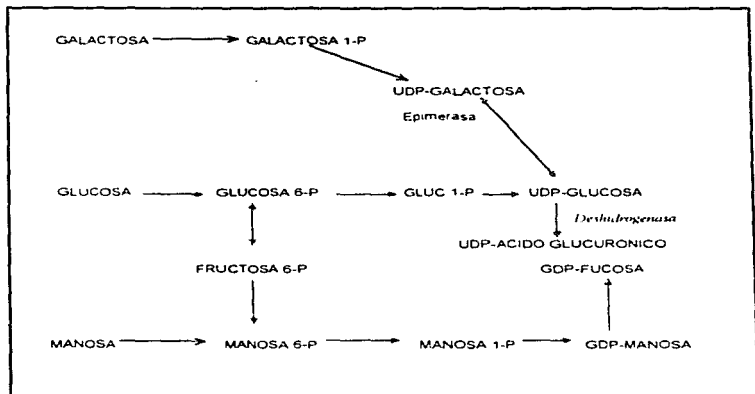
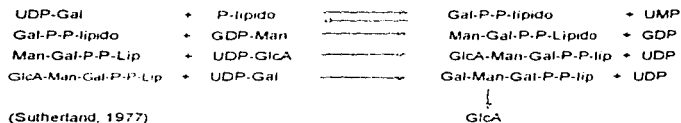


FIGURA 1. Sistemas catabólicos que conducen a la síntesis de azúcares nucleotídicos y sus interconversiones (Sutherland, 1990)

La formación del exopolisacárido se inicia con la construcción de las unidades estructurales características del polímero que se repiten a lo largo de la molécula. Esto es dependiente de la transferencia de los monosacáridos apropiados desde las unidades de azúcar pertenecientes a los nucleótidos al transportador lipídico-isoprenoide alcohol fosfato. La secuencia de reacciones han sido bien caracterizadas en *Enterobacter aerogenes*. Esta serie de reacciones son descritas a continuación:



La entrada de los sustituyentes como acetilo, piruvato provienen de acetil-CoA y fosfoenolpiruvato y en el caso de xantana forman parte de esta síntesis secuencial de las unidades estructurales. Las unidades estructurales del polisacárido requieren de la posterior elongación y el pasaje del material polimerizado al exterior de la membrana citoplasmática. Finalmente el polímero es excretado al medio externo a través de enzimas que liberan el polímero en su unión lipídica. Los oligosacáridos unidos al lipido transportador es separado por la reacción enzimática que divide a los fosfatos de los monosacáridos (Sutherland, 1990).

La longitud de la cadena del polímero puede también depender de la velocidad de crecimiento celular, de una manera análoga a las cadenas de lipopolisacáridos. A mayor velocidad de crecimiento hay un mayor recambio de los lípidos transportadores y liberación

de polimeros de menor peso molecular. Esto puede ser importante para la producción comercial de gomas y puede ser ventajoso el uso de cepas mutantes con defectos de superficie. La producción de EPS microbianos involucra un gran numero de enzimas, algunas de las cuales estan involucradas en la formacion de otros polisacaridos en forma adicional a los exopolisacandos (Sutherland, 1990)

## 2.5. CARACTERISTICAS REOLOGICAS DE LOS POLISACARIDOS.

En procesos fermentativos microbianos en batch la naturaleza viscosa de algunos caldos tienen un efecto importante en el caracter reologico del fluido, debido al aumento de la concentracion celular dentro del bioreactor, cambios en la morfologia microbiana, o aumento de la produccion de metabolitos extracelulares. En algunos procesos productivos tales cambios son deseables como es el caso de la produccion de los exopolisacaridos microbianos. En el siguiente esquema se detallan tipos de fermentacion donde el producto es el causante directo de los cambios en la reologia del caldo de cultivo

Cuadro 4. Categorías de fermentaciones viscosas No-Newtonianas

Categoría	Tipo de Producto	Forma Microbiana	Ejemplo
1	Biomasa	Filamentosa	<i>Pecilomyces vanotii</i> <i>Scytalidium acidophilum</i>
2	EPS	Filamentosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Sclerotinia glucanicum</i>
3	EPS	Unicelular	<i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>

(McNeil et al, 1993)

La fermentación para la producción de polisacáridos microbianos presenta como característica más importante el cambio sustancial en el comportamiento reológico del caldo durante el cultivo, que se deben considerar parámetros críticos como la transferencia de masa y calor, características de mezclado y requerimiento de potencia de agitación, los cuales pueden volverse críticos al intentar escalar el sistema. El fluido al inicio de la fermentación en el caso de la producción de xantana es prácticamente newtoniano, entonces la viscosidad es independiente de la rapidez de deformación, al avanzar la fermentación se vuelve más viscoso pero con comportamiento no-newtoniano. Por lo general, en las etapas finales de producción de xantana se presenta un comportamiento reológico de tipo pseudoplástico o reofluidizante, ya que la viscosidad disminuye con el incremento en la rapidez de deformación.

Los modelos reológicos más comúnmente utilizados para describir medios de fermentación conteniendo EPS bacterianos son la Ley de Potencia, Plástico de Bingham y Casson.

El modelo de Ley de Potencia o de Ostwald de Waele es el que más se ajusta al EPS referido en este estudio:

$$\tau = K (\dot{\gamma})^n$$

$\tau$  = esfuerzo de corte (Pa s)

$K$  = índice de consistencia (Pa s<sup>n</sup>)

$\dot{\gamma}$  = rapidez de deformación (seg<sup>-1</sup>)

$n$  = índice de flujo o pseudoplasticidad (adimensional)

El modelo de la Potencia ha sido el más aplicado ampliamente para describir caldos de suspensiones filamentosas de hongos en forma dispersa y caldos conteniendo exopolisacáridos, incluyendo soluciones de goma xantana, pululana, wellana y rhamsana. Para ambos tipos de productos, en cultivos en batch,  $n$  típicamente disminuye a valores mínimos indicando un alto grado de pseudoplasticidad. Los valores de  $k$  llegan a un máximo, el cual usualmente ocurre en coincidencia con los mínimos valores de  $n$  (McNeil *et al.*, 1993, Charles, 1978, Galindo, 1985).



### 3. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo fue generar conocimientos y tecnología en el área de producción y caracterización de exopolisacáridos de origen microbiano, proveniente de una cepa nativa de *Rhizobium phaseoli*

Los objetivos particulares que se plantearon son los siguientes

- 1) estudiar los efectos de nutrientes, sustancias que alteran el metabolismo microbiano y modificaciones ambientales, sobre la producción de biopolímeros en la cepa en estudio
- 2) Estudiar y evaluar diferentes técnicas para caracterizar químicamente el exopolisacárido
3. Evaluar las características reológicas del polisacárido extraído y del medio de fermentación

#### 4. MATERIALES Y METODOS.

##### 4.1. MICROORGANISMO

Se utilizó una cepa de *Rhizobium phaseoli* nativa obtenida de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris*), la cual fue aislada de nódulos de buen tamaño e intensamente coloreados que indican su buena fijación de nitrógeno. Se realizaron pases sucesivos en un medio de cultivo sólido para el crecimiento y selección del microorganismo. El medio sólido utilizado se compuso de cloruro férrico 0.15 g/l, cloruro de sodio 0.45 g/l, extracto de levadura 1.5 g/l, sulfato de magnesio 1.01 g/l, fosfato dibásico de potasio 1.16 g/l, manitol 10 g/l y agar bacteriológico 15 g/l, que fueron estandarizados a pH=7. Las cajas de cultivo se mantuvieron a 30°C en estufa microbiológica durante 5 días. Se utilizaron tinciones de azul de anilina y rojo Congo para evaluar la homogeneidad de las cepas cultivadas o detectar cambios en el comportamiento del microorganismo durante el periodo de selección. Las colonias de mayor tamaño y de alta producción mucóide fueron aisladas y cultivadas nuevamente en forma rutinaria, evaluándose la cantidad de exopolisacárido producido en un medio líquido previamente utilizado para *Rhizobium phaseoli* (Reginensi, 1992). En esta forma se seleccionó una cepa de *R. phaseoli* (FES-C1) por sus características de producción de exopolisacárido bajo las condiciones impuestas y fue utilizada para el desarrollo de la fase experimental del trabajo.

## 4.2. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO EN MATRAZ

El estudio de los efectos de los diferentes nutrientes sobre la producción de exopolisacárido fue realizada utilizando un diseño experimental en bloques incompletos con arreglo factorial de tratamientos de acuerdo a la forma recomendada por Box y Behnken (1960). El contenido de bloqueo fueron las diferentes etapas de cultivo (13 matraces por etapa) para cubrir un total de 104 cinéticas de crecimiento. Cada bloque contaba con 12 matraces correspondientes a los tratamientos y un control. En el Cuadro 5 se presentan los niveles de cada una de las variables estudiadas en cultivo y las concentraciones de cada nivel para cada nutriente. Los medios de cultivo para cada tratamiento contenían en forma constante 1.16 g/l de fosfato dibásico de potasio, 0.15 g/l de cloruro de sodio y el sulfato de sodio necesario para balancear el aporte de azufre en todos los tratamientos. El pH inicial de los medios fue de 7, la temperatura de incubación de 30° C y la agitación se reguló a 200 rpm.

Los resultados obtenidos a partir del total de cinéticas de producción realizadas, se sometieron a un análisis de regresión para ajustar un modelo explicativo de la respuesta en producción de exopolisacárido. Los niveles óptimos de cada nutriente se obtuvieron por medio de superficies de respuesta.

Los medios de cultivo para fermentación se colocaron en matraces de 1000 ml con 300 ml de medio y cada matraz fue inoculado con 5 ml de un cultivo de *Rhizobium phaseoli* con una densidad óptica (DO) de 1 medida a 600 nm de absorbancia. Los conteos de células viables a DO de 1 equivalen a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La cuantificación de la producción de exopolisacáridos se realizó en muestras obtenidas durante 10 días de fermentación. Las

muestras obtenidas se centrifugaron (10 ml) a 17000 g por 30 minutos y en las más viscosas se repitió el proceso señalado hasta lograr un sobrenadante transparente. Luego de separar el paquete celular del sobrenadante, a este último se le adicionaron de 30 a 60 ml de isopropanol y se agitaron con barras magnéticas por 10 minutos para cada muestra. La producción del exopolisacárido se evaluó en el precipitado obtenido por peso seco constante a 80° C.

Cuadro 5 Niveles utilizados para cada uno de los componentes del medio de cultivo

COMPONENTE	-1	0	+1
Manitol (g/l)	10	20	30
Extracto de levadura (g/l)	0.37	0.75	1.5
Carbonato de calcio (g/l)	0	1.5	3.0
Sulfato de magnesio (g/l)	0.33	0.67	1.01
Sulfato de aluminio (µM/l)	0	50	100
Cloruro férrico (µM/l)	0	50	100
Sulfato manganoso (µM/l)	0	200	400
Biotina (µg/l)	0	10	20
Penicilina (mg/l)	0	1.5	3.0

Luego de optimizar las concentraciones de cada uno de los componentes del medio de cultivo se evaluó el efecto de la variación de las fuentes de carbono en la producción de exopolisacárido, utilizando sacarosa y glucosa como carbohidratos alternativos. Para definir las condiciones de fermentación se realizaron estudios para evaluar el efecto de la variación del pH inicial (6,7,8) y de la temperatura de incubación (30° C y 34° C) sobre la concentración de exopolisacárido en el medio de cultivo.

La cuantificación del crecimiento celular se realizó en forma periódica durante 10 días de incubación en la etapa de ajuste final de las condiciones de fermentación en matraces y en el trabajo realizado por 100 h en fermentador. La DO se determinó por medio de un espectrofómeto (Espectronic 20 Baush&Lomb) a 660 nm de absorbancia. La cantidad de sales de carbonatos y de exopolisacárido en el medio de cultivo, interferían en las lecturas por lo que se aplicó la técnica descrita por Suresh *et al* (1981). Utilizando 10 ml de cultivo fueron centrifugados a 10000 rpm, las células y el  $\text{CaCO}_3$  fueron precipitados. El  $\text{CaCO}_3$  fue removido con HCl al 1M y el precipitado fue lavado con agua. Las mediciones se realizaron de los paquetes celulares diluidos con agua 5 veces.

#### 4.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDO EN FERMENTADOR (SISTEMA BATCH)

En esta etapa del trabajo experimental se utilizó un fermentador de 14 l (New Brunswick Scientific Magnaferm) para la propagación bacteriana y la producción de exopolisacárido, utilizando el medio optimizado obtenido en la etapa experimental previa. Se trabajó con 8 l de medio de cultivo que fue esterilizado y posteriormente se ajustó el pH a 8, el cual se mantuvo durante todo el proceso por ajuste automático con una solución de KOH 1N. En forma separada, se preparó el inóculo utilizando 5 ml de una suspensión bacteriana provenientes de medio sólido de 5 días de crecimiento, que se colocaron en matraces de Erlenmeyer de 1000 ml conteniendo 300 ml de medio optimizado. El inóculo fue incubado en agitador orbital a 30 °C y 200 rpm durante 3 días, previo a su transferencia al fermentador. El medio de cultivo fue inoculado con 266 ml de biomasa de *Rhizobium phaseoli* FES-C1. El

volúmen del inóculo equivale al utilizado en la fase experimental para la optimización del medio de cultivo en matraz. En forma adicional, se adiciona silicón (FG10 Dow Corning) para evitar la formación de espuma durante el periodo de fermentación. La producción de exopolisacando en el fermentador se realizó utilizando un valor de aereación de 1 VVM, agitación de 400 rpm, pH=8, temperatura de 30 °C y un periodo de 100 horas.

Durante la etapa experimental de fermentador se midieron las siguientes variables:

a) *Cuantificación del crecimiento celular*. La medición del crecimiento bacteriano se realizó por lecturas periódicas de la DO a 660 nm de absorbancia durante el transcurso de la fermentación. Las muestras se trataron en forma similar a lo descrito anteriormente y se obtuvieron las relaciones de esta medida con el peso seco bacteriano y la proteína celular por medio de la técnica de Bradford (Robyt y White, 1990).

b) *Cuantificación de la producción de exopolisacando*. Se centrifugaron 10 ml de muestra obtenidas en forma periódica durante el transcurso de la fermentación. Las condiciones de centrifugación fueron 17000 g por 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante obtenido se agregaron de 30 a 60 ml de isopropanol y se agitaron durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue filtrado en papel Whatman N°1 previamente secado hasta peso constante y fueron colocados en estufa de aire forzado 80 °C. El peso seco de exopolisacando producido fue obtenido por diferencia.

c) *Cuantificación de sacarosa*. La técnica utilizada es la de  $\beta$ -fructofuranosidasa-DNS. La enzima fue activada en un buffer de citrato 0.32 M a pH=4.6. Se colocaron 0.9 ml de muestra

(sobrenadante) + 0.1 ml de la solución enzimática, se mezclaron y se dejaron reposar por 3 minutos. Se adicionó 1 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma). Los tubos se calentaron en un baño de agua a ebullición por 5 minutos e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo. Se le adicionaron 10 ml de agua a cada tubo, se mezclaron y se realizaron las lecturas de las muestras a 540 nm contra un blanco de agua destilada. Por las cantidades iniciales de sacarosa utilizadas y el rango de detección del método se utilizaron las diluciones necesarias (Tinoco y Lopez-Munguia, 1993).

d) *Medición de la viscosidad y curvas de flujo del medio de cultivo.* La obtención de las curvas de flujo se realizó directamente en muestras del medio de cultivo obtenidas en el transcurso de la fermentación. Se utilizó un Reómetro Physica MC100 con geometría de cono y plato MK24, con 75 mm de diámetro, un ángulo de 1° y la truncación de 50 µm (todas las determinaciones se realizaron a 30° C). Se utilizó un programa en el que la velocidad de deformación se aumentó progresivamente de 1-1000 s<sup>-1</sup> en 120 segundos, tomando 15 puntos. Se evaluó la viscosidad aparente ( $\tau_{app}$ ) en cada velocidad de deformación obtenida.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL EPS.

a) *Determinación de la viscosidad intrínseca.* Las mediciones se realizaron en un viscosímetro capilar de Ubbelohde a 25° C. El viscosímetro se calibró con agua, etanol y isopropanol, los tiempos de desplazamiento de las soluciones y dispersiones se midieron con cronómetro automático y por quintuplicado. La viscosidad intrínseca fue expresada en decilitros/gramo (dl/g), y fue determinada por extrapolación de las gráficas de viscosidad reducida y viscosidad inherente vs. concentración. La goma fue solubilizada en agua y

formamida (mejores solventes para xantana y el EPS obtenido desde *R. phaseoli*) en las concentraciones  $4 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$  y  $2 \times 10^{-4}$  g/dl, se determinaron la viscosidad relativa y la viscosidad específica. A partir de las ecuaciones de Huggins y Kraemer (1984) se permitio evaluar el grado de interaccion entre el biopolimero y el solvente. Los resultados fueron comparados con gomas comerciales sometidas a las mismas determinaciones (Rodríguez, 1984, Whitcomb *et al.* 1976).

b) *Determinación de curvas de flujo y propiedades viscoelásticas del polimero aislado*. Las mediciones fueron realizadas a partir muestras aisladas, purificadas y dializadas obtenidas del proceso fermentativo, las cuales se utilizaron dispersiones del exopolisacárido seco en agua desionizada a pH=7 a 25° C. Los estudios reológicos se realizaron en muestras hidratadas y homogeneizadas por 2 horas, y almacenadas a 4°C por 7 horas. Para estos estudios se utilizo un reometro Physica MC100 con geometria de cono y plato MK24, con diámetro de 75 mm, un ángulo de 1° y truncacion de 50 µm. Se realizaron determinación de curvas de flujo y viscosidad aparente, así como determinación de modulo elastico (G') y el módulo viscoso (G''), en pruebas de cizalla oscilatoria utilizando concentraciones del exopolisacárido al 1 %. En las pruebas de dinámica se realizaron en forma previa barridos de amplitud para seleccionar la zona de viscoelasticidad lineal.

El polimero fue sometido a diferentes tratamientos para conocer el efecto de la temperatura sobre el comportamiento reológico. La dispersión del exopolisacárido fue sometida a temperaturas de 96°C por 10 minutos, a 121° C por 15 minutos o a 121° C por 30 minutos. Cada tratamiento fue comparado con un control sin tratamiento térmico y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las muestras se sometieron a las mismas



determinaciones detalladas anteriormente. En forma adicional las muestras tratadas fueron sometidas posteriormente a un almacenaje por 5 días en refrigeración para evaluar los mismos efectos.

Se estudiaron los efectos de diferentes sales mono y divalentes (modificando la fuerza iónica) en el comportamiento reológico, utilizando concentraciones 0.5% de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{NaCl}$ . Se realizaron pruebas con un catión trivalente ( $\text{Al}^{+++}$ ), para estudiar sus efectos en el exopolisacárido luego de los tratamientos térmicos. Sin embargo, los estudios con este catión no fueron considerados por la producción de agregados gelificados con exceso de sinéresis. Los estudios anteriores se realizaron a  $\text{pH}=7$  y posteriormente se evaluó el efecto del  $\text{pH}$  en las propiedades viscoelásticas del biopolímero tratado por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Se utilizaron dispersiones del polisacárido al 1% en agua desionizada con valores de  $\text{pH}$  de 3 y 11. Las mediciones de los diferentes módulos se realizaron en las mismas condiciones que para  $\text{pH}=7$ .

#### **4.5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA**

##### **4.5.1. Aislamiento y purificación del exopolisacárido**

Al finalizar la cinética de producción el exopolisacárido liberado en el medio de cultivo fue centrifugado a 17000 g por 60 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , y el sobrenadante obtenido fue precipitado con etanol frío en presencia de acetato de sodio al 0.5 M. La extracción del polímero de alto peso molecular se completó al centrifugar a 10000 g por 15 minutos.

El precipitado se secó a 60° C y se dializó por 4 días utilizando agua bidestilada que fue cambiada a los 30 min, 2, 4 y 24 horas, sometiendo las muestras a otro proceso de precipitación una vez finalizada la diálisis. A los biopolímeros obtenidos se les determinó la posible presencia de restos de proteínas celulares por estudios electroforéticos y técnica de Bradford (Robyt y White, 1990)

#### **4.5.2. Análisis del exopolisacárido por cromatografía en capa fina.**

Se sometieron a hidrólisis ácida 10 mg de goma/ml de ácido sulfúrico al 0.5 M, a 121° C por 23 minutos, 1, 1.30 y 2 horas, y los hidrolizados fueron neutralizados a pH=7 con hidróxido de bario. Se estudiaron los niveles de hidrólisis por medio de una determinación enzimática con D-glucosa oxidasa (Sigma, Diagnostics a 505 nm) utilizando como variable los diferentes tiempos de exposición detallados (Zevenhuizen, 1973). Los análisis en cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron en cromatofolios de Silicagel G60 y de UV expuestos a diferentes sistemas de disolventes: TLC1 acetónitrilo-agua 85/15, TLC2 propanol-acetato de etilo-agua 60/30/10 y TLC3 etanol-butanol-agua 50/50/40. Los cromatofolios fueron revelados con una solución de ácido ftálico y se compararon los frentes de retención ( $R_f$ ) con estándares de diferentes azúcares. Se metilaron 20 mg de goma (Amemura *et al.*, 1985) en la fase clorofórmica se estudiaron por TLC con el sistema solvente TLC3 para 4 tiempos ascendentes de 8 horas cada uno. Los cromatogramas se revelaron con una disolución al 10 % de ácido sulfúrico en etanol y calentando las cromatoplasmas a 105° C por 15 minutos (Breedveld *et al.*, 1990)

#### **4.5.3. Extracción de las diferentes fracciones en el medio de cultivo por HPLC**

Se centrifugaron 20 ml de medio de cultivo, el sobrenadante obtenido fue sometido a precipitación con 2 volúmenes de etanol, y nuevamente centrifugado para remover al PLS de alto peso molecular. El sobrenadante obtenido fue concentrado a pequeños volúmenes y se centrifugó nuevamente, luego de mezclarlo con 14 volúmenes de etanol frío. El biopolímero de bajo peso molecular se obtuvo por precipitación con etanol y secado al vacío. La extracción de las diferentes fracciones del exopolisacárido se realizó con la finalidad de determinar la producción en el fermentador en el medio optimizado. En las muestras obtenidas se realizaron dializados utilizando agua bidestilada por 4 días y se analizaron por HPLC para determinar las diferentes fracciones de EPS en columnas de TSK gel G5000 PWXL (TOSOHAAS), con una fase móvil de buffer compuesto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NaCl}$  a  $\text{pH}=6.8$ . La velocidad de flujo fue de 1 ml / minuto, y la detección por UV a 205 nm. Se utilizaron estándares para filtración en gel provenientes de una mezcla liofilizada de: tiroglobulina (bovina) 670,000 d, gamma globulina (bovina) 158,000 d, ovoalbúmina 44,000 d, mioglobina (caballo) 17,000 d y cianocobalamina 1,350 d (Gel Filtration Standard BIO-RAD) para la obtención del peso molecular de cada fracción obtenida (Benincasa *et al.*, 1987; Zevenhuizen, 1983; Canter, 1991).

#### **4.5.4. Estudio de la composición monosacárida de las diferentes fracciones por HPLC.**

Al separar las fracciones en el exopolisacárido, éstas se sometieron a hidrólisis ácida a 121° C por 2:30 y 3 horas, se neutralizaron a  $\text{pH}=7$  con hidróxido de bario. Los análisis de los componentes monosacáridos de las fracciones se realizaron en una columna de amina, en

una fase móvil de agua acetónitrilo (80/20 v/v), con un flujo de 0.8 ml/minuto y la detección se realizó por índice de refracción. La identificación de los azúcares componentes del exopolisacárido se realizó por comparación con monosacáridos estándares.

#### **4.5.5. Determinación de la temperatura de degradación.**

Utilizando 30 mg de EPS se determinó la temperatura de degradación por medio de un equipo Fisher, donde los resultados obtenidos se compararon con xantana, guar, algarroba, alginato y carboximetilcelulosa sometidas al mismo proceso. La degradación de los polisacáridos se determinó por el cambio de color.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1. PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS EN FERMENTACION EN LOTE.

#### 5.1.1. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO EN MATRAZ.

##### 5.1.1.1. Efecto de nutrientes en el medio

En el Cuadro 6 y Cuadro 7 se presentan los promedios de producción en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y producción diaria (Cuadro 7) para los diferentes niveles de nutrientes utilizados en el experimento

La producción promedio de exopolisacáridos durante 10 días de fermentación variando los niveles de la fuente de carbono en el medio de cultivo fue de 4.91, 6.87 y 7.40 g/l, mientras que la producción diaria fue de 0.74, 0.86 y 0.90 g/l, para concentraciones de manitol de 10, 20 y 30 g/l de medio, respectivamente. Los resultados del análisis de la información para la fuente de carbono (Cuadro 8 y 9) muestran la existencia de efectos significativos lineales ( $P < 0.007$ ) y cuadráticos ( $P < 0.02$ ), indicando un efecto positivo del aporte de manitol en el medio de cultivo sobre la producción de exopolisacárido por el microorganismo. El efecto positivo del aumento de la concentración de manitol en el medio de cultivo sobre la producción de exopolisacárido, será a tasas decrecientes por cada unidad adicional de manitol agregada. El cultivo de *Rhizobium* para su uso como microorganismo del suelo o para la producción de polisacáridos ha utilizado preferentemente al manitol como fuente de carbono, aunque otras fuentes (glucosa, sacarosa, glicerol) pueden ser utilizadas en

sustitución sin cambios detrimientales en el crecimiento del cultivo (Ghai *et al.*, 1981, Reginensi, 1992).

Cuadro 6. Producción total promedio (g/l) de exopolisacárido con diferentes niveles de nutrientes en 10 días de fermentación (media  $\pm$  error estándar)

COMPUESTO	-1	0	+1
MANITOL	4 91 $\pm$ 0 30	6 87 $\pm$ 0 86	7 40 $\pm$ 0 34
EXTRACTO DE LEVADURA	5 84 $\pm$ 0 36	7 04 $\pm$ 0 20	5 72 $\pm$ 0 33
SULFATO DE MAGNESIO	6 33 $\pm$ 0 35	6 65 $\pm$ 0 21	7 00 $\pm$ 0 47
CARBONATO DE CALCIO	6 10 $\pm$ 0 43	6 80 $\pm$ 0 21	6 80 $\pm$ 0 45
SULFATO DE ALUMINIO	6 72 $\pm$ 0 42	6 72 $\pm$ 0 52	7 09 $\pm$ 0 37
CLORURO FERRICO	6 60 $\pm$ 0 30	6 72 $\pm$ 0 23	6 40 $\pm$ 0 30
SULFATO MANGANOSO	6 76 $\pm$ 0 48	6 77 $\pm$ 0 20	6 02 $\pm$ 0 42
BIOTINA	6 51 $\pm$ 0 20	6 95 $\pm$ 0 48	6 99 $\pm$ 0 42
PENICILINA	5 98 $\pm$ 0 28	6 80 $\pm$ 0 28	6 64 $\pm$ 0 43

Cuadro 7. Promedios diarios de producción (g/l) de exopolisacandos con diferentes niveles de nutrientes (media  $\pm$  error estándar).

COMPUESTO	-1	0	+1
MANITOL	0 74 $\pm$ 0 052	0 86 $\pm$ 0 020	0 90 $\pm$ 0 048
EXTRACTO DE LEVADURA	0 76 $\pm$ 0 034	0 88 $\pm$ 0 022	0 79 $\pm$ 0 039
SULFATO DE MAGNESIO	0 75 $\pm$ 0 034	0 86 $\pm$ 0 021	0 89 $\pm$ 0 059
CARBONATO DE CALCIO	0 81 $\pm$ 0 047	0 86 $\pm$ 0 022	0 85 $\pm$ 0 048
SULFATO DE ALUMINIO	0 91 $\pm$ 0 053	0 84 $\pm$ 0 022	0 84 $\pm$ 0 032
CLORURO FERRICO	0 85 $\pm$ 0 033	0 86 $\pm$ 0 023	0 79 $\pm$ 0 042
SULFATO MANGANOSO	0 90 $\pm$ 0 054	0 84 $\pm$ 0 022	0 85 $\pm$ 0 032
BIOTINA	0 85 $\pm$ 0 044	0 86 $\pm$ 0 021	0 91 $\pm$ 0 056
PENICILINA	0 78 $\pm$ 0 035	0 86 $\pm$ 0 022	0 85 $\pm$ 0 049

Cuadro 8. Efectos lineales, cuadráticos e interacciones de los nutrientes utilizados en el medio sobre la producción total (g/l) de exopolisacáridos

PARAMETRO	Efectos lineales		Efectos cuadráticos	
	Coefficiente de regresión	Significancia (P< )	Coefficiente de regresión	Significancia (P< )
Intercepto	8 716527	0 0001	--	--
Manitol	1 247500	0 0001	-1 172777	0 0001
Nitrógeno	-0 055625	0 8120	-1 672777	0 0001
Mg <sup>**</sup>	0 327187	0 1643	-0 500694	0 0889
CaCO <sub>3</sub>	0 346562	0 1410	-0 828194	0 0056
Fe <sup>***</sup>	-0 145625	0 5339	-0 710277	0 0168
Mn <sup>**</sup>	-0 369680	0 1167	-0 860694	0 0040
Penicilina	0 330937	0 1596	-0 964861	0 0014
Fe <sup>***</sup> *Mn <sup>**</sup>	1 140000	0 0167	--	--
Mg <sup>**</sup> *Penicilina	0 960000	0 0427	--	--

Cuadro 9 Efectos lineales, cuadráticos e interacciones de los nutrientes utilizados en el medio sobre la producción diana (g/l) de exopolisacáridos

PARAMETRO	Efectos lineales		Efectos cuadráticos	
	Coefficiente de regresión	Significancia (P< )	Coefficiente de regresión	Significancia (P< )
Manitol	0 075437	0 0068	-0 077408	0 0235
Nitrógeno	0 011048	0 6849	-0 139535	0 0001
Mg <sup>**</sup>	0 071331	0 0103	-0 078222	0 0221
Ca <sup>***</sup>	0 015553	0 5680	-0 064926	0 0562
Al <sup>***</sup>	-0 036567	0 1816	ns	ns
Fe <sup>***</sup>	-0 145625	0 5339	-0 710277	0 0168
Mn <sup>**</sup>	-0 022179	0 4161	ns	ns
Biotina	0 029203	0 2850	ns	ns
Penicilina	0 031366	0 2511	-0 083564	0 0147
Fe <sup>***</sup> *Mn <sup>**</sup>	0 142500	0 0104	--	--
Al <sup>***</sup> *Biotina	-0 117882	0 0329	--	--
Mg <sup>**</sup> *Biotina	0 110877	0 0444	--	--
Mg <sup>**</sup> *Penicilina	0 098678	0 0728	--	--
Mn <sup>**</sup> *Penicilina	-0 101133	0 0661	--	--

El tipo de sustrato específico puede depender de la especie de *Rhizobium*, y en el caso particular de *R. phaseoli* el crecimiento bacteriano con glicerol y sacarosa es similar al obtenido con manitol (Reginensi, 1992). En forma general, la estructura del polisacárido producido por la especie microbiana es independiente del sustrato carbonado utilizado, aunque *Pseudomonas* puede modificar el polisacárido producido al variar la fuente de carbono utilizada para el crecimiento del microorganismo (Sutherland, 1990). En la mayoría de los estudios de producción de goma por *Rhizobium* se ha utilizado manitol en concentraciones de 5 a 10 g/l (Zevenhuizen, 1984; Breedveld *et al.*, 1990b), aunque en algunos casos la fuente ha sido glucosa (Ghai *et al.*, 1981) o fructosa (Courtois *et al.*, 1986). Breedveld *et al.* (1990a) estudiaron el efecto de diferentes niveles de manitol (2.5 a 50 g/l medio) sobre la producción de exopolisacáridos en 10 días de fermentación. Los resultados de este trabajo muestran que los efectos positivos sobre la producción de polisacáridos fueron igualmente a tasas decrecientes por cada unidad adicional de manitol agregada.

Probablemente los efectos decrecientes en la respuesta en producción de exopolisacáridos al incrementarse el aporte de una fuente de carbono, sean debidas a que la reducción de su concentración en el medio por el crecimiento microbiano incrementa la fuerza de manejo necesaria para su transferencia desde el medio hacia el interior de la célula. Por otra parte, esta menor transferencia de la fuente de carbono hacia la célula puede ser causada por interferencia del mismo exopolisacárido producido en el medio y circundando a la célula microbiana (Funahashi *et al.*, 1987). En *Xanthomonas campestris*, concentraciones mayores a 50 g/l de glucosa en el medio inicial de cultivo tienen efectos negativos sobre el



crecimiento bacteriano y la producción de xantana, por lo que proponen utilizar niveles iniciales menores (42 g/l medio) y concluida la fase logarítmica de crecimiento bacteriano mantener concentraciones de 30 a 40 g/l por adiciones rutinarias. Esta estrategia de producción de gomas ha sido utilizada con éxito en *Xantomonas campestris* (Funahashi et al., 1987, Rajeshwan et al., 1995), esto permitiría mejorar la tasa específica de producción del polisacárido.

Sin embargo, en el género *Rhizobium* se debe tener en cuenta que la producción de polisacáridos genera más de un producto polimérico (polisacárido capsular,  $\beta$ -1-2-glicanos y polisacárido de alto peso molecular). Zevenhuizen (1986) trabajando con un sistema de dos fases, con una concentración inicial de manitol de 50 g/l en el medio de cultivo y un aporte adicional de 10 g/l en la fase de producción del polisacárido de alto peso molecular, encontró que el incremento de la producción de polisacárido era principalmente a nivel capsular con sólo pequeños cambios en los polisacáridos extracelulares. Los cambios encontrados en la concentración de estos últimos fueron fundamentalmente en  $\beta$ -1-2-glicanos. Por lo tanto, las condiciones de cultivo para la producción dependerá del tipo de polisacárido que se requiera (Zevenhuizen, 1986).

El efecto del aporte de nitrógeno sobre los promedios de producción del exopolisacárido en 10 días de fermentación se presenta en el Cuadro 6, mientras que los promedios de producción diaria se incluyen en el Cuadro 7. Los promedios de producción de exopolisacárido en 10 días de fermentación fueron de 5.84, 7.04 y 5.72 g/l de medio, mientras que la producción diaria fue de 0.76, 0.88 y 0.79 g/l, para un aporte de 0.37, 0.75 y

1.5 g de extracto de levadura. El análisis de la información (Cuadro 8 y 9) indicó la presencia de efectos cuadráticos altamente significativos ( $P < 0.0001$ ), lo cual permitiría concluir que las concentraciones intermedias utilizadas fueron óptimas para la producción de goma.

Las cantidades óptimas de nitrógeno para la producción de exopolisacáridos que surgen de esta información son cercanas al óptimo requerimiento calculado para el crecimiento microbiano (Aiba *et al.*, 1973; Bergensen, 1961) y coincidente con las concentraciones utilizadas en trabajos de crecimiento y producción de polisacáridos utilizando *Rhizobium*. Entre las fuentes de nitrógeno que se han utilizado para el crecimiento de *Rhizobium* la más común es el ácido glutámico, cuyo aporte es de 0.08 a 0.09 g N/l de medio de cultivo (Bergensen, 1961; Zevenhuizen y van Neerven, 1983; Zevenhuizen, 1984, 1986; Breedveld *et al.*, 1990a). Bergensen (1961) estudio la utilización de diferentes fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno sobre el crecimiento de *Rhizobium*, concluyendo que la fuente más adecuada es el ácido glutámico y que los aportes de nitrógeno inorgánico conducen a menores tasas de crecimiento bacteriano. Courtois *et al.* (1986) utilizó 0.18 g N/l de medio de cultivo en forma de extracto de levadura para estudios de producción de exopolisacáridos en *Rhizobium*, lo cual es coincidente con las recomendaciones que se han realizado para los medios de cultivo utilizados en *Xanthomonas campestris* (De Vuyst *et al.*, 1987; García-Ochoa *et al.*, 1992).

Diferentes autores han presentado resultados concluyentes que indican que las relaciones carbono-nitrógeno (C/N) bajas favorecen un crecimiento celular acelerado, mientras que relaciones elevadas estimulan la producción de exopolisacárido y el nitrógeno es solamente

aportado para el crecimiento celular (Slodki y Cadmus, 1978, Jarman *et al.* 1978). Sin embargo, es de considerar en *Rhizobium* el tipo de polisacárido que se seleccione para producción y en este caso las modificaciones en el nitrógeno contenido en el medio puede cambiar el patrón de polisacáridos excretados. Zevenhuizen (1986) aumentó 4 veces el aporte de ácido glutámico basal (1 g/l), con esta modificación logró bajas concentraciones de exopolisacáridos solubles de alto peso molecular y polisacárido capsular, pero aumento a 4 g/l de medio la producción de  $\beta$ -1-2-glicanos de bajo peso molecular. Posteriormente, Breedveld *et al.* (1990a) trabajaron con un medio de cultivo para alto crecimiento celular incrementando el contenido de manitol (2.5 hasta 50 g/l) y ácido glutámico (0.5 hasta 10 g/l), pero manteniendo la relación carbono/nitrógeno constante. La producción de proteína microbiana se incrementó a lo largo de todo el rango estudiado, aunque por ambas de 20 g/l de manitol y 4 g/l de ácido glutámico los aumentos de biomasa no fueron proporcionales a la concentración del sustrato. En términos de producción de polisacáridos se encontró un aumento en la producción de exopolisacárido de alto peso molecular hasta niveles de 20 g/l de manitol y 4 g de ácido glutámico (hasta 2.7 g/l), disminuyendo a mayores concentraciones de sustrato. En cambio, la producción de exopolisacárido de bajo peso molecular ( $\beta$ -1-2-glicanos) aumento considerablemente hasta la máxima concentración de sustrato utilizada (50 g/l manitol y 10 g/l ácido glutámico) llegando a una producción de 10.9 g/l, lo cual representa un rendimiento del 21.8% del manitol inicialmente agregado. Por lo tanto, las cantidades de nitrógeno aportada al medio y el manejo de las relaciones carbono/nitrógeno del medio pueden permitir la dirección de la fermentación hacia los productos deseados.

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los promedios de producción de polisacárido para el período de 10 días de fermentación (Cuadro 6) y la producción diaria (Cuadro 7) para los diferentes niveles de aporte de  $Mg^{++}$  en el medio de cultivo. La producción total en 10 días de fermentación fue de 6.33, 6.65 y 7.00 g/l, mientras la producción diaria fue de 0.75, 0.86 y 0.89 g/l de medio para las concentraciones de 0.33, 0.67 y 1.01 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O/l$  de medio, respectivamente. El análisis presentado en el Cuadro 8 indica la inexistencia de efectos significativos lineales ( $P < 0.16$ ) o cuadráticos ( $P < 0.09$ ), mientras que el análisis para la producción diaria (Cuadro 9) indicó la existencia de efectos significativos lineales ( $P < 0.01$ ) y cuadráticos ( $P < 0.02$ ). Conociendo que el  $Mg^{++}$ , junto con el  $K^+$  y en menor grado el  $Ca^{++}$ , son requeridos en forma esencial para lograr óptimo crecimiento (Sutherland, 1990), es probable que los efectos encontrados sobre la producción diaria del polisacárido sean atribuibles a la acción que ejerce sobre el crecimiento bacteriano, más que un efecto directo sobre la síntesis del exopolisacárido. García-Ochoa *et al.* (1992) que trabajando con *Xantomonas campestris* encontró efectos del  $Mg^{++}$  sobre el crecimiento del cultivo pero no afectó la producción de xantana, lo cual es coincidente con lo obtenido con en este trabajo al evaluar producción total. En algunos microorganismos productores de polisacáridos como *Arthrobacter* y *Hansenula* el  $Mg^{++}$  tiene efectos directos sobre la producción de goma y en medios con menos de 0.4 g/l la producción es afectada fuertemente (Slodki y Cadmus, 1978). El  $Mg^{++}$  está involucrado en diferentes actividades celulares y juega un papel importante en el control de la actividad de la enzima que intervienen en la síntesis extracelular, por lo que niveles bajos en el medio de cultivo podría reducir o incluso detener la síntesis de polisacáridos (Evans *et al.*, 1979).

Los niveles de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  utilizados en el crecimiento de *Rhizobium* es de 0.2 g/l de medio de cultivo (Zevenhuizen, 1984, 1986, Zevenhuizen y van Neerven, 1983, Breedveld *et al.*, 1990a) aunque Ghai *et al.* (1981) utiliza 0.5 g/l de medio. En *Xanthomonas* es frecuente el uso de 0.2 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (De Vuyst *et al.*, 1987, Jarman *et al.*, 1978) hasta niveles recomendados mas elevados de 1.1 a 1.3 g/l (Rajeshwari *et al.*, 1995, Garcia-Ochoa *et al.*, 1992). Los niveles que se sugieren optimos en este trabajo están dentro de las concentraciones medias utilizadas en el rango de estudio lo cual es superior a lo que normalmente se utiliza actualmente en los medios de *Rhizobium*.

El efecto de diferentes niveles del  $CaCO_3$  sobre la producción promedio de exopolisacando total se presenta en el Cuadro 6, mientras que el Cuadro 7 presenta la información promedio para la producción diaria. Las medias de producción total de exopolisacandos en 10 días de fermentación fueron 6.10, 6.80 y 6.80 g/l de medio, mientras las producciones diarias fueron de 0.81, 0.86 y 0.85 g/l de medio para los niveles de 0, 1.5 y 3.0 g/l de  $CaCO_3$  en el medio. El análisis de la información para producción total (Cuadro 8) y diaria (Cuadro 9) indicó la existencia de efectos cuadráticos significativos ( $P < 0.05$ ). Los niveles de inclusión de  $Ca^{++}$  exceden ampliamente los requerimientos bacterianos y por tanto están por encima de las concentraciones normalmente utilizadas en la literatura de *Rhizobium* que se utiliza entre 0.04 g/l de medio en la forma de  $CaCl_2$  (Zevenhuizen, 1984, 1986, Breedveld *et al.*, 1990a) hasta 0.5 g/l de medio en la forma de  $CaCO_3$  (Ghai *et al.*, 1981), otras bacterias productoras de polisacáridos (Jarman *et al.*, 1978). Los efectos detectados en este caso se atribuyen a la regulación que ejerce el  $CaCO_3$  sobre los cambios de pH en el medio de cultivo en crecimiento. La influencia del  $CaCO_3$  en la producción de polisacandos (curdian) ha sido

reportado *Agrobacterium tumefaciens* var *myxogenes* y se considera el mejor agente amortiguador posible para la producción con este microorganismo. La utilización de otros buffer no ha logrado los niveles de producción alcanzados con  $\text{CaCO}_3$ , aunque se alcanzaran niveles de pH similares. El  $\text{CaCO}_3$  funciona para neutralizar el polisacárido ácido producido a medida que este es formado. La concentración de  $\text{CaCO}_3$  utilizada es de 10 g/l por litro de medio (Slodki y Cadmus, 1978, Harada *et al.*, 1993).

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los promedios de producción de polisacárido en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y diaria (Cuadro 7) cuando se utilizaron diferentes niveles de inclusión de  $\text{Fe}^{+++}$  en el medio de cultivo. La producción total de polisacárido fue de 6.60, 6.72 y 6.40 g/l, mientras la producción diaria fue de 0.85, 0.86 y 0.79 g/l, cuando se utilizaron 0, 50 y 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3/\text{l}$  de medio de cultivo, respectivamente. El análisis de la información indicó la existencia de efectos cuadráticos significativos ( $P < 0.02$ ) de la inclusión de  $\text{Fe}^{+++}$  en el medio de cultivo.

Los niveles utilizados en *Rhizobium* han sido de 2-2.5 mg/l a 10 mg/l de medio de cultivo (Bergensen, 1961, Zevenhuizen, 1984, 1986, Zevenhuizen y van Neerven, 1983) hasta 10 mg/l de medio de cultivo (Humphrey y Vincent, 1959, Courtois *et al.*, 1986). Los resultados indican que las cantidades intermedias del rango utilizado en este trabajo pueden ser las indicadas para un medio optimizado, lo cual sería superior a las máximas concentraciones utilizadas en los trabajos con *Rhizobium*.

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los promedios de producción de polisacárido en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y diaria (Cuadro 7) cuando se utilizaron diferentes niveles de

inclusión de  $Mn^{2+}$  en el medio de cultivo. La producción promedio de polisacáridos en 10 días de fermentación fue de 6.76, 6.77 y 6.02 g/l, mientras que la producción diaria fue de 0.90, 0.84 y 0.85 g/l de medio de cultivo para las concentraciones de 0, 200 y 400  $\mu M$   $MnSO_4 \cdot H_2O/l$ , respectivamente. El análisis de la información indicó la existencia de un efecto cuadrático significativo ( $P < 0.004$ ) en la producción total del polisacárido en 10 días de fermentación, no presentando efectos en la producción diaria ( $P > 0.10$ ). El  $Mn^{2+}$  participa en la biosíntesis del polisacárido y participa en el control de los mecanismos de transcripción (Sodki y Cadmus, 1978). Appanna y Preston (1987) encontraron que la utilización de un aporte de 400  $\mu M$  de  $Mn^{2+}$  en *Rhizobium N<sub>1</sub>*, el microorganismo sintetizó un polisacárido que presentó una marcada diversidad respecto al producido en medio control sin adición de sales de  $Mn^{2+}$ . Las variaciones encontradas se concentraron en un aumento de los carbohidratos se incrementaron en un 18.7% sobre los niveles del control, una reducción aproximada al 50% en el contenido de ácidos urónicos y cambios en la estructura del polímero. El polímero presentó aumentos en la viscosidad y estos cambios son atribuidos a una adaptación del microorganismo para poder atrapar al  $Mn^{2+}$  en exceso en el medio.

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los promedios de producción de total en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y diaria (Cuadro 7) en medios con diferentes aportes de  $Fe^{3+}$ . Los promedios obtenidos para producción en 10 días de fermentación fueron de 6.60, 6.72 y 6.40 g/l de medio, mientras que las producciones diarias fueron de 0.85, 0.86 y 0.79 g/día para concentraciones de 0, 50 y 100  $\mu M$   $FeCl_3/l$  de medio, respectivamente. El análisis de la información indica la existencia de efectos cuadráticos significativos ( $P < 0.02$ ). Appanna

(1988) trabajando con *Rhizobium meliloti* JJ-1 en medios de cultivo conteniendo concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+++}$  o sin adición del mismo, encontró efectos estimulantes del  $\text{Fe}^{+++}$  sobre el crecimiento con una reducción del tiempo de generación medio a 7.5 h respecto al control (8.2 h), y una duplicación en la producción de polisacárido excretado al medio (127 vs 64 mg/100 ml). Es conocido el papel que tiene el  $\text{Fe}^{+++}$  como nutriente esencial de los organismos vivos y puede tener efectos sobre la estimulación del crecimiento (Lankford, 1973; Arceneaux *et al.*, 1984). Appanna (1988) considera que los cambios en la producción y composición del polisacárido producido en medios con metales ( $\text{Fe}^{+++}$  y  $\text{Al}^{+++}$ ) puede deberse a las propiedades de atrapar estas moléculas o que realmente puedan estar involucrados en la biosíntesis del exopolisacárido.

La producción total y la producción diaria del exopolisacárido presento en forma consistente una interacción positiva y significativa ( $P < 0.02$ ) de hierro\*manganeso. Esto indicaría que la presencia de ambos nutrientes en el medio de cultivo puede conducir a un efecto positivo sobre la producción. En la producción de succinoglicanos se ha encontrado que  $\text{Fe}^{+++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  son nutrientes esenciales para la producción del polímero y deben ser incluidos en el medio de cultivo. Slodki y Cadmus (1978) consideran que estos micronutrientes actúan activando el crecimiento celular ( $\text{Mn}^{++}$ ) y la producción del polisacárido ( $\text{Fe}^{+++}$ ). Requerimientos de ambos nutrientes han sido reportados en el género *Hansenulla* para la obtención de una eficiencia óptima en la fermentación y producción de polímeros (Slodki y Cadmus, 1978).

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los promedios de producción total en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y diaria (Cuadro 7) para diferentes concentraciones de  $\text{Al}^{+++}$  en el



medio de cultivo. La producción total fue de 6.72, 6.72 y 7.09 g/l de medio, mientras la producción diaria fue de 0.91, 0.84 y 0.84 g/l para concentraciones de 0, 50 y 100 mM de  $Al_2(SO_4)_3$  /l de medio. El análisis de la información indica la inexistencia de efectos lineales o cuadráticos significativos ( $P>0.05$ ) en el modelo para producción total o producción diaria. La utilización de  $Al^{+++}$  en concentraciones de 100  $\mu M$  de  $Al^{+++}$ /l condujeron a una severa reducción en el crecimiento celular y un mayor periodo de incubación para la producción del polisacárido. Sin embargo, la producción del exopolisacárido fue superior a la del control sin aluminio (127 vs 64 mg/100 ml) atribuyendo este comportamiento a causas similares a las comentadas anteriormente para el  $Fe^{+++}$  (Appanna, 1988). El aluminio presentó asimismo interacción con la biotina en el modelo ajustado para producción diaria del polisacárido, lo cual podría ser atribuido a los efectos detrimentales que tiene sobre el crecimiento.

El efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre la producción total y diaria se presenta en los Cuadros 6 y 7. La producción total de exopolisacárido fue de 6.51, 6.95 y 6.99 g/l, mientras que la producción diaria fue de 0.85, 0.86 y 0.91 para 0, 10 y 20  $\mu g/l$  de medio, respectivamente. La biotina no presentó efectos significativos ( $P>0.10$ ) sobre la producción total o la producción diaria, sin embargo en producción diaria presentó interacción positiva con magnesio. Los efectos positivos de la biotina en el crecimiento de *Rhizobium* ha sido reportado previamente (Bergersen, 1961). El trabajo de Bergersen (1961) estableció respuestas en crecimiento de *Rhizobium* hasta niveles de 250  $\mu g$  de biotina. La biotina es utilizada en forma rutinaria en los medios de cultivo para producción de polisacáridos (Zevenhuizen, 1984, 1986, Breedveld *et al.*, 1990a).

En los Cuadros 6 y 7 se presentan los efectos de la inclusión de penicilina en el medio de cultivo sobre la producción total en 10 días de fermentación (Cuadro 6) y diaria (Cuadro 7). La producción total promedio fue de 5.98, 6.80 y 6.64 g/l y para producción diaria 0.78, 0.86 y 0.85 g/l para concentraciones de 0, 1.5 y 3.0 mg/l de medio. El análisis de la información permitió encontrar efectos cuadráticos significativos ( $P < 0.01$ ) sobre la producción total y diaria.

Los efectos positivos de los antibióticos sobre la producción de polisacáridos ha sido reportada previamente (Deretic *et al.*, 1986) y para goma xantana se ha asociado a la penicilina como un buen índice de la calidad del polisacárido excretado (Torrestiana *et al.*, 1990). La penicilina presentó interacciones positivas y significativas ( $P < 0.07$ ) con magnesio en producción diaria y producción total. En cambio presentó correlaciones negativas y significativas ( $P < 0.07$ ) con manganeso.

En base a la información obtenida previamente se optimizaron los medios para producción total y diaria de exopolisacárido que se presentan en el Cuadro 10. Estas concentraciones optimizadas se utilizaron en la siguiente fase de matraz durante el ajuste de otras variables para el medio de cultivo.

Cuadro 10. Medios optimizados en base a la producción diaria y producción total de polisacáridos de *R. phaseoli*

COMPUESTO	MEDIO DE CULTIVO	MEDIO DE CULTIVO
	Producción diaria MEDIO A	Producción total MEDIO B
MÁNITOL g / l	25.1	25.4
EXTRACTO DE LEVADURA g / l	0.76	0.7
SULFATO DE ALUMINIO $\mu\text{M}$ / l	57.5	66.4
CLORURO FERRICO $\mu\text{M}$ / l	50.7	0
CARBONATO DE CALCIO g / l	1.70	3.79
SULFATO DE MAGNESIO g / l	0.73	1.3
SULFATO MANGANOSO $\mu\text{M}$ / l	256.5	0
BIOTINA $\mu\text{g}$ / l	8.06	3.6
PENICILINA mg / l	1.46	2.9

#### 5.1.1.2. Efecto del pH inicial del medio

En base a la información anterior se definieron los medios de cultivo A y B, los cuales fueron incubados bajo diferentes condiciones de pH inicial del medio. Los resultados obtenidos en esta etapa se presentan en el Cuadro 11. Como se aprecia en ambos medios se incrementa la producción de exopolisacárido al incrementarse el pH inicial y los pH finales en el medio tienden a incrementarse a medida que aumenta el pH inicial. El análisis de la información correspondiente a producción se presenta una interacción entre el medio utilizado y el pH inicial, cuyo análisis indica que la producción de polisacárido en el medio B es similar entre pH de 7 a 8, y es superior en pH 8. La producción máxima lograda con el medio B fue de 10.5 g/l lo cual implica un incremento respecto a los valores presentados anteriormente. *Rhizobium phaseoli* es una bacteria acidificadora y su crecimiento es favorecido por pH

neutro o alcalino, y bajo esas condiciones el crecimiento celular se ve favorecido con alta producción de biomasa (Reginensi, 1992) y la producción de metabolitos microbianos.

Cuadro 11. Efecto del pH inicial sobre la producción de exopolisacárido (EPS) y el pH final obtenido en el medio

Medio de Cultivo	pH inicial	pH final	Producción de EPS (g/l)
<i>Medio A</i>	6	5.7	7.77
	7	5.9	8.24
	8	6.2	8.70
<i>Medio B</i>	6	5.8	7.84
	7	5.9	8.00
	8	6.0	10.47

#### 5.1.1.3. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno utilizada

La fuente de carbono utilizada en la primera etapa fue manitol y la construcción del medio optimizado para producción diaria sugería la utilización 25.1 g/l de medio de cultivo. Resultados previos (Reginensi, 1992) indicaban que en el caso de *Rhizobium phaseoli* los índices de crecimiento en cultivo podrían sustituir el manitol por otra fuente con iguales o mejores resultados. La producción con manitol (10.5 g/l) no presentó diferencias significativas ( $P > 0.10$ ) con lo obtenido con dextrosa (9.8 g/l), sin embargo la utilización de sacarosa mejoró ( $P < 0.01$ ) incrementó la producción a 16 g/l.

La producción en matraz fue evaluada sustituyendo el extracto de levadura por un sustrato inorgánico (sulfato de amonio). La producción lograda en medio de sacarosa con sulfato de

amonio fue inferior al testigo logrando 12.52 g/l Humphrey y Vincent (1959) utilizaron nitrato de potasio como fuente inorganica de nitrógeno, sin embargo, Bergersen (1961) encontró que las fuentes de nitrógeno no proteico tienen menores sobre el crecimiento de *Rhizobium* que las fuentes orgánicas, y entre estas últimas el ácido glutámico condujo a las mejores tasas de crecimiento. Los trabajos de producción de exopolisacáridos con *Rhizobium* utilizan en general una fuente orgánica de nitrógeno, principalmente ácido glutámico.

#### 5.1.1.4 Efecto de la temperatura del cultivo

En base a la información de temperatura existente en la literatura se probaron temperaturas de 30 y 34°C sobre la producción de exopolisacárido. La producción del polímero con temperatura de 34°C se redujo a 12 g/l respecto a 16 g/l en el control a 30°C. En estudios previos realizados en *Rhizobium phaseoli* (Reginensi, 1992) indicaron que la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) del microorganismo es afectado por la temperatura de acuerdo a un modelo de tipo cuadrático:  $\mu = -2.207 + 0.158(T) - 0.003(T)^2$ , donde T es la temperatura de incubación del medio de cultivo. De esta información surge una temperatura óptima de 30°C, posteriormente a la cual la reducción del crecimiento es marcada y probablemente esto explica la reducción en la producción del polímero en este estudio. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que los incrementos de la temperatura hasta 33°C pueden conducir a un cambio en el tipo de exopolisacáridos producidos por *Rhizobium* aumentando considerablemente la producción  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos (Breedveld *et al.*, 1990a).

En base al estudio realizado con las condiciones de producción del exopolisacárido se definió que el medio óptimo para la producción de exopolisacárido en la cepa utilizada de *Rhizobium phaseoli* debe crecer a pH=8 y con temperaturas de 30°C. La constitución del medio de crecimiento se presenta en el Cuadro 12.

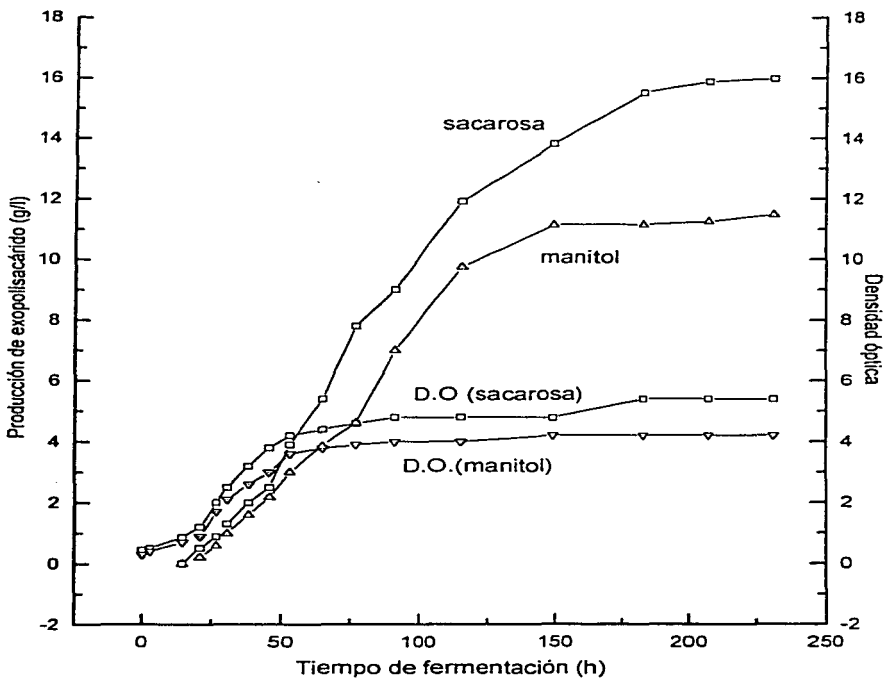
Cuadro 12. Medio Optimizado para la producción de exopolisacárido en *Rhizobium phaseoli* (pH = 8 y 30 ° C).

COMPUESTO	CONCENTRACION
SACAROSA (g/l)	25.1
EXTRACTO DE LEVADURA (g/l)	0.76
CARBONATO DE CALCIO (g/l)	1.70
SULFATO DE MAGNESIO (g/l)	0.73
SULFATO MANGANOSO (µM/l)	256.5
CLORURO FERRICO (µM/l)	50.7
SULFATO DE ALUMINIO (µM/l)	57.5
BIOTINA (µg/l)	8.06
PENICILINA (mg/l)	1.46

#### 5.1.1.5. Producción de exopolisacáridos en matraz con el medio optimizado.

En la Figura 2 se puede observar la evolución de la producción del exopolisacárido total a lo largo del periodo de fermentación cuando se utilizaron manitol y sacarosa. De esta información surge que la tasa de producción es mayor con sacarosa y que con esta fuente se mantiene la excreción por un periodo mayor de tiempo. La producción se inicia en la fase logarítmica de crecimiento del microorganismo y se prolonga en la fase estacionaria. Probablemente las diferencias en producción puedan ser explicadas por un mayor crecimiento microbiano cuando se utiliza sacarosa como fuente. Resultado previos del

Figura 2. Crecimiento y producción de exopolisacáridos totales usando manitol y sacarosa como fuentes en el medio optimizado

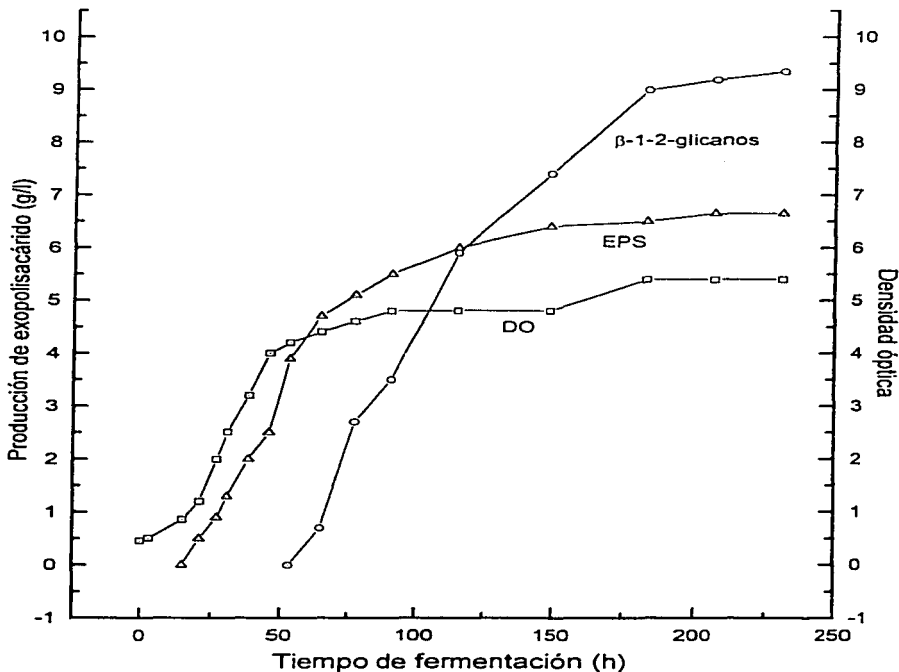


estudio de *Rhizobium phaseoli* con diferentes fuentes de carbono permiten confirmar el buen comportamiento de crecimiento de esta cepa cuando se utiliza sacarosa (Reginensi, 1992)

Posteriormente, el exopolisacárido producido en cultivo con sacarosa fue separado de acuerdo al peso molecular (alto y bajo peso) y los resultados se presentan en la Figura 3. Como se aprecia entre las 20-25 h de crecimiento del cultivo comienza la producción del exopolisacárido de alto peso molecular coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial del cultivo. Este crecimiento se prolonga hasta la primera parte de la fase estacionaria para mantenerse constante posteriormente a las 150 h de fermentación. A partir de las 50 horas de cultivo inicia la producción de polisacáridos de bajo peso molecular ( $\beta$ -1-2-glicanos) cuyo incremento se prolonga hasta poco antes de la finalización del periodo de fermentación. Estos resultados son coincidentes con lo obtenido por Zeeuwen (1986) que encuentran una separación en el tiempo en la producción de los exopolisacáridos de alto y bajo peso molecular, obteniendo una producción de 4 g/l de exopolisacáridos de bajo peso molecular y 1.5 g/l de alto peso molecular. Posteriormente, Breedveld *et al.* (1990a) reportan una alta concentración de exopolisacáridos de bajo peso molecular en cultivos con 50 g/l de manitol y una producción de 10.9 g/l de  $\beta$ -1-2-glicanos. La producción de polisacáridos de alto peso molecular fue de 4.8 g/l. Estos resultados son comparables a los obtenidos en este trabajo en términos de producción aunque las concentraciones de sacarosa utilizadas correspondieron a la mitad de la utilizada por Breedveld *et al.* (1990a). Estos resultados permiten concluir que el potencial de la cepa utilizada de *Rhizobium phaseoli* se encuentra dentro de los más altos reportados en la literatura en el medio optimizado para la misma. Por



Figura 3. Producción de exopolisacáridos de alto peso molecular (EPS) y  $\beta$ -1-2-glicanos durante la fermentación en matraz con sacarosa.



otra parte hay una clara separación en el tiempo en la producción de ambos polisacáridos y esta puede ser una alternativa de manejo de la fermentación para lograr el polisacárido deseado.

### 5.1.2. PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO EN FERMENTADOR.

En la Figura 4 se presenta la evolución de la producción de exopolisacáridos en cultivo en fermentador utilizando el medio optimizado. El tiempo de fermentación fue de 100 horas y las condiciones de fermentación se ajustaron a  $T=30^{\circ}\text{C}$ , 400 rpm,  $\text{pH}=8$  y aireación=1 VVM. Como se aprecia la producción en este periodo la alcanzó un peso seco total de 10.8 g/l, correspondiendo 9.2 g/l al exopolisacárido de alto peso molecular y 1.6 g/l al polímero de bajo peso molecular. La máxima concentración de biomasa se obtuvo a las 28 h con 3.6 g/l en base a peso seco que coincide con el comienzo de la liberación del EPS de bajo peso molecular. Probablemente, la producción del polisacárido de bajo peso molecular en este periodo, se asocia al inicio de la muerte celular luego de la fase exponencial de crecimiento, más que a un mecanismo activo de excreción (Breedveld y Miller, 1994).

En la Figura 5 se presenta gráficamente la producción total de exopolisacárido en relación al consumo de sacarosa y producción de biomasa (peso seco y proteína celular). La información obtenida en esta etapa fue ajustada a un modelo matemático que describe la cinética de fermentación de acuerdo a la ecuación logística descrita por Weiss y Ollis (1980).

Figura 4. Peso seco celular y producción de exopolisacáridos de Rhizobium phaseoli en fermentador con medio optimizado

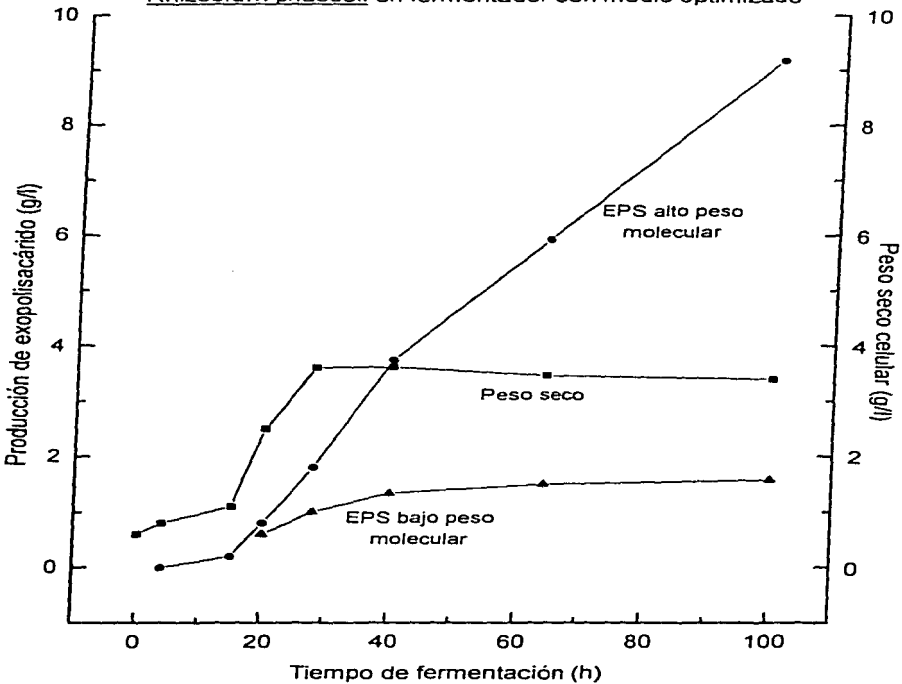
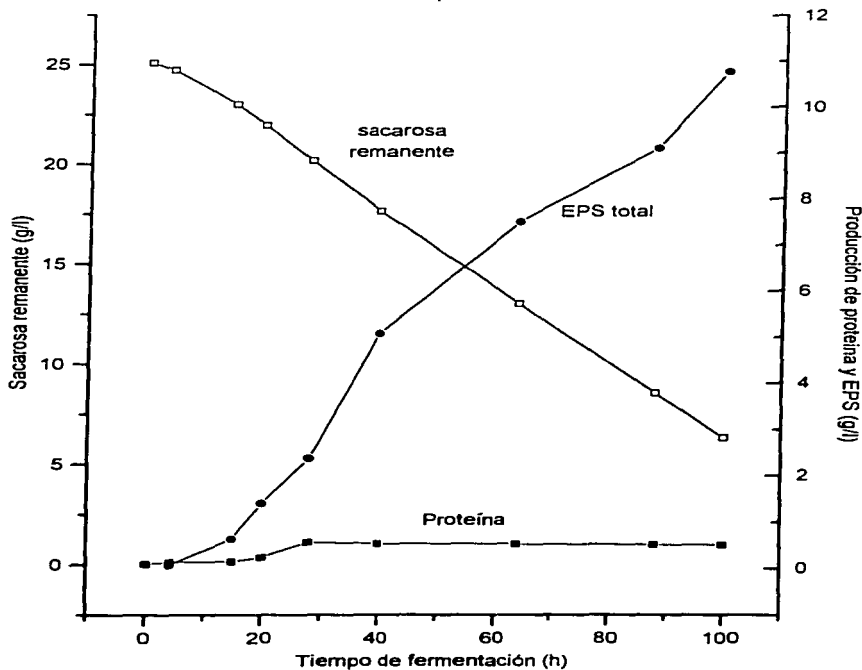


Figura 5. Producción de proteína, exopolisacárido total y sacarosa remanente durante el periodo de fermentación



$$\text{BIOMASA} = X_{(t)} = X_0 \cdot X_m \cdot \exp(\mu \cdot \text{hora}) / (X_m - X_0 \cdot (1 - \exp(\mu \cdot \text{hora})))$$

donde

$X_0$  = concentración inicial de biomasa (g/l)  $0.46 \pm 0.06^*$

$X_m$  = máxima concentración de biomasa (g/l)  $3.10 \pm 0.47^*$

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )  $0.11 \pm 0.04^*$

\* (error estándar)

La producción máxima de exopolisacáridos en 100 h de fermentación fue de 10.76 g/l y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) para *Rhizobium phaseoli* bajo estas condiciones de crecimiento fue de  $0.106 \text{ h}^{-1}$ , y la producción máxima de biomasa fue de 3.10 g/l. El estudio de la producción de exopolisacárido en relación a la biomasa se analizó de acuerdo a la ecuación propuesta para la formación de producto de Luedeking-Piret (Weiss y Oltis, 1980) donde expresan

$$\text{PRODUCTO} = P_{(t)} = P_0 + \alpha (X_m / \mu) \ln [ 1 - (X_0 / X_m) (1 - e^{-\mu t}) ] + \beta X_0 e^{-\mu t} / [ 1 - (X_0 / X_m) (1 - e^{-\mu t}) ]$$

donde

$P_0$  = concentración inicial del producto (g/l)

$\alpha$  = constante (relacionada al crecimiento) (g producto / g biomasa / hora)

$\beta$  = constante (relacionado a la biomasa instantánea) (g producto / g biomasa)

Las constantes obtenidas fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) diferentes de cero y los valores obtenidos fueron  $\alpha = 0.341$  (g EPS/g biomasa/hora) y  $\beta = 0.792$  (g EPS/g biomasa). La

producción de exopolisacárido esta asociada a la biomasa instantánea (presente en el momento) y por el crecimiento. De acuerdo a los valores presentados la biomasa instantánea esta más relacionada con la producción que con el crecimiento del cultivo

El estudio del consumo de sustrato en relación a la producción de biomasa se analizó de acuerdo a la ecuación de Luedeking-Piret (Weiss y Ollis, 1980):

$$\text{SUSTRATO} = S_m = S_0 - n(X_m - X_0) - m(X_m/\mu) \ln [ 1 - (X_0/X_m)(1 - e^{-\mu t}) ]$$

donde.

$S_0$  = sustrato inicial (g / l)

$n$  = constante (g fuente de C / g biomasa)

$m$  = constante (g fuente de C / g biomasa / hora)

Los valores obtenidos fueron significativamente diferentes ( $P < 0.0001$ ) de cero, con  $n = 1.57$  (g Sacarosa/g Biomasa) y  $m = 0.057$  (g Sacarosa / g Biomasa / hora). El consumo de sacarosa está en función de la biomasa instantánea y por la velocidad de crecimiento. Por lo tanto, la mayor parte del consumo de sacarosa estaría relacionado con la biomasa instantánea presente.

## 5.2. CARACTERIZACION REOLOGICA DEL EXOPOLISACARIDO

### 5.2.1 Determinación de la viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca se calculó para cada uno de los polímeros por la intercepción en la ordenada de las regresiones para  $\eta$  reducida y la  $\eta$  inherente. Las Figuras 6 a la 9 presentan gráficamente los relatos de estas regresiones. En el Cuadro 13 se detallan las  $[\eta]$  obtenidas en este estudio.

Cuadro 13. Comparación de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  calculada para los diferentes polímeros en estudio

Polisacárido	Viscosidad intrínseca evaluada en agua (dl/g)
Xantana	7,099
Alginato	5,336
EPS de <i>Rhizobium</i>	3,730
Guar	1,882
Algarrobo	897
Carboximetilcelulosa	774

Los resultados logrados en esta etapa muestran que el polisacárido de alto peso molecular, aislado de la cepa de *Rhizobium phaseoli*, presenta una viscosidad intrínseca intermedia entre valores superiores de xantana y alginato de sodio, e inferiores de las gomas guar, carboximetilcelulosa (CMC) y algarrobo.

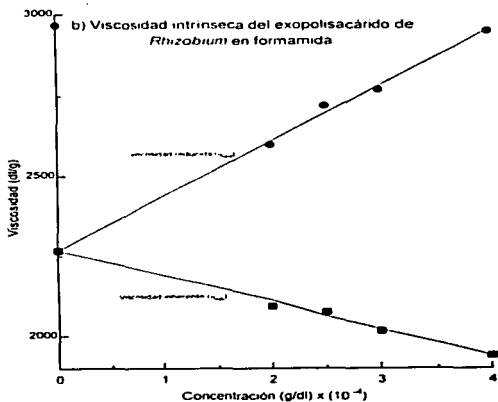
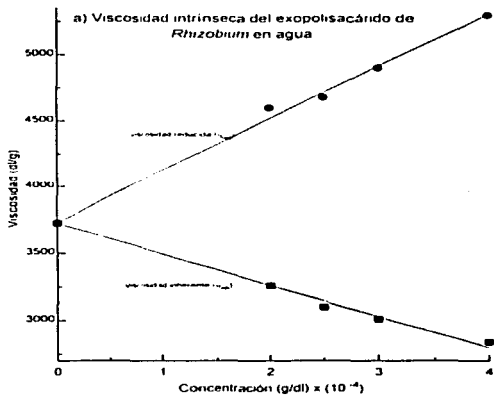


Figura 6. Valores de viscosidad intrínseca (dl/g) del polímero de *Rhizobium phaseoli* FES-C1 en soluciones de agua (a) y en formamida (b).



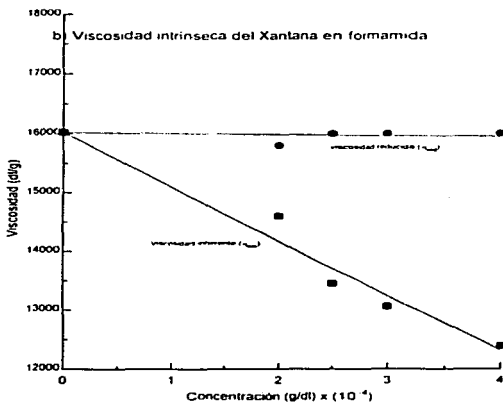
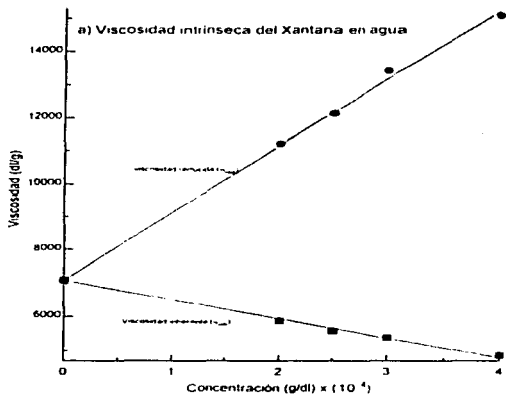


Figura 7. Valores de viscosidad intrínseca (dl/g) del polímero de xantana en soluciones de agua (a) y en formamida (b).

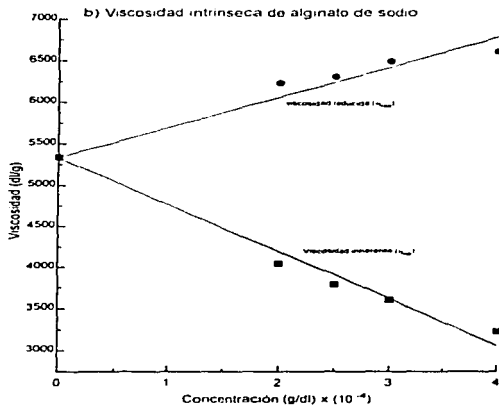
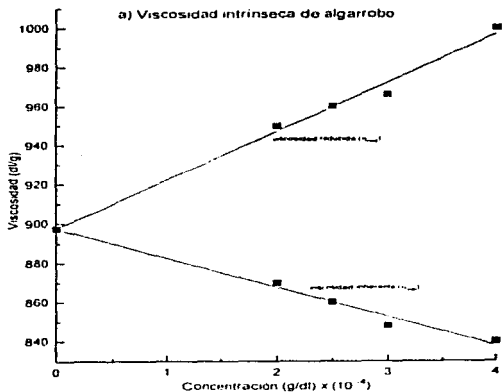


Figura 8. Valores de viscosidad intrínseca (dl/g) del polímero de algarrobo (a) y alginato de sodio (b) en soluciones de agua.

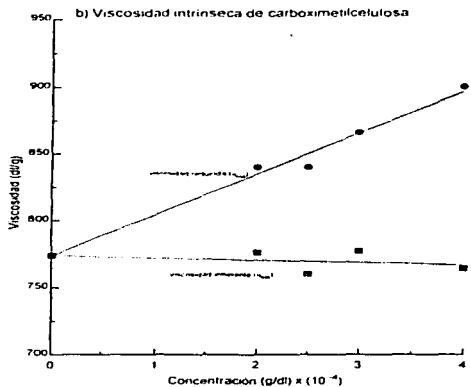
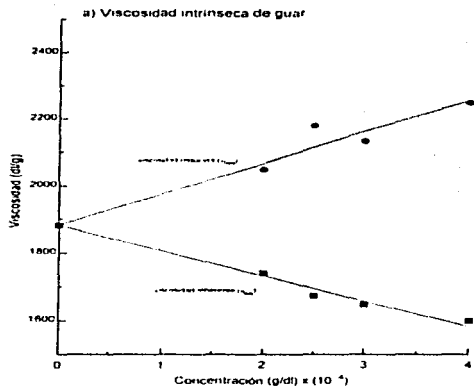


Figura 9. Valores de viscosidad intrínseca (dl/g) del polímero de guar (a) y carboximetilcelulosa (b) en soluciones de agua.

ESTA COPIA DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En el Cuadro 14 se presentan los valores para los parámetros de Huggins ( $K'$ ) y de Kraemer ( $K''$ ). Estos coeficientes se calcularon en soluciones acuosas para todos los polisacáridos en estudio y en formamida para xantana y el exopolisacárido de *Rhizobium* debido a su mayor solubilidad. Los coeficientes  $K'$  o  $K''$  nos indican el grado de solubilidad del polímero y las variaciones que experimenta con el cambio en el solvente utilizado.

Cuadro 14 Resumen de las constantes de Huggins ( $K'$ ) y de Kraemer ( $K''$ ) para el polisacárido de alto peso molecular de *R. phaseoli* y diferentes gomas comerciales

Polisacárido	$K'$ con agua	$K'$ con formamida	$K''$ con agua	$K''$ con formamida
Xantana	$3.64 \times 10^{-3}$	$8.02 \times 10^{-3}$	$-1.1 \times 10^{-3}$	$-3.4 \times 10^{-3}$
Alginato	$5.60 \times 10^{-4}$		$-1.7 \times 10^{-3}$	
EPS de <i>Rhizobium</i>	$2.48 \times 10^{-3}$	$3.26 \times 10^{-3}$	$-1.5 \times 10^{-3}$	$-1.6 \times 10^{-3}$
Guar	$5.41 \times 10^{-3}$		$-1.9 \times 10^{-3}$	
Algarrobo	$3.09 \times 10^{-3}$		$-1.8 \times 10^{-3}$	
CMC	$5.47 \times 10^{-4}$		$-1.6 \times 10^{-4}$	

Desde el punto de vista físico, la existencia de diferencias en los valores de  $K'$  al utilizar distintos solventes puede indicar la rigidez de la partícula o la dificultad de penetración del solvente (Walton y Blackwell, 1973). La goma xantana mostró una amplia diferencia en los valores  $K'$  con los dos solventes utilizados, lo cual sugiere que el grado de expansión o de contracción del biopolímero difiere considerablemente al variar el solvente. En cambio los valores de  $K'$  para el polisacárido de *Rhizobium* en los dos solventes no presentaron la magnitud de las diferencias observadas en xantana, lo cual podría indicar una mayor rigidez. Los resultados obtenidos para  $K''$  en estos exopolisacáridos presentaron las mismas tendencias de variación para los dos polímeros en los dos solventes utilizados, y en el caso de *Rhizobium* los valores en estos solventes fueron similares.

La información disponible, a partir de estos resultados en el polisacárido de *Rhizobium phaseoli* nos indica que posee un peso molecular intermedio y un adecuado comportamiento hidrodinámico en ambos solventes

### **5.2.2. Determinación de Curvas de Flujo en el Medio de Cultivo en el Transcurso de la Fermentación**

En las Figuras 10 y 11 se observan las curvas de flujo (viscosidad aparente y  $\tau$  en relación a la velocidad de deformación  $\dot{\gamma}$ ) en muestras del medio de cultivo de *Rhizobium phaseoli*, obtenidas a diferentes horas en el transcurso de la fermentación. El índice de consistencia ( $K$ ) se incrementa a medida que aumenta la viscosidad del medio, y es particularmente apreciable a partir de las 40 horas de iniciada la fermentación, continuando en aumento hasta el final de la misma. Estos cambios son atribuibles al inicio de la producción del polisacárido en el medio hacia el final de la etapa logarítmica de crecimiento y a la acumulación del mismo a medida que aumenta el tiempo de fermentación. El comportamiento del fluido en el muestreo de las primeras horas de fermentación (28 h) es prácticamente newtoniano y en esta etapa la viscosidad es independiente de la rapidez de deformación. A medida que avanza la fermentación el medio se vuelve más viscoso y el comportamiento del fluido es no-newtoniano presentado cambios en la viscosidad al variar la rapidez de deformación. Hacia el final de la fermentación el comportamiento del fluido es del tipo pseudoplástico reofluidizante.

Los resultados obtenidos en esta etapa, se ajustaron a un comportamiento reológico que puede ser descrito matemáticamente por el modelo Ostwald de Waele. Utilizando esta relación matemática, la

Figura 10. Variación en la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) en diferentes tiempos de fermentación en lote.

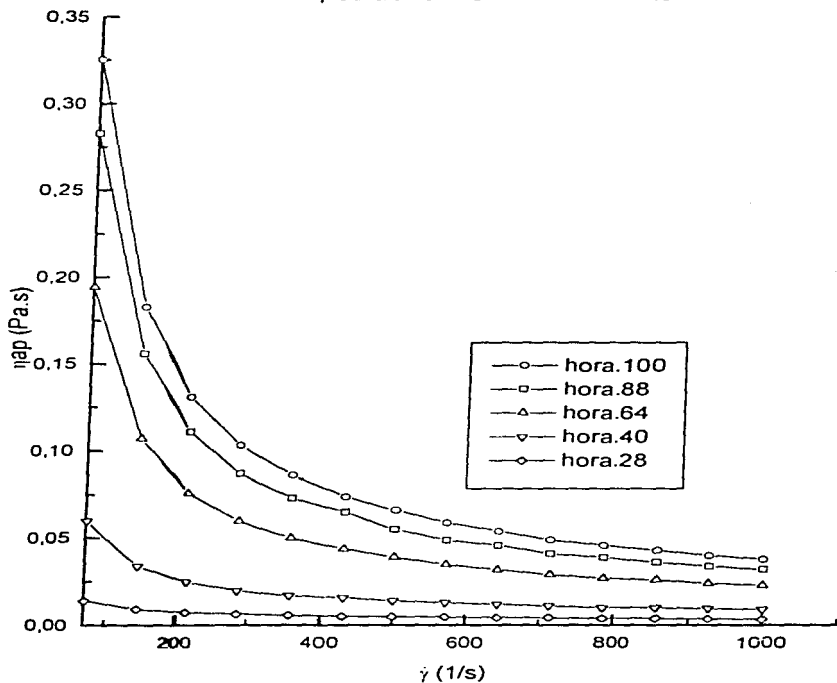
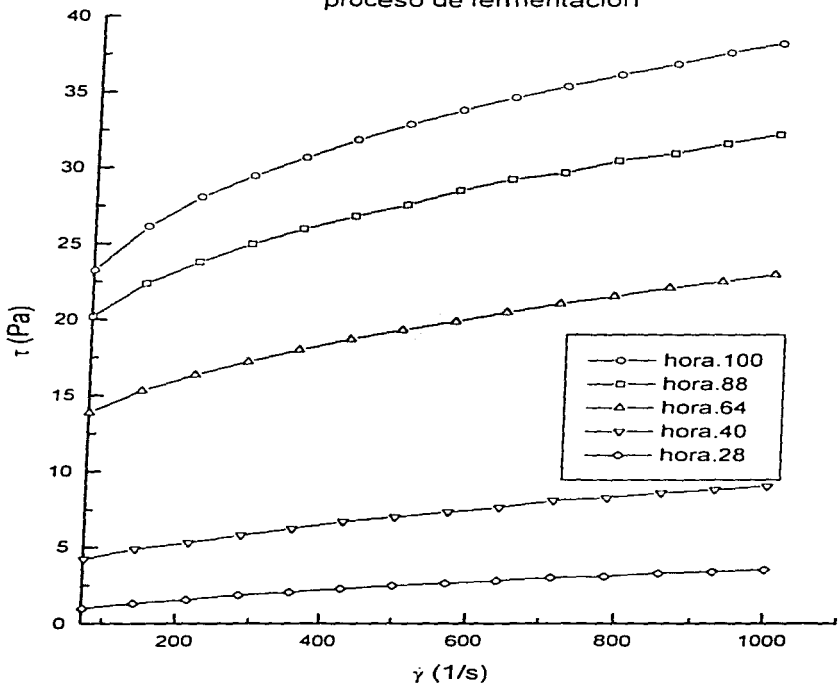


Figura 11. Curvas de flujo en diferentes horas del proceso de fermentación



viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) aparece como una función de la rapidez de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) Como se aprecia en el Cuadro 15 al avanzar el tiempo de fermentación se presenta un incremento en los valores de  $K$  hasta alcanzar  $10.1 \text{ Pa s}^n$  a las 100 horas de incubación, lo cual indica un aumento en la viscosidad global del fluido y a su vez presenta un descenso en los valores del índice de flujo ( $n$ ) hasta 0.19 Desde el punto de vista reológico las propiedades deseables en un polímero están asociadas con altos valores de  $K$  y bajos valores de  $n$ , lo cual permite obtener alta  $\eta_{ap}$  a baja velocidad de deformación y un comportamiento reofluidizante (disminución de la viscosidad en función de la velocidad de deformación) lo que facilita el manejo en tuberías o filtración a nivel industrial. En *Rhizobium phaseoli* no se dispone de información que permita comparar los resultados obtenidos para estas variables. En xantana comercial en concentraciones de polisacáridos similares a las obtenidas en el medio de fermentación utilizado en este trabajo, los valores determinados para  $K$  y  $n$  fueron de  $34.5 \text{ Pa s}^n$  y 0.23 (Kennedy et al., 1982). Estos autores trabajando con *Xanthomonas campestris* IC 19 en diferentes medios de cultivo determinaron los valores de  $K$  y  $n$  en el medio de fermentación. Los valores de  $n$  determinados por estos autores fueron tan altos como 0.86 hasta valores similares a los deseados en el producto comercial (0.22) cuando se vanó la fuente de nitrógeno en el medio, mientras que los valores de  $K$  fueron tan bajos como  $0.21 \text{ Pa s}^n$  hasta valores de  $28.8 \text{ Pa s}^n$  que se acercan a los deseados para un polisacárido comercial adecuado. Estos resultados indicarían que el exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* bajo las condiciones de este estudio no mostraron las altas consistencias obtenidas en xantana, aunque los valores de  $n$  fueron inferiores (0.19). Es importante señalar el contenido de proteína extraída del medio utilizado en este trabajo y los efectos detrimentales que puede tener sobre las propiedades reológicas del fluido. Como se aprecia en el Cuadro 15 el contenido de proteína celular al final de la fermentación alcanzó valores de  $0.98 \text{ g/l}$  y la presencia de estas cantidades podría tener efectos antagonicos o sinérgicos sobre las propiedades reológicas del



medio Normalmente los fluidos con altos valores de  $K$  y bajos valores de  $n$  se asocian a la presencia de niveles bajos de aminoácidos (Kennedy *et al.* 1982) en fermentaciones similares a las reportadas para xantana Cuando comparamos con las determinaciones en el polisacárido aislado y purificado a una concentración similar que se logra a las 100 horas de fermentación (1%), los valores de consistencia encontrados en el fluido de fermentación fueron superiores

Cuadro 15 Índice de consistencia ( $K$ ), índice de flujo ( $n$ ) de la ecuación de Ostwald, producción de exopolisacárido y de proteína celular en el transcurso de la fermentación

Horas	$k$ (Pa s <sup>n</sup> )	$n$	Promedio de Producción de EPS (g/l)	Producción de proteína celular (g/l)
0	--	--	0	0.05
4	--	--	0.08	0.13
15	--	--	0.64	0.16
20	0.10	0.50	1.41	0.37
28	0.12	0.49	2.38	1.13
40	1.02	0.31	5.08	1.06
64	5.50	0.20	7.50	1.05
88	8.83	0.18	9.10	1.00
100	10.1	0.19	10.76	0.98

En forma adicional se determinó el comportamiento del polisacárido cuando se disminuían las velocidades de deformación una vez alcanzado el máximo esfuerzo dentro del rango en estudio. En esta forma se pudo demostrar que el polímero no presenta cambios dependientes del tiempo de cizallamiento en  $\eta_{sp}$  y  $\tau$ , lo cual indica el comportamiento reversible del polisacárido al vanar la velocidad de deformación aplicada sobre el mismo.

### **5.2.3. Efecto del tratamiento térmico y diferentes sales en el comportamiento reológico del exopolisacárido.**

#### **5.2.3.1. Efecto del tratamiento térmico**

##### **5.2.3.1.1. Pruebas de Flujo.**

El estudio del comportamiento reológico del polisacárido aislado y purificado se realizó en dispersiones o en soluciones utilizando una concentración del 1%, las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos térmicos. En las Figuras 12 y 13 se presenta la información correspondiente al efecto de la temperatura (96° C por 10 min y 121° C por 15 min) sobre el comportamiento de flujo. En la Figura 12 se aprecia para todas las curvas un aumento de  $\tau$  al incrementarse la  $\dot{\gamma}$ , y el polisacárido sin tratamiento térmico presentó una  $\tau$  mayor para una misma velocidad de deformación respecto a los tratados térmicamente. También la gráfica indica que a medida que la velocidad de deformación aumenta las diferencias en  $\tau$  entre los tratamientos térmicos se incrementan. En la Figura 13 se muestran los cambios en viscosidad aparente para los diferentes tratamientos térmicos aplicados al polisacárido en estudio. Desde el punto de vista reológico es de interés que algunos polisacáridos mantengan sus características de viscosidad con los cambios de temperatura. La goma xantana dispone de buenas características porque presenta cambios pequeños en viscosidad al incrementarse la temperatura entre 0 y 200° C (Cottrell *et al.*, 1980). No obstante, existen otras gomas espesantes que son fuertemente dependientes de la temperatura que también se emplean para modificar la consistencia de los alimentos (Sutherland, 1990).

Figura 12. Variaciones de las curvas de flujo del exopolisacárido al 1% por efecto del tratamiento térmico aplicado al biopolímero

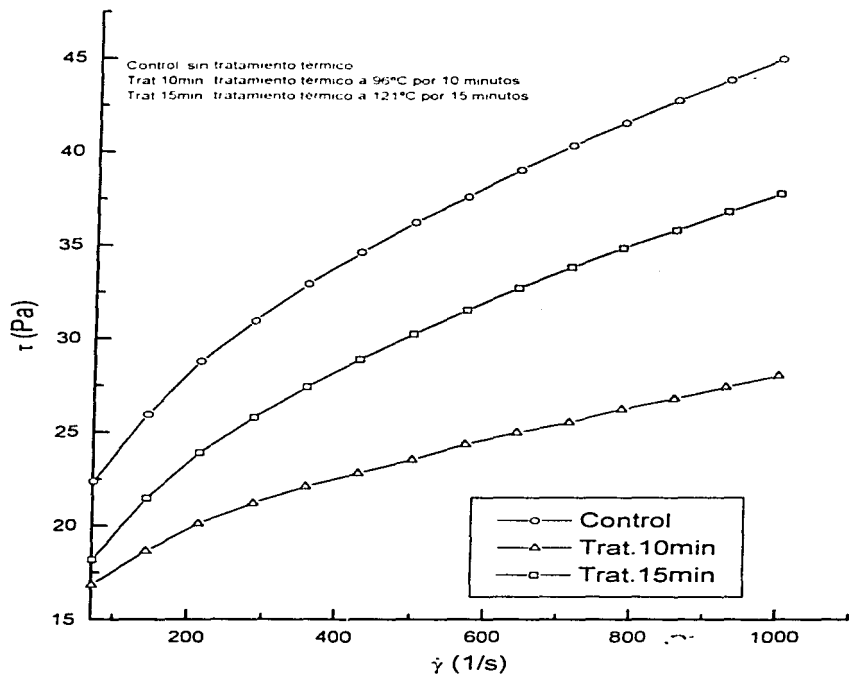
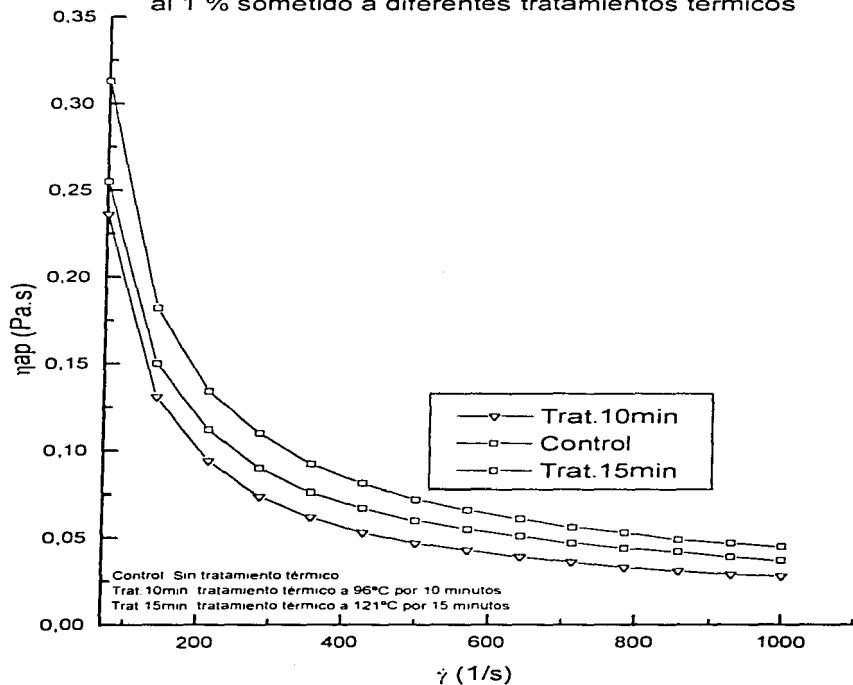


Figura 13. Variación de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) en el biopolímero al 1 % sometido a diferentes tratamientos térmicos



En el Cuadro 16 se presentan los efectos del tratamiento térmico sobre el índice de consistencia (K) y el índice de flujo (n). Como se aprecia en el Cuadro se presenta un descenso en K por efecto del tratamiento térmico, sin embargo la reducción en el índice de consistencia fue mayor para el polisacárido tratado a 96° C por 10 min. respecto al tratamiento de 121° C por 15 min. Por otra parte, para los dos tratamientos térmicos se presentó un incremento similar en el índice de flujo

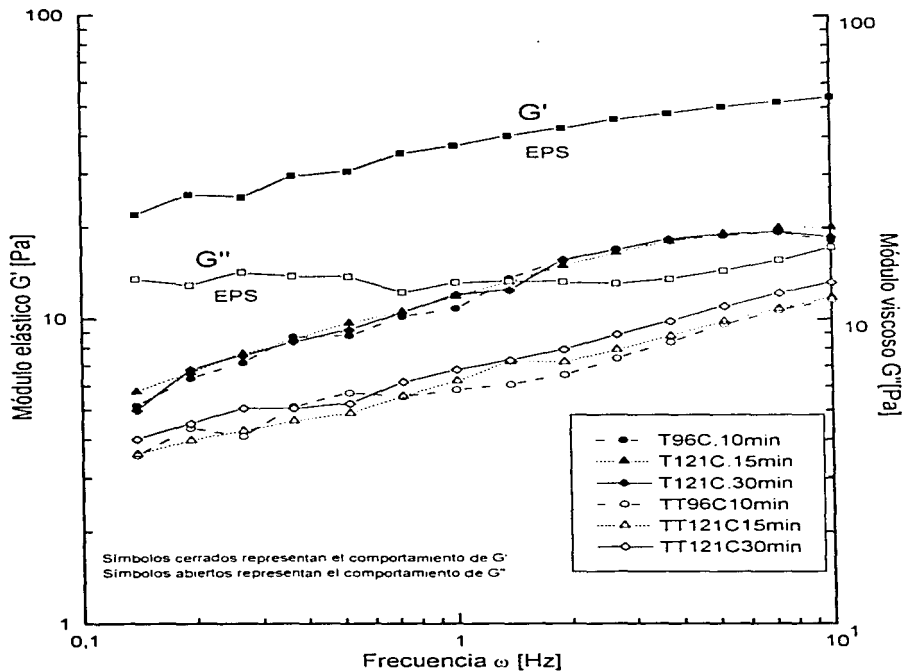
Cuadro 16 Efecto del tratamiento térmico en el comportamiento de flujo del exopolisacando

Tratamiento	Índice de consistencia (K) Pa s <sup>n</sup>	Índice de flujo (n)
EPS 1% (control)	6,9	0,20
EPS 1% + 10 minutos a 96° C	5,1	0,29
EPS 1% + 15 minutos a 121° C	6,5	0,28

#### 5.2.3.1.2. Pruebas viscoelásticas.

En la Figura 14 se puede observar la respuesta viscoelástica del polímero a través de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), indicando que el  $G'$  para el exopolisacárido sin tratamiento térmico es elevado. Esta información es coincidente con los valores obtenidos para el índice de consistencia (K) presentado en el Cuadro 16. El módulo elástico  $G'$  muestra una dependencia de la frecuencia, de esta forma  $G' \cong \omega^n$ , para todos los fluidos de estudio. Por su parte,  $G''$  muestra una dependencia similar. En Cuadro 17 se presentan los valores promedios y la dependencia de  $G'$  y  $G'' \cong \omega$ , para cada tratamiento térmico. El fluido muestra características elásticas en su respuesta puesto que los valores

Figura 14. Efecto del tratamiento térmico sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del polisacárido de Rhizobium phaseoli



de  $G'$  son mayores que los valores de  $G''$  en todas las frecuencias con y sin tratamiento térmico (Yukihiko *et al.*, 1991. Baird y Pettit, 1991) Por otra parte, el comportamiento es típico a un material viscoelástico similar a lo que algunos autores denominan gel débil

En todos los tratamientos térmicos los módulos elásticos y viscosos disminuyeron. La disminución en el módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) fue similar en todos los tratamientos térmicos aplicados (96° C por 10 min, 121° C por 15 min y 121° C por 30 min). Sin embargo, en las curvas de flujo se observaron diferencias entre los tratamientos térmicos. Las formas de las curvas, nos indicaría que es posible que a frecuencias mayores al rango utilizado tenderían a cruzarse y en esta etapa  $G'$  sería menor a  $G''$ , indicando que el polímero podría comportarse como líquido viscoso a partir de ese punto.

Cuadro 17. Efecto del tratamiento térmico sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), en los valores promedios y en la dependencia de  $G'$  y  $G''$ .

Tratamiento	$G'$ Promedio		Función de la Frecuencia $G' \cdot \omega^{-n}$ *		$G''$ Promedio		Función de la Frecuencia $G'' \cdot \omega^{-n}$ *	
	(Pa)	d.e	a	r	(Pa)	d.e	a	r
EPS sin tratamiento térmico	38.43	10.7	0.22	0.99	13.90	1.26	0.04	0.56
EPS con tratamiento térmico a 96° C por 10 min	12.74	5.1	0.31	0.97	6.77	2.47	0.26	0.98
EPS con tratamiento térmico a 121° C por 15 min	13.10	5.1	0.31	0.99	6.93	2.65	0.28	0.99
EPS con tratamiento térmico a 121° C por 30 min	12.89	5.1	0.31	0.97	7.69	2.97	0.28	0.99

d.e = desviación estándar

$G'$  = módulo elástico

$G''$  = módulo viscoso

### 5.2.3.2. Efecto de la adición de sales.

#### 5.2.3.2.1. Pruebas de flujo.

El exopolisacárido producido por *Rhizobium phaseoli* en presencia de sales produce geles débiles que calentados a 96° C regresan a la consistencia líquida y en frío gelifican nuevamente. La formación de geles es favorecida por la presencia de sales catiónicas mono y divalentes como ha sido descrito para los geles de alginato (Mitchell, 1979). Esto es explicado por el grado de entrecruzamiento entre los componentes del polímero y puede ser alterado variando la concentración de iones divalentes necesarios para promover la gelificación. También, el grado de polimerización aumenta con incremento de la flexibilidad (Mitchell, 1979). Sutherland (1990) reporta en la goma gellan que la temperatura para la formación de gel y su dureza depende de la naturaleza del polímero y la concentración del catión, así como de la concentración del exopolisacárido. En este caso la gelificación requiere de dos pasos, uno inicial que conduce a un ordenamiento de las cadenas y una posterior de asociación entre las mismas. En algunos polisacáridos el sitio de unión de los cationes es importante para mantener la estabilidad de la conformación ordenada.

En las Figuras 15 y 16 se evidenciaron cambios en viscosidad e índice de flujo del exopolisacárido tratado térmicamente (control) cuando se le adicionaron sales divalentes y monovalentes. En la Figura 15 se aprecia un incremento importante en la viscosidad por la adición de  $\text{Na}^+$ , mientras que las respuestas a la adición de  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ , fueron sólo levemente superiores al control. En cambio la viscosidad aparente disminuyó respecto al control cuando el catión adicionado fue  $\text{Ca}^{++}$ . Estos



Figura 15. Variación de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) del biopolímero al 1% con tratamiento térmico (121°C por 15 min.) y la adición de diferentes sales al 0.5%.

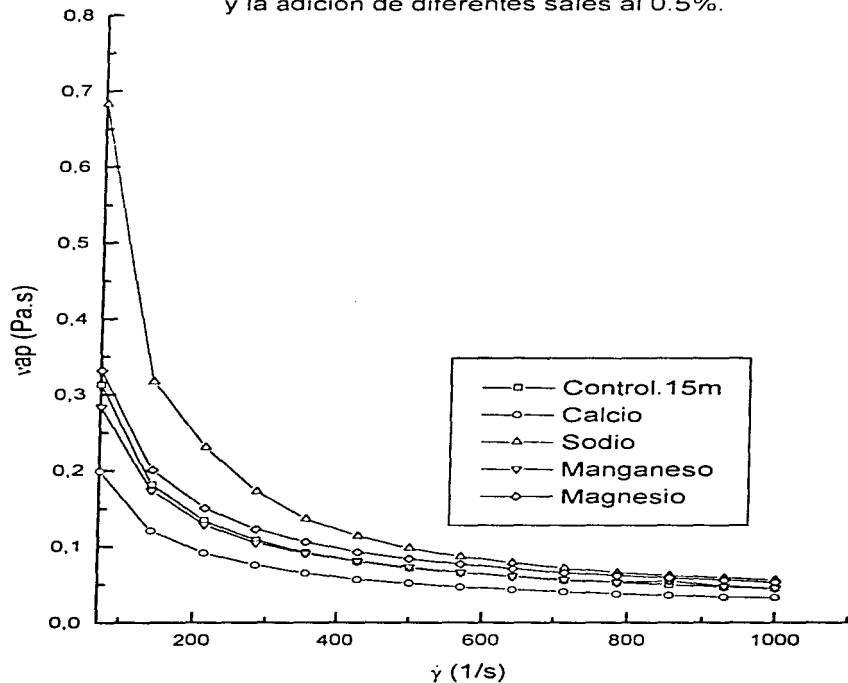
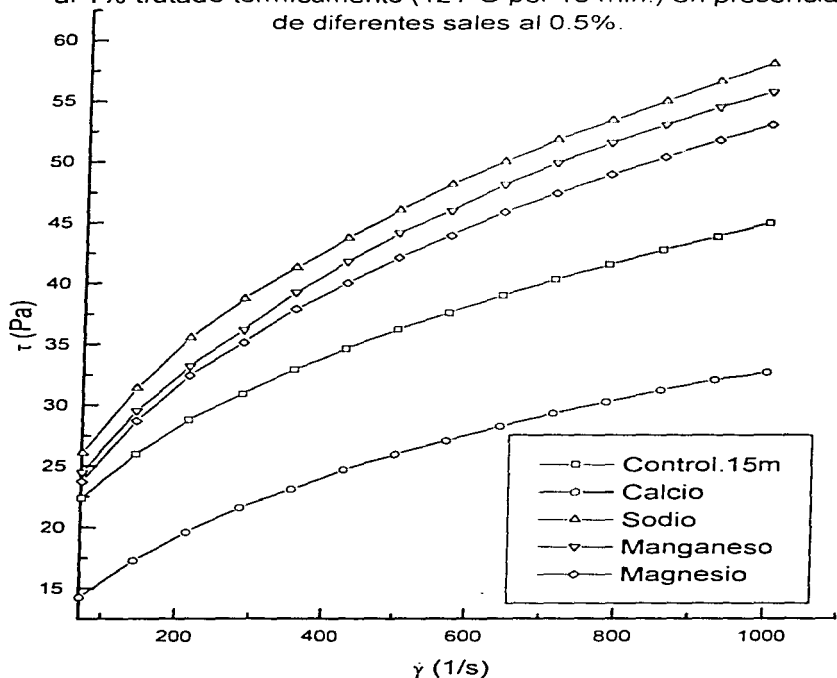


Figura 16. Variaciones en las curvas de flujo en el biopolímero al 1% tratado térmicamente (121°C por 15 min.) en presencia de diferentes sales al 0.5%.



cambios en la viscosidad aparente se presentaron para bajas velocidades de deformación, mientras que en altas las diferencias entre los diferentes cationes y el control se minimizaron. En relación a las curvas de flujo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  presentaron mayores valores que el control, mientras que el  $\text{Ca}^{++}$  presentó valores menores.

En el Cuadro 18 se presentan los índices de consistencia ( $K$ ) y de flujo ( $n$ ) para el polisacárido tratado térmicamente ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min) al cual se le adicionaron sales a una concentración de 0.5% (cuyos equivalentes son para el  $\text{NaCl}$ : 87 mM/g,  $\text{CaCl}_2$ : 45 mM/g,  $\text{MgCl}_2$ : 52 mM/g y  $\text{MnCl}_2$ : 40 mM/g). En todos los casos se presentó una reducción en el índice de consistencia que fue dependiente del tipo de catión adicionado. La reducción fue mayor para el  $\text{Ca}^{++}$  bajando hasta valores de  $K$  de  $3.4 \text{ Pa s}^n$ , intermedia para  $\text{Mg}^{++}$  ( $6.0 \text{ Pa s}^n$ ) y  $\text{Mn}^{++}$  ( $5.1 \text{ Pa s}^n$ ), y mínima en el caso de  $\text{Na}^+$  ( $6.4 \text{ Pa s}^n$ ). Los cambios en el índice de flujo mantuvieron un orden similar con escaso incremento en el caso de  $\text{Na}^+$  (0.30), medio en  $\text{Mn}^{++}$  (0.31) y  $\text{Mg}^{++}$  (0.31), y más elevado en el  $\text{Ca}^{++}$  (0.33).

Cuadro 18 Efecto del tratamiento térmico y la presencia de sales mono y divalentes, en el comportamiento de flujo del exopolisacárido

Tratamiento	Índice de consistencia ( $K$ ) $\text{Pa s}^n$	Índice de flujo
EPS 1% + 15 minutos a $121^\circ\text{C}$	6,5	0,28
EPS 1% + 15 minutos a $121^\circ\text{C}$ + 0.5 % de $\text{MnCl}_2$	5,1	0,31
EPS 1% + 15 minutos a $121^\circ\text{C}$ + 0.5 % de $\text{MgCl}_2$	6,0	0,31
EPS 1% + 15 minutos a $121^\circ\text{C}$ + 0.5 % de $\text{CaCl}_2$	3,4	0,33
EPS 1% + 15 minutos a $121^\circ\text{C}$ + 0.5 % de $\text{NaCl}$	6,4	0,30

### 5.2.3.2. Pruebas viscoelásticas.

En la Figura 17 se observa el efecto de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ ) sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ). En relación a los cambios en el comportamiento de  $G'$  se puede apreciar que los cationes divalentes aumentaron los valores del módulo elástico a lo largo de las diferentes frecuencias utilizadas. Por otra parte, los incrementos fueron diferentes entre los distintos cationes con los mayores aumentos para manganeso y los menores para calcio. Es importante notar que los aumentos en  $G'$  fueron mayores cuando las frecuencias fueron bajas mientras que disminuyeron en las más elevadas cambiando la dependencia del módulo  $G'$  con la frecuencia. En el Cuadro 19 se presentan los valores promedios y la función de la frecuencia para los módulos elásticos y viscosos en relación a la presencia de sales. En ausencia de iones (EPS) la dependencia de  $G'$  con la frecuencia fue  $G' \propto \omega^{0.31}$  mostrando un comportamiento típico de un fluido viscoelástico. La adición de iones conduce a una reducción de esta dependencia con una función  $G' \propto \omega^{0.14}$  ( $\text{Ca}$ ), tendiendo al comportamiento de un sólido viscoelástico.

Cuadro 19 Efecto de diferentes iones sobre los módulos elásticos ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), en los valores promedios y en la dependencia de  $G'$  y  $G''$ .

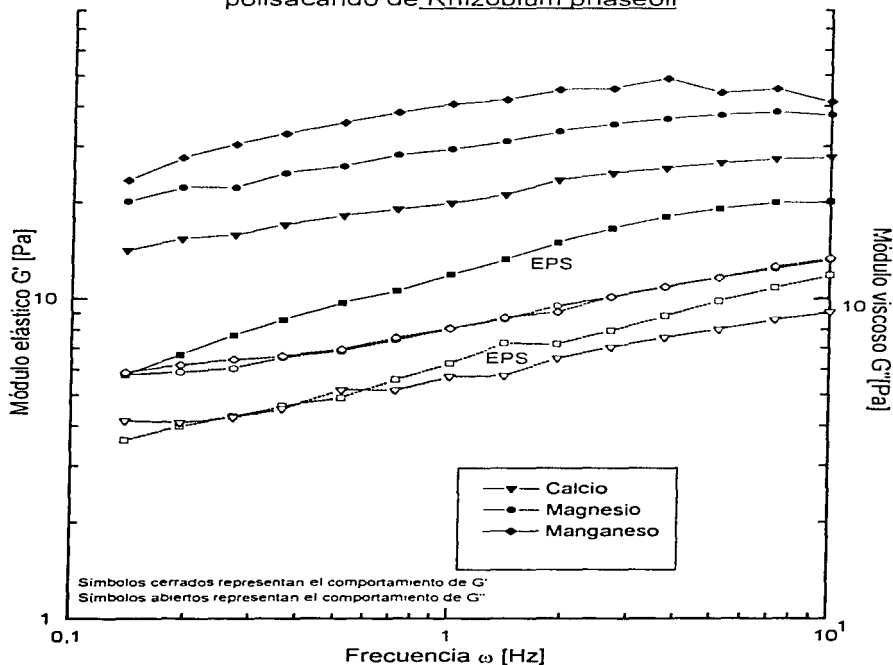
Tratamiento Térmico a 121° C por 15 min	G Promedio		Función de la Frecuencia $G' \propto \omega^a$		G' Promedio		Función de la Frecuencia $G'' \propto \omega^r$	
	(Pa)	de	a	r	(Pa)	de	a	r
EPS (Control)	13.10	5.11	0.31	0.99	6.93	2.65	0.28	0.99
EPS + $\text{MnCl}_2$	38.73	7.65	0.14	0.89	8.89	2.54	0.20	0.99
EPS + $\text{MgCl}_2$	30.27	6.44	0.16	0.98	8.8	2.54	0.23	0.99
EPS + $\text{CaCl}_2$	21.20	4.75	0.14	0.88	6.12	1.70	0.20	0.99
EPS + $\text{NaCl}$	24.80	7.58	0.24	0.98	8.07	2.30	0.20	0.99

d.e. = desviación estándar

G' = módulo elástico

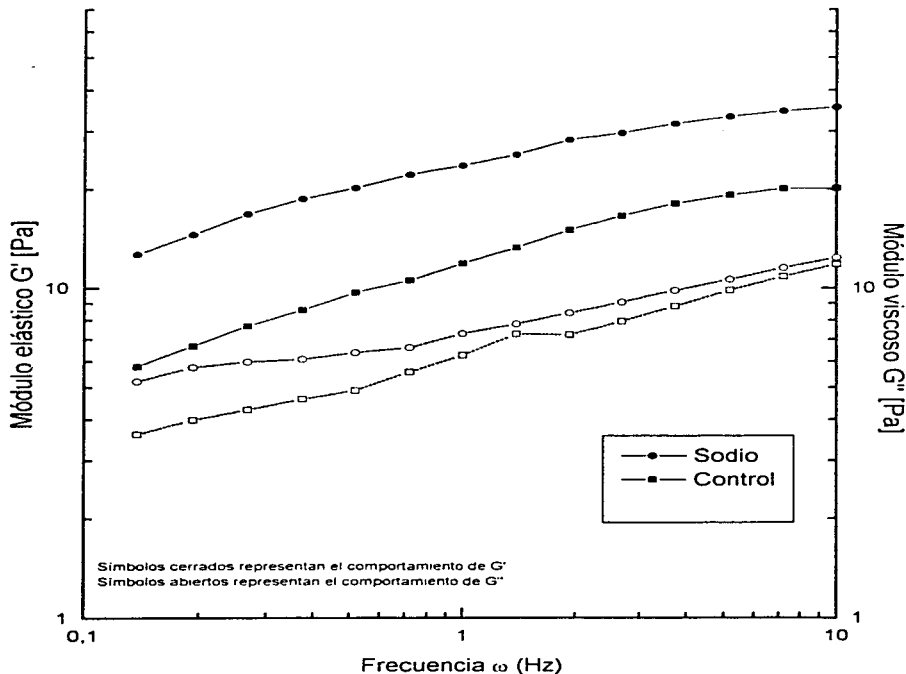
G'' = módulo viscoso

Figura 17. Efecto del tratamiento térmico (121°C por 15 min.) y cationes divalentes (0.5%) sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del polisacárido de Rhizobium phaseoli



En el módulo viscoso ( $G''$ ) el promedio de valores para el biopolímero en soluciones con sales de  $Mn^{++}$  (8 89 Pa  $\pm$  2 54) y  $Mg^{++}$  (8 80 Pa  $\pm$  2 54) se comportaron en forma similar y fueron superiores al control (6 93 Pa  $\pm$  2 65). En el caso de soluciones del biopolímero con sales de  $Ca^{++}$  el promedio de  $G''$  (6 12 Pa  $\pm$  1 70) fue similar al control en frecuencias bajas, mientras que al aumentar las frecuencias los valores de  $G''$  tendieron a disminuir por debajo de los promedios del control sin sales. Los resultados permiten especular sobre cierto grado de selectividad por diferentes cationes, particularmente parecería existir una preferencia por  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$  en relación al  $Ca^{++}$ . En la Figura 18 se presentan los módulos elástico y viscoso al incluir un catión monovalente ( $Na^+$ ). Los valores de  $G'$  se incrementaron respecto al control (13 10 Pa  $\pm$  5 11) por la inclusión de  $Na^+$  y su comportamiento se mantiene a lo largo de las diferentes frecuencias. En comparación a los valores observados en los cationes divalentes, el sodio presentó un comportamiento intermedio dado que los mismos incrementaron los valores de  $G'$  con promedios para  $Mn^{++}$  de 38 73 Pa  $\pm$  7 65, para  $Mg^{++}$  de 30 27 Pa  $\pm$  6 44 y para  $Ca^{++}$  de 21 20 Pa  $\pm$  4 75. Los valores para el módulo viscoso para el caso de sodio (8 07 Pa  $\pm$  2 30) fueron similares a los encontrados con  $Mn^{++}$  y  $Mg^{++}$ , aunque en frecuencias altas la tendencia a acercarse a los valores del control fue más acelerada que en estos cationes divalentes. Por lo tanto, los incrementos en los valores de  $G'$  y  $G''$  con la inclusión de sales dependieron del tipo de catión incorporado que en orden decreciente fueron  $Mn^{++} > Mg^{++} > Na^+ > Ca^{++}$ . El buen comportamiento de los cationes divalentes sobre la gelificación en polisacáridos producidos por *Rhizobium* ha sido reportado por Morns (1991), que considera que estos cationes son más efectivos para la gelificación que los monovalentes. En el presente trabajo los cationes  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  presentaron comportamiento similar en el módulo elástico, cuyas pendientes tienden a cero y se describen por las funciones  $G' \approx \omega^{0.142}$ ,  $G' \approx \omega^{0.160}$  y  $G' \approx \omega^{0.136}$ , respectivamente. Emako (1994) trabajando con la

Figura 18. Efectos de la inclusión de sodio (0.5%) sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del polisacárido de Rhizobium phaseoli



goma gelana indica que la presencia de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  funcionan como ordenadores de la estructura y a bajas concentraciones producen un efecto altamente hidratante sobre los grupos carboxilos. Elliot (1977) establece que las fuerzas iónicas del medio reducen la repulsión entre las cargas adyacentes sobre la cadena del polímero. Morns *et al.* (1981) detallan que en la mayoría de los casos la gelificación ocurre por "zonas de uniones" entre secuencias de las cadenas poliméricas, bajo adecuadas condiciones de temperatura, concentración, fuerza iónica y/o ambiente iónico. Probablemente el  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  permiten establecer uniones más firmes que el  $\text{Ca}^{++}$  en la formación del gel por el establecimiento de uniones cruzadas entre los polisacáridos (Sutherland, 1990, Emako *et al.*, 1994). Las soluciones del polisacárido de *R. phaseoli* con  $\text{Na}^+$ , en condiciones de tratamiento térmico de la goma, mostraron un mejor comportamiento que los divalentes en las pruebas de flujo a través del índice de consistencia. Probablemente exista también una selectividad por  $\text{Na}^+$  en este polisacárido y diversos autores han encontrado, en trabajos con otras gomas, un incremento en el volumen hidrodinámico efectivo de la molécula, lo cual determina un aumento en la viscosidad (Kang y Pettit, 1993; Dunstan *et al.*, 1995; Morns 1987).

### **5.2.3.3. Estabilidad del Exopolisacárido en el almacenamiento refrigerado**

#### **5.2.3.3.1. Pruebas de Flujo**

En el Cuadro 20 se presentan los valores de los índices de consistencia y de flujo para los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{++}$ , cuando el polisacárido tratado a 121° C por 15 min. fueron refrigerados por 5 días. Los valores de K fueron de 5.7 Pa.s<sup>n</sup> para  $\text{Mn}^{++}$  y de 6.62 Pa.s<sup>n</sup> para  $\text{Na}^+$ , presentando valores superiores



a los obtenidos con el tratamiento térmico solamente ( 5.16 y 6.4 Pa s<sup>n</sup> para Mn<sup>++</sup> y Na<sup>+</sup>, respectivamente) Los valores correspondientes al índice de flujo (n) fueron de 0.33 para Mn<sup>++</sup> y 0.31 para Na<sup>+</sup>, respecto a 0.31 sin el tratamiento de refrigeración

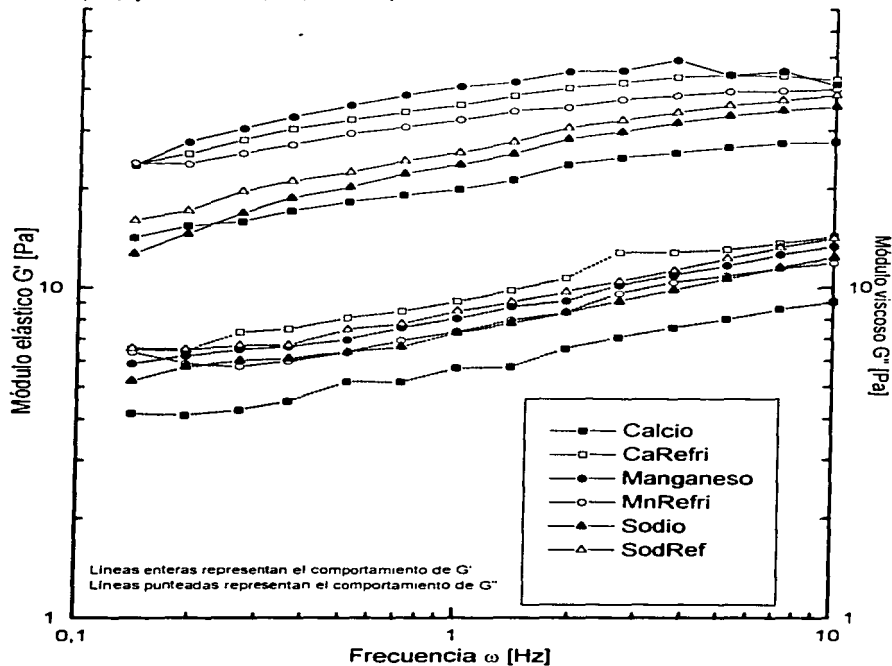
Cuadro 20 Efecto del tratamiento térmico y refrigeración sobre los índices de consistencia y de flujo

Tratamiento térmico 121° C por 15 min / 5 días de refrigeración	Índice de consistencia (K) Pa s <sup>n</sup>	Índice de flujo (n)
EPS 1% + 0.5 % de MnCl <sub>2</sub>	5.76	0.33
EPS 1% + 0.5 % de NaCl	6.62	0.31

#### 5.2.3.3.2. Pruebas viscoelásticas.

En la Figura 19 se presenta el efecto de refrigeración durante 5 días del polisacárido tratado a 121° C por 15 min y en presencia de sales de Mn<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> y Na<sup>+</sup>, sobre los módulos elástico (G') y viscoso (G''). Los resultados para el módulo elástico muestran que el polisacárido refrigerado en presencia de Na<sup>+</sup> (27.3 Pa ± 7.53), presentó un leve incremento en los valores de G' respecto al control no refrigerado (24.8 Pa ± 7.58) a lo largo de todas las frecuencias. En cambio, los incrementos en los valores de G' en refrigeración con sales de Ca<sup>++</sup> (36.06 Pa ± 7.16) fueron amplios respecto al control sin refrigeración (21.2 Pa ± 4.75). En el caso de la inclusión de Mn<sup>++</sup>, la refrigeración condujo a reducciones en los valores de G' a lo largo de todas las frecuencias. Los cambios descritos para el módulo elástico (G') fueron similares para el caso del módulo viscoso (G''). En el Cuadro 21 se presentan los valores promedios y la función de la frecuencia para los módulos elásticos y viscosos en relación a la presencia de sales y la refrigeración. La presencia de sales de Mn<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup> en el

Figura 19. Efecto de la refrigeración sobre los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en el polisacárido con diferentes cationes



biopolimero con y sin tratamiento termico a 4° C. mostraron una dependencia de G con la frecuencia de  $G' \propto \omega^{0.14}$ , tendiendo el biopolimero a un comportamiento de un sólido viscoelástico. lo que sugiere que estos iones favorecen la formacion de un gel debil. Mientras que las sales de Na<sup>+</sup> ( $G' \propto \omega^{0.21}$ ) mostraron un efecto diferente en el comportamiento tendiendo a un fluido viscoelastico. En el módulo viscoso (G'') el promedio de los valores para el exopolisacarido refrigerado y no refrigerado en presencia de iones, en el caso de Mn<sup>2+</sup> refrigerado (8 23 Pa ± 2 21) y no refrigerado (8 89 Pa ± 2 54) mostro un comportamiento similar a las sales de Na<sup>+</sup>. Mientras que la presencia de Ca<sup>2+</sup> en el tratamiento refrngerado (10 04 Pa ± 2 81) y no refrigerado (6 12 Pa ± 1 70) indicaron diferencias importantes por la presencia de este ion. lo que sugiere que la refrigeracion aumentaria la hidratacion del biopolimero. La inclusion de sales con y sin refrigeración presentaron una dependencia de la frecuencia de G' similar para todos los tratamientos. la pendiente nos indica el comportamiento de un fluido viscoelástico.

Cuadro 21 Efecto de la refrigeracion del biopolimero en presencia de sales sobre los modulos elástico (G') y viscoso (G'') en los valores promedios y en la dependencia de G' y G''

Tratamiento	G Promedio		Función de la Frecuencia $G' = \omega^a$		G'' Promedio		Función de la Frecuencia $G'' = \omega^b$	
	(Pa)	de	a	r	(Pa)	de	a	r
EPS + MnCl <sub>2</sub>	38.73	7.65	0.14	0.99	8.89	2.54	0.20	0.99
EPS + MnCl <sub>2</sub> + Refrig	32.60	5.95	0.13	0.98	8.23	2.21	0.19	0.97
EPS + CaCl <sub>2</sub>	21.20	4.75	0.14	0.88	6.12	1.70	0.20	0.99
EPS + CaCl <sub>2</sub> + Refrig	36.06	7.16	0.15	0.96	10.04	2.81	0.21	0.98
EPS + NaCl	24.80	7.58	0.24	0.98	8.07	2.30	0.20	0.99
EPS + NaCl + Refrig	27.30	7.53	0.21	0.99	8.69	3.49	0.20	0.99

d e# desviación estándar  
G' = módulo elástico  
G'' = módulo viscoso

## 5.2.4. Determinación de los índices de consistencia y de flujo a diferente pH.

### 5.2.4.1. Pruebas de Flujo.

Las muestras de EPS se evaluaron a diferentes pH (3, 7 y 11) las muestras se sometieron a un tratamiento térmico de 121° C por 15 min. en ausencia de sales. A pH=11,  $k$  fue de 7,8 Pa s<sup>n</sup> y  $n$  de 0,25, para pH=7,  $k$  fue de 6,5 Pa s<sup>n</sup> y  $n$  de 0,28 y para pH=3,  $k$  fue de 6,6 Pa s<sup>n</sup> y  $n$  de 0,26. A pH alto el comportamiento viscoso del EPS fue mayor mientras que la variación de pH neutro a ácido no afectó el comportamiento reológico respecto a  $k$  y  $n$ . Estos resultados con relación al pH nos indican que no existen variaciones en el comportamiento reológico entre pH=3 y de 7. Mientras que a pH=11 presentó un comportamiento superior lo que se refleja con aumento de  $k$ .

## 5.2.5. Comparación del polisacárido de *R. phaseoli* con soluciones de xantanas comerciales.

### 5.2.5.1. Pruebas de flujo.

En la Figura 20 se presenta la información correspondiente a las curvas de viscosidad del polímero bajo estudio respecto a dos xantanas comerciales. Como se aprecia la xantana 1 presentó una curva con valores superiores a las obtenidas del polímero de *R. phaseoli*, mientras que la segunda goma comercial presentó valores inferiores a velocidades de deformación bajas siendo similares a velocidades altas. La Figura 21 presenta las curvas de flujo en la cual se aprecia que la xantana 1 presentó valores mayores al polisacárido bajo estudio a lo largo de todas las velocidades de

Figura 20. Comparación de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) del biopolímero y dos productos comerciales de xantana al 1%.

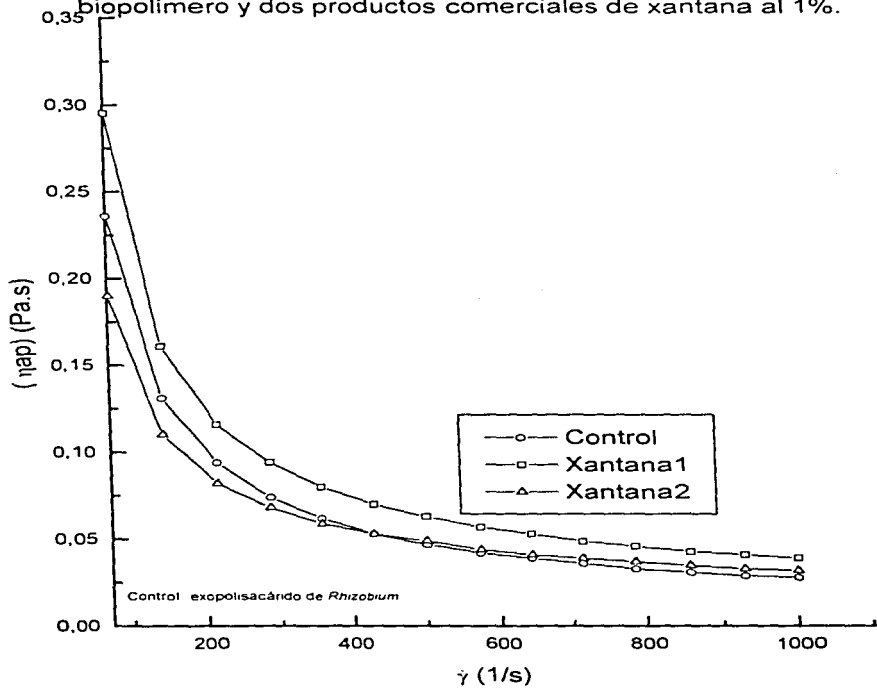
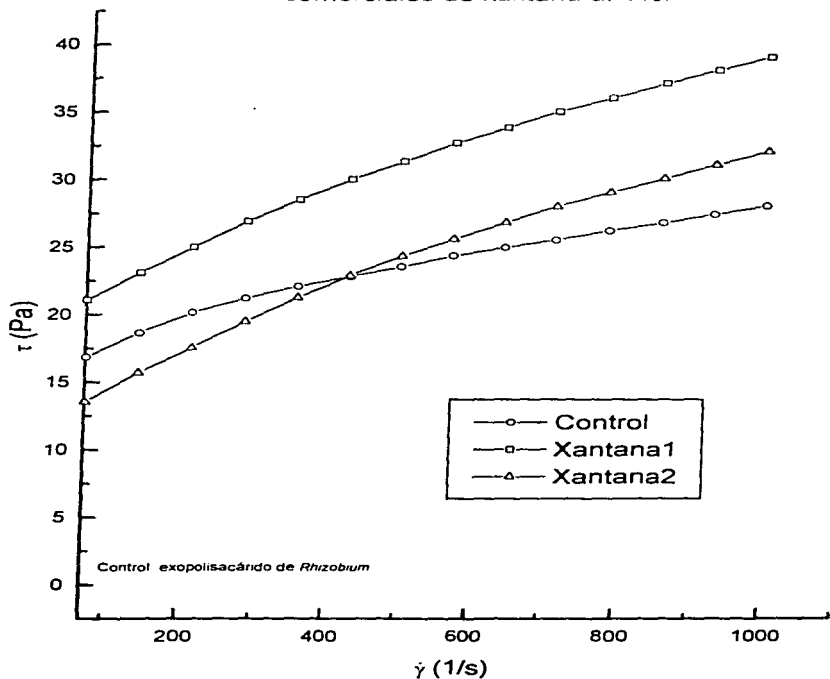


Figura 21. Curvas de flujo del biopolímero y dos gomas comerciales de xantana al 1%.



deformación, en cambio, la xantana 2 presentó valores superiores a velocidades de deformación bajas e inferiores a velocidades de deformación elevadas.

En el Cuadro 22 se presenta la información obtenida de los valores de los índices de consistencia (K) y de flujo (n). Los valores de K fueron de 6.9 Pa s<sup>n</sup> para el polisacárido en estudio, 6.3 Pa s<sup>n</sup> para xantana 1 y 2.6 para xantana 2, mientras que n presentó valores de 0.20, 0.26 y 0.36, respectivamente. El exopolisacárido obtenido presentó características reológicas superiores por el mayor índice de consistencia y menor índice de flujo que las xantanas comerciales probadas.

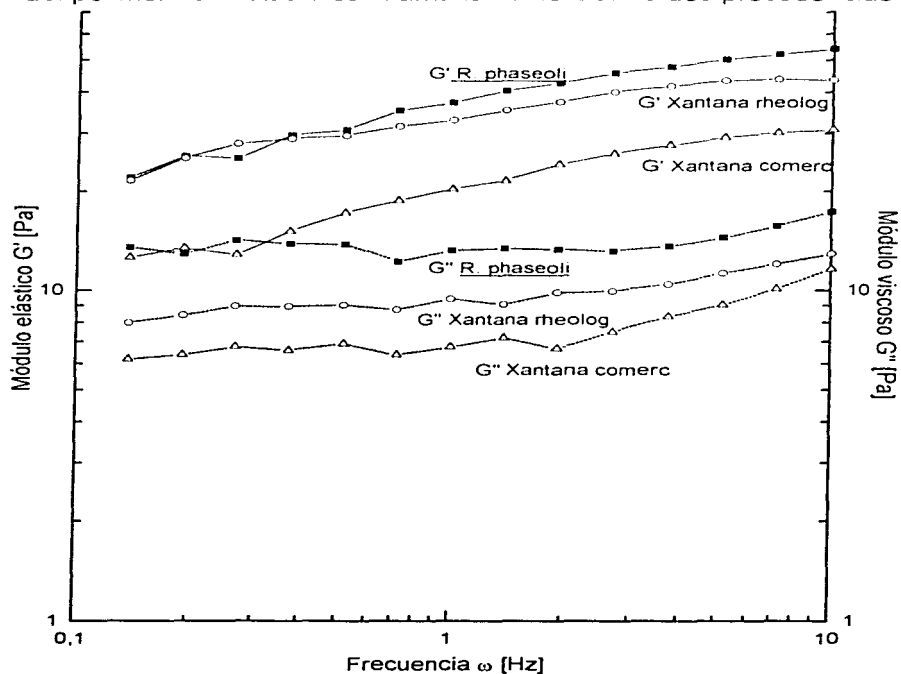
Cuadro 22 Comportamiento de flujo del polisacárido de alto peso molecular producido por *R. phaseoli* con dos xantanas comerciales

Goma al 1%	índice de consistencia (K) Pa s <sup>n</sup>	Índice de flujo (n)
Xantana 1	6.3	0.26
Xantana 2	2.6	0.36
Polisacárido de <i>R. phaseoli</i>	6.9	0.20

#### 5.2.5.2. Pruebas viscoelásticas.

En la Figura 22 se presenta la comparación de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') para el exopolisacárido obtenido de *Rhizobium phaseoli* con 2 gomas de xantana comerciales de diferente calidad. En el Cuadro 23 se presentan los valores de G', que fueron similares a xantana 1 (34.45 Pa ± 7.33) en frecuencias bajas y al incrementarse las frecuencias los valores de G' para *R. phaseoli* (38.42 Pa ± 10.69) tendieron a ser levemente superiores. Respecto a la segunda goma comercial comparada (21.58 Pa ± 6.6), los valores de G' fueron superiores a lo largo de todas las frecuencias. Los valores

Figura 22. Comparación de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) del polímero en estudio con xantana comercial de dos procedencias.





de  $G'$  del polisacando de *R phaseoli* (139 Pa  $\pm$  126) fueron superiores a lo largo de todas las frecuencias probadas respecto a las dos gomas comerciales, incrementandose las diferencias en frecuencias bajas y tendiendo a acercarse en las frecuencias altas. La dependencia de la funcion de la frecuencia para el modulo elastico fue similar para el exopolisacando de *Rhizobium* ( $G' \propto \omega^{0.21}$ ) y xantana 2 ( $G' \propto \omega^{0.21}$ ), mientras que para xantana 1 la pendiente fue menor (0.16). El modulo viscoso  $G''$  para la goma de *Rhizobium* fue superior a los promedios calculados para las gomas comerciales de xantana. El polimero bajo estudio, presento una menor dependencia de la frecuencia ( $G'' \propto \omega^{0.03}$ ), lo cual nos indica un comportamiento tipico de un material viscoelastico similar a un gel.

Cuadro 23 Estudio del comparativo de los modulos elastico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en el exopolisacando de *Rhizobium phaseoli* y dos gomas de xantana comerciales

Tratamiento	$G'$ Promedio		Funcion de la Frecuencia $G' \propto \omega^r$		$G''$ Promedio		Funcion de la Frecuencia $G'' \propto \omega^r$	
	(Pa)	d.e.	a	r	(Pa)	d.e.	a	r
EPS de <i>R phaseoli</i>	38.42	10.69	0.21	0.99	13.90	1.26	0.03	0.56
Xantana 1	34.45	7.33	0.16	0.98	9.78	1.42	0.10	0.95
Xantana 2	21.58	6.60	0.23	0.99	7.59	1.62	0.12	0.86

d.e.= desviacion estandar  
 $G'$ = modulo elastico  
 $G''$ = modulo viscoso

### **5.3. CARACTERIZACION QUIMICA DEL EXOPOLISACARIDO PROVENIENTE DE LA CEPA DE *Rhizobium phaseoli* FES-C1.**

#### **5.3.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL BIOPOLIMERO**

La producción de exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* FES-C1 obtenida en el medio de cultivo optimizado bajo condiciones de fermentador fue posteriormente purificado por medio de centrifugación y diálisis, como fue descrito anteriormente. Utilizando las técnicas de Bradford y electroforesis se confirmó la ausencia de proteínas en el material sometido a estudio. Las técnicas de separación utilizadas permitieron obtener dos fracciones en el polisacárido producido en el medio de cultivo, coincidentes con otros reportes de la literatura en este género (Zevenhuizen, 1984, 1986, Breedveld y Miller, 1994)

#### **5.3.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL EXOPOLISACARIDO AL CALOR**

El exopolisacárido total obtenido del medio de cultivo no presentó punto de fusión, pero se pudo determinar la temperatura a la cual se degrada y este valor se comparó con las temperaturas necesarias para degradar muestras de cinco polisacáridos comerciales. El exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* requiere 225° C, xantana 210° C, carboximetilcelulosa 200° C, guar 190°C, algarroba 181° C y alginato 180°C. Los resultados obtenidos nos permiten conocer la estabilidad polimérica del exopolisacárido en estudio, que puede soportar altas temperaturas antes de que se desnaturalice. La estabilidad del exopolisacárido producido por esta cepa de *R. phaseoli* fue similar o superior a otros polímeros existentes en el mercado. Si bien el polisacárido puede soportar altas temperaturas para lograr su desnaturalización, es

importante resaltar que la temperatura puede tener efectos en la despolimerización en dispersiones que son calentadas, afectando de esta forma las propiedades reológicas (Pedersen, 1977)

### 5.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los resultados obtenidos de la caracterización del biopolímero total excretado al medio de cultivo por espectroscopia infrarroja se presentan en el Cuadro 24. Se pueden observar las principales bandas y asignaciones encontradas en el exopolisacárido de esta cepa bacteriana. Otros polímeros comerciales (xantana, carboximetilcelulosa, guar, algarroba y alginato) fueron sometidos a la misma metodología de análisis para efectos comparativos, mostrando en algunas bandas y asignaciones cierta similitud con algunos de estos polímeros en los componentes de su estructura. En las Figuras 23, 24, 25, 26 y 27 se presentan los resultados de espectroscopia infrarroja para *Rhizobium phaseoli* FES-C1, xantana, alginato, algarroba y guar, respectivamente.

### 5.3.4. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL EXOPOLISACARIDO POR HPLC.

Los resultados obtenidos en HPLC de los estándares utilizados se presentan en la Figura 28 e indican que la tiroglobulina bovina presenta un peso molecular de 670,000 d que equivale en el sistema utilizado a un tiempo de retención ( $t_R$ ) 7.95 min, gamma-globulina bovina con 158,000 d y un  $t_R$  de 8.76 min, ovoalbúmina de gallina con 44,000 d y un  $t_R$  de 9.23 min, mioglobina de caballo con 17,000 d y un  $t_R$  de 9.63 min y cianocobalamina con 1,350 d y un  $t_R$

Cuadro 24 Resultados de frecuencias y bandas de asignación obtenidos en espectroscopia infrarroja del exopolisacárido de *R phaseoli* FES-C1

FRECUENCIA (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACION	% T	GRUPOS
3418	Banda ancha	25	OH
2922	Banda corta	67	CH <sub>2</sub>
2918	Banda corta	69	CH <sub>3</sub>
1732	Banda media	46.7	$\begin{array}{c} \text{--- C --- O} \\   \\ \text{O} \end{array}$ Ester
1608	Banda media	53.2	Carboxilo
1550	Banda media	60	Carboxilo
1415	Banda media	56	Carboxilo
1374	Banda media	52	CH <sub>3</sub>
1260	Banda media	56	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{---C---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
1160	Banda media	36	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{---C---} \\   \\ \text{H} \end{array}$
1072	Banda ancha	11.7	$\text{C---O---C}$ Eter

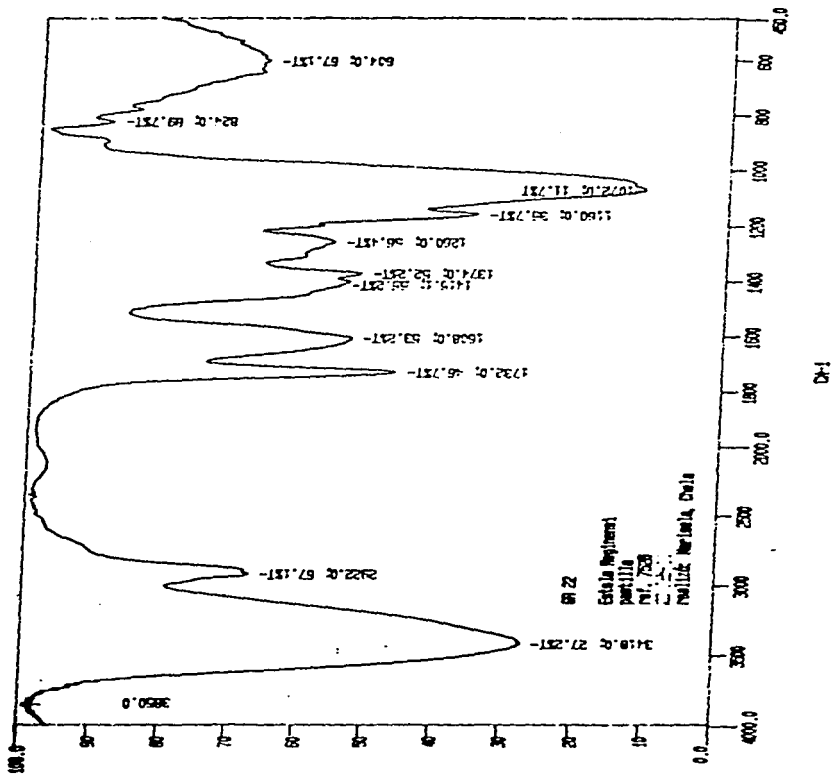
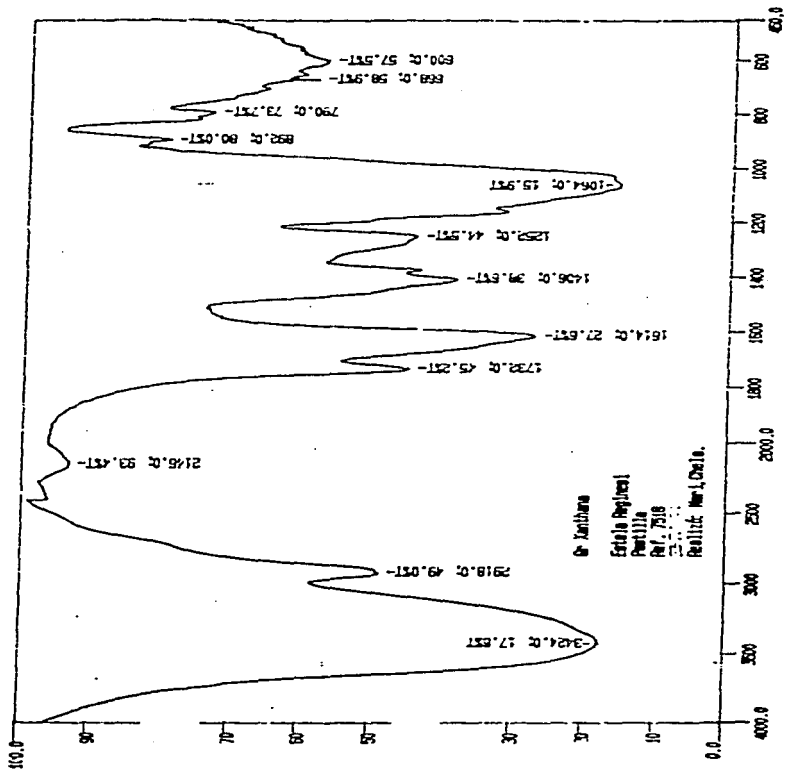
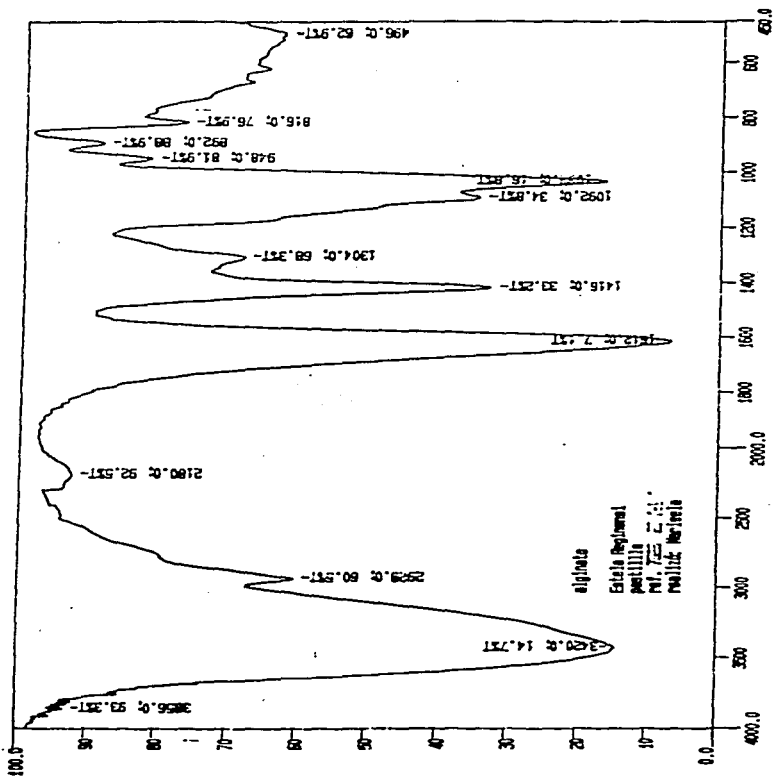


Figura 23 Espectroscopia infrarroja del exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* FES-C1, identificándose las bandas y asignaciones.



OH-1

Figura 24 Espectroscopia infrarroja de la goma xantana, identificándose las bandas y asignaciones en el espectro.



141

Figura 25. Espectroscopia infrarroja del alginato, identificándose las bandas y asignaciones en el espectro. 114

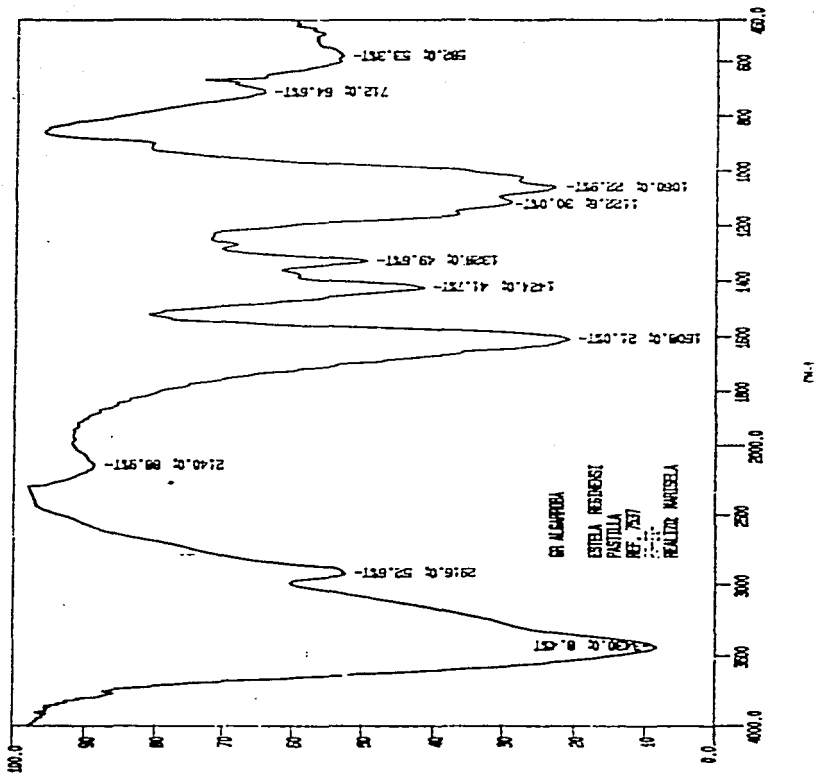
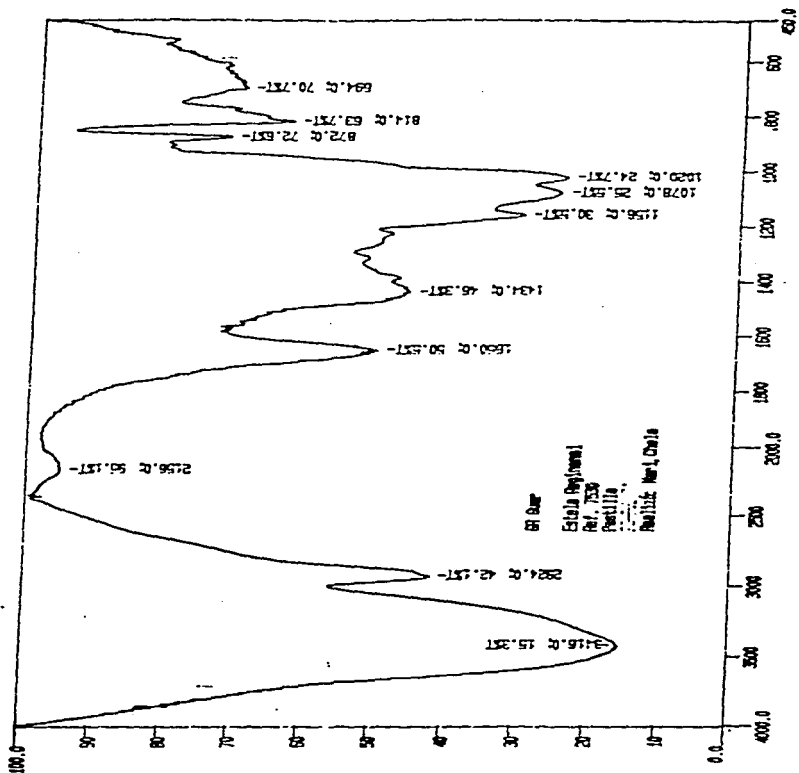


Figura 26 Espectroscopia infrarroja de la goma de algarroba, identificándose bandas y asignaciones.





140

Figura 27. Espectroscopia infrarroja de la goma guar, identificándose bandas y asignaciones.

DEVICE 01      SAMPLE      METHOD      TIME      DATE  
          991                              03:15:33      00:00:00  
 WUTZ

RUN TIME 13.27

DEFAULT 0  
 NORMALIZATION METHOD USING AREA

TIME	AREA	%AREA	PK NAME
7.95	133348	P 14.73940982	
8.76	183732	P 23.84781751	
9.23	140120	P 18.96323558	
9.63	176287	P 21.34119914	
11.58	196835	P 24.04718034	
TOTAL	825022	93.92903150	

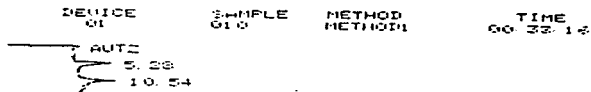
Figura 28. Cromatograma de HPLC de los diferentes estándares para pesos moleculares.

de 11 58 min. Las muestras de la goma purificada analizadas por medio de HPLC, revelan la presencia de dos fracciones una de alto peso molecular de 878.222 d y otra de bajo peso molecular de 5.200 d (Figura 29) Amemura *et al* (1983) trabajando con una cepa de *Rhizobium phaseoli* AHU 1133 identificaron la presencia de un exopolisacando ácido de alto peso molecular y otra fracción de bajo correspondiente a  $\beta$  1  $\rightarrow$  2 glicano cíclico. En este estudio, Amemura *et al* (1983) no detectó la presencia de unidades lineales de octasacandos en los polisacandos estudiados, que corresponden a las unidades estructurales para la síntesis del exopolisacando de alto peso molecular. La hidrólisis ácida de la fracción de bajo peso molecular permitió detectar la existencia de 15 curvas en HPLC como se aprecia en la Figura 30. Estos resultados son coincidentes con otros reportes en diferentes cepas de *Rhizobium* las cuales pueden presentar hasta un grado de polimerización de 40 glucosas (Amemura *et al*, 1985, Koizumi *et al*, 1983, Breedveld y Miller, 1994).

La fracción de alto peso molecular de *Rhizobium phaseoli* presenta un peso de  $8.78 \times 10^5$  d que es similar a otras gomas de interés industrial, entre ellas alginatos  $5 \times 10^5$  d, dextrinas  $5 \times 10^5 - 2 \times 10^7$  d, pullulanas  $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  d, elsinanas  $3 \times 10^5$  d, escleroglucanas  $1.9 \times 10^4 - 2.5 \times 10^4$  d (Sutherland, 1990).

### 5.3.5. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DEL POLISACARIDO.

5.3.5.1. La utilización de métodos enzimáticos (D-glucosa oxidasa) permitió determinar el grado de hidrólisis en relación con el tiempo transcurrido desde el inicio de la misma. Los resultados indican que a medida que aumenta el tiempo de acción del ácido mayor es la



RUN TIME 14.12

DEFAULT 0	NORMALIZATION METHOD	USING AREA	PK NAME
TIME	AREA	%AREA	
5.28	327	4.44423237	
10.54	6635	95.55530276	
TOTAL	6962	100.0000000	

Figura 29 Cromatograma de HPLC con separación de dos fracciones del exopolisacárido de *Rhizobium phaseoli* FES-C1.

FILE NAME (H2SO4BROU) =  
TIME FUNCTION VALUE  
TT =  
METHOD NUMBER (0, 1, 2, 5) (0) HR =  
END OF DIALOC  
PT=100

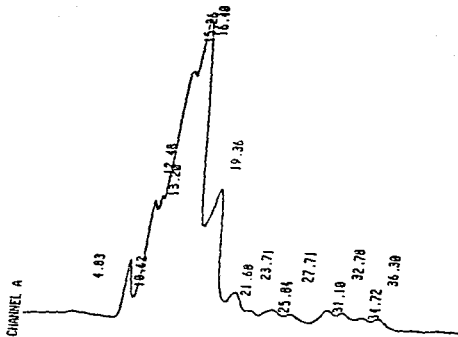


Figura 30 Cromatograma de HPLC de la fracción de bajo peso molecular luego de 3 horas de hidrólisis ácida, identificándose 15 curvas.

cantidad del hidrolizado. Utilizando mediciones a los 23, 60, 90 y 120 minutos de exposición a hidrólisis ácida se detectaron concentraciones de glucosa de 32, 44, 76 y 94 mg/100 ml de muestra, respectivamente. Estos resultados muestran la presencia de glucosa en la composición del polisacárido en estudio cuya configuración es D (Aman *et al.* 1981).

5.3.5.2. Los resultados en cromatografía en capa fina se obtuvieron comparando los valores  $R_f$  de las muestras problemas con los controles. El sistema de disolvente TLC1 permitió los mejores  $R_f$  para el hidrolizado del exopolisacárido durante 2 horas. Los resultados mostraron que los polisacáridos están constituidos por glucosa ( $R_f$  0.30), ácido glucurónico ( $R_f$  0.19) y galactosa ( $R_f$  0.29) y se encontraron coincidencias con la mancha correspondiente a manosa ( $R_f$  0.33). La ausencia de este último monosacárido en cepas de *Rhizobium* de crecimiento rápido (Humphrey *et al.*, 1974) se confirmó por HPLC, los cuales revelaron la inexistencia de manosa en el biopolímero de la cepa en estudio (Koizumi *et al.*, 1983; Breedveld y Miller, 1994). Resultados similares de presencia de manosa se han encontrado cuando se trabaja con extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, y normalmente se atribuye a las mananos provenientes de las levaduras (Humphrey *et al.*, 1974).

5.3.5.3. Como se mencionó anteriormente las dos fracciones del exopolisacárido aislado fueron estudiadas en forma separada. En la Figura 31 se presenta el cromatograma en capa fina con el sistema de disolvente TLC3 de la fracción clorofórmica de la goma metilada, revelando la presencia de 17 manchas ascendentes de glucosa, lo cual difiere con las 15 glucosas determinadas por HPLC. Estas diferencias podrían ser asociadas a los tiempos de

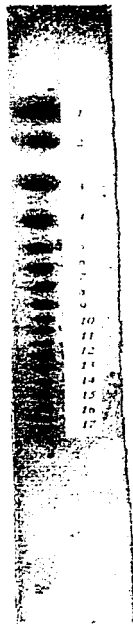


Figura 31 Cromatografía en capa fina de la fracción cloroformica del metilado del exopolisacando de *Rhizobium phaseoli* FES-C1, detectando 17 glucosas.

hidrólisis y probablemente al uso de una única relación de acetonitrilo-agua (Koizumi *et al*, 1983).

Hacia uno de los extremos del cromatograma no existe una separación clara por lo cual el grado de polimerización podría ser mayor. Esta fracción estudiada corresponden a un polisacárido de bajo peso molecular con un grado de polimerización de 17 o más glucosas. La cepa utilizada de *Rhizobium phaseoli* para la producción de goma, al igual que otras bacterias del mismo género, producen y liberan al medio de cultivo una fracción de bajo peso molecular compuesta por  $\beta$ -1-2-D- glicanos (Zevenhuizen 1984, 1986, Amemura *et al*, 1985, Breedveld y Miller, 1994)

### 5.3.6. ESTUDIO DEL EXOPOLISACÁRIDO POR HPLC

Los resultados de HPLC de la fracción de alto peso molecular revelan que está compuesto por glucosa, ácido glucurónico y galactosa, lo cual confirma los resultados que fueron obtenidos por Cromatografía en Capa Fina (CCF) y además se detectan ácido pirúvico y radicales acetilo como se aprecia en la Figura 32. La presencia de radicales de ácido pirúvico y acetilos ha sido reportada en polisacáridos de *Rhizobium*, que se presentan normalmente como sustituyentes en las unidades estructurales del polímero (Zevenhuizen, 1973; Somme, 1974; Jansson y Lindberg, 1979)

En la Figura 33 se observa la separación de los monosacáridos de la fracción de alto peso molecular, luego de una hidrólisis ácida con una exposición de 2 h 30 min, donde se detectaron ácido glucurónico con un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 10.64 min, glucosa con un  $t_R$



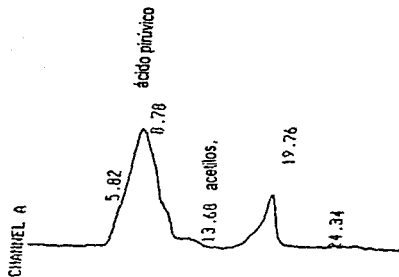


Figura 32 Cromatograma de HPLC detectando en el exopolisacárido de la fracción de alto peso molecular ácido pirúvico y radicales acetilos, luego de una hidrólisis ácida al 1 M y por 30 minutos a 121° C.

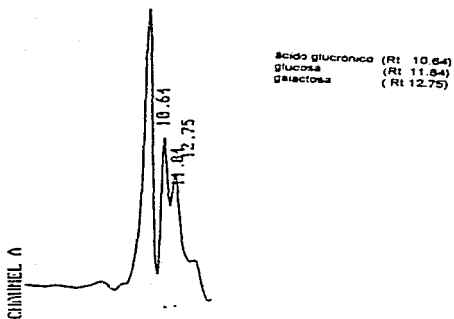


Figura 33 Cromatograma de HPLC de la fracción de alto peso molecular, detectando glucosa, galactosa y ácido glucurónico.

de 11.84 min y galactosa con un  $t_R$  de 12.75 min. Estos  $t_R$  coinciden con los monosacáridos estándares evaluados en las mismas condiciones y columnas que los provenientes a los exopolisacáridos.

Cuando se trabajó con una hidrólisis ácida más agresiva de la fracción de bajo peso molecular sometida a 121° C durante 3 horas, se detectó que la glucosa era el único componente de este polisacárido. En la Figura 34 se presentan los resultados de este análisis que confirman la composición estructural de los  $\beta$ -1-2-glicanos cíclicos reportadas en diferentes cepas del género *Rhizobium* (Breedveld y Miller, 1994).

### 5.3.7. ESTUDIO POR RMNH

En la Figura 35 se presenta el cromatograma de RMNH realizado a la fracción de alto peso molecular, indicando la presencia de tripletes correspondientes según la zona de protones anoméricos presentes en enlaces  $\alpha$  y mayoritariamente a enlaces  $\beta$ , provenientes de unidades de glucosa y probablemente galactosa. Por otra parte, se observan picos correspondientes a grupos metilos, aislados que pueden corresponder a los compuestos pirúvicos y acetilados, detectados previamente por medio de HPLC.

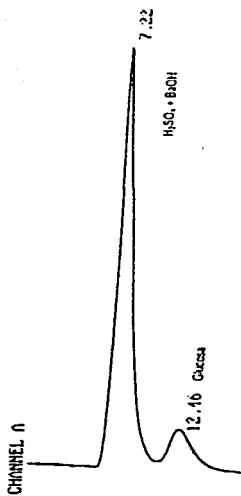


Figura 34 Cromatograma de HPLC para el polisacárido de bajo peso molecular sometido a hidólisis de 3 horas

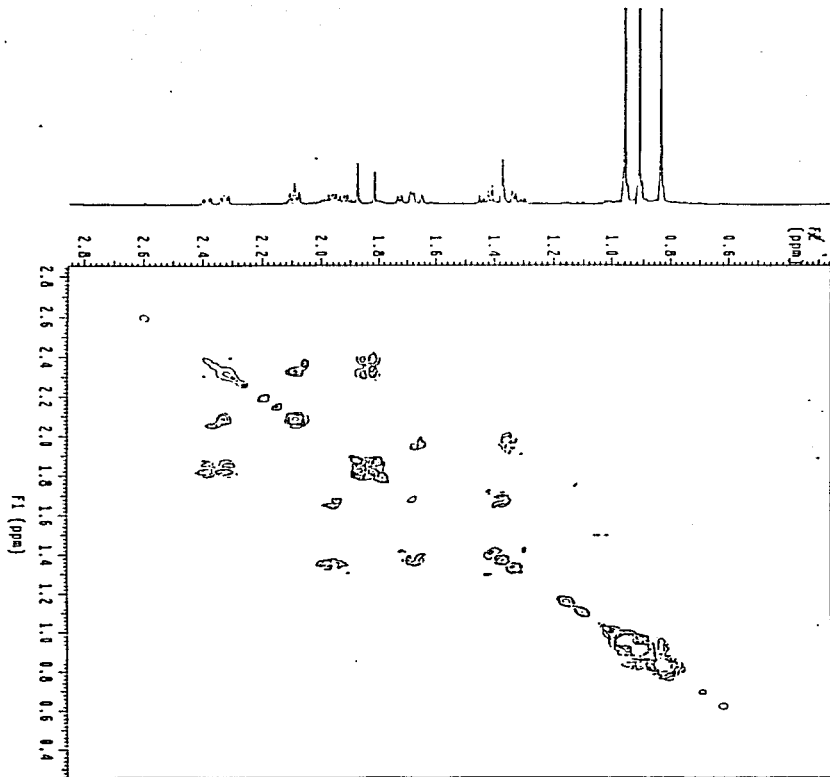


Figura 35 Cromatograma de RNMH de la fracción de alto peso molecular, indicando la existencia de enlaces  $\beta$  y  $\alpha$  en el polisacárido

## 6. CONCLUSIONES.

El estudio inicial de los componentes del medio de cultivo permitió establecer una composición óptima, que condujo a una alta producción de polisacáridos liberados al medio por esta cepa bacteriana. En la composición de nutrientes del medio de cultivo destaca el papel de la fuente de carbono y de nitrógeno en términos de sus efectos sobre la producción. Las relaciones elevadas entre estos dos nutrientes favorecieron la producción de altas cantidades de polisacárido. Sin embargo, las concentraciones óptimas de la fuente de carbono se situó en 25 g/l, lo cual aparece por debajo a los niveles utilizados por Breedveld *et al* (1990a) que llegan a 50 g/l o las cantidades habitualmente utilizadas en la producción comercial de xantana. El estudio de la fuente más apropiada de carbono para el crecimiento permitió establecer que la sacarosa tiene mayores efectos sobre la producción de exopolisacárido (16 g/l) respecto al manitol (10.5 g/l) utilizado previamente. Si bien los niveles de carbohidratos en el medio de cultivo para producción no fueron elevados o llegaron a las concentraciones utilizados por Breedveld *et al* (1990a), el rendimiento obtenido fue similar lo que indica la alta eficiencia de la cepa de *Rhizobium* aislada.

El uso de fuentes inorgánicas de nitrógeno condujo efectos detrimentales en la producción de goma. La concentración óptima de nitrógeno fue de 0.76 g/l, aportado en forma orgánica (extracto de levadura). Las sales de amonio como fuente inorgánica no permitieron un aumento en la producción (12.52 g/l), por lo que se concluye que la producción es rápida y con altos rendimientos de biopolímeros al utilizar fuentes de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo.

Bajo las condiciones de cultivo la cepa utilizada respondió a niveles elevados de aporte de  $\text{CaCO}_3$ , indicando la necesidad de un amortiguador en el medio para evitar cambios en el pH. Este tipo de respuesta ha sido reportada en especies de *Agrobacterium* (Harada *et al.* 1993). Los niveles de magnesio óptimos fueron superiores a los comúnmente utilizados en el género, aunque en algunos microorganismos como *Arthrobacter* y *Hansenula* se han encontrado efectos directos de su inclusión en concentraciones elevadas sobre los rendimientos de exopolisacárido.

La inclusión de  $\text{Mn}^{++}$  y  $\text{Fe}^{+++}$  presentaron efectos positivos sobre la producción de biopolímero que se asocian probablemente a la función del polisacárido para atrapar estos cationes o que alguno de ellos pueda estar involucrado en los mecanismos de síntesis del mismo.

Las sales de  $\text{Mg}^{++}$  junto con el  $\text{K}^+$  y en menor grado con el  $\text{Ca}^{++}$  son requeridas para la producción de biomasa, y en forma indirecta sobre para la producción de exopolisacándos. El  $\text{Mg}^{++}$  no afectó la producción del biopolímero, pero su importancia radica en las diferentes actividades celulares, en que participa y en especial por su papel sobre las enzimas involucradas en la síntesis de polisacándos.

La biotina no presentó efectos positivos ( $P > 0.1$ ) sobre la producción total o la producción diaria de exopolisacándos, sin embargo mostró interacción positiva con el ión  $\text{Mg}^{++}$ . Se ha citado el uso de biotina en el medio por sus efectos sobre el crecimiento de los microorganismos, y normalmente es utilizada en para la producción bacteriana de polisacándos.

El uso de antibióticos en el medio de cultivo presentó efectos sobre la producción de polisacárido probablemente por las modificaciones que genera en la permeabilidad de la pared. Reportes previos han indicado este tipo de efectos e incluso en *Xanthomonas* puede estar relacionada con la calidad del producto obtenido y servir como prueba evaluativa en el proceso de selección de cepas (Torrestiana *et al.*, 1990).

La evaluación de las condiciones de pH y temperatura permitieron establecer las condiciones del medio óptimo en pH=8 y T=30° C. La producción de exopolisacárido en el medio establecido y bajo condiciones óptimas de pH y temperatura permitió obtener 16 g/l en fermentación en matraz durante 10 días. Esta cantidad es similar al máximo reportado por Breedveld *et al.* (1990a) con un patrón de producción de dos fracciones que son liberadas por el cultivo en tiempos diferentes a lo largo de la fermentación. La fracción de alto peso molecular inicia su producción durante la fase logarítmica de crecimiento y continúa en las primeras etapas de la fase estacionaria (130 h), mientras que el polímero de bajo peso molecular inicia su producción al final del crecimiento bacteriano y se prolonga hasta el final de la fermentación. Existe una separación clara en el tiempo de producción de ambos polisacáridos y puede ser una alternativa de manejo de la fermentación para obtener el biopolímero de interés.

La producción en fermentador se realizó en un período de 100 h obteniendo alta producción (10.76 g/l) que se constituyó en su mayor parte por el polisacárido de alto peso molecular (90%). La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) fue de 0.106 h<sup>-1</sup>, y la producción máxima de biomasa fue de 3.1 g/l. La máxima producción de celular coincide con la liberación del exopolisacárido de bajo peso molecular y esto se asocia al inicio de la



muerte celular más que a un mecanismo de transporte hacia el medio. La utilización de la sacarosa para la producción de polisacárido estuvo relacionada principalmente con la biomasa instantánea más que con el crecimiento del cultivo, aunque estas dos variables presentan una relación directa.

La caracterización reológica en el transcurso de la fermentación se realizó a través de pruebas de flujo en el medio de cultivo. El índice de consistencia (K) se incrementó a medida que aumenta la viscosidad y es apreciable a partir de las 40 horas de iniciada la fermentación. El comportamiento del fluido en el muestreo a las 28 horas de crecimiento bacteriano es prácticamente no-newtoniano, y hacia el final de la fermentación el comportamiento es del tipo pseudoplástico reofluidizante. Al avanzar la fermentación K aumenta hasta  $10.1 \text{ Pa s}^n$  a las 100 horas, con un descenso de n hasta 0.19, esta última característica reológica es deseada a nivel industrial por el manejo en tuberías. El exopolisacárido producido fue aislado y purificado para la determinación de la viscosidad intrínseca, indicando valores de  $3,730 \text{ dl/g}$ , lo cual se encuentra entre la goma xantana y guar evaluadas en las mismas condiciones.

El estudio de las pruebas de flujo del polisacárido purificado en relación a los efectos tratamiento térmico nos indica una reducción del índice de consistencia (K), que fue particularmente marcado para  $96^\circ \text{ C}$  por 10 min., mientras que el índice de flujo (n) se incrementó levemente y fue similar para  $96^\circ \text{ C}$  por 10 min. y  $121^\circ \text{ C}$  por 15 min. La temperatura y el tiempo de exposición no produjeron variaciones de importancia en n, indicando que temperaturas altas no producen la desnaturalización del biopolímero. Las

pruebas viscoelásticas nos indican que los módulos  $G'$  y  $G''$  disminuyeron en relación al control ( $G' 38.43 \text{ Pa}$  y  $G'' 13.90 \text{ Pa}$ ).

El efecto de la adición de sales en las pruebas de flujo, condujo a una reducción en el índice de consistencia que fue dependiente del tipo de catión adicionado. La reducción fue mayor con las sales de  $\text{Ca}^{++}$  ( $3.4 \text{ Pa s}^n$ ), intermedia para el  $\text{Mg}^{++}$  ( $6.0 \text{ Pa s}^n$ ) y  $\text{Mn}^{++}$  ( $5.1 \text{ Pa s}^n$ ) y mínima para el  $\text{Na}^+$  ( $6.4 \text{ Pa s}^n$ ). El índice de flujo fue similar para todos los tratamientos, por lo tanto las sales de sodio son las que menor alteración presentaron en las pruebas de flujo. Las pruebas viscoelásticas revelan que la adición de iones conduce a una reducción de la dependencia con la función de  $G' \propto \omega^{0.14}$ , tendiendo a un comportamiento de un sólido viscoelástico. En relación al módulo viscoso  $G'' \propto \omega$  tendieron a cero, por lo cual los cationes de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  son más efectivos para producir geles. El  $\text{Na}^+$  en condiciones de tratamiento térmico de la goma, presentó un mejor comportamiento que los divalentes en las pruebas de flujo a través del índice de consistencia y probablemente exista una selectividad por este catión.

El almacenamiento refrigerado del biopolímero luego del tratamiento térmico y en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mn}^{++}$ , los valores de  $K$  de  $6.62 \text{ Pa s}^n$  y  $5.7 \text{ Pa s}^n$  respectivamente, que fueron superiores a los no refrigerados. Las pruebas viscoelásticas indican que la dependencia de  $G'$  con la frecuencia es baja para el ión  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ , tendiendo el biopolímero a un comportamiento de un sólido viscoelástico parecido a un gel débil. La inclusión de sales con y sin refrigeración demostró la existencia de la dependencia de la frecuencia de  $G'$  similar para todos los tratamientos indicando un comportamiento de un fluido viscoelástico.

La variación de pH en las soluciones no mostró diferencias de comportamiento reológico entre pH= 3 y pH= 7, mientras que pH= 11 reveló un aumento en el índice de consistencia (K) de 7.8 Pa s<sup>n</sup> y n de 0.25. En este punto es importante señalar que la variación de pH hacia la acidez no interfirió en el comportamiento de flujo.

La comparación en las pruebas de flujo del polisacárido de *Rhizobium phaseoli* con dos gomas de xantana comerciales, mostraron valores promedios de K de 6.9 Pa s<sup>n</sup> y n de 0.20 para el exopolisacárido de *Rhizobium* que superaron las propiedades de los polímeros comparados. Las pruebas viscoelásticas indicaron también un comportamiento reológico superior donde los valores promedios de G' y de G'' para el exopolisacárido en estudio, con promedios de 38.42 Pa y de 13.9 Pa, respectivamente. El polímero obtenido en *Rhizobium* presentó una menor dependencia de la frecuencia G', lo cual nos indica un comportamiento típico de un material viscoelástico similar a un gel débil.

Desde el punto de vista químico se estableció de acuerdo a los resultados obtenidos que el polímero excretado por la cepa de *Rhizobium phaseoli* FES-C1 no presentó punto de fusión y se degrada a 225° C. También se identificaron por HPLC dos fracciones con pesos moleculares de 878000 y 5200. La fracción de alto peso molecular luego de una hidrólisis ácida fue estudiada por Cromatografía en Capa Fina y por HPLC, revelando la presencia de glucosa, galactosa y ácido glucurónico como constituyentes sacáridos, y como sustituyentes se detectó la presencia de ácido pirúvico y acetilo. Los grupos reactivos identificados por Espectroscopía Infrarroja indican como componentes importantes grupos metilos y carboxilos. El polisacárido de bajo peso molecular luego de

una hidrólisis ácida total fue estudiada por HPLC, los resultados indican que es un polímero compuesto de monosacáridos de glucosa. Se pudo establecer por el efecto del tratamiento ácido y el tiempo de exposición en esta fracción una hidrólisis parcial del polímero que se estudio por Cromatografía en Capa Fina y por HPLC, los resultados muestran que la composición es de 15 a 17 residuos de glucosa. Estos polimeros podrian corresponder a los  $\beta$ -1-2-glicanos ciclicos citados por Breedveld y Miller (1994), por las características químicas y tambien por el comportamiento de producción en el sistema estudiado. Los estudios realizados por RMNH en la fracción de alto peso molecular indican la presencia de grupos metilos, enlaces del tipo  $\alpha$  y  $\beta$  provenientes de las unidades de glucosa y galactosa.

## BIBLIOGRAFIA-

- Abe, M., Anemura A. y Higashi S. Studies on cyclic 1-2-glucan obtained from periplasmic space of *Rhizobium trifolii* cells. *Plant Soil*. 1982, 4:315-324
- Aiba, S., Humphrey, A. E. y Millis, N. F. Requirerments for growth and formulation of medio. In: *Biochemical Engineering*. Ac Press 1973, pp 27-30.
- Anderson, A. J. y Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxialkanoates. *Microbiol Rev*. 1990, 54:450-472
- Amemura, A., Hisamatsu, M. Mitani, H. y Harada, T. Cyclic (1,2)-beta-D-glucan and the octasaccharide-repited units of extracellular acidic polysaccharides produced by *Rhizobium*. *Carbohydr Res* 1983, 114:277-285
- Amemura, A., Foottrakul, P., Koizumi, K., Utiamura, T. y Taguchi, H. Isolation of (1,2)-beta-D-glucan from tropical strains of *Rhizobium* of their degrees of polymerization. *J Ferment Technol*. 1985, 63:115-120
- Appanna, V. D. y Preston, C. M. 1987. Manganese elicits the synthesis of a novel exopolysaccharide in an arctic *Rhizobium*. *FEBS Letters* 1987,215:79-82.
- Appanna, V. D. A comparative study of exopolisaccharide synthesis in *Rhizobium meliloti* JJ-1 exposed to aluminum and iron. *Microbios*. 1988, 55:33-39.
- Arceneaux, J. E., Aranha H., Mortin M. F., Evans, S. L., Strachan, R. C., Salin M. L., Welch B. y Byers B. R. Oxigen toxicity in *Streptococcus mutans* Mnaganesse, iron and superoxide dismutase. *J. Bacteriol*. 1984, 159:745-749.
- Baird, J. K. y Pettitt, D. J. Biogums use in food and made by fermentation. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. Edit. Y. Goldberg y R. Williams 1991, Cap. 9:223-263.
- Batley, M., Redmond, J. W., Djordjevic, S. P. y Rolfe, B. G. Characterensation of glycerophosphorylado cyclic beta-1,2-glucan from a fast-growing *Rhizobium* species. *Bioch. Biophys. Acta*. 1987, 901:119-126.
- Benincasa, M., Cartoni, G. P. y Coccioli F. High-performance liquid chromatography of cyclic beta-(1,2)-D-glucans (cyclosphoroases) produced by *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *J. Chromat*. 1987, 393:263-271.
- Bergensen, F. j. The growth of *Rhizobium* synthetic media. *Aust. J. Biol. Sci.* 1961, 14:349-360.
- Boulnois, G. J. y Jann, K. Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Molecular Microbiol*. 1989, 3:1819-1823
- Box, G. E. P. y Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 1960, 2:455-473.
- Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M. y Zehnder, A. J. B. Excessive excretion of cyclic beta-(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. *Appl. Enviro. Microbiol*. 1990a, 56:2080-2086.

- Breedveld M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M. y Zehnder, A. J. B. Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47 *J. Gen. Microbiol.* **1990b**, 136:2511-2519.
- Breedveld, M. W. y Miller, K. J. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of the family *Rhizobiaceae* *Microbiol. Rev.* **1994**, 58: 145-161.
- Breedveld, M. W., Hadley, J. A. y Miller, K. J. A novel cyclic  $\beta$ -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti* *J. Bacteriol.* **1995**, 177(22):6346-6351.
- Canter C., Stevens, K., Lugtenberg, B. J., Wijffelman, C. A., Batley, M. A., Redmond, J. W., Breedveld, M. W. y Zevenhuizen, L. P. T. M. Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 248 *Carbohydr. Res.* **1991**, 218:185-200.
- Claudy, P., Letoffe, J. M., Germain, P., Bastide, J.P., Bayol, A., Blasquez, S., Rao, R.C., González, B. Physicochemical characterization of cholesterol-beta cyclodextrin inclusion complexes *J. Thermal Anal.* **1991**, 37:2497.
- Coronado, C., Sanchez-Andujar, B. y Palomares, A. J. *Rhizobium* extracellular structures in the symbiosis *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 12:127-136.
- Cottrell, I. A., Kang, K. S. y Kovacs, P. Xanthan gum. In: Handbook of water-soluble gums and resins. Edit. R. L. Davidson. Cap. 24. **1980**.
- Courtois, B., Courtois J., Heyraud A. y Rinaudo M. Effect of biosynthesis conditions on the chemical composition of the water-soluble polysaccharides of fast-growing *Rhizobia* *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1986**, 32:519-526.
- Charles, M. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.* **1978**, 8: 1-61.
- Deretic, V., Tomasek B., Darzins A. y Chakfabyarty, A. M. 1986. Gene amplification induces mucoid phenotype in rec-2 *Pseudomonas aeruginosa* exposed to kanamycin. *J. Bacteriol.* **1986**, 165:510-516.
- De Leizaola, M. y Dedonder, R. Etude de quelques polyoisides produits par des souches de *Rhizobium*. *C.R. Acad. Sci.* **1955**, 240:1825.
- De Vuyst, L., Van-Loo, J. y Vandamme, E. J. Two step fermentation process for improving xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1987**, 39:263-273.
- Djordjevic, S. P., Rolfe B. G., Batley M. y Redmond J. W. The structures of the exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. strain ANU280 (NG234) *Carbohydr. Res.* **1986**, 148:87-99.
- Dudman, W. F. The extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. Compositional studies. *Carbohydr. Res.* **1976**, 46:97-110.
- Dudman, W. F. The role of surface polysaccharides in natural environments. In: Sutherland, Y. W. (Eds). Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. Academic Press. **1977**, pp. 457-414.
- Dudman, W. F. Structural studies of the extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* strains 71A, CC 708 and CB 1795. *Carbohydr. Res.* **1978**, 66:9-23.

- Dunstan, D. E., Chai, E., Lee, M. y Boger, V. The rheology of engineered polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **1995**, 9 225-228
- Emako M., Takaya, T. y Nishinari, K. Gel-sol transition in gellan gum solutions. I Rheological studies on the effects of salts. *Food Hydrocoll.* **1994**, 8 505-527.
- Elliot, J. H. Some rheological properties of gum solutions. In: extracellular Microbial Polysaccharides. Edit P. A. Sandford y A. Laskin. **1977**, 144-179
- Evans, C. G. T., Yeo R. G y Ellwood D. C.. Continuous culture studies in the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas campestris*. In Microbial Polysaccharides and Polysaccharases Edit R. C.W. Berkeley, G. M. Goodway y D. C. Ellwood. **1979**, 51-68.
- Funahashi, H., Yoshida T y Taguchi H. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. *J. Ferment. Technol.* **1987**, 65 603-606
- Galindo, E. Polisacáridos Microbianos. In: Prospectiva de la Biotecnología en México CONACYT-Fundación Javier Barros Sierra. **1985**, 65-92
- García-Ochoa, F., Santos, V. E. y Fnstch, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of expernents. *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, 14 991-996.
- Geiger, O., Weissborn, A. C y Kennedy, E.P. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **1991**, 173:3021-3024.
- Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R. A. A *Rhizobium meliloti* mutant that form ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form b-(1,2)-glucan. *J. Bacteriol.* **1987**, 169:880-884.
- Ghal, S. K., Hisamarsu, M. Anemura, A. y Harada, T. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, **1981**, 122:33-40.
- Gray, J. X., Zhan H., Levery S. B., Battisti L., Rolfe B. G. y Leigh J. A. Heterologous exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234 and consequences for nodule development. *J. Bacteriol.* **1991**, 173:3066-3077.
- Harada, T., Amemura A., Jansson P.E. y Lindberg B. Comparative studies of polysaccharides elaborated by *Rhizobium*, *Alcaligenes* and *Agrobacterium*. *Carbohydr. Res.* **1979**, 77:285-288.
- Harada, T., Terasaki, M. y Harada A. Curdian. In: Whistler R. L. y BeMiller J. N. (Eds.) Industrial Gums. Polysaccharides and their derivates. Academic Press, London. **1993**, pp. 427-445.
- Hebbar, K. P., Gueniot, B., Heyraud, A., Colin-Morel, P., Heulin T., Balandreau, J y Rinaudo, M. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **1992**, 38:248-253.
- Hisamatsu, M., Sano K., Amemura A. y Harada T. Acidic polysaccharides containing succinic acid in various strains of *Agrobacterium*. *Carbohydrat. Res.* **1978**, 61:89-96.

- Hisamatsu, M., Abe J., Amemura A y Harada T. Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special b-D-glycanases and methylation analysis *Agric Biol Chemist.* **1980**, **44**:1049-1055.
- Humphrey, B., Edgley M, y Vincent J M Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast-growing *Rhizobia* *J Gen. Microbiol* **1974**, **81** 267-270.
- Humphrey, B. y Vincent, J. M. Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium* *J Gen. Microbiol.* **1959**, **21**: 477-484.
- Jansson, P. E., Kenne L., Lindberg B., Ljunggren H., Lönngrén J., Rudén V. y Svensson A. Demonstration of an octasaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide of *Rhizobium meliloti* by sequential degradation *J. Amer. Chem Soc* **1977**, **99** 3812-3815
- Jansson, P. E. y Lindberg B. Structural studies of the *Rhizobium trifolii* extracellular polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **1979**, **75** 207-220
- Jarman, T. R., Deavin, L., Slocombe y Righelato, R. C. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, **107** 59-64.
- Kang, K. S. y Cottrell, Y. W. Microbial Polysaccharides. In: Peppier, H. J. y Pertman, D. (Eds.) *Microbial Technology*. Vol I. Academic Press, New York. **1979**, pp 417-481.
- Kang, K. S. y Pettitt, D. J. Xanthan, Gellan, Wellan and Rhamsan. In: *Industrial Gums*. Edit. R. L. Whistler y J. N. BeMiller. Cap 13. **1993**, 341-397.
- Kenne, L y Lindberg, B. Bacterial polysaccharides. In: Aspinall G. O. (Eds.). *The Polysaccharides*. Academic Press, NY. **1983**, Vol. 2. pp 287-363.
- Kennedy, J. F., Jones, P y Barker, S. A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enzyme Microbial. Technol.* **1982**, **4**:39-43.
- Kennedy, E. P. y Rumley, M. K. Osmotic regulation of biosynthesis of membrane derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* , **1988**. **170**:2457-2461.
- Kidby, D. K. Culture maintenance and productivity. In: Sandford P. A. y Laskin A. (Eds.) *Extracellular Microbial Polysaccharides*. American Chemical Society. Washington, DC. **1977**, pp 1-13.
- Kneen, B. E y LaRue T. A Congo red absorption by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, **45**:340-342.
- Koizumi K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Hisamatsu M., y Amemura A. Separation of cyclic (1-2) - $\beta$ -D-glucans produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium*, and determination of their degree of polymerization by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromat.* **1983**, **265**:89-96.
- Koizumi K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Higashiura T., Ikeda M. Preparation of cyclophoraosaA and its complex forming ability. *J. Inclusion Phenomena*. **1984**, **2**:891-899.



- Lankford, C. E. Bacterial assimilation of iron *CRC Crit Rev Microbiol* 1973, 2 273-331
- Leigh, J. A., Reed, J. W., Hanks, J. F., Hirsch, A. M. y Walker, G. C. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* 1987, 51 579-587
- McNeil, B. y Harvey, L. M. Viscous fermentanion products. *Critical Rev Biotechnol* 1993, 13 275-304
- Mitchell, J. R. Rheology of polysaccharides solutions and gels. In: Polysaccharides in Food. Edit. J. W. V. Blanshard y J. R. Mitchell. Cap 4. 1977, 51-71
- Miller, K. J., Kennedy, E. P. y Reinhold, V. N. Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 1986, 231 48-51
- Miller, K. J., Gore, R. S., y Venesi, A. J. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic beta-1-2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol* 1988, 170 4569-4575
- Miller, K. J., Reinhold, V. N., Weisborn, A. C. y Kennedy, E. P. Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with sn-1-phosphoglycerol residues. *Biochim Biophys. Acta* 1987, 901.112-118
- Mittal, G. S. Microbial synthesis and production. In: Food Biotechnology. Edit. G. S. Mittal. Cap. IV. 1992, 105-117
- Morris, E. R., Cutler, A. N., Ross-Murphy, S. B. y Rees, D. A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydr Polym* 1981, 1.5-21.
- Morris, V. J. New and modified polysaccharides. In: Food Biotechnology. Edit. R. D. King y Cheetan. 1987. Cap 5. 193-238.
- Morris, V. J. Bacterial polysaccharides for use in food and agriculture. In: Biotechnology and Polymers. Edit. C. G. Gebelein. New York. 1991, 135-146
- Mort, A. J. y Bauer, W. D. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. *Plant Physiol* 1980, 66:158-163
- Pedersen, J. K. The selection of hydrocolloids to meet functional requirements. In: Polysaccharides in Food. Edit. J. W. V. Blanshard y J. R. Mitchell. Cap 14. 1977, 220-225
- Rajeshwan, K. V., Prakash G. y Ghosh P. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. *Letters Appl. Microbiol*. 1995, 21:173-175.
- Ramirez, M. E., Fucikovsky L., García Jiménez, F., Quintero R. y Galindo E. Xanthan production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988, 5-10.
- Reginensí, S. M. *Producción de inoculantes para leguminosas usando como soporte bagacillo de caña de azúcar*. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán, UNAM. 1992, 143 p.
- Robyt, J. F. y White, B. J. Biochemical techniques theory and practice. Edit. Waveland Press, Inc. Illinois-USA. 1990.

- Rodríguez, F. Flujo viscoso. In: Principios de sistemas de polímeros. Edit. El Manual Moderno 1984, Cap 7. 157-199
- Roller S. y Dea, J. C. M. Biotechnology in the Production Modification of Biopolymers for Foods. *Critical Rev. Biotechnol.* 1992, 12 (3) 261-277
- Sandford, P. A. A survey of possible new polysaccharides. In: Polysaccharides in Food. Edit. Blanshard y Mitchell 1979, Cap 6, 251-260
- Sandford, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. In: Advances in carbohydrates chemistry and biochemistry. Edit. R. Stuart 1979, 36 266-312
- Sandford, P. A., Pittsley J. E., Knutson C. A., Watson P. R., Cadmus M. C. y Jeanes A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: Sandford, P. A. y Larkin A. (Eds.) *Extracellular Microbial Polysaccharides*. American Chemical Society, Washington, DC 1977, pp 192-209
- Sandford, P. A. y J. K. Baird. Industrial utilization of polysaccharides. In: The Polysaccharides. Edit. G. O. Aspinall 1983, 2 411-490
- Sherwood, J. E., Vasse J. M., Dazzo F. B. y Truchet G. L. Development of tinfoin A-binding ability of the capsule of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 1984, 159 145-152
- Sinskey, A., Jamas, S., Eason, D. Jr. y Rha, C. Biopolymers and modified polysaccharides. In: Biotechnology in Food Processing. Edit. S. K. Harlander y T. P. Labuza 1986, Cap 6 73-
- Stodki, M. E. y Cadmus, M. C. Production of microbial polysaccharides. In: Perlman D. (Eds.) *Advances in Applied Microbiol.* 1978, pp 19-54
- Smith, Y. A. y Pace G. W. Recovery of microbial polysaccharides. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1982, 32 119-129
- Somme, R. Chemical analysis of exocellular, acid polysaccharides from seven *Rhizobium* strains. *Carbohydr. Res.* 1974 33:89-96
- Stanfield, S. W., Leipe, L., O'Brochta, D., Helinski, D. R. y Ditta, G. S. The ndvA gene product of *Rhizobium meliloti* is required for b-1-2-glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* 1988, 170 3523-3530
- Sutherland, Y. W. Microbial exopolysaccharide synthesis. In: Extracellular polysaccharides. Edit. American Chemical Society. 1977, 41-57
- Sutherland, Y. W. Microbial exopolysaccharides: control of synthesis and acylation. In: Berkeley, R. C. W., Gooday, G. W. y Ellwood, D. C. (Eds.), *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. Academic Press. 1979, pp 1-34
- Sutherland, Y. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1982, 23: 79-150.
- Sutherland, Y. W. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 1985, 39:243-270
- Sutherland, Y. W. In: Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Edit. Cambridge University Press. 1990, pp1-163.

- Suresh K. G., Hisamatsu, G. M., Aramura, A. y Harada, T. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J Gen Microbiol* 1981, 122:33-40
- Tinoco, V. R. y López-Munguía Canales, A. Producción de alginatos por fermentación de *Azotobacter vinelandii*. V Congreso nacional de Biotecnología (México) 1993 3 FE7-FE13
- Tomblini, R. y Nuti, M. P. Poly-( $\beta$ -hidroxialcanoate) Biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, 60:299-304
- Torrestiana, B., Fucikovsky, L. y Galindo E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Letters Appl Microbiol* 1990, 10:81-83
- Vashitz, O. y Sheintuch, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady growth of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Bioeng* 1990, 27:383-85
- Weiss, R. M. y Ollis, D. F. Extracellular microbial polysaccharides. I substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnol Bioeng* 1980, 22:859-873
- Whistler, R. L. Introduction to industrial gums. In: Industrial Gum. Edit. Whistler y BeMiller. 1993. Cap. 1. 1-19
- Whitcomb, P. J., Ek, B. J. y Macosko C. W. Rheology of xanthan gum solutions. In: Extracellular microbial polysaccharides. Edit. P. A. Sandford y A. Laskin. Cap. 12. 1977, pp 160-182
- Whitfield, C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol*. 1988, 34:415-420
- Wong, P. P. y Evans, H. J. Poly-D-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol* 1971, 47:750-755
- York, W. S., McNeil, M., Darvill, A. G. y Albersheim P. Beta-2- linked glucans secreted by fast-growing species of *Rhizobium*. *J. Bacteriol*. 1980, 142(1):243-248.
- Yukihiko, N., Konno A., Taguchi T., Tawada T., Kasai H., Toda J. y Terasaki M. Curdlan: properties and application to foods. *J. Food. Sc.* 1991, 56:769-776.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. Chemical composition of exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol*. 1971, 68:239-243.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. Methylation analysis of acidic exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *Carbohydr. Res.* 1973, 26:409-419.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. Cellular glycogen,  $\beta$ -1-2-glucan, poli- $\beta$ -hidroxibutiric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1981, 47:481-497.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. Gel-forming capsular polysaccharide of fast-growing rhizobia: occurrence and rheological properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1984, 20:393-399.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium trifolii* strain TA-1. *FEMS Microbiol. Letters*. 1986, 35:43-47

- Zevenhuizen, L. P. T. M. y H. J. Scholten-Koerselman. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. I.  $\beta$ -1-2-glucan. *J. Microbiol. Serol.*, 1979, 45:165-175.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. y van Neerven, A. R. W. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. III (1-2)- $\beta$ -D-glucan and acidic oligosaccharides produced by *Rhizobium meliloti*. *Carbohydr. Res* 1983a, 118:127-134.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. y van Neerven, A. R. W. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. IV. Gel-forming capsular polysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Carbohydr. Res* 1983b, 124:166-171.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Bertocchi, C., van Neerven, A. R. W. Congo-red absorption and cellulose synthesis by *Rhizobioceae*. *J. Microbiol.* 1986, 52:381-386.
- Zhan, H.; Lee C. C. y Leigh J. A. Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J. Bacteriol.* 1991, 173:7391-7394.