

11661



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

"Producción y caracterización química  
del exopolisacárido obtenido de  
*Rhizobium loti*"

**T E S I S**

P R E S E N T A D A

P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E :

**MAESTRO EN CIENCIAS  
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

P O R

**Q.F.B. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA**

DIRECTORES: DR. STELLA MARRIS REGINENSI RIVERA  
DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO  
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN



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.

LA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por darme la vida y las fuerzas para obtener otra más de mis metas en la vida.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan por permitirme ser un egresado más de su posgrado.

A mis padres por darme todo su apoyo y confiar en mi, espero nunca defraudarlos, crean siempre en mi.

A mis profesores, compañeros y laboratoristas por darme sus conocimientos, confianza y amistad.

A la familia Estévez Reginensi por creer en mi, gracias Stella por sembrar en mi la semilla de la investigación.

Susi Gracias por tu amistad incondicional, confianza, apoyo, por tolerarme y ser mi otra madre académica.

Gracias a mis asesores por sus conocimientos y apoyo.

Gracias Anahny, Marite, Ludin, Alejandro, Julio, Beatriz, Beto, Sebas, Mary, Naty, Azbel, Alba, Caleb, Agustín, Alba N. Por su apoyo comprensión y tolerancia los quiero a todos.

‡ Gracias, Catita siempre te recuerdo.

‡ Don Bulmaro sin su ayuda no estaría aquí gracias.

“8” Gracias por todo, siempre estaré a tu lado, en lo bueno y lo malo, espero que juntos vencamos todos los obstáculos que se nos presenten.

A todos mis compañeros de generación de la Maestría gracias los recuerdo siempre.

A todos los alumnos que han creído en mi, apoyado mis proyectos, confiando su trabajo de tesis, servicio social y sobretodo por su amistad y comprensión en los buenos y malos momentos Gracias los recuerdo siempre.

Al CONACYT por haberme dado la oportunidad de contar con una beca para mis estudios y la realización de mi proyecto de Tesis.

A la Fundación UNAM por apoyarme en la realización del trabajo de Tesis.

A la cátedra de Rhizobiología.

Gracias a todos aquellos de los cuales no me acuerdo en este momento y que de alguna forma participaron en mi formación y realización del trabajo de Tesis.

**GRACIAS A TODOS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

EPS	Exopolisacárido
D.O.	Densidad óptica
nm	Nanometros
hrs	Horas
g/l	Gramos por litros
tD	Tiempo de duplicación
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
°C	Grados centígrados
pH	pH
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de calcio
$\mu\text{m/l}$	Micromoles por litro
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganeso
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CCF	Cromatografía de capa fina
CP	Cromatografía de papel
EPS's	Exopolisacaridos
PSC	Polisacárido capsular
PHB	Polihidroxibutirato
<b>Rh.</b>	<b>Rhizobium</b>
UDP	Uridin difosfato
UV	Ultravioleta
r.p.m	Revoluciones por minuto
NaOH	Hidróxido de sodio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro férrico hexahidratado
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dibásico de potasio

NaCl	Cloruro de sodio
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de sodio
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato dibásico de sodio
ml	Mililitros
g	Gramos
LPS	Lipopolisacárido
dp	Grado de polimerización
M	Molar
µg/l	Microgramos por litro
%v/v	Porcentaje volumen volumen
d	Daltons
hr	Hora
µm	Micrómetros
ml/mim	Mililitros por minuto
Ext de lev	Extracto de levadura

## LISTA DE FIGURAS

- Figura No 1 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en tres medios de cultivo
- Figura No 2 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en tres diferentes medios de cultivo
- Figura No 3 Cinética de producción de *Rhizobium loti* en medio base con tres diferentes azúcares
- Figura No 4 Cinética de producción de *Rhizobium loti* en medio base con tres diferentes azúcares
- Figura No 5 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base con tres diferentes fuentes de carbono
- Figura No 6 Cinética de producción de *Rhizobium loti* en medio base con tres diferentes fuentes de carbono
- Figura No 7 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base con diferentes fuentes de nitrógeno
- Figura No 8 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio base con diferente fuente de energía
- Figura No 9 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base a diferentes concentraciones de manitol
- Figura No 10 Cinética de producción del EPS obtenido de *Rhizobium loti* a diferentes concentraciones de manitol
- Figura No 11 Efecto del manitol en la producción de EPS
- Figura No 12 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* a diferentes concentraciones de Ext de lev.
- Figura No 13 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio base a diferentes concentraciones de Ext de lev.
- Figura No 14 Efecto de la concentración de Extracto de levadura en la producción de EPS
- Figura No 15 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio



Figura No 16 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio base a diferentes concentraciones de sulfato de magnesio

Figura No 17 Efecto del sulfato de magnesio en la producción de EPS

Figura No 18 cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base optimizado a diferentes temperaturas

Figura No 19 Cinética de producción del EPS de *Rhizobium loti* en medio base optimizado a diferentes temperaturas

Figura No 20 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base optimizado a 32°C y a diferentes pH's

Figura No 21 Cinética de producción de *Rhizobium loti* en medio base optimizado a 32°C y diferentes pH's

Figura No 22 Efecto del pH en la producción del EPS

Figura No 23 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio base optimizado 32°C, pH de 8.0 y diferentes volúmenes de aire

Figura No 24 Cinética de producción del EPS obtenido de *Rhizobium loti* en medio base optimizado a 32 °C, pH de 8.0 y diferentes porcentajes de aire.

Figura 25 Efecto de la aireación sobre la producción e EPS

Figura 26 Cinética de *Rhizobium loti* en medio optimo con diferentes niveles de carbonato de calcio

Figura No 27 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio optimizado a diferentes niveles de carbonato de calcio

Figura No 28 Efecto de la adición de calcio en la producción de EPS

Figura No 29 Cinética de crecimiento de *Rhizobium loti* en medio optimizado a diferentes concentraciones de sulfato de manganeso

Figura No 30 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio optimo con diferentes niveles de sulfato de manganeso

Figura No 31 Efecto de la adición de manganeso sobre la producción de EPS

Figura No 32 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio optimizado a diferentes concentraciones de Penicilina

Figura no 33 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio optimizado a diferentes concentraciones de Polimixina B

Figura no 34 Cinética de producción de EPS de *Rhizobium loti* en medio optimizado a diferentes concentraciones de Bacitracina

Figura No 35 Relación lineal de producción de EPS vs tiempo de fermentación

Figura No 36 Cinética en fermentador de *Rhizobium loti* proteínas vs D.O.

Figura No 37 Cinética en fermentador de *Rhizobium loti* Peso seco bacteriano vs D.O.

Figura No 38 Cinética en fermentador de *Rhizobium loti* EPS vs D.O.

Figura No 39 Cinética en fermentador de *Rhizobium loti* peso seco bacteriano vs tiempo de incubación

Figura No 40 Relación de producción de proteínas vs tiempo de fermentación

Figura No 41 Cromatograma obtenido por CLAE de los estándares de peso molecular comerciales BIO-RAD

Figura No 42 Cromatograma del EPS obtenido de *Rhizobium loti*

Figura No 43 Cromatograma de CLAE de la composición monosacarida de la fracción de alto peso molecular del EPS obtenido de *Rhizobium loti*

Figura No 44 Cromatograma de CLAE donde se observa los radicales de la fracción del EPS de alto peso molecular

Figura No 45 Cromatograma de CLAE de la composición monosacarida de la fracción de bajo peso molecular del EPS

Figura No 46 Cromatograma de la fracción de bajo peso molecular del EPS

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la producción y caracterización química del exopolisacárido (EPS) obtenido de *Rhizobium loti*, para lo cual se evaluaron tres medios de cultivo, Vincent, Morris y Base. Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción del EPS por duplicado en matraces de un litro, determinando la D.O. a 600 nm y el peso seco del EPS obtenido cada 24 hrs encontrando que en el medio base calculado se obtenía una mayor producción del EPS de 4.6 g/l, y un menor tD y una mayor  $\mu$  con respecto a los otros medios de cultivo. Se evaluaron tres diferentes fuentes de carbono: manitol, sacarosa y dextrosa en el medio base para determinar cual era la más adecuada para el crecimiento y producción. Se evaluaron dos fuentes de nitrógeno, una orgánica y otra inorgánica, encontrando que la fuente orgánica (extracto de levadura) era la adecuada. Posteriormente se prosiguió a evaluar 5 diferentes niveles de manitol, extracto de levadura y sulfato de magnesio, realizando cinéticas de crecimiento por duplicado en matraces Erlenmeyer c/300 ml de medio de cultivo, con la variación en el nivel del componente. Se determino la D.O. a 600 nm en forma periódica, desde el día cero hasta el día 11 de incubación y tomando 10 ml de medio de cultivo para la determinación del EPS. La producción del EPS se realizo centrifugando el medio de cultivo a 15,000 g por 15 minutos a 4°C para separar el sobrenadante del paquete celular, al sobrenadante se le adicionó tres veces su volumen de alcohol isopropílico frío y se agitó hasta la precipitación del EPS, el cual fue llevado a peso seco a 60°C en la estufa y posteriormente se peso y se determinó cual era la concentración óptima de los componentes evaluados para la producción del EPS, encontrando que el medio de cultivo óptimo para la producción es manitol 20 g/l, extracto de levadura 1.5 g/l, sulfato de magnesio 0.4, cloruro de sodio 0.26 g/l, cloruro férrico 0.1 g/l y fosfato dibasico de potasio 1.66 g/l. En el medio optimizado se prosiguió a evaluar las siguientes condiciones ambientales, pH del medio desde 6.0 hasta 9.0 con 0.5 unidades de variación, temperatura de incubación de 30, 32 y 34 °C y aireación desde 100 ml hasta 800 ml de medio de cultivo en matraz

erlenmeyer de 1 litro con una variación de 100 ml, encontrándose que el pH óptimo para la producción del EPS es de 8.5 unidades con una temperatura de 32 °C y una aireación del 80% (200 ml de medio en un matraz de 1 litro). Con el medio de cultivo optimizado y sus condiciones ambientales se prosiguió a evaluar el efecto en la producción del EPS del carbonato de calcio, sulfato de manganeso y tres antibióticos a 3 diferentes niveles, encontrando que el mejor nivel de  $\text{CaCO}_3$  es 2.0 g/l y 120  $\mu\text{M/l}$  de  $\text{MnSO}_4$ , no existiendo un efecto positivo en la producción del EPS cuando se utilizan antibióticos. Se evaluó la producción del EPS en fermentador de 19 litros con el medio optimizado y las condiciones ambientales encontrándose una producción de 10.6 g/l del EPS y no se llegó a la fase estacionaria de la curva de crecimiento por problemas en la agitación y aireación. La caracterización química del EPS mostró que estaba compuesto por dos fracciones una de bajo peso molecular de 27,000 daltons y una de alto peso molecular de 98,000 daltons, compuesta la primera por glucosas y posiblemente por enlaces  $\beta$ -1,2 glucosídicos, encontrándose además doce residuos de glucosa. La fracción de alto peso molecular compuesta por glucosa, galactosa y ácido glucorónico, se demostraron al realizar estudios en cromatografía en papel, cromatografía en capa fina y confirmado por CLAE.

## INDICE.

Índice	x
Agradecimientos	i
Lista de abreviaturas	iii
Lista de figuras	v
Resumen.	viii
1.0 Introducción.	1
1.1 Generalidades.	2
1.1.1 Generalidades del género <i>Rhizobium</i> .	2
1.1.2 Papel del EPS en la interacción planta-bacteria.	4
1.1.3 Componentes bacterianos de <i>Rhizobium</i> .	6
1.1.4 EPS's del género <i>Rhizobium</i>	7
1.1.5 Composición química del EPS de <i>Rhizobium</i> .	10
1.1.6 Biosíntesis de exopolisacáridos bacterianos.	11
1.1.7 Polisacáridos microbianos.	14
1.1.8 Importancia de los polisacáridos en la industria.	15
1.1.9 Requerimientos nutricionales del género <i>Rhizobium</i>	16
2.0 Objetivos.	18
2.1 Objetivo general.	18
2.2 Objetivos particulares.	18
3.0 Materiales y Métodos	19
3.1 Caracterización e identificación de la cepa de trabajo	19
3.2 Evaluación del crecimiento y producción de EPS en diferentes medios de cultivo.	20
3.3 Optimización del medio de cultivo. del crecimiento y producción de EPS en diferentes medios de cultivo.	21
3.4 Optimización de las condiciones ambientales.	23
3.5 Estimación del efecto que presenta la producción de biopolímero en presencia de sales de manganeso y calcio.	24
3.6 Evaluación del efecto de antibióticos sobre el rendimiento del biopolímero.	24
3.7 Cinética de producción de biopolímero en fermentador.	25

3.8 Obtención y purificación del exopolisacárido	25
3.9 Determinación de las fracciones que componen el EPS.	26
3.10 Obtención de las fracciones que componen el género <b><i>Rhizobium loti</i></b> .	26
3.11 Caracterizaron en cromatografía en papel y capa fina.	27
3.12 Estudio químico del EPS por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia	29
4.0 Resultados	30
5.0 Discusión	84
6.0 Conclusiones.	91
7.0 Bibliografía	92

## 1.0 INTRODUCCION

En la vida de todo ser vivo, las macromoléculas son esenciales para realizar funciones primordiales, por lo que un gran número de investigaciones han girado alrededor de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. El estudio de los exopolisacáridos (EPS) producidos por microorganismos son de gran interés por el papel que juegan en el microorganismo y sus características que lo hacen interesante a nivel industrial. Estos polisacáridos microbianos pueden ser utilizados como: fuente de carbono, mecanismo de defensa contra receptores específicos, etc. Estas macromoléculas tienen una gran aplicación a nivel industrial principalmente por su capacidad de alterar las propiedades reológicas del agua. Son utilizados en la industria alimenticia; farmacéutica; cosmética; aceitera; papelera; textil; agronómica; etc. (39, 41,42),

Dentro del mercado de las gomas se tiene diferentes tipos, las obtenidas a partir de los géneros microbianos: ***Xantamona***, ***Azotobacter***, ***Pseudomona***, ***Klebsiella***, ***Leuconostoc***, ***Sclerotium***, ***Alcaligenes***, así como las de origen vegetal como la goma arábiga, las de origen animal como la gelatina y las sintéticas como carboximetil celulosa ( 39,29 ).

Las gomas del género ***Rhizobium*** aún no han sido comercializadas por lo que es necesario darles mas importancia en su uso a nivel industrial, optimizar los métodos de obtención y disminuir los costos de producción, (30, 34,42).

Dentro del género ***Rhizobium*** se ha descrito que los EPS's producidos presentan funciones muy importantes como el reconocimiento leguminosa-***Rhizobium***, para la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico, lo que se traduce en un aumento de tamaño de la planta sin la necesidad de aportar al suelo fertilizantes nitrogenados, (8,10).

Es así que aprovechando la capacidad de este género bacteriano para producir EPS, este trabajo de investigación pretende mejorar la producción de estos biopolímeros y caracterizarlos químicamente, ya que se ha reportado que estos polisacáridos presentan diferentes aplicaciones a nivel industrial.

## 1.1 GENERALIDADES

### 1.1.1 Características generales del género *Rhizobium*

Todas las especies del género *Rhizobium* poseen la habilidad de infectar y establecer una relación simbiótica para la fijación de nitrógeno con las plantas leguminosas. La relación *Rhizobium* planta es actualmente el modelo de muchas otras relaciones endosimbióticas (51). El género *Rhizobium* en la rizósfera es quimiotáctico a los compuestos segregados por las raíces de las plantas. Los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* pertenecen a la familia de las *Rhizobiaceas*, que se caracterizan por causar hipertrofia cortical en las raíces de plantas y estas se diferencian por su naturaleza, por ejemplo los nódulos organizados que se forman en las raíces pertenecen al género *Rhizobium* y los no organizados al género *Agrobacterium* (59).

Los tres géneros que conforman a la familia *Rhizobiaceas* estuvieron por muchos años agrupados con las *Agrobacterias* y *Phylobacterias*, dentro de esta misma familia. Con el uso de la metodología sistemática bacteriana, como en el caso de la taxonomía numérica, hibridación de ácidos nucleicos y análisis de rRNA 16S, se ha demostrado la existencia de marcadores genéticos diferentes en estas familias, por lo que actualmente sólo se consideran dentro de esta familia a *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, así como la clasificación basada en función de la especie vegetal que hospedan (22).

La taxonomía del género *Rhizobium* se basa principalmente en la especie huésped aunque este es un sistema imperfecto, también se puede clasificar en función de su tiempo de crecimiento: en crecimiento lento y rápido, el tiempo que tardan en cambiar el pH del medio de cultivo. A continuación se muestra una de las clasificaciones del género *Rhizobium* en función de las especies que pueden nodular (64).



CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO RHIZOBIUM SEGÚN SU RELACIÓN CON LA  
LEGUMINOSA HOSPEDERA

Rhizobium	Planta huésped
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, y Trigonella spp.</i>
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, y Lens spp</i>
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. trifoli</i>	<i>Trifolium spp</i>
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. loti</i>	<i>Lotus spp</i>
<i>R. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>R. spp cepa</i> NGR 234	<i>leguminosas tropicales, Parasponia spp.</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena spp, Macroptilium spp.</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega, Officinalis, Galega orientalis.</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glicine max, G. soya y otras leguminosas</i>

(64)

El género **Rhizobium** esta constituido de bacterias bacilares Gram negativas de 0.5 a 0.9 x 1.2 a 3  $\mu\text{m}$ , simples o en pares, móviles cuando son jóvenes por flagelos peritricos polares o subpolares, no forman endosporas, presentan gránulos de inclusión de glucógeno y poli- $\beta$ -hidroxibutirato (58). Las especies del género **Rhizobium** producen colonias características incoloras, blancas o de un color crema en agar-manitol-extracto de levadura, el tiempo promedio de generación es de 2 a 4 horas, las colonias forman un mucílago, aunque se encuentran variantes poco o no gomosas (66).

Estas bacterias son quimiorganotróficas y crecen en medios complejos en un rango de temperatura de 25 a 30  $^{\circ}\text{C}$  de incubación, aunque son aeróbicas pueden crecer a bajas concentraciones de oxígeno (58).

Las bacterias de crecimiento rápido requieren de 1 a 5 días de incubación y su movimiento es por flagelos peritricos, su metabolismo requiere de pentosas, hexosas y mono, di y trisacaridos, el gen simbiótico se localiza a nivel de plasmido y cromosoma, presentan una resistencia baja a ciertos antibióticos, mientras que las de crecimiento lento crecen entre 6 y 8 días, su movimiento es por flagelos polares o subpolares, su metabolismo de carbohidratos es a base de pentosas y hexosas, el gen simbiótico se

encuentra a nivel de cromosoma y presentan una alta sensibilidad a antibióticos y pertenecen al género *Bradyrhizobium* (64).

Las técnicas de identificación para este género son: tinción de Gram; Prueba de leche tornasolada, en la cual se pueden observar reacciones de acidez, alcalinidad, digestión o formación de coágulo, formación o no de suero o sin cambio alguno. Se utiliza la prueba de azul de bromotimol para evaluar la acidez del medio de cultivo (58); prueba de bacteriolisis con el uso de fagos aunque esta no es específica, ya que hay cepas no lisogénicas. Otras pruebas de identificación son las inmunológicas como la aglutinación, precipitación o inmunodifusión las cuales nos ayudan a diferenciar las cepas de *Rhizobium* con los antisueros específicos (58), así como el uso de anticuerpos monoclonales.

Bajo condiciones de limitación de nitrógeno, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* se hospedan en las leguminosas formando un órgano especializado denominado nódulo, estas estructuras se encuentran en la raíz de la planta, bajo estas condiciones las bacterias tienen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en amoníaco, el cual es usado por la planta (64).

### 1.1.2 Papel del EPS en la interacción planta-bacteria

Los EPSs son polímeros de carbohidratos que son excretados por una gran variedad de bacterias, estos pueden estar asociados con la pared celular formando una capa de la cápsula o estar relacionados a las células como un material adherente extracelular, el EPS tiene la capacidad de permitir a la bacteria estar libre y viva, al adherirse y colonizar superficies sólidas, donde los nutrientes se encuentran acumulados. Envuelven a la cápsula celular y pueden protegerla de la desecación y de otras condiciones de estrés ambiental y ayuda a la cápsula a atrapar minerales y nutrientes cercanos a la célula bacteriana debido a sus características aniónicas.

El EPS también juega un papel muy importante en la patogénesis y simbiosis en el nódulo de la raíz formado por la interacción leguminosa-bacteria; que puede funcionar

como un factor de adherencia o prevenir la opsonización e ingestión por fagocitosis (27).

Los polisacáridos extracelulares de las cepas de *Rhizobium* son interesantes porque juegan un papel determinante en la especificidad del reconocimiento existente entre la cepa bacteriana y la especie de leguminosa en la que se dará la fijación simbiótica del nitrógeno (13, 17, 22,34).

El EPS al parecer participa en la supresión de la respuesta de defensa de la planta, aparentemente contribuye a la formación del hilo de infección, quizás como un componente más de la matriz, donde puede funcionar como un agente secuestrador de iones de calcio y modificar el modelo de ensamblaje de la pared celular de la planta, así mismo puede actuar como una molécula de señal difusible que inicie la infección en la raíz de la leguminosa (34). El polisacárido puede ser uno de los dos factores de alta polimerización que participan en la deformación del pelo de la raíz, que comúnmente precede a la infección del hospedero (48).

Las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido, segregan varios polisacáridos los cuales pueden estar involucrados en las interacciones planta-bacteria. El EPS que es un heteropolisacárido extracelular y liberado al medio de cultivo, mientras que hay otros polisacáridos que se adhieren a la célula como es el caso del polisacárido capsular. Los  $\beta$ -1-2-glucanes cíclicos con un arreglo circular formado por 17 a 34 residuos de glucosas en enlaces  $\beta$ -1-2 pueden ser liberados también al medio de cultivo en algunas cepas de *Rhizobium*. Finalmente el lipopolisacárido que también participa en la simbiosis planta-bacteria junto con el EPS y los  $\beta$ -1-2-glucanas cíclicas en la formación del nódulo y reconocimiento del hospedero (1, 4, 26, 28, 32,71).

El análisis de mutantes de *Rhizobium* incapaces de realizar la producción de EPS, sugiere que este juega un papel importante en los eventos de la infección, por no tener la habilidad de inducir al meristemo del nódulo, factor que juega un papel importante para el proceso de infección.

Seis diferentes *loci* (exo A, B, C, D, E, y F) están involucrados en la síntesis de EPS. En *Rhizobium meliloti*, cuatro de estos *loci* (exo A, B, E, y F) se encuentran en un plasmido no simbiótico, mientras que los otros dos *loci* están localizados en el

cromosoma bacteriano. Las mutaciones en estos seis *loci* suprimen la habilidad en *Rhizobium meliloti* de rizar el pelo de la raíz en la formación del hilo de infección, en nódulos no efectivos se encuentran raíces no rizadas (16, 23, 38,48).

### 1.1.3 Componentes de *Rhizobium*

Los componentes bacterianos que envuelven a la interacción planta-microorganismo caen dentro de dos grupos principalmente, el primero que contiene moléculas que son parte integral de la superficie celular de *Rhizobium*, estos son particularmente importantes por interacción con la superficie celular, tal como un ataque célula-célula y el reconocimiento. El segundo grupo contiene moléculas difusibles que pueden variar como señales de reconocimiento entre *Rhizobium* y las células de la planta hospedera. La estructura de la superficie de las células de *Rhizobium* es compleja.

La pared tiene la arquitectura de una bacteria Gram negativa ya que presenta dos membranas, la membrana citoplasmática y la membrana externa. Los componentes de secreción difunden libremente a la superficie celular de *Rhizobium*, cubierta por una cápsula que contiene principalmente de ácido exopolisacárido, el cual tiene la capacidad de absorber agua, complejos con metales iónicos tales como el magnesio. El Polisacárido Capsular neutro (PSC), el cual es un polisacárido adicional de la superficie celular, del que se ha aislado ceto-deoxiectano el cual a se vez puede ser similar al antígeno K de *E. coli*. La membrana externa consiste de una bicapa lipídica asimétrica, con la existencia de un hojillo externo, formado por lípidos que son parte del lipopolisacárido (LPS), el interior del hojillo esta compuesto por fosfolípidos y lipoproteínas inmersas en la membrana externa, con este arreglo forman canales con proteínas integrales en sitios definidos de la membrana, los cuales permiten atravesar moléculas hidrofílicas. La membrana externa es firme por las lipoproteínas que se encuentran unidas a la capa de peptidoglican, el cual le confiere rigidez y fuerza a la membrana celular.

Entre las membranas interna y externa se encuentra el espacio periplásmico, el cual contiene en su interior oligosacáridos que presenta una función osmoreguladora, así

como proteínas con funciones estructurales o enzimáticas. Estos oligosacáridos son los  $\beta$  1-2-glucanas cíclicos. La membrana citoplásmica consiste de una bicapa fosfolipídica que lleva una gran variedad de proteínas integrales (12,34, 38,51).

#### 1.1.4 EPS's del género *Rhizobium*.

La habilidad fijar nitrógeno atmosférico que presentan muchos géneros bacterianos que habitan en el suelo en asociación con las plantas, está en relación con su capacidad de producir polisacáridos, habilidad que ha sido comprobada en las Rhizobacterias, que forman colonias lisas mucoides con una alta capacidad de fijar nitrógeno, en comparación con las que no fijan nitrógeno y son colonias rugosas no mucoides (21, 29,68).

El género *Rhizobium* se caracteriza por una diversa producción de polisacáridos extracelulares altamente viscosos, polisacáridos capsulares insolubles,  $\beta$ -1-2-glucanas cíclicas y unidades estructurales octosacáridas que forman parte del exopolisacárido (32,35). Las especies del género *Rhizobium* de crecimiento rápido producen tres tipos diferentes de EPS, 1) polisacáridos capsulares insolubles neutros, 2)  $\beta$ -1-2 glucanas cíclicas y 3) EPS de alto peso molecular.

El polisacárido capsular (PSC) se localiza alrededor de la bacteria en forma masiva. La producción del PSC comienza al final de la fase logarítmica del crecimiento, alrededor del tercer día, con una disminución del contenido de glucógeno, la síntesis del PSC depende de la presencia de la fuente de carbono disponible, a mayor aporte de carbono mayor producción de PSC. Existen en la bacteria otro tipo de polímeros como el poli- $\beta$ .hidroxibutirato (PHB) y el glucógeno que funcionan como reservas y son utilizados en la producción de polisacáridos, estos se acumulan al final de la fase logarítmica y se utilizan en la fase estacionaria cuando las reservas de carbono se están agotando. Otro producto que se acumula en la fase logarítmica es el  $\beta$ -1,2 glucano, el cual no se utiliza como fuente de carbono, pero que se elimina al medio de cultivo gradualmente durante la fase estacionaria (34,72).

La producción de EPS capsulares en diferentes cepas *Rhizobium melilotii*, *Rh. trifolii* y *Rh. japonicum* han logrado concentraciones de 0.2 a 0.9 g/l de medio de cultivo precipitado (26).

La composición del EPS capsular varía en las diferentes fases de cultivo y por lo tanto el EPS del medio refleja un promedio de estos cambios, detectándose pequeñas diferencias en la composición de ambos polisacáridos (53).

Los  $\beta$ -1,2 glucanes cíclicos son moléculas que se presentan únicamente en el género *Rhizobium*, se acumulan a nivel celular y posteriormente son liberados hacia el medio de cultivo, (73) bajo ciertas circunstancias de cultivo, entre un 5 al 20 % del peso celular producido corresponde a  $\beta$ -1,2-glucanas cíclicas. Estas moléculas están constituidas por glucosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,2 glucosídicos y su grado de polimerización varía entre 17 y 40 residuos de glucosas para las cepas de *Rhizobium meliloti*. Se localizan en la región periplásmica (6,9), aunque cantidades importantes se pueden encontrar también en el medio de cultivo (1,10,71).

La cantidad total de  $\beta$ -1-2 glucanas producidos así como las cantidades segregadas al medio son altamente dependientes de la especie bacteriana utilizada y de la composición del medio de cultivo, una alta concentración de  $\beta$ -glucanas se encuentra normalmente asociada a la fase estacionaria del cultivo, la composición del medio de cultivo y las altas temperaturas ejercen un papel decisivo en la excreción de este polisacárido (9). La regulación de la síntesis de este polisacárido durante la fase de crecimiento parece estar asociada a condiciones de baja osmolaridad en el periplásmo (13). No se conocen bien las funciones que realizan las  $\beta$ -glucanas cíclicas a nivel celular, pero pueden intervenir en el volumen periplásmico celular, la fuerza osmótica periplásmica y la presión ejercida sobre la membrana citoplasmática. En aquellas cepas mutantes carentes de estos polímeros, se han detectado alteraciones en las propiedades de superficie celular, entre las que se encuentran pérdida de la motilidad, con una disminución en el número de flagelos, mayor resistencia a bacteriofagos y una alta sensibilidad a antibióticos, así como un aumento en la producción de EPS celular y modificaciones en la composición proteica de las envolturas celulares (7,8,9). Se ha

sugerido que son importantes durante el proceso de infección de los pelos radiculares de las leguminosas (25).

Las  $\beta$ -1,2 glucanas cíclicas son moléculas potencialmente útiles debido a su espacio interno relativamente hidrofóbico, lo que les confiere propiedades de agentes de inclusión, efecto comparable con las ciclodextrinas que contiene de 6 a 8 residuos de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4. El espacio interno de estos dos tipos de moléculas es similar pero la solubilidad de los  $\beta$ -1,2-glucanas es mayor (3,7). Mucho se ha escrito sobre estos compuestos con funciones similares a las ciclodextrinas, pero se ha investigado sobre los  $\beta$ -1,2-glicanes cíclicos como transportadores (37).

El EPS extracelular es una molécula de alto peso molecular, considerado como un heteropolisacárido complejo formado por unidades repetitivas de 7,8 y 9 residuos de oligosacáridos unidos por enlaces alfa y beta ordenados, en cualquiera de los enlaces se pueden encontrar cadenas lineales o ramificadas por los lados de la cadena principal, presentando muchas veces sustitutos no carbohidratos como, piruvato y acetatos, la naturaleza ácida del exopolisacárido proviene del ácido urónico, cetales de piruvato y succinato (3,7). La galactosa, glucosa y ácido glucurónico son los monosacáridos más comunes que constituyen a los polisacáridos así como el ácido pirúvico, grupos acetilos y metilos (14, 26, 30,60).

Estos EPS pueden ser divididos en de dos grupos, los polisacáridos de tipo 1) que son aquellos excretados por las especies de ***Rhizobium meliloti*** y ***Agrobacterium spp*** compuestos por D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico y ácido succínico en una relación de 7:1:1:1 y 2) Los polisacáridos excretados por las especies de ***Rhizobium leguminosarum***, ***trifolii*** y ***phaseoli***, compuestos por D-glucosa, D-galactosa, ácido glucurónico y ácido pirúvico en una relación 5:1:2:2 respectivamente (71).

El polisacárido extracelular es producido por las bacterias, excretado hacia el medio de cultivo y conduce a que este se vuelva viscoso. Las condiciones de cultivo del microorganismo pueden llevarnos a cambios en la producción y composición del polisacárido extracelular, el cual se inicia en la fase logarítmica del crecimiento y se prolonga hasta la fase estacionaria en condiciones limitantes de nitrógeno, siendo favorecida por el aporte de carbono al final de la fase logarítmica, sin embargo esto

favorece la producción del polisacárido capsular pero aumentando la aereación en el medio de cultivo se invierte la producción, aumentando el EPS extracelular y disminuyendo el capsular. Si al final de la fase logarítmica hubiera un aumento en la fuente de nitrógeno se aumentaría la producción de  $\beta$ -1,2-glucanas cíclicas, por lo tanto, dependiendo de los nutrientes y su manejo en el medio de cultivo durante la fase de crecimiento se puede manipular la producción de los polisacáridos producidos por el género *Rhizobium* de acuerdo a nuestros intereses (73).

### 1.1.5 Composición química del EPS de *Rhizobium*

La composición química de los polisacáridos solubles de *Rhizobium* no es homogénea. Los primeros trabajos que reportaron la composición química de los polímeros indican la presencia de glucosa, galactosa y manosa y algunas veces ácido glucurónico (19,21). Posteriormente (1,21,29) indicaron que los polisacáridos de *Rhizobium* están formados por unidades repetitivas de monosacáridos, que no contienen manosa, pero que en algunas ocasiones esta puede unirse al ácido pirúvico o succínico en diferentes proporciones (31). Trabajos con *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium meliloti* SA47 encontraron que el polisacárido extraído del medio de cultivo no purificado presentaban manosa, pero esta era eliminada al purificarse. Los medios de cultivo que contienen extracto de levadura, probablemente contribuyen a la detección de manosa en el polisacárido siendo esta extraída junto con el polisacárido soluble, sin embargo existen reportes que indican que existen polisacáridos con manosa como constituyente en cepas de *Rhizobium meliloti* (26), en polisacáridos capsulares de *Rhizobium leguminosarum* y *trifolii* (72).

Composición química de los EPS extracelulares solubles de diferentes especies del género *Rhizobium*. Las uniones en los monosacáridos y en el polisacárido son de tipo  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,6 restringiéndose los enlaces tipo  $\alpha$  a las uniones con galactosa y las unidades estructurales entre si (6, 10,15,29, 32).

A continuación se muestra la composición química del EPS extracelular de algunas cepas del género *Rhizobium*.



## COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXOPOLISACÁRIDOS OBTENIDOS DE *RHIZOBIUM*

CEPA	CONSTITUYENTES DEL EXOPOLISACARIDO	SUSTITUYENTE
<i>Rhizobium japonicum</i> 311b-138 311-110	Glucosa-manosa-ácido galacturónico 2:1:1 Galactosa y 4-O-metilgalactosa	Acético, pirúvico y succínico
<i>Rhizobium meliloti</i> J7071, 2020,204,207,209,y U27	Glucosa-galactosa- ácido pirúvico 7:1:1	Acético, pirúvico y succínico
<i>Rhizobium meliloti</i>	Glucosa-galactosa-pirúvico-succínico acético	Acético, pirúvico y succínico
<i>Rhizobium spp</i>	Glucosa-galactosa-ácido galacturónico 5:2:2	Ascético, pirúvico y succínico
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	glucosa-ácido glucurónico-galactosa 5:2:1	acético, pirúvico y succínico
<i>Rhizobium trifolii</i>	Glucosa-galactosa-ácido glucurónico	ácido pirúvico y O-acetilo
<i>Rhizobium phaseoli</i> 127-K38	Glucosa-ácido glucurónico-galactosa 6:3:1	acetilo
<i>Rhizobium leguminosarum, Rh trifolii y Rh phaseoli</i>	Glucosa-galactosa-ácido pirúvico 5:1:2	ácido pirúvico

### 1.1.6 Biosíntesis de exopolisacáridos bacterianos

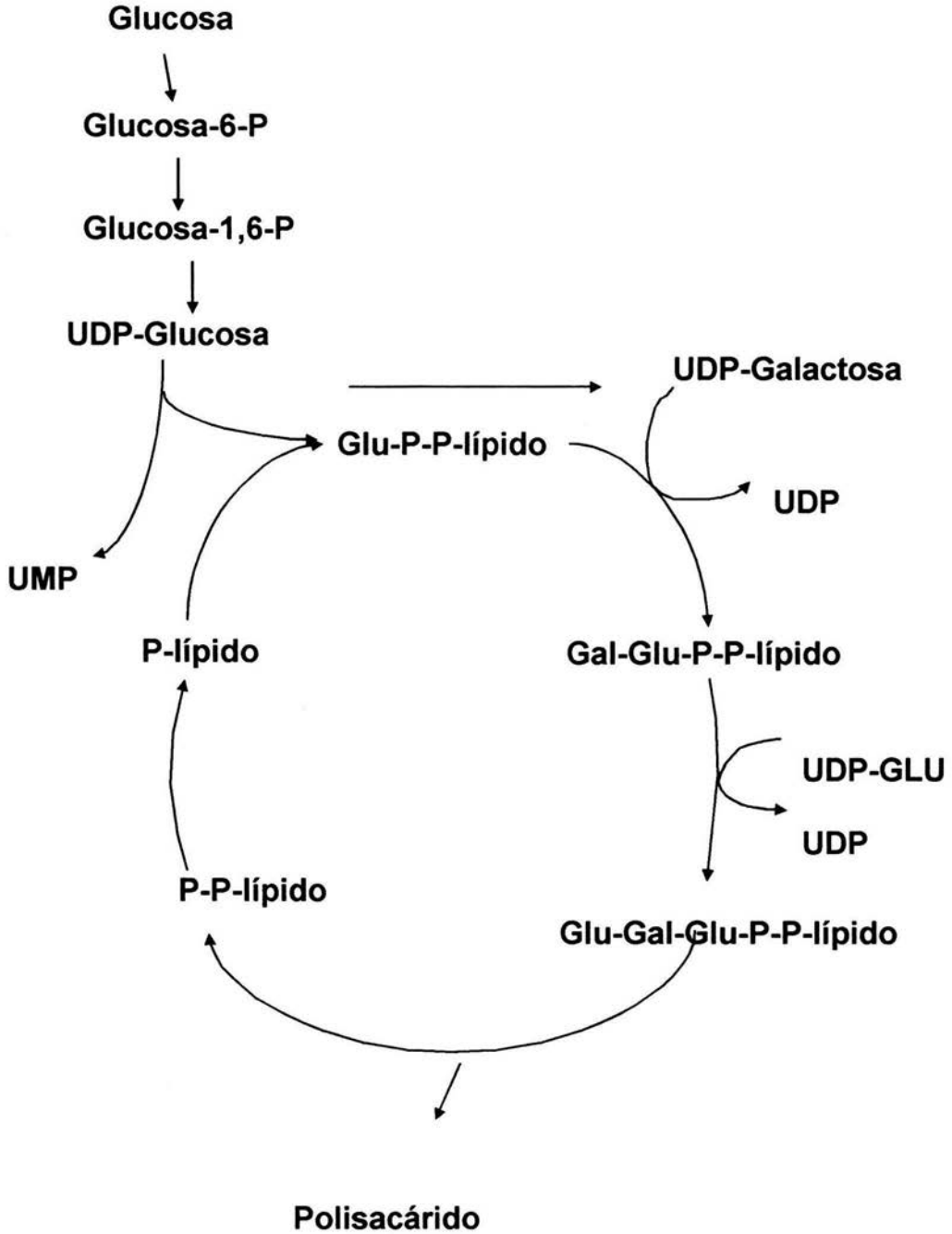
La biosíntesis de los EPSs involucra dos aspectos principales de interés que son, el sitio de síntesis del polisacárido y la naturaleza del precursor (59). En algunos casos como en *Acetobacter* la síntesis de celulosa se lleva a cabo en la membrana citoplásmica y utiliza como precursores azúcares nucleotídicos y no involucra lípidos intermediarios como ocurre en la mayoría de las bacterias que producen algún otro tipo de EPS (68). En la síntesis de EPSs bacterianos a excepción de las dextranas, levanas y mananas, involucran azúcares activos en forma de intermediarios como nucleótido difosfato.

Al parecer una de las limitantes para la síntesis del EPS es la entrada a la célula del sustrato ya que este puede ser a través de difusión facilitada, transporte activo o traslocación de grupos (59,60). Otro aspecto importante en el proceso de síntesis, es el requerimiento de transportadores lipídicos que se encuentran en la parte externa de la membrana celular. Los lípidos isoprenoides intervienen en la formación del lipopolisacárido, peptidoglican y exopolisacáridos. El lípido funcional es el bactoprenol en forma de monofosfato lipídico, por lo que es esencial para la síntesis la disponibilidad del lípido isoprenoide fosfato (61).

Una posible ruta biosintética para un polisacárido hipotético de glucosa y galactosa, sería que la glucosa fuese transportada dentro de la célula como glucosa-6-fosfato que

sería convertida a glucosa-1,6-difosfato por la enzima fosfoglucomutasa. El difosfonucleótido es formado por una enzima nucleotidil transferasa a partir del azúcar fosforilado, formándose en este caso UDP-glucosa. En este estado, la azúcar activada puede ser interconvertida a una variedad de azúcares nucleotídicos. La reacción de acoplamiento incluye la epimerización, deshidratación y descarboxilación. La presencia de un monosacárido particular en el polisacárido requiere de la existencia de un monosacárido difosfonucleotídico en particular como precursor. En este ejemplo, UDP-glucosa es epimerizado a UDP-galactosa. La reacción se dirige a la polimerización de una variedad de azúcares nucleotídicos, lo que indica la presencia de intermediarios lipídicos en algunos sistemas que se han propuesto para la transferencia del azúcar 1-fosfato a un isoprenoide lipídico fosforilado, seguido por la adición de azúcares nucleotídicos para formar la unión del lípido con unidades repetitivas de oligosacáridos. Múltiples unidades repetitivas entonces formadas por la transferencia, reducción y fin del crecimiento del polisacárido. Subsecuentemente, el EPS debe ser liberado del lípido isoprenoide que puede ser reutilizado en la mezcla, y entonces deben pasar por la membrana externa hidrofóbica. En las bacterias Gram negativas el mecanismo probablemente involucra la adhesión en sitios conocidos como, el sitio Bayer en que las membranas internas y externas se asocian una con la otra (59, 60,61). Se propuso que el EPS es excretado por estos canales, a caminos análogos a la importación de algunos substratos por las porinas (7, 15, 20, 21,61). Una vez formado el polisacárido, los sustituyentes no carbohidratos como acetilo, pirúvato que provienen de la acetil coenzima A y fosfoenol pirúvato se anexan a la cadena principal del EPS, posteriormente a la elongación y el pasaje del material polimerizado al exterior de la membrana citoplásmica, para finalmente ser excretado al medio a través de enzimas que liberan el polímero de su unión lipídica (61). A continuación se muestra el esquema # 1 de la ruta biosintética propuesta para un EPS compuesto por glucosa y galactosa, producido por una bacteria Gram negativa.

# ESQUEMA # 1 BIOSINTESIS DE EXOPOLISACARIDO



### 1.1.7 Polisacáridos microbianos.

La síntesis de polisacáridos extracelulares se ha observado en cultivos bacterianos desde 1880 debido al incremento en la viscosidad de las soluciones acuosas, lo que nos indica la liberación de polisacáridos en forma lenta de las bacterias. Este tipo de polímeros tiene una gran importancia debido a su gran calidad y estabilidad química (41).

Los polisacáridos microbianos representan solamente una pequeña fracción en el mercado pero tiene un gran potencial técnico para el desarrollo de nuevos y mejores productos.

Las bacterias que producen EPS se han identificado en una gran variedad de nichos ecológicos siendo dependientes del medio ambiente en el que se encuentren. Esto sugiere que la producción de EPS responde a señales directas de selectividad, y presión en el medio ambiente. En la Tabla No 1 se muestran algunos EPS (gomas solubles) de origen microbiano así como tipo de goma a nivel industrial y microorganismo productor (41,45 , 68).

#### FUENTE DE OBTENCIÓN DE POLISACÁRIDOS MICROBIANOS COMERCIALES

TIPO DE POLISACARIDO	CARACTERISTICA IONICA	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Dextrana	neutro	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Streptococos bovis</i> , <i>Streptococos viridans</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ,
Xantana	Anionica	<i>Xantamona campestris</i>
Curdian	neutra	<i>Alcaligenes fecalis var mixogenes</i>
Gelana	anionica	<i>Pseudomona elodea ATCC 311461</i>
Glucano de levadura	neutra	<i>Sacharomyces cerevisae</i>
Pululana	Neutra	<i>Aerobasidium pullulans</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>BeigerInckia</i>
Alginato microbiano	Nd	<i>Pseudomona aeuuginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>
Escleroglucano	Neutro	<i>Esclerotum glucanicum</i>
Zafo	Nd	<i>Erwinia tahitica</i>
Levand	Nd	<i>Acetobacter</i> , <i>Achrobacterium</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Phytobacterium</i> , <i>Pseudomona</i> , <i>Streptococos</i> , <i>xantomonas</i> , <i>Zymomonas</i> .

Nd = no determinado

### **1.1.8 Importancia de los polisacáridos en la industria.**

Los polisacáridos o biopolímeros de mayor importancia con aplicación en la industria de alimentos, cosmética, farmacéutica, química, médica, tratamiento de aguas y en la industria aceitera se basan principalmente en sus propiedades: adhesivas en papeles, productos textiles y usos en la construcción, se pueden usar como acarreadores de drogas, germicidas, fungicidas, en recubrimiento de metales, controladores de reacciones, en purificación de agua, en la precipitación o recuperación de proteínas, en procesos industriales, como: agentes dispersantes, estabilizadores, o como agentes activos de superficie; en la industria cosmética su aplicación se basa en su uso como agentes quelantes, agentes deshidratantes, protectores de UV, especialmente en productos para la piel y cabello; en productos fotográficos, pinturas, pigmentos y tintas; como gelificantes en alimentos, su aplicación en la industria aceitera como clarificantes y lubricantes; se usan como matrices de separaciones en cromatografía, estructura de matriz en alimentos o sustancias relacionadas, para la inmovilización de enzimas o células y en materiales de cirugía, funcionan como membranas o películas; en separaciones o filtraciones, en películas comestibles; en el campo de la medicina como antígenos para la elaboración de vacunas por su acción estimulante del sistema inmunitario (11, 34, 45, 52, 61).

Los polisacáridos microbianos representan solamente una pequeña fracción de las gomas o biopolímeros en el mercado, tiene un gran potencial técnico, para el desarrollo de nuevos productos, con una próspera aplicación de la ingeniería y tecnología genética.

La síntesis biológica de polímeros naturales, especialmente de polisacáridos tienen gran aplicación comercial. Estos productos son derivados de plantas, bacterias, hongos y de un gran número de organismos eucariontes. Otra ventaja de los biopolímeros es su baja toxicidad, seguros para el ambiente por su naturaleza y son alternativas viables como sustituyentes de los polímeros derivados del petróleo.

La mayoría de los polisacáridos utilizados en la industria se obtienen del cultivo de plantas (almidón, galactomananas) o de algas marinas (agar, alginatos, y caragenina).

Pectinas obtenidas de plantas (extracto de jugos, manufactura de sidra). Recientemente, las fermentaciones microbianas tienden a ser usadas para la producción de polisacáridos, como la goma xantana. Las propiedades funcionales de estos polisacáridos dependen de su estructura química y esta puede variar dependiendo del método de extracción, la edad del cultivo, la fuente de carbono y nitrógeno y tipo de microorganismo.

Los biopolímeros o EPS de *Rhizobium* pueden ser otra alternativa para la industria de los hidrocoloídes, por las características que presentan sus polisacáridos, de ahí el hecho de conocer sus mecanismos de producción y de su composición química ya que dependiendo de sus características se puede manipular para mejorar estas propiedades, que son de gran utilidad e interés en el mercado de las gomas solubles en agua (11,41,45,54,56,60,61,72).

El polisacárido extracelular excretado por algunas bacterias son una fuente de nuevos biopolímeros, que tiene gran potencial de aplicación en la industria de alimentos, agricultura, cosmética, etc.

Los ciclofuranos son una familia de  $\beta$ -1,2 glucanas cíclicas producidos por especies bacterianas del suelo como *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Estudios preliminares han sugerido su aplicación potencial como un nuevo agente encapsulante, en la formación de complejos con indometacina, fluoreceína, y vitaminas. Los estudios de modelación molecular sugieren que el tamaño de anillo corresponde a un grado de polimerización de 15 residuos de glucosa (dp 15).

La preparación del ciclofuranos esta restringido por la secreción de un EPS extracelular bacteriano de alta viscosidad. Este biopolímero extracelular restringe la aireación del medio impidiendo la remoción de la célula bacteriana y por lo tanto la separación del glucano,

### 1.1.9 Requerimientos nutricionales del género *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* en los nódulos de las raíces de las leguminosas son heterótrofas y capaces de utilizar una amplia variedad de carbohidratos, en general los compuestos inorgánicos del nitrógeno (NH, NO) son suficientes para su desarrollo aunque existen cepas que pueden tener requerimientos específicos por uno o más aminoácidos y vitaminas para lograr crecimientos óptimos (35, 58,59,).

Pueden crecer en diversos extractos complejos de origen vegetal. La levadura es la fuente más conveniente de nitrógeno, estas bacterias no crecen en medios de cultivo adicionados con peptonas como normalmente crecen otras bacterias. Los extractos comerciales de levadura se deben de analizar cuidadosamente en función de su composición de aminoácidos, ya que una alta concentración de estos inhibe el crecimiento de estas bacterias. Las fuentes de carbono comunes son el manitol, sacarosa o glucosa. Las cepas de lento crecimiento pueden utilizar galactosa o arabinosa (30).

La mayor parte del peso del microorganismo consiste de materia orgánica. Requieren de iones inorgánicos como potasio, sodio, magnesio, calcio y cloro, los cuales le sirven para facilitar la catálisis enzimática y conservar los gradientes químicos a través de la membrana celular, regulando la presión osmótica a excepción del magnesio que funciona como cofactor enzimático, además con un exceso en la concentración de cloro inhibe el crecimiento. Los elementos trazas como manganeso, cobre zinc, molibdeno etc. se encuentran en el medio de cultivo ya que pueden estar presentes como contaminantes en algunas otros ingredientes del mismo (58,66).

Para la producción de exopolisacáridos hay que tomar en cuenta los requerimientos nutricionales de la cepa de trabajo así como el tipo de polisacárido que se requiere producir ya que de esto dependerá la composición del medio de cultivo. Para la producción de exopolisacárido celular se requerirá una mayor concentración de la fuente de carbono y una menor concentración de la fuente de nitrógeno para poder así obtener el exopolisacárido de *Rhizobium loti* (14, 24, 58, 66,73).

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar procesos tecnológicos para la producción y caracterización química de un biopolímero (exopolisacárido) producido por *Rhizobium loti*.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

2.2.1 Identificación y caracterización química de la cepa de *Rhizobium loti*.

2.2.2 Evaluar la cinética de crecimiento y producción del EPS en medios de cultivos.

2.2.3 Comparar la producción del EPS en presencia de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno.

2.2.4 Optimizar los componentes del medio de cultivo (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sulfato de magnesio), así como las condiciones ambientales (pH, temperatura y aireación) para obtener un mejor rendimiento de EPS a partir del medio de cultivo de donde se obtuvo mayor producción.

2.2.5 Evaluar el efecto del carbonato de calcio, sulfato de manganeso y tres antibióticos en el rendimiento de EPS.

2.2.6 Realizar cinéticas de producción en fermentador con el medio optimizado.

2.2.7 Purificación del biopolímeros por *Rhizobium loti*.

2.2.8 Caracterización química del EPS utilizando Cromatografía en Papel, Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía líquida de Alta Resolución (CLAE).

2.2.9 Posibles aplicaciones del biopolímero obtenido de *Rhizobium loti*.



### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE LA CEPA DE TRABAJO

Se trabajó con una cepa de *Rhizobium loti*, donada por el Ministerio de Agricultura de Uruguay, A la cual se le realizaron pruebas de Identificación y caracterización, como tinción de Gram, prueba de acidificación del medio de cultivo, motilidad, determinación del tiempo de crecimiento, prueba de leche tornasolada y prueba de nodulación a *Lotus corniculatus* que es la especie forrajera hospedadora y se evaluó la formación de nódulos y su reaslamieto.

3.1.1 La prueba de acidificación de medio de cultivo se realizó en medio de cultivo base, al cual se le adicionó 5 ml de una solución de azul de bromotimol (la cual consiste en adicionar 1.25g de azul de bromotimol en 40 ml de NaOH 0.5 M), en base al medio de cultivo este vira a color azul a un pH mayor de 7.6 y a un color amarillo a un pH ácido por debajo de 6.0, el medio se inocula con la cepa, se incuba a 30 °C, con una agitación de 200 r.p.m. Durante 15 días o hasta que el pH cambie.

3.1.2 La prueba de motilidad se realizó por gota suspendida, a partir de un cultivo joven de bacterias en medio de cultivo líquido. Posteriormente se hace la prueba de gota suspendida para observar la motilidad de la bacteria.

3.1.3 La prueba de tiempo de crecimiento se realizó en cajas de Petri con el medio de cultivo Base, se sembró por dilución, la cepa se incubo a 30°C y se revisó diariamente hasta observar el crecimiento de la bacteria en la caja.

3.1.4 La prueba de leche tornasolada es una prueba especial para este género de bacterias. La cepa se sembró e incubo a 30°C por 30 días que es el tiempo en el que esta especie de *Rhizobium* crece sin observarse ningún cambio.

3.1.5 Para evaluar la Nodulación a la especie forrajera se utilizaron jarras de Leonard modificadas con tierra estéril, se prepararon las jarras de Leonard y se procedió a sembrar, las semillas previamente se resuspendieron en medio de cultivo con la cepa de trabajo la cual tenía tres días de crecimiento. Las semillas se sembraron por triplicado y se dejó en un área con sol y sombra, se regaba cada tercer día o cuando la planta lo requirió, hasta que la planta creció y floreció. Las jarras se revisaron cada tercer día hasta la aparición de nódulos en las raíces de la planta. Una vez formados los nódulos, los cuales se observaron de color rojo y carnosos, se prosiguió al reaislamiento de *Rhizobium loti* de estos y se hicieron pruebas de identidad. El reaislamiento se hizo en el medio rojo congo previo lavado y desinfección de los nódulos con agua estéril, alcohol y agua estéril en condiciones de esterilidad.

### 3.2 EVALUACION DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE EXOPOLISACÁRIDO

Se realizó la evaluación del crecimiento de *Rhizobium loti* en tres medios de cultivo experimentales: Vincent, Morris, y el medio Base calculado, la composición de dichos medios se muestran en la Tabla 2.

Tabla No 2. Componentes de los medios de cultivo experimentales.

Componente	Base calculado	Morris	Vincent
Manitol	10.0 g/l	10.0 g/l	10.0 g/l
Ext. de levadura	1.0	1.0	-----
Sulfato de amonio	-----	-----	1.0
Sulfato de magnesio	0.76	0.2	0.2
Fosfato dibásico de potasio	1.66	0.5	0.5
Cloruro férrico	0-1	0.1	0.1
Cloruro de sodio	0.26	0.1	0.1
Biotina	-----	-----	10 ug/l
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Las cinéticas de crecimiento en lote fueron realizadas por duplicado en matraces de un litro con 300 ml del medio de cultivo, a un pH de 7.0, y a temperatura de 30°C y una agitación constante de 200 r.p.m., cada matraz se inoculó con 10 ml de una suspensión bacteriana de tres días de crecimiento, y se determinó la D.O. a 600 nm cada 2 hrs hasta cumplir 28 hrs comenzando en la hora cero, para poder determinar en cual de los tres medios de cultivo se tiene una mayor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) con un menor tiempo de duplicación (tD), se dejó hasta el treceavo día de incubación para determinar la producción de EPS, tomando muestras cada 24 hrs. La determinación del peso seco de EPS se llevo a cabo tomando 10 ml del medio de cultivo cada 24 hrs, el cual fue centrifugado a 15,000 r.p.m./15 minutos eliminándose el paquete celular, al sobrenadante se le adicionó 3 veces su volúmen de alcohol isopopílico a 4°C y se agitó hasta la precipitación total del EPS por cada día de incubación.

### 3.3 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Una vez seleccionado el mejor medio de cultivo, se procedió a la optimizar los otros componentes, primero se evaluaron diferentes fuentes de carbono (sacarosa, manitol, glucosa) y después la fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio), posteriormente se prosiguió a optimizar las concentraciones de los componentes utilizando un método estadístico completamente al azar para determinar la concentración del componente por evaluar. La optimización del sulfato de magnesio del medio se realizaron en matraces de un litro c/u con 300 ml del medio de cultivo variando el componente y las concentraciones del componente, manteniéndose constante el fosfato dibásico de potasio, cloruro férrico, cloruro de sodio, fuente de carbono, fuente de nitrógeno. Los parámetros ambientales: temperatura de 30°C, pH de 7.0 y una agitación de 200 r.p.m., se mantuvieron constantes por los 11 días de incubación del medio de cultivo, cuando se sustituyó el extracto de levadura por sulfato de amonio se adicionó al medio 10  $\mu$ g/l de biotina. El parámetro que se utilizó para determinar cual de las concentraciones evaluadas era la mayor producción de EPS.

En las Tablas No 3, 4 y 5 se muestran las diferentes variaciones y condiciones de crecimiento de cada uno de los componentes del medio de cultivo a probar para *Rhizobium loti*, como fuente de carbono, nitrógeno.

Tabla No 3. Variaciones en las fuentes de carbono

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACION g/l
Manitol	10.0
Sacarosa	10.0
Glucosa	10.0
pH 7.0, 30°C, 200 r.p.m.	

Tabla No 4. Variaciones de la fuente de nitrógeno.

FUENTE DE NITROGENO	CONCENTRACION g/l
Extracto de levadura	1.5
Sulfato de amonio	1.5
pH 7.0, 30°C, 200 r.p.m.	

Tabla No 5. Variación en las concentraciones de los componentes

COMPONENTE	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
F. carbono	0.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0
F. de nitrógeno	0.0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.01					
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5					
NaCl	0.1					
Condiciones ambientales pH 7.0, 30°C, 200 r.p.m.						

### 3.4 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES

Con el medio optimizado pasamos a evaluar los parámetros ambientales como son: temperatura, pH y aireación. Para lo cual se realizaron cinéticas en lote, en matraz de un litro c/u con 300 ml de medio optimizado y se estimó el rendimiento de biopolímero (EPS) variando la temperatura de incubación de 30, 32 y 34 °C, permaneciendo constante el pH y la agitación, una vez determinado el rendimiento de EPS a diferentes temperatura se proseguirá a estimar la producción a diferentes pH (6.0 a 9.0) con una variación de 0.5 unidades de pH en el medio optimizado a la temperatura en la cual se obtuvo un mayor rendimiento. Con el pH y la temperatura se proseguirá a estimar el efecto que hay en la aireación con respecto a la producción de biopolímero. La aireación se realizo variando los volúmenes de medio de cultivo optimizado en los matraces de 1L desde 100 a 800 ml de medio de cultivo con una variación de 100 ml por tratamiento. A continuación se muestra en la tabla No 6 donde se muestran las diferentes condiciones de cada uno de los parámetros ambientales a evaluar una vez que se tenga optimizado la concentración y fuente de carbono y nitrógeno óptimos para la producción.

Tabla No 6. Variaciones en las condiciones ambientales

AIREACION % v/v	pH	TEMPERATURA °C
100	6.0	30
200	6.5	32
300	7.0	34
400	7.5	
500	8.0	
600	8.5	
700	9.0	
800		

### 3.5 ESTIMACION DEL EFECTO QUE PRESENTAN LA PRODUCCION DE BIOPOLIMERO EN PRESENCIA DE SALES DE MANGANESO Y DE CALCIO

En el medio de cultivo optimizado se evaluará el efecto que tienen las sales de carbonato de calcio y sulfato de manganeso, realizando cinéticas de producción en el medio de cultivo variando las diferentes concentraciones de calcio y posteriormente el efecto que hay en presencia de manganeso, ya que se ha observado que estos cationes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) tienen un efecto importante en la producción de EPS, En la tabla No 7 se muestran las diferentes concentraciones de las sales que se probaron.

Tabla No 7. Variaciones de carbonato y manganeso en la producción de EPS en el medio optimizado.

$\text{CaCO}_3$ g/l	0.0	1.0	2.0	3.0
$\text{MnSO}_4$ $\mu\text{g/l}$	0.0	120.	240	360

### 3.6 EVALUACION DEL EFECTO DE ANTIBIOTICOS SOBRE EL RENDIMIENTO DE BIOPOLIMERO

Se estimó el efecto en el rendimiento de EPS cuando se adicionó al medio de cultivo un antibiótico a concentraciones subletales, utilizando dos antibióticos que actúen a nivel de pared (penicilina y bacitracina), y otro que actúe a nivel de membrana (polimixina B). Se espera una pared y membrana celular débiles, por lo tanto el EPS sería fácilmente excretado al medio de cultivo y así se obtendría una mayor producción de EPS. En la tabla No 8 se muestran los diferentes tratamientos a evaluar.

Tabla No 8. Variaciones en las concentraciones de antibióticos

PENICILINA mg/l	BACITRACINA mg/l	POLIMIXINA B mg/l
0.0	0.0	0.0
3.0	3.0	3.0
6.0	6.0	6.0

### 3.7 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMERO EN FERMENTADOR

Con el medio de cultivo optimizado, condiciones ambientales, las sales de calcio y manganeso y los antibióticos se procedió a realizar la producción en lote del EPS en un fermentador New Brunswick de 19 litros, con un volumen de operación de 14 litros de medio de cultivo. Manteniendo constante el pH a 8.0, la temperatura a 30 °C, una agitación de 200 r.p.m. y una aireación 1.0 %v/v. Se realizaron diferentes determinaciones (D.O, producción de EPS, proteína unicelular bacteriana g/L). Para detectar la concentración de proteínas del producto se utilizó el Método de Bradford, para la determinación de peso seco bacteriano se usó membrana milipore de 0.2 $\mu$  de poro.

### CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EXOPOLISACÁRIDO

#### 3.8 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO.

Una vez obtenido el EPS del medio de cultivo optimizado se procedió a realizar la caracterización química, para lo cual se purificó el EPS obtenido de *Rhizobium loti*, la purificación del EPS se realizó de la siguiente manera, se centrifugó a 15000 r.p.m./15 min a 4 °C, hasta que el sobrenadante quedó completamente transparente, lo que indica que no hay células bacterianas, lo cual se comprobó observando al microscopio el sobrenadante, se separó el sobrenadante del paquete celular y al sobrenadante se le adicionó tres veces su volumen de alcohol isopropílico frío para precipitar el EPS que es liberado al medio de cultivo por las bacterias. El EPS precipitado se colocó en una membrana de diálisis y se dializó por 5 días contra agua destilada a 4°C en agitación constante y con cambios periódicos de agua cada 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se le realizaron al EPS dializado determinaciones de proteínas ya que se ha reportado que pueden ser unos de los contaminantes más comunes en el EPS, por el método de Bradford e inmunoelectroforesis. Si se encontraran proteínas se

volvería a precipitar y dializar nuevamente el EPS hasta que no se detectaran proteínas.

### 3.9 DETERMINACION DE LAS FRACCIONES QUE COMPONE EL EPS

Una de las características que presentan los biopólimeros bacterianos es que pueden estar formados por uno o mas polisacáridos por lo que se determino si este EPS estaba compuesto por mas de un polisacárido además de evaluar la metodología de CLAE (Cromatografía líquida de alta resolución), El EPS purificado y dializado se hizo pasar por una columna de TSK gel G5000 PWXL (TOSHAAS), en una fase móvil de buffer de fosfatos y NaCl a un pH de 6.8, a una velocidad de flujo de 1 ml/min., para la detección de las fracciones se uso U.V a una longitud de onda de 205 nm. La determinación del peso molecular de las fracciones se determinó por comparación con los estándares (Biorrad) por filtración en gel provenientes de una mezcla liofilizada de: tiroglobulina (bovina), 670,000d, gama globulina (bovina) 158,000d, ovoalbumina 44,000d, mioglobina (caballo) 17,000d y cianocobalamina 1,350d.

### 3.10 OBTENCION DE LAS FRACCIONES QUE COMPONEN AL BIOPOLIMERO OBTENIDO DE *Rhizobium loti*

Para la determinación de las fracciones que componen el EPS se siguiendo la metodología descrita por Amemura et.al. (1) la cual consiste en una primera precipitación del polisacárido con alcohol etílico a 4°C, fue centrifugado a 5000 r.p.m por 10 minutos a 4°C, una vez centrifugado se separo el precipitado que corresponde a una de las fracciones, la de alto peso molecular, al sobrenadante se le adiciona 13 veces su volumen de alcohol isopropílico, se agita y se centrifuga nuevamente con lo cual se obtuvo una segunda fracción del polisacárido, la de bajo peso molecular. Cada una de las fracciones fue dializada y se les determinó la presencia de proteínas.



### 3.11 CARACTERIZACION EN CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y CAPA FINA.

El análisis químico de EPS se realizó por medio de Cromatografía en papel y posteriormente se comprobó por Cromatografía en capa fina (CCF).

Del EPS dializado se hicieron varias pruebas de hidrólisis total y parcial con  $H_2SO_4$  a diferentes concentraciones y tiempos de hidrólisis a una temperatura de  $121^\circ C$ , este hidrolizado fue neutralizado con hidróxido de bario, se filtro en membrana milipore de  $0.22 \mu m$  con el filtrado se corrieron cromatogramas en papel para comprobar si se llevo a cabo la hidrólisis del polímero por medio de las bandas que se presentaban en el papel, indicando que el polisacárido se fragmento. Se utilizó muestras del EPS total y de las fracciones que lo forman la de alto y bajo peso molecular, en la Tabla No 9 se muestran los tiempos y las concentraciones de ácido para llevar acabo la hidrólisis del biopolímero.

Tabla No 9. Tiempos de hidrólisis y concentraciones de ácido

ACIDO SULFURICO (M)	TIEMPO DE HIDROLISIS
0.5	2 hrs
0.5	2:30 hrs
1.0	2 hrs
1.0	2:30 hrs
2.0	2 hrs
2.0	2:30 hrs
4.0	30 minutos
4.0	1 hrs

Se hidrolizaron 20 mg de EPS total y cada una de las facciones encontradas de las diferentes condiciones, se neutralizó y se montaron las muestras en papel Whatman # 1. Las muestras standard de los monosacáridos más comunes reportados (9, 13, 15, 26, 32,70,) para EPS como lo son: galactosa, ácido D-galacturónico, glucosa, manosa

y ácido glucorónico. Se usaron a una concentración de 10mg/ml en agua destilada, y se procedió a realizar la Cromatografía en papel (CP) con diferentes fases móviles de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla No. 10

Tabla No 10. Composición de las fases móviles

Fase móvil	Proporciones
Acetonitrilo : agua	85 :15
Butanol : piridina : agua	5 :3 :2
Butanol : etanol : agua	4 : 1 :5
Butanol : etanol : agua	5 : 1 : 4
Acetato de etilo : propanol : agua	3 : 6 :1
Propanol : Acetonitrilo : agua	6 : 3 :1
Acetonitrilo : agua	5: 5
Acetonitrilo : agua	7.5 : 2.5
Butanol : piridina : agua	45 : 30 : 35

Una vez corrida la fase móvil en la cámara se revelaron los cromatogramas para evidenciar la posible composición del EPS, los reveladores utilizados se aplicaron con atomizadores, en la Tabla No. 11 se muestran los diferentes reveladores utilizados, fueron secados a temperaturas de 50 a 100 °C cuidando de no quemar los cromatogramas, se probaron todas las concentraciones de ácido, tiempos de hidrólisis, fases móviles y reveladores para las muestras. En la Tabla No 11 se muestran los diferentes reveladores utilizados

Tabla No 11. Reveladores usados

REVELADORES
Nitrato de plata
P- anisidina clorada
ácido ftálico, anilina butanol agua
ácido sulfúrico-etanol

Una vez realizada las Cromatografía en papel se corrieron los Cromatogramas en silica gel (CPF) utilizando las mejores condiciones de hidrólisis, fase móvil y reveladores encontrados para la CP, para poder así corroborar los resultados de los cromatogramas en papel.

### 3.12 ESTUDIO QUIMICO DEL EPS POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Con los datos obtenidos de las Cromatografía en papel y CCF se hicieron los estudios de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para confirmar la composición química del exopolisacárido así como de cada una de las fracciones encontradas, para lo cual se uso la siguiente metodología. Una vez realizadas las hidrólisis en ácido sulfúrico se extrajo los restos del polisacárido con cloroformo. La mezcla de cloroformo, polisacárido se lavó con agua destilada hasta un pH de 7.0, cuando se alcanzó el pH deseado, se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y se evaporó el cloroformo hasta un volumen aproximado de 20 a 22 ml posteriormente se alicuoto en viales y se evaporo a sequedad. Posteriormente las muestras fueron disueltas en cloroformo grado HPLC y se inyecto al equipo a las siguientes condiciones de trabajo: Columna TSK gel G5000 PWXL (TOSOHAAS), fase móvil (Buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05M,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  0.05M, NaCl 0.15M, pH 6.8), velocidad de flujo de 1 ml/min, detector de UV a 203 nm

## 4.0 RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el trabajo experimental se presentan a continuación

### 4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA CEPA DE TRABAJO.

Los resultados obtenidos del aislamiento e identificación de la cepa de trabajo se resumen en la Tabla No 12.

Tabla No 12. Pruebas de identidad realizadas a la cepa de estudio

PRUEBA DE IDENTIDAD	RESULTADO
Tinción de Gram	Gram positivo
Morfología bacteriana	Bastones
Morfología colonial	Colonias blancas convexas opacas con producción de mucilago
Motilidad	positiva
Producción de ácido	positivo en 48 horas
Prueba de leche tornasolada	Sin cambios en 31 días
Nodulación en <i>Lotus corniculatus</i>	Presencia de nódulos en la raíz
Aislamiento de <i>Rhizobium loti</i> de nódulos <i>Lotus corniculatus</i>	Positivo

Los resultados del aislamiento e identificación de la cepa trabajada permitieron comprobar que era una cepa de *Rhizobium loti* fijadora de nitrógeno en forma simbiótica, de crecimiento rápido, productora de ácido y lo más importante produce un mucilago, el cual es de nuestro interés para continuar con el trabajo experimental.

#### 4.2 EVALUACION DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO.

La evaluación del crecimiento de *Rhizobium* en los tres medios de cultivo nos permitió seleccionar el medio Base calculado como óptimo, en el cual el crecimiento bacteriano se adapta mejor y por consiguiente su velocidad específica de crecimiento fue mayor ( $\mu$ ), así como menor su tiempo de duplicación (tD), y con una mayor producción de exopolisacárido. En las Figuras No 1, 2, 3 y 4 se observa el crecimiento y la producción de EPS en los tres medios de cultivo probados.

FIGURA 1. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO

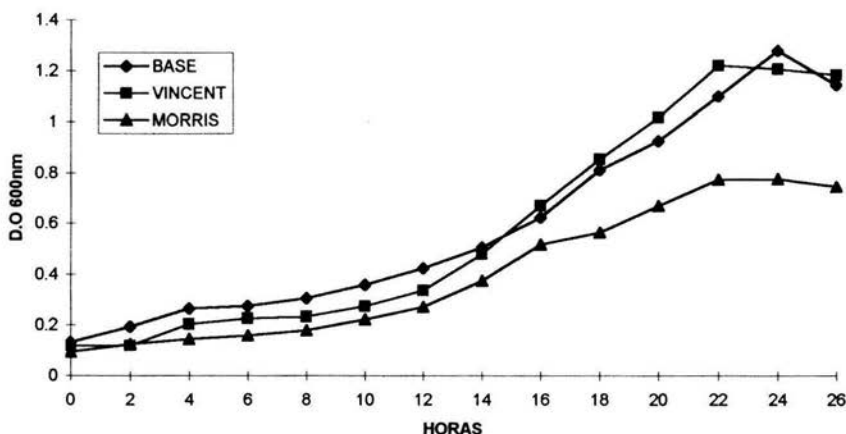


FIGURA 2. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN TRES DIFERENTE MEDIOS DE CULTIVO

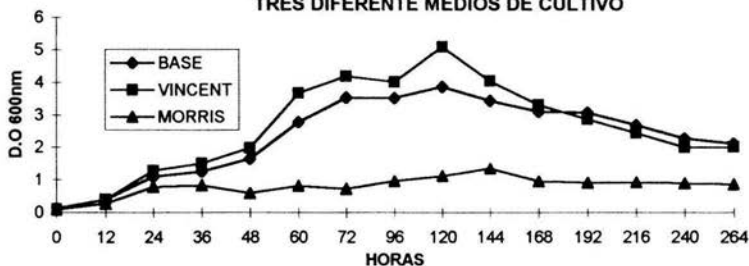


FIGURA 3. CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN TRES DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

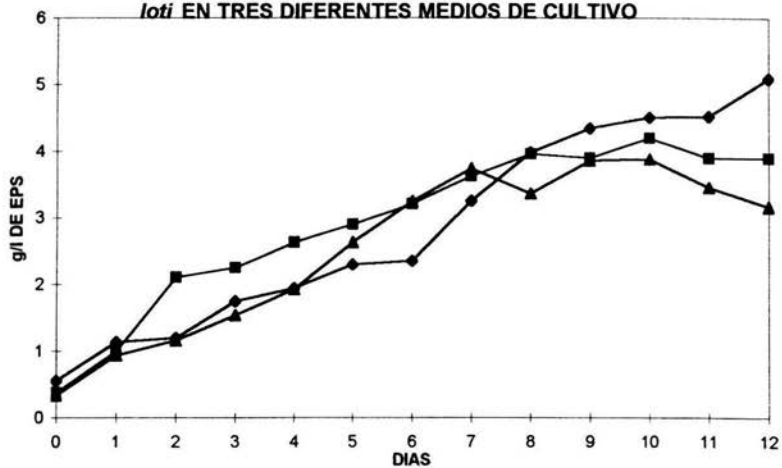
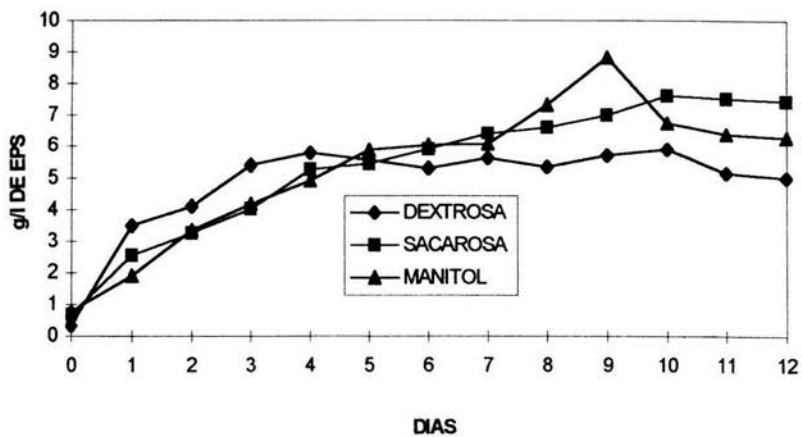


FIGURA 4 CINETICA DE PRODUCCION DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE CON TRES DIFERENTES AZUCARES



En la Tabla No. 13, se muestran los resultados de las cinéticas de crecimiento y producción de exopolisacárido en los tres diferentes medios de cultivo, los datos se analizaron por diseño completamente al azar. Con los resultados se seleccionó el mejor medio de cultivo, el cuál fue el medio base calculado mostrando una producción de EPS de 4.72 g/l,  $\mu$  0.116 hr<sup>-1</sup> y un tD 5.92 hrs y resultando que los medios de cultivo Vincent y Morris no son los mas adecuados para la producción del EPS.

Tabla No 13. Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación (tD) y producción de EPS de *Rhizobium loti* en tres medios de cultivo

	$\mu$	tD	EPS g/l
Base	0.116a	5.92	4.72
Vincent	0.1085b	6.42	3.99
Morris	0.1065b	6.51	3.48
ee	0.0054	0.38	
	P<0.07	P<0.006	

ee = error estándar.

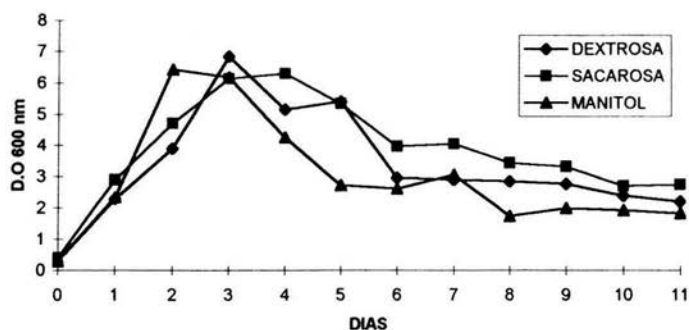
a,b = diferencia significativa (P<0.05)

#### 4.3. EVALUACION DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE

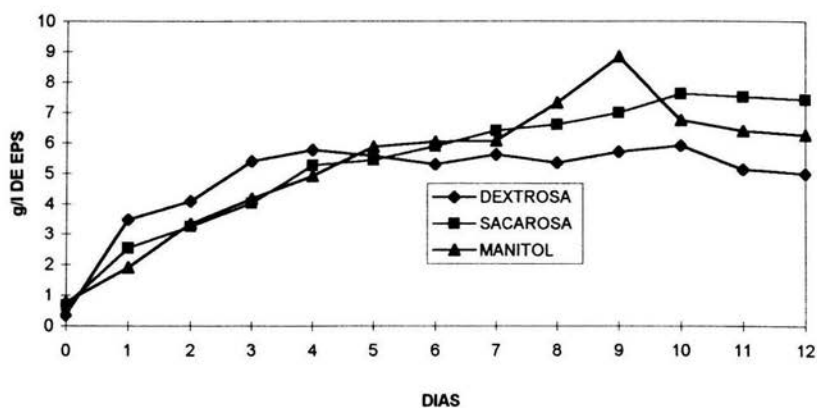
Se evaluó la variación en la producción de EPS en el medio de cultivo Base dependiendo de la fuente de carbono la cual se sustituyó por dextrosa y sacarosa. Se realizaron cinéticas de producción de EPS, En las Figuras 5 y 6 donde se observa que la mejor fuente de carbono es el manitol donde la producción de EPS es mayor y se alcanza una mayor crecimiento en un menor tiempo de incubación, siendo la sacarosa una segunda opción para usarse como fuente de carbono en la producción de EPS para *Rhizobium loti*. Estos datos corresponde con lo reportado por algunos autores

donde se recomienda el uso de manitol como fuente de carbono para la producción de biomasa y exopolisacáridos (14,38,56)

**FIGURA 5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE CON TRES DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**



**FIGURA 6. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE CON TRES DIFERENTES AZUCARES**



Al realizar un análisis estadístico completamente al azar de los datos de producción del EPS se encontró que la mejor fuente de carbono es manitol con una producción de 0.69 g/l/día existiendo una diferencia significativa de 0.09 g/l/día con respecto a los otros azúcares como se muestra en la Tabla No 14. Por lo cual se decidió trabajar con manitol como fuente de carbono.



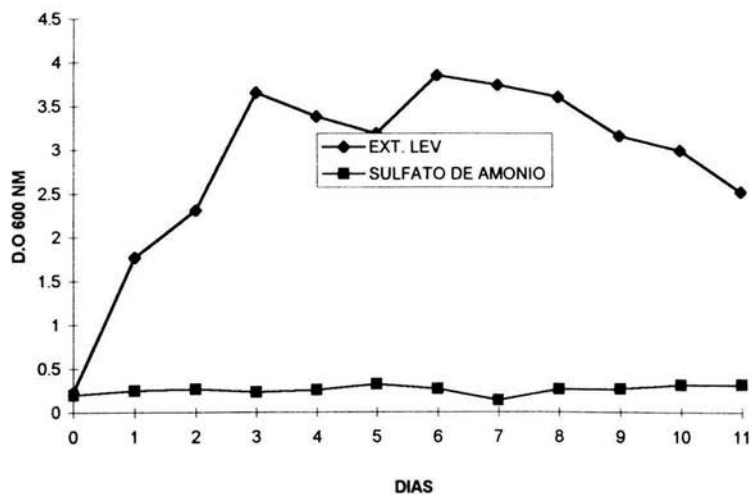
TABLA No 14. PRODUCCION DEL EPS EN MEDIO BASE CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

FUENTE DE CARBONO 10 g/l	PRODUCCION g/l/día
DEXTROSA	0.41 c
SACAROSA	0.60 b
MANITOL	0.69 a
a,b,c = diferencia significativa (P<0.001)	

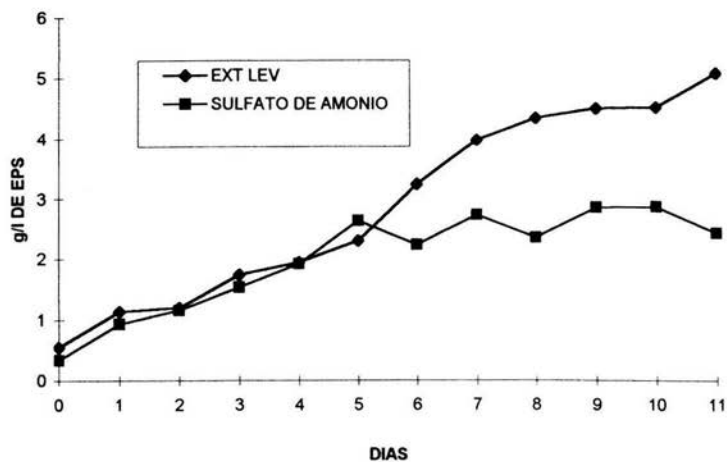
#### 4.4. EVALUACION DE DOS FUENTES DE NITROGENO EN LA PRODUCCION DE BIOPOLIMERO EN MEDIO BASE.

Se estudio el efecto que tiene una fuente de nitrógeno orgánica (extracto de levadura) y una inorgánica (sulfato de amonio) en la producción de EPS. Para esto se hicieron las cinéticas de crecimiento y de producción del EPS. En las Figuras 7 y 8 se muestran las cinéticas de crecimiento y producción respectivamente y se observa que cuando se utiliza sulfato de amonio como fuente de energía la cepa de trabajo no logra adaptarse al medio, no observándose crecimiento ni producción de EPS, sin embargo si se utiliza la fuente de nitrógeno orgánica (extracto de levadura) *Rhizobium loti* crece muy bien y con una producción de EPS de 0.69 g/l/día. Esta fuente de energía además proporciona otras sustancias que favorecen el crecimiento microbiano y la producción de biomasa, lo cual genera mayor cantidad de EPS. Con base en la evaluación de la fuente de nitrógeno se encontró que la fuente orgánica resulto ser mucho mejor para la producción del EPS, lo cual se debe al aporte de vitaminas y otros compuestos que contiene el extracto de levadura (58,59). Para la producción del EPS en el género *Rhizobium* por lo general utiliza como fuente de nitrógeno el ácido glutámico. (60) El cual haría muy caro el medio de cultivo de ahí la selección de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**FIGURA 7. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE CON DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO**



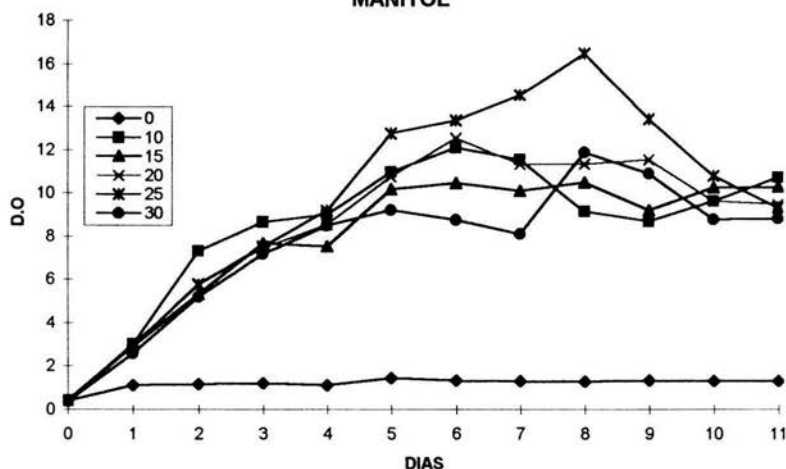
**FIGURA 8. CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE CON DIFERENTE FUENTE DE ENERGIA**



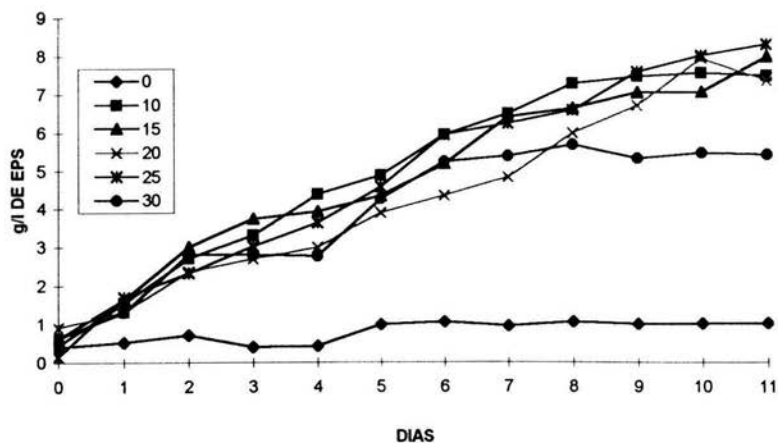
#### 4.5. EVALUACION DE LA PRODUCCION DE EPS EN MEDIO A DIFERENTES NIVELES DE MANITOL.

Las Figuras 9 y 10 obtenidas del crecimiento y producción de biopolímero al variar la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo, muestra que si se aumenta o disminuye la concentración de manitol, se lleva a cabo una represión metabólica por lo que hay que adicionar la cantidad adecuada de manitol al medio de cultivo, lo cual se refleja en el mejor crecimiento y producción del EPS. El género *Rhizobium* tiene la capacidad de producir un heteropolisacárido el cual puede estar formado por mas de un polisacárido, estos se producen en diferentes estadios del crecimiento bacteriano, de ahí que se observen dos picos en la curva de crecimiento, y en la curva de producción se observe la tendencia al aumento hasta el día 8 de incubación y luego en algunos casos la cantidad de EPS se mantiene. Para el caso de 25 y 20g/l de manitol la tendencia es al aumento y un posterior descenso cuando los nutrientes se agotan, o hay un descenso en el pH el cual impide que la bacteria siga multiplicándose lo cual corresponde con algunos autores (58, 69).

FIGURA 9. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANITOL



**FIGURA 10. CINETICA DE PRODUCCION DEL EPS OBTENIDO DE *Rhizobium loti* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANITOL**



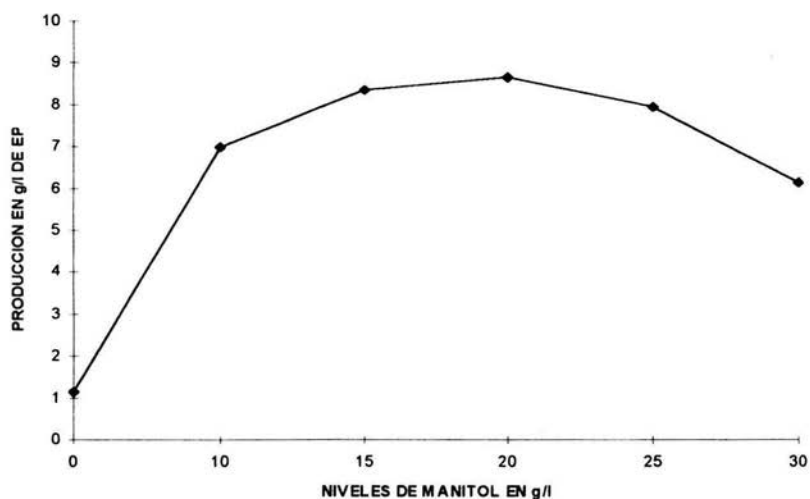
Se realizó un análisis estadístico utilizando los valores máximos de producción en cada uno de los niveles probados los cuales se ajustaron a una ecuación del tipo  $a + bx + cx^2$  obteniéndose la Figura 11.

Del análisis estadístico se obtuvo una ecuación cuadrática, la cual nos explica la producción de exopolisacárido al variar la concentración de la fuente de carbono y se puede predecir la cantidad de EPS que excretaría la bacteria si se modifica la cantidad de manitol en el medio de cultivo según la ecuación que se muestra continuación.

$$\text{Producción de EPS g/l} = 1.15 + 0.797(\text{niv}) - 0.21 (\text{niv})^2$$

En la Figura No 11. Se observa que la máxima producción de EPS se obtiene al adicionar al medio de cultivo 20g/l de manitol con lo cual nosotros teóricamente obtendríamos 8.69 g de EPS/ l de medio de cultivo. Encontrando además que existe una represión catabólica cuando se adicionan al medio de cultivo más de 20 g/l de manitol.

FIGURA 11. EFECTO DEL MANITOL EN LA PRODUCCION DE EPS

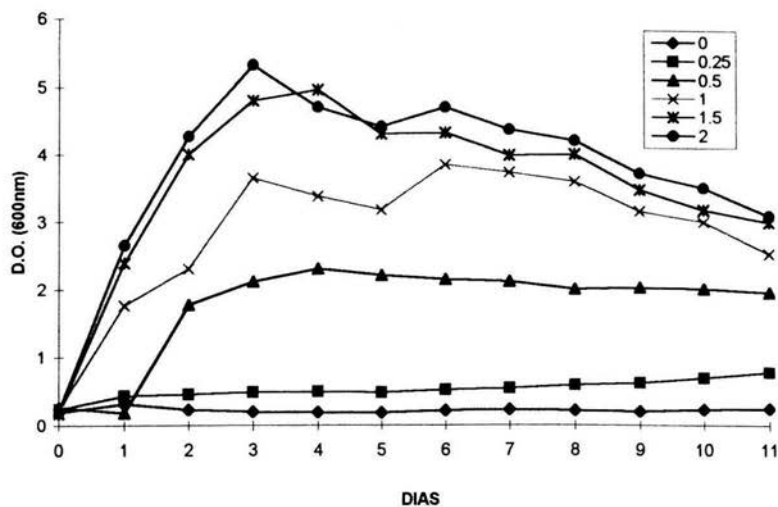


#### 4.6. ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE EPS EN MEDIO BASE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE LEVADURA.

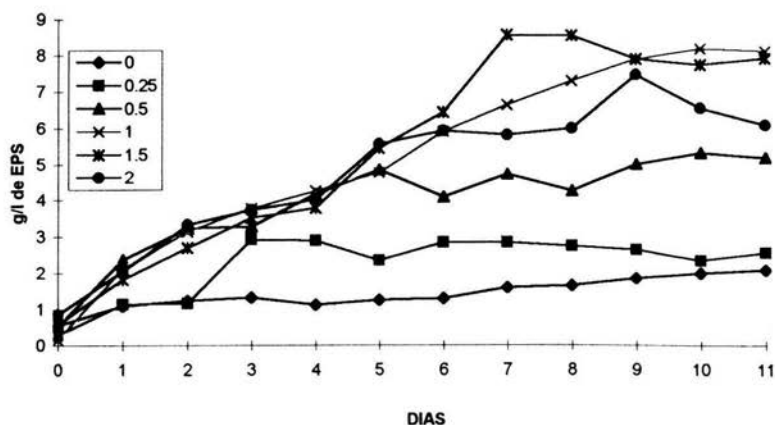
Se estudió el comportamiento de *Rh. loti* en el medio base con diferentes concentraciones de extracto de levadura desde 0 hasta 2 g/l, encontrándose los siguientes resultados que se muestran en las Figuras 12 y 13. A una concentración de 1.5 y 2.0 g/l de extracto de levadura se alcanza el mayor crecimiento microbiano hacia el tercer día de incubación. A concentraciones menores se alcanza en el segundo día de incubación.

La excreción del EPS alcanza su máximo en el día 7 y 8 cuando se usaron concentraciones de 1.0 y 1.5g/l y se puede observar además que la excreción de EPS es similar cuando se adicionan 1.0 ó 2.0 g/l de extracto de levadura, esto se debe al igual que en el caso del manitol, a una represión catabólica por exceso y o bajos niveles de fuente de nitrógeno.

**FIGURA 12. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXT. DE LEV.**



**FIGURA 13. CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXT. DE LEV.**



Los datos de la cinética de producción de EPS se analizaron por análisis de regresión con los valores máximos de producción de EPS obtenidos de los diferentes niveles de extracto de levadura empleados, datos que se ajustaron al siguiente modelo

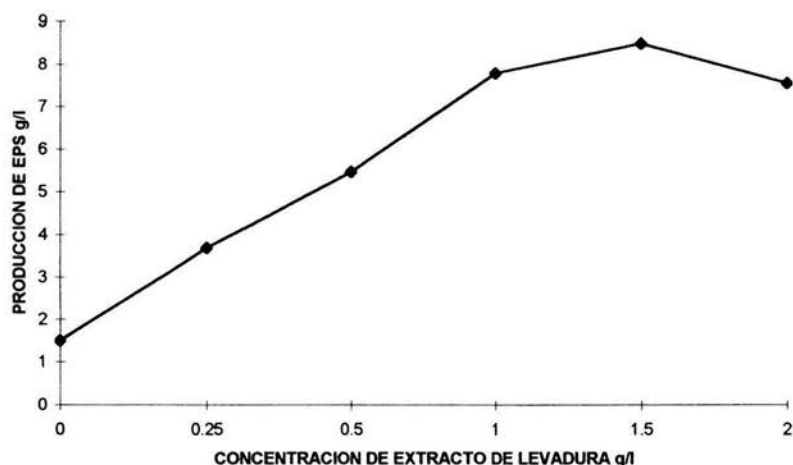
matemático  $a + bx + cx^2$  encontrando así la ecuación que nos explica el comportamiento de la fuente de energía empleada es la siguiente.

$$\text{Producción de EPS g/l} = 1.52 + 9.52(\text{niv}) - 3.25(\text{niv})^2$$

Observándose que a una concentración de 1.5 g de extracto de levadura se tiene la máxima producción del biopolímero que es de 8.48 g/l del medio de cultivo.

En la Figura No 14, Se muestra el comportamiento de la producción de biopolímero a diferentes niveles de extracto de levadura. Se observa que conforme se aumenta la fuente de nitrógeno va aumentando la producción de biopolímero. Es interesante observar que a una concentración de 1,5 g/l se tiene la máxima se excreción de biopolímero y a partir de esta al aumentar la concentración de extracto de levadura da una disminución en la excreción.

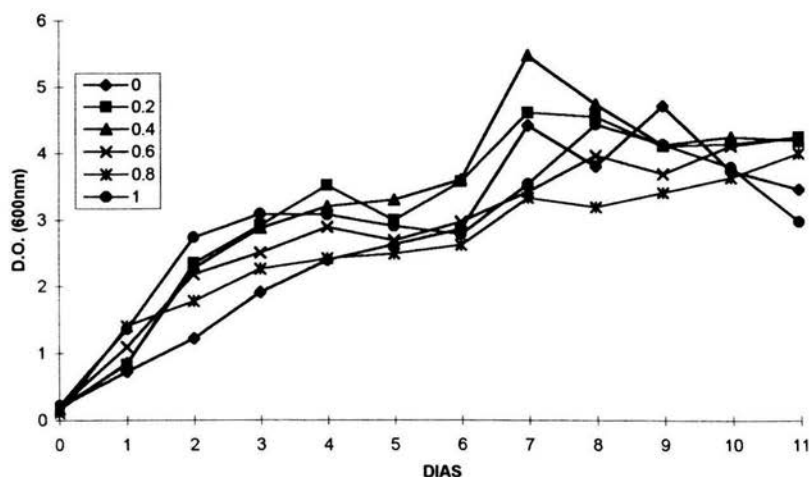
**FIGURA 14. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE LEVADURA EN LA PRODUCCION DE EPS**



#### 4.7. EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE MAGNESIO EN LA PRODUCCION DEL EPS EN EL MEDIO BASE

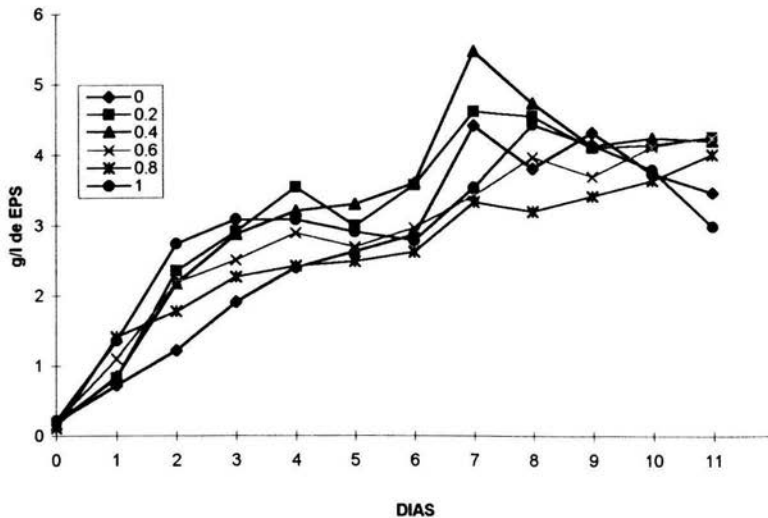
La evaluación de las diferentes concentraciones de sulfato de magnesio en el medio de cultivo base se realizó al variar las concentraciones desde 0 hasta 1 g/l con una variación de 0.2 g/l. Las Figuras No 15 y 16 muestran el comportamiento que se obtuvo en el crecimiento y la excreción del EPS al medio de cultivo. Se observó que en el cuarto día de incubación se llega al máximo de crecimiento y después del día 5 y 6 disminuye para volver a aumentar en el día séptimo lo cual nos indica la producción de un segundo polisacárido, que las bacterias consumen los metabolitos producidos o los microorganismos muertos para volver a producir polisacáridos, de ahí que se observe como una curva diauxica. El magnesio sirve como un catalizador en una gran cantidad de reacciones enzimáticas, esto a bajas concentraciones, y a alta funciona como inhibidor. Obteniéndose por lo tanto un mayor crecimiento y excreción de EPS con 0.04 g/l de sulfato de magnesio como se puede observar gráficamente.

**FIGURA 15. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SULFATO DE MAGNESIO**





**FIGURA 16. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SULFATO DE MAGNESIO**



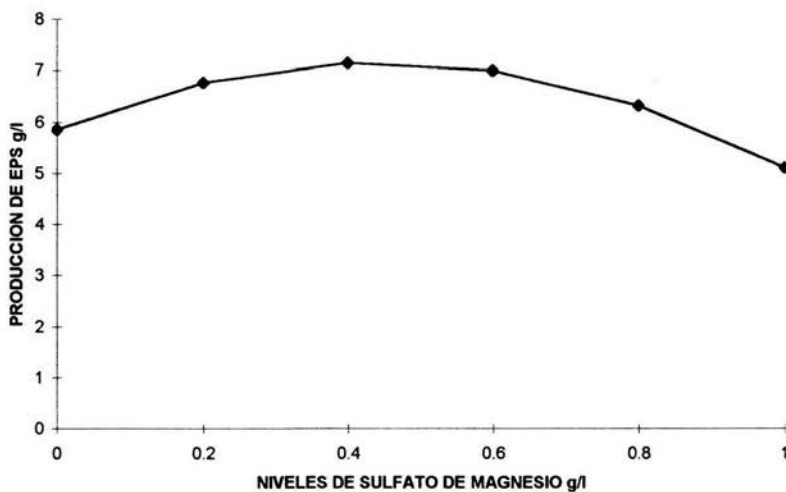
El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con los valores máximos de producción de EPS en cada uno de los tratamientos, ajustándose a un modelo matemático a  $+ bx + cx^2$ . La ecuación que se ajusta y nos explica este comportamiento es la siguiente.

$$\text{Producción de EPS g/l} = 5.86 + 5.86 (\text{niv}) - 6.61 (\text{niv})^2$$

Encontrando que la máxima producción de biopolímero se obtiene a una concentración de 0.4 g de sulfato de magnesio/l de medio de cultivo obteniéndose 7.14 g del EPS por litro de medio de cultivo, como se observa en la Figura 17. Se observa además que variaciones de 0.2 a 0.6 g/l de sulfato de magnesio no alteran la excreción del EPS significativamente, esta sal no es esencial para la producción pero a concentraciones elevadas éste inhibe la excreción del biopolímero. Por lo que la concentración encontrada de magnesio está dentro de las concentraciones recomendadas por algunos autores, las cuales oscilan entre 0.2 a 0.5 g/l de medio, los cuales varían

dependiendo del género bacteriano y del biopolímero producido. (72,7,26,24) Algunos autores adicionan este cation por ser requerido por un sin fin de enzimas y para un óptimo crecimiento de la bacteria (61). El efecto en la producción del EPS es una consecuencia de la producción de biomasa lo que refleja un aumento en la cantidad de exopolisacárido obtenido (24). En algunos trabajos se ha encontrado que el magnesio presenta un efecto negativo en la producción del biopolímero pero en este caso al igual que en la producción de la goma Xantana no hay efecto en la producción (56), además, este cation presenta actividad en muchas reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis extracelular (51).

**FIGURA 17. EFECTO DEL SULFATO DE MAGNESIO EN LA PRODUCCION DE EPS**

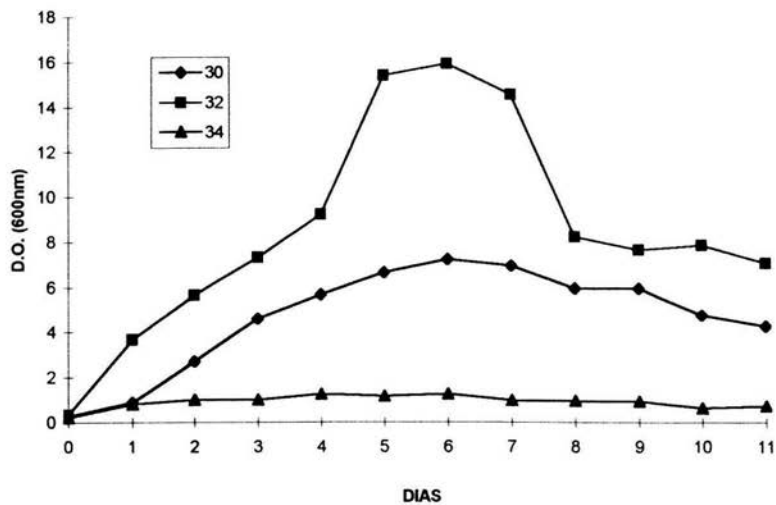


#### 4.8.1. EVALUACION DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL MEDIO BASE OPTIMIZADO PARA LA PRODUCCION DE EPS.

En las Figuras No 18 y 19 se muestra el comportamiento de la cepa de estudio en su crecimiento y producción de biopolímero al variar la temperatura de incubación del medio optimizado, donde se observó que la temperatura óptima de incubación esta entre los 30 y 32 °C siendo la mas adecuada 32°C aunque se observa que a una temperatura de 32°C en los días 4 y 5 se da un incremento en la D.O. Con respecto a la producción del biopolímero este se ve favorecido a 32°C, lo cual explica una de las funciones de los exopolisacáridos bacterianos durante la fijación de nitrógeno, en la cual actúan como mecanismo de protección en contra de la desecación y altas temperaturas, de ahí que con esta temperatura la excreción del EPS aumentó. A temperaturas por arriba de 32°C la bacteria muere. El incremento de la excreción de EPS durante los días 5 a 8 coincide también con lo que algunos autores (7,25) indican sobre la producción de los polisacáridos  $\beta$ -cíclicos, que juegan un papel osmoregulador evitando así la deshidratación de la bacteria y que se incrementa su producción a temperaturas por arriba de 33°C (7)

Como se puede apreciar en las Figuras No 18 y 19 la temperatura de crecimiento más adecuada para la producción de EPS es de 32 °C así como la de 30 °C que es la temperatura ideal para el crecimiento del género *Rhizobium*, encontrándose una máxima excreción de biopolímero a 32°C con 9.6 g/l de EPS

**FIGURA 18. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE OPTIMIZADO A DIFERENTES TEMPERATURAS**



**FIGURA 19. CINETICA DE PRODUCCIÓN DEL EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE OPTIMIZADO A DIFERENTES TEMPERATURAS**

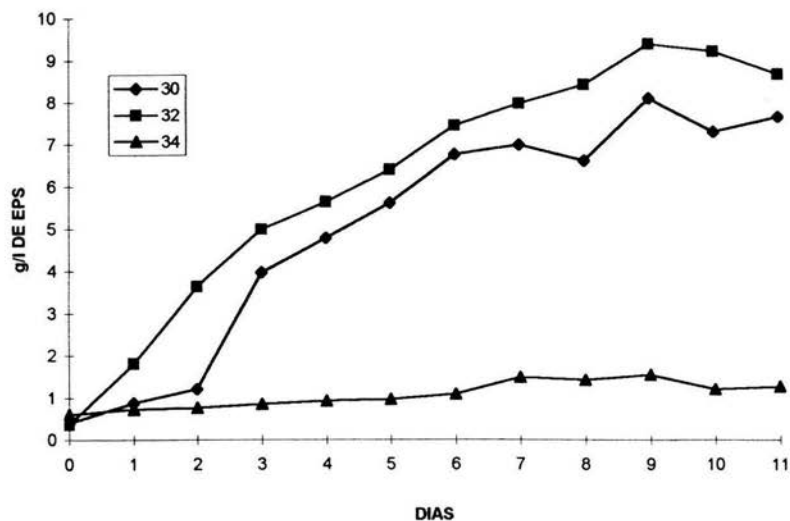
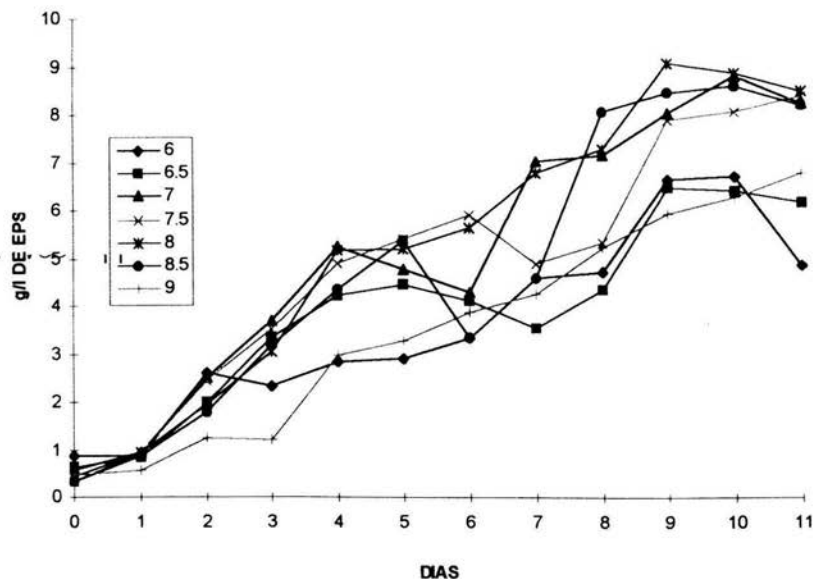




FIGURA 21. CINETICA DE PRODUCCION DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE OPTIMIZADO A 32°C Y DIFERENTES pH's



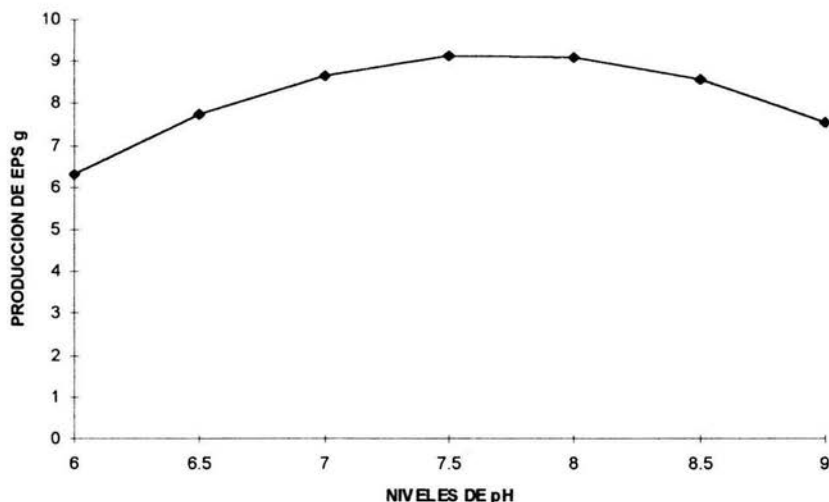
La información obtenida de la producción máxima de EPS en cada uno de los diferentes niveles de pH trabajados permitió que se ajustara a la ecuación cuadrática que se ha estado empleando para explicar el comportamiento general de la producción. La ecuación que permitió un mejor ajuste es la siguiente.

$$\text{Producción de EPS g/l} = -49.13 + 15.12(\text{pH}) - 0.98(\text{pH})^2$$

Encontrando que a un pH de 8.0 se tiene una producción de 9.11 g/l de medio optimizado a 32° C. A continuación se muestra la Figura No. 22 que nos explica la ecuación anterior. Ahi podemos observar que en el intervalo de pH de 7.5 a 8.0 se puede trabajar obteniendo una producción similar. El pH que se utilizara será de 8.0 lo cual no afectara a la cepa de trabajo. El pH donde se encontró una mayor producción corresponde con lo reportado por varios autores donde se menciona que al tener un metabolismo rápido, este tipo de bacterias consumen la fuente de carbono produciendo rápidamente ácidos, por otro lado esto le permite crecer a pH de 8.0 con

el transcurso del tiempo se prolonga más la fase estacionaria de crecimiento microbiano implicando un aumento en la producción del exopolisacárido.

FIGURA 22. EFECTO DEL pH EN LA PRODUCCION DE EPS

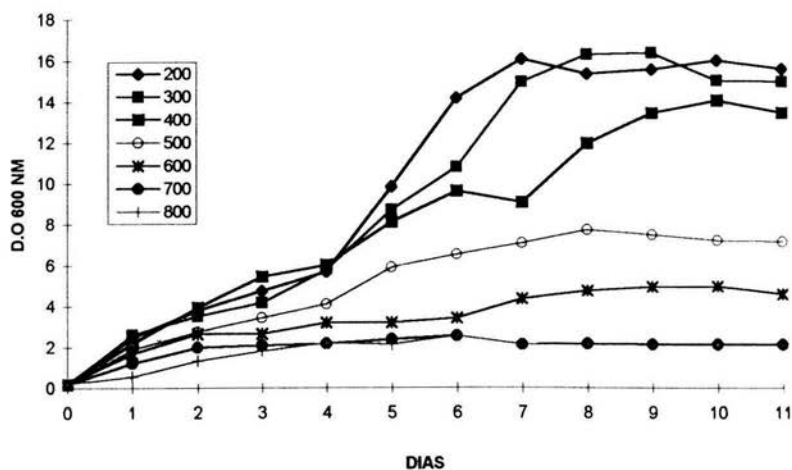


#### 4.8.3. EFECTO DE LA AEREACION EN LA EXCRECION DE EPS EN EL MEDIO BASE OPTIMIZADO A 32°C Y pH de 32 °C

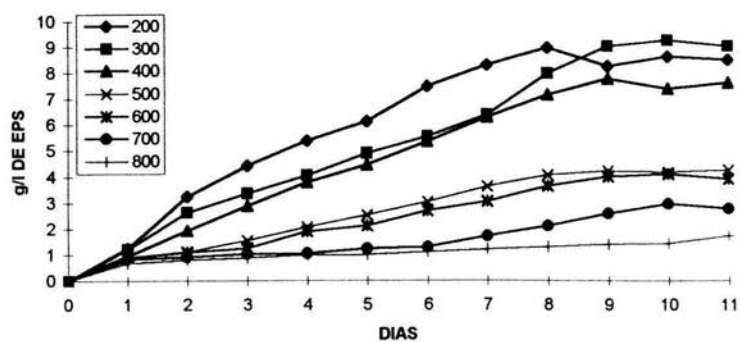
En las Figuras No. 23 y 24. Las cuales se obtuvieron al variar el volumen de aire en el medio de cultivo, de 200 hasta 800 ml de medio de cultivo, con una variación de 100 ml por tratamiento. Se puede observar que a una mayor concentración de oxígeno disuelto o mayor volumen de aire en los matraces se puede tener un mayor crecimiento microbiano y excreción de biopolímero. El género *Rhizobium* es una bacteria aerobia por lo que el oxígeno favorece su crecimiento. Esta bacteria fijadora de nitrógeno requiere condiciones anaerobias para poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno, ya que la enzima nitrogenasa se inactiva en presencia de oxígeno, por lo que la bacteria

produce EPS, para que se lleven a cabo condiciones anaerobias y se realice la fijación de nitrógeno (27, 40,60).

**FIGURA 23. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE OPTIMIZADO 32°C, pH DE 8.0 Y DIFERENTES VOLUMENES DE AIRE**



**FIGURA 24. CINETICA DE PRODUCCION DEL EPS OBTENIDO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO BASE OPTIMIZADO A 32°C, pH 8.0 Y DIFERENTES PORCENTAJES DE AIRE**





El efecto de la aireación en el medio de cultivo se puede explicar ajustando las producciones del EPS a una ecuación lineal en la que se explica el comportamiento de la bacteria al variar su concentración de oxígeno, como se muestra en la Figura 25. La producción de para cada corrida fue obtenida por medio de regresión lineal de producción sobre días. La pendiente de la regresión para cada corrida se utilizó como la producción diaria de biopolímero y se corrió un análisis de varianza presentando diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.0001$ ) que fueron comparadas por medio del procedimiento de mínimos cuadrados (LSMEANS) del paquete estadístico SAS. Las medias para los tratamientos utilizados y el error estándar se muestran en la Tabla No 14.

Tabla No 14. Producción de EPS (g EPS/día) con diferentes cantidades de medio de cultivo y diferentes tratamientos de aireación.

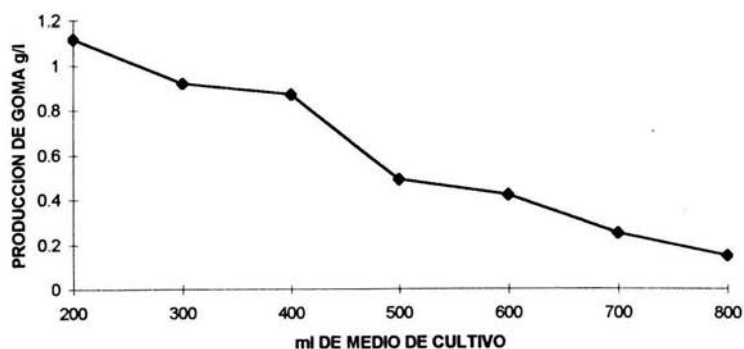
TRATAMIENTO	PRODUCCION (g EPS/día)
200 ml de medio	1.12
300 ml de medio	0.92
400 ml de medio	0.87
500 ml de medio	0.49
600 ml de medio	0.42
700 ml de medio	0.25
800 ml de medio	0.15
error estándar global	0.010

Al aumentar el contenido de medio de cultivo en el matraz o reducirse el grado de aireación la producción de EPS a se vio afectada significativamente. Esta relación puede ser expresada por la ecuación siguiente. La cual fue obtenida por el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS

Producción EPS g/l =  $1.48 - 0.0017$  (ml de medio de cultivo)

La gráfica muestra que a un volumen de 200 ml de medio de cultivo y con un 80% de aire el microorganismo se encuentra en las mejores condiciones para producir el biopolímero. Condición que corresponde con el metabolismo respiratorio de la bacteria ya que la bacteria es aeróbica, y conforme se aumenta el volumen de medio y se disminuye el porcentaje de aire en el medio de cultivo y la producción de EPS se ve disminuida así se tiene que con 800 ml de medio de cultivo la producción del biopolímero fue la menor como se observa en la Tabla No 14. Durante la fijación simbiótica del nitrógeno, el oxígeno inhibe la enzima nitrogenasa, cumpliendo así otra función que se reporta del exopolisacárido producido por este género, que tiene que ver en la fijación del nitrógeno, impidiendo así la inhibición de la enzima y llevándose a cabo la fijación del nitrógeno (38).

**FIGURA 25. EFECTO DE LA AIREACION SOBRE LA PRODUCCION DE EPS**



#### 4.9. EVALUACION DEL EFECTO DEL CARBONATO DE CALCIO Y DE SULFATO DE MANGANESO EN LA PRODUCCION DE EPS.

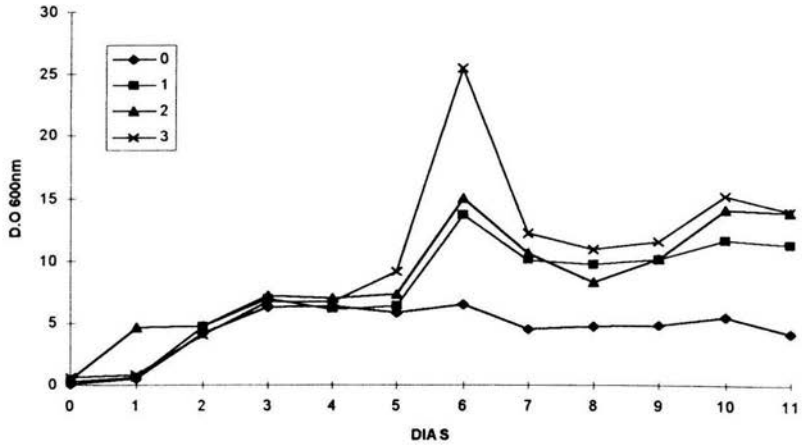
Con la optimización de los nutrientes así como de las condiciones ambientales se evaluó el efecto del calcio y del manganeso en la producción de EPS.

##### 4.9.1. EVALUACION DE CARBONATO DE CALCIO EN LA PRODUCCION DE EPS

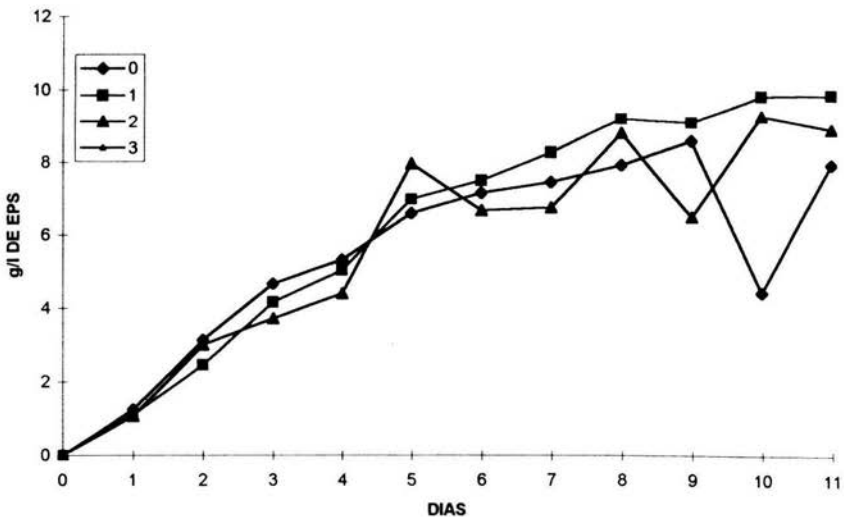
En las Figuras 26 y 27 se observa el comportamiento del calcio en la producción del biopolímero, tomando encuentra que el calcio funciona como un amortiguador de pH en el medio de cultivo, jugando un papel importante en la neutralización del EPS ácido producido; lo cual ha sido reportado en la producción del Curdlan, biopolímero obtenido a partir del genero ***Agrobacterium***, donde no ha habido otro regulador de pH que mejore los resultados de producción (56,29).

Como se puede apreciar en las gráficas, la producción del EPS no se ve afectada significativamente si no se adiciona carbonato de calcio y si se adiciona en cantidades mayores de 1 g/l de medio de cultivo no tiene un efecto comparable. A la concentración de un gramo por litro se observa que la tendencia en la producción del EPS sigue en aumento y es con la cual gráficamente se observa una mayor producción. Las concentraciones que se reportan van desde 0.4 hasta 10 g/l de carbonato de calcio, dependiendo del género bacteriano y del exopolisacárido ácido producido. (72, 7,26,).

**FIGURA 26. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMO CON DIFERENTES NIVELES DE CALBONATO DE CALCIO**



**FIGURA 27. CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMIZADO A DIFERENTES NIVELES DE CARBONATO DE CALCIO**

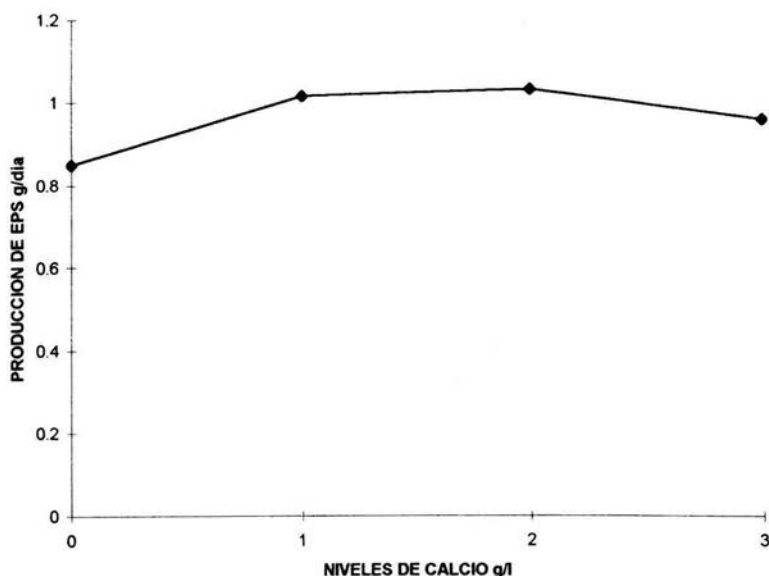


En la Tabla No 15 se presentan las medias de producción de goma g/l obtenidas por medio de regresión lineal de peso sobre días, para cada una de las repeticiones (2 por dosis de calcio aplicada). Los datos de producción obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza para un modelo completamente al azar con dos repeticiones por tratamiento y las medias analizadas por medio del procedimiento LSMEANS del paquete estadístico SAS. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.04$ ) de los niveles de aplicación de calcio respecto al control sin carbonato de calcio, no existiendo diferencias entre los niveles de calcio aplicado ( $P > 0.10$ ). La información obtenida fue utilizada para ajustar una ecuación de tipo cuadrático resultando significativa ( $P < 0.0008$ ) y  $r^2 = 0.85$  como se muestra en la Figura 28.

TABLA No 15. Efecto de los diferentes niveles de calcio en el medio sobre la producción de goma

TRATAMIENTO	PRODUCCIÓN EPS g /DÍA
0 g/l de calcio	0.850
1 g/l de calcio	1.017
2 g/l de calcio	1.033
3 g/l de calcio	0.963
error estándar global	0.029

FIGURA 28. EFECTO DE LA ADICION DE CALCIO EN LA PRODUCCION DE EPS



El efecto de calcio en la producción de goma se puede explicar por medio de la siguiente ecuación cuadrática obtenida por medio de los datos experimentales, que predice que.

$$\text{Producción g/l} = 0.853 + 0.2144 (\text{niv}) - 0.596 (\text{niv})^2$$

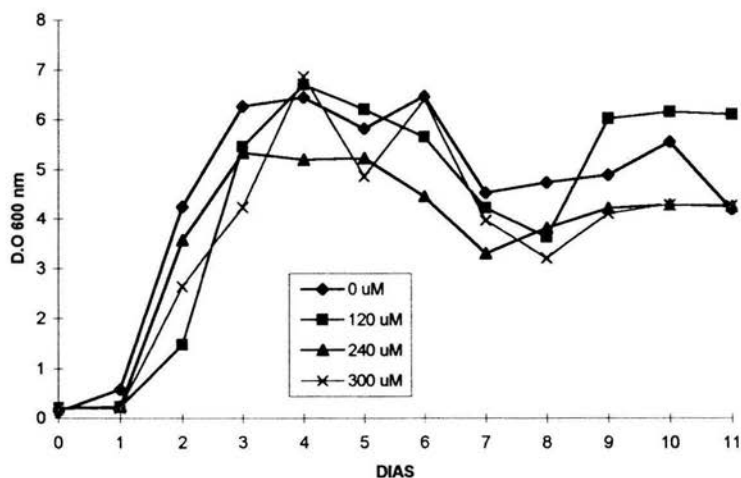
Obteniéndose una producción de EPS semejante con 1 g/l y 2 g/l de carbonato de calcio. Por lo que se tendrá que utilizara como concentración optima para la producción del EPS la de 1 g/l, ya que por las funciones que lleva a cabo este cation en el metabolismo celular y como amortiguador de pH es recomendable su uso a una concentración menor, pues si se usara a una concentración mayor causaría un impacto económico importante si es que se requiere de su aplicación industrial.

#### 4.9.2. EFECTO DE LA ADICION DE SULFATO DE MANGANESO EN LA PRODUCCION DEL EPS EN EL MEDIO OPTIMIZADO.

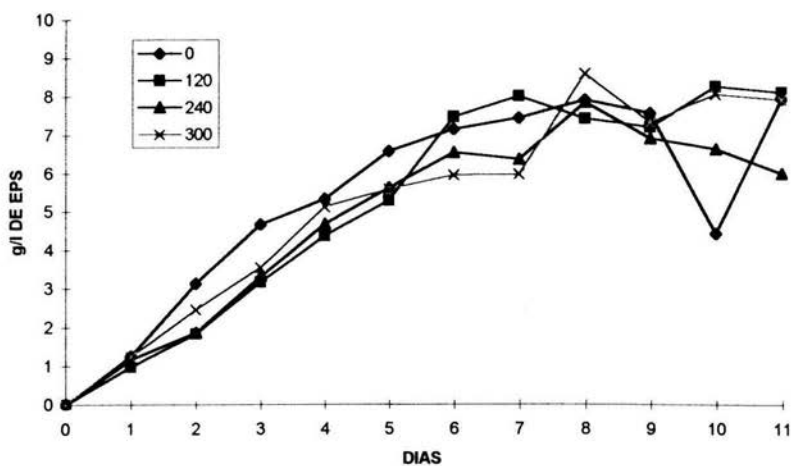
En las Figuras 29 y 30 obtenidas de las cinéticas de producción del biopolímero obtenido de *Rh. loti*, donde se aprecia que la producción del EPS se mantiene constante hasta el día 7 de incubación y posteriormente esta decae, este cation al igual que el carbonato de calcio juega papeles muy importantes en la regulación, como catalizador de muchas reacciones enzimáticas, participando en la producción del polisacárido y en procesos de transcripción (56,22).

En la producción de succino glicanos son importante los iones manganeso y hierro para la producción siendo necesarios Slodki 1978 (56,5), considerando que el manganeso actúa en el crecimiento celular.

**FIGUA 29. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMIZADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SULFATO DE MANGANESO**



**FIGURA 30.**  
**CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN**  
**MEDIO OPTIMO CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE**  
**MANGANESO**



Los cálculos de la producción de EPS se llevo a cabo para cada corrida de acuerdo a lo realizado en los casos anteriores. En la Tabla No 16 se presentan las medias y el error estándar para los diferentes niveles de manganeso, aplicados en el medio de cultivo. El análisis de la producción diaria de EPS se realizó de acuerdo a un modelo completamente al azar y se encontraron diferencias ( $P < 0.007$ ) y la comparación de medias indica que las diferencias respecto al control, se encontraron con las aplicaciones de 240 y 300  $\mu\text{moles/l}$ , mientras que la menor aplicación (120  $\mu\text{moles/l}$ ) no presentó diferencias respecto al control. Los mismos datos de producción se analizaron mediante regresión lineal de producción por dosis de manganeso, indicando una relación lineal negativa de ( $r^2 = 0.54$ ) y significancia ( $P < 0.04$ ), lo cual indicaría un efecto negativo de la aplicación sobre el rendimiento en polisacárido, como se observa en la Figura No 31. A continuación se muestra la Tabla No 16 muestra los datos obtenidos de la producción de EPS en g/día obtenidos del análisis anterior.



TABLA No 16. Efecto del uso de manganeso en el medio sobre la producción de goma.

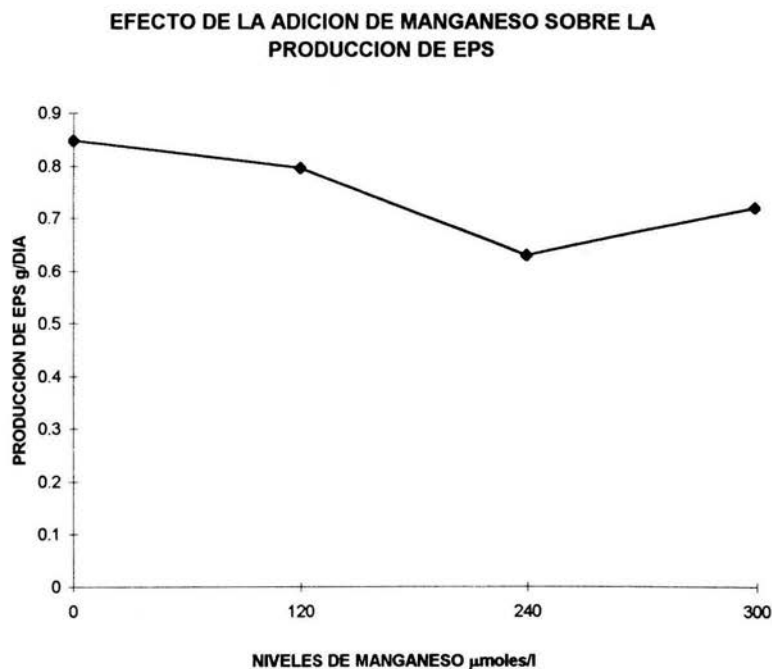
TRATAMIENTO	PRODUCCION EPS g / DÍA
0 $\mu$ moles de manganeso	0.849
120 $\mu$ moles de manganeso	0.797
240 $\mu$ moles de manganeso	0.630
300 $\mu$ moles de manganeso	0.722
error estándar global	0.041

La producción del EPS se puede explicar mediante la siguiente ecuación lineal que predice la producción en g/día en función del sulfato de manganeso.

Producción goma g/día =  $0.847 - 0.00059 (\mu\text{moles sulfato de manganeso/l})$

Encontrando la máxima producción a una concentración de 120  $\mu$ moles/l de medio de cultivo y una concentración del EPS de 7.97 g/l, la cual es menor a la producida sin manganeso lo cual no indica que no es importante sino que hasta puede inhibir la producción, pero es un catión importante en muchos procesos enzimáticos.

Figura 31. Efecto de la adición de manganeso sobre la producción de goma

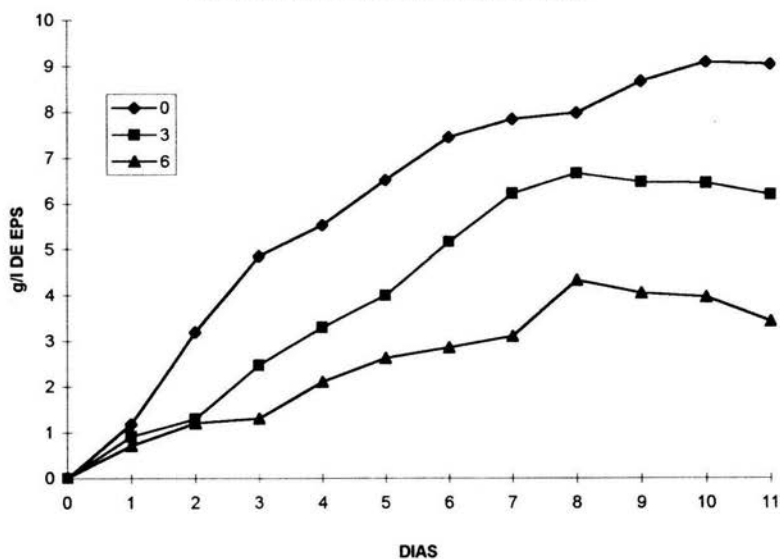


#### 4.10. EVALUACION DEL EFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS SOBRE LA PRODUCCION DE BIOPOLIMERO DE *Rhizobium loti*

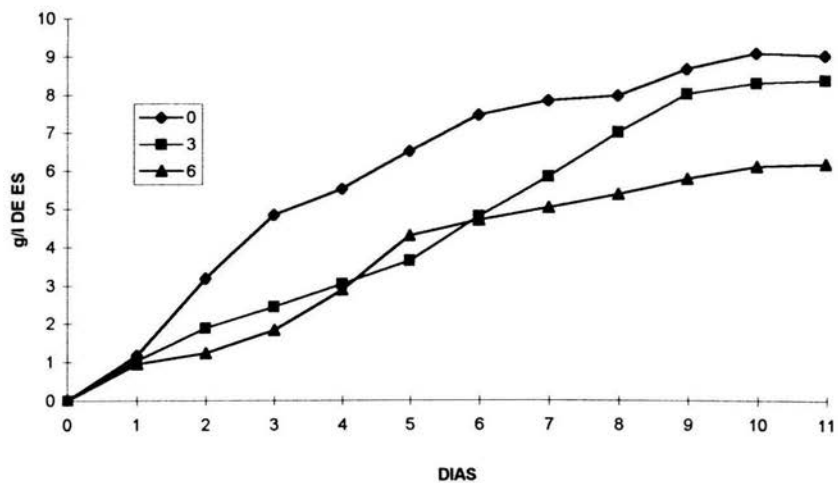
El estudio del efecto de los antibióticos en la producción de goma se muestra en las Figuras 32, 33 y 34. Se puede observar como afecto en la producción del EPS, la presencia de los antibióticos que actúan al nivel de pared celular (penicilina y bacitracina) y membrana celular (Polimixina B); las Figuras que se obtuvieron indican claramente que a las concentraciones evaluadas no hay ningún efecto positivo sobre la excreción del biopolímero.

En algunos estudios se observa que para la producción de algún metabolito (aminoácidos) extracelular, el uso de antibióticos ayudaba a mejorar la producción ya que al ser flexible su pared o de alguna forma su membrana celular, la liberación de estos era mayor, pero esto no ocurrió en el caso de la producción del EPS obtenido a partir de la bacteria *Rh. loti*. Aunque las concentraciones que se manejaron eran subletales, no hubo desarrollo de la bacteria y por lo tanto tampoco producción del EPS.

**FIGURA 32 CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMIZADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PENICILILNA**

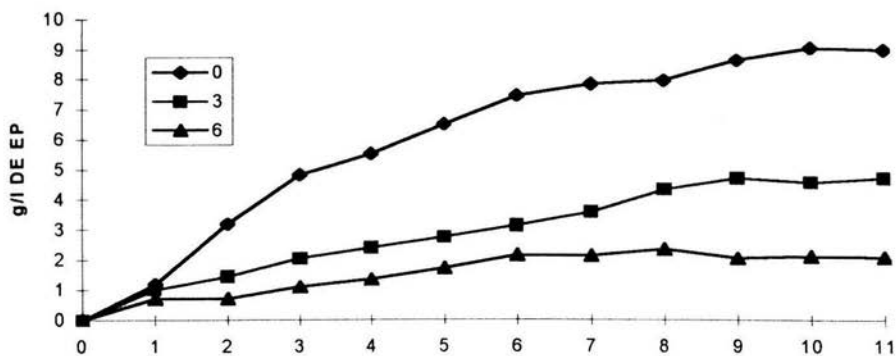


**FIGURA 33. CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMIZADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B**



En la Tabla No 17, se muestran las medias de producción de EPS para los diferentes tratamientos utilizados en este experimento. La producción para cada corrida de

**FIGURA No 34 CINETICA DE PRODUCCION DE EPS DE *Rhizobium loti* EN MEDIO OPTIMIZADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BACITRACINA**



En la Tabla No 17, se muestran las medias de la producción de EPS (goma) para los diferentes tratamientos utilizados en este experimento. La producción para cada corrida de matraces (2 repeticiones por tratamiento) se realizaron mediante regresión lineal de peso sobre días. Las pendientes de cada repetición se utilizaron en el análisis de varianza que mostró la existencia de diferencias ( $P < 0.005$ ) entre tratamientos. El control difirió ( $P < 0.10$ ) entre tratamientos con todos los medio que presentaron antibióticos a excepción de Polimixina B, que a 3 mg/l dio como resultado no significancia ( $P < 0.56$ ). Por otra parte el incremento de las dosis aplicadas afectó ( $P < 0.01$ ) la producción de goma por las bacterias.

TABLA No 17. Efecto de antibióticos en el medio sobre la producción de goma

TRATAMIENTO	PRODUCCION g GOMA / DÍA
Control	0.89
Penicilina 3 mg/l	0.76
penicilina 6 mg/l	0.59
Bacitracina 3 mg/l	0.50
Bacitracina 6 mg/l	0.29
Polimixina B 3 mg/l	0.29
Polimixina B 6 mg/l	0.65
error estándar global	0.46

#### 4.11. ESTUDIO EN FERMENTADOR DE LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO EN EL MEDIO OPTIMIZADO.

La evaluación de la producción en fermentador se realizó en un fermentador New Brunswick con una capacidad de 19 litros y un volumen de operación de 14 litros a 30°C un pH constante de 8.0, una aireación por burbujeo de aire de 1.0 v/v y una agitación de 200 r.p.m. por cinco días. Las Figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40 nos muestran, el comportamiento de la bacteria durante la excreción del EPS, donde se observa que los parámetros medidos se encuentran en fase exponencial, el tiempo de incubación se disminuyo, debido a lo denso del medio de cultivo y la dificultad que presento el fermentador para la agitación. El tiempo de incubación debió ser mayor para observar toda la curva de crecimiento en el fermentador.

En la Figura 35 se observa la relación que existe entre la producción de EPS contra el tiempo de incubación, donde se observa que se alcanza la máxima producción de 10.41 g/l de EPS a las 120 horas, no llegando a la fase estacionaria del crecimiento y si este es comparado con los rendimientos máximos de producción en matraces se observa que la producción en el fermentador y matraces es similar solo que en fermentador se tardo solo 5 días de incubación y en el matraz se requirieron de 11 días de incubación, si se contara con el sistema de agitación adecuado en el fermentador se podría haber alcanzado una producción mayor del EPS, ya que se requiere para la producción de biopolímeros como xantana un sistema de agitación turbulento que proporcione la aireación y homogeneidad al cultivo. El fermentador que se utilizó esta equipado con un sistema de agitación laminar la cual es adecuada para cultivos no muy densos y favorecer la producción de biomasa (24, 22,35).

Se encontró además una ecuación lineal la cual predice la producción del EPS en peso seco en función del tiempo de incubación.

Producción PSEPS g/l = -0.402 +0.0886 (hora)

En la Figura 36 se observa la correlación existente entre la producción en g/l de proteína celular con respecto a la D.O, donde se observa que la producción de proteína se incrementa casi un 200% más, existiendo una correlación de 0.71 ( $P < 0.0012$ ), lo cual nos permito obtener la siguiente ecuación que predice la producción de proteínas en función de la D.O.

Producción de Proteínas g/l =  $1.139 + 0.1036 (D.O.)$

Con respecto a la relación existente entre el peso seco bacteriano en g/l contra la D.O, se muestra un comportamiento similar al de la cantidad de proteína como era de esperarse ya que la cantidad de proteína celular esta en función del peso seco bacteriano por lo cual se puede tomar cualquiera de los dos parámetros (35). Como se puede observar en la Figura No 37 donde existe una correlación entre el peso seco bacteriano y la densidad óptica de 0.791 ( $P < 0.0001$ ) lo que permite obtener la siguiente ecuación.

Producción PSB g/l =  $0.233 + 0.0811 (D.O.)$

En la Figura No 38 se observa el comportamiento existente entre la producción del EPS con respecto a la D.O observando una correlación de 0.983 ( $P < 0.0001$ ), donde se puede observar que la producción de EPS es de 10.41 g/l con una densidad óptica de 18.25, encontrando la ecuación que predice este comportamiento.

Producción del PSEPS g/l =  $-0.886 + 0.644 (D.O.)$

Observando además una fase estacionaria cuando se alcanza una D.O. de 8.02 y una segunda fase exponencial cuando con una D.O. de 8.52 y que se dispara hasta una D.O. de 18.25 lo cual concuerda con Breeveld et al (9), quien reporta que este género bacteriano puede producir mas de un tipo de EPS

Cuando se compara el peso seco bacteriano contra el tiempo de incubación se observa que a partir de las 12 horas de incubación, se dispara la producción de biomasa celular y no se llega a la fase estacionaria en el tiempo de incubación, lo que nos indica que como el EPS es un metabolito secundario el cual se empieza a producir al final de la fase exponencial del crecimiento microbiano y alcanza su máximo en la fase estacionaria (46), considerando que la producción de biopolímero puede ser mayor si se contara con un sistema de agitación alterno en el fermentador (35,46) y poder pasar

de un fluido laminar a uno turbulento lo cual nos permitiría mantener por mayor tiempo la agitación y las condiciones aeróbicas en el fermentador. Como se puede observar en la Figura 39, La curva bifásica de crecimiento medido por el peso seco bacteriano nos permite obtener la siguiente ecuación que predice la producción de biomasa celular en función del tiempo con estas condiciones.

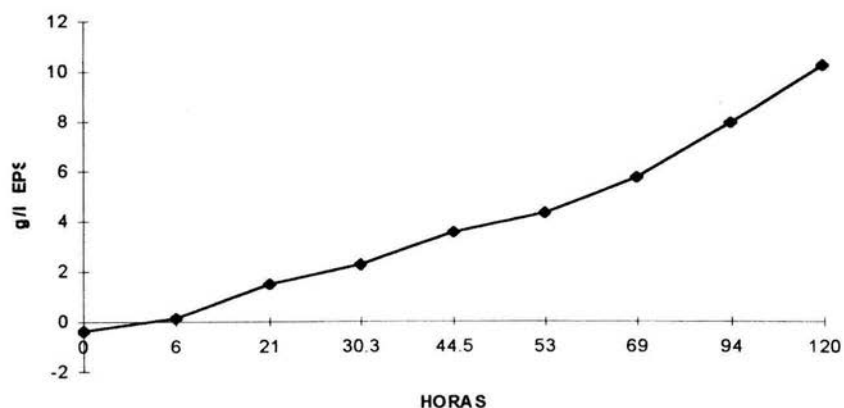
$$\text{Producción PSB g/l} = 0.256 + 0.0119 (\text{hora})$$

En la Figura 40 se observa la relación existente entre la producción de proteínas en g/l contra el tiempo de incubación, en el cual se observa un comportamiento lineal, correspondiendo a una curva típica de crecimiento microbiano, que no llega a la fase estacionaria debido al aumento gradual de viscosidad del cultivo como se muestra en las Figuras 36 a 40.

Se encontró la ecuación lineal que nos predice dicho comportamiento.

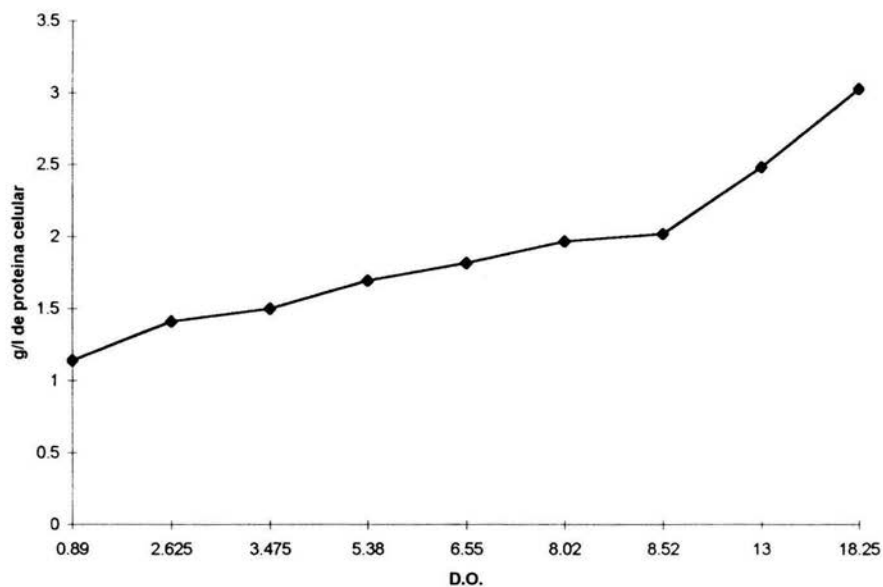
$$\text{Producción proteínas g/l} = 1.166 + 0.0153 (\text{hora})$$

**FIGURA 35. RELACION LINEAL DE PRODUCCION DE EPS vs TIEMPO EN FERMENTACION**

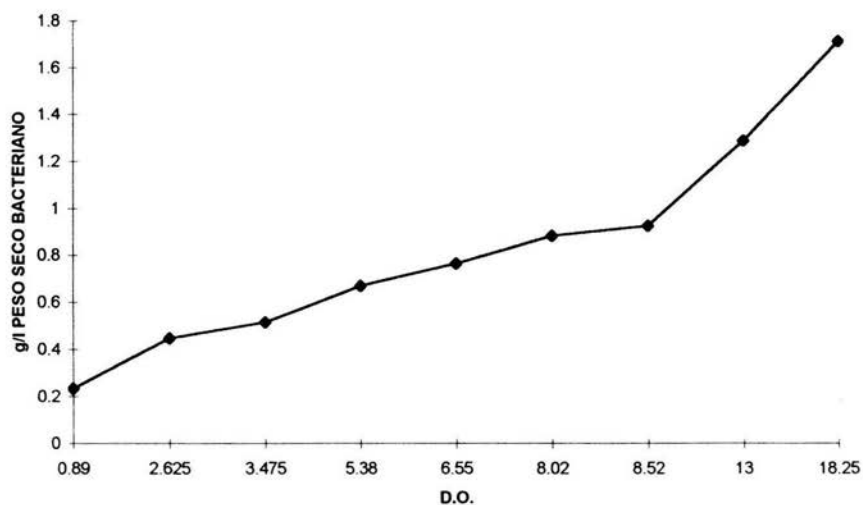




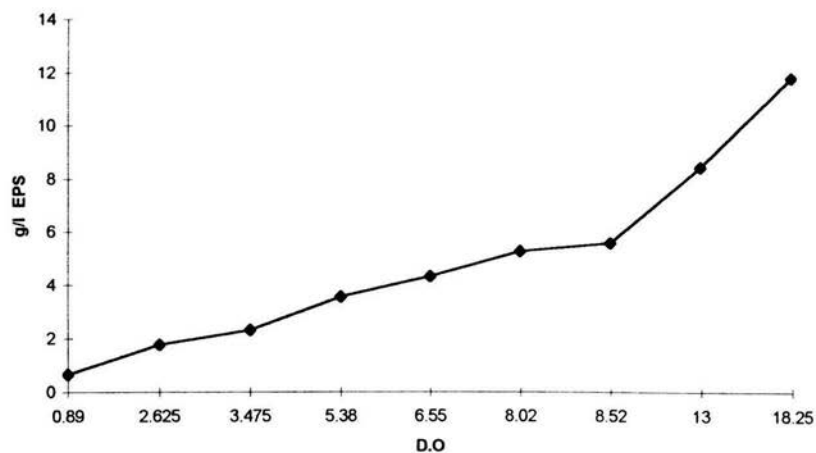
**FIGURA No36. CINETICA EN FERMENTADOR DE *Rhizobium loti*  
proteinas vs D.O**



**FIGURA No 37. CINETICA EN FERMENTADOR DE *Rhizobium loti*  
PESO SECO BACTERIANO vs D.O.**



**FIGURA No 38. CINETICA EN FERMENTADOR DE *Rhizobium loti*  
EPS vs D.O**



**FIGURA No 39. CINETICA EN FERMENTADOR DE *Rhizobium loti*  
PESO SECO BACTERIANO vs TIEMPO DE INCUBACION**

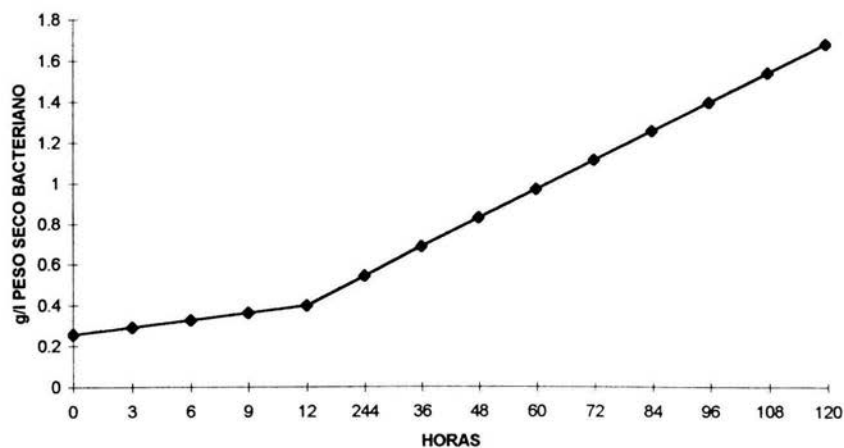
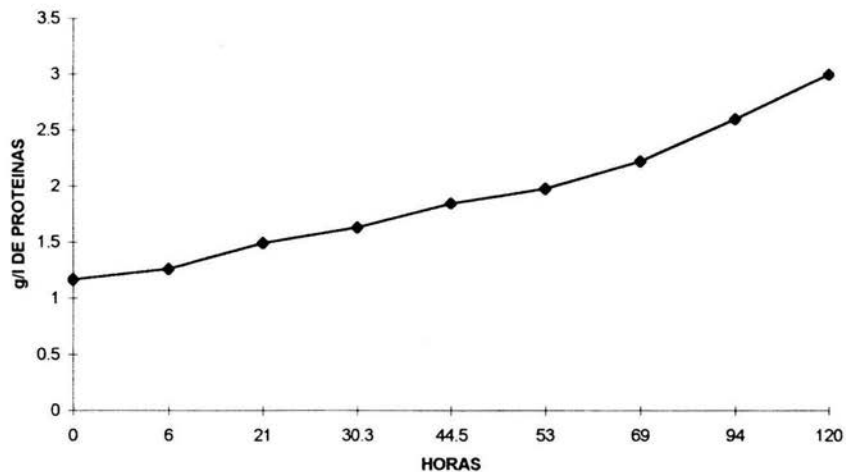


FIGURA No 40. RELACION DE PRODUCCION DE PROTEINAS vs TIEMPO EN FERMENTACION



Con los datos obtenidos de los diferentes parámetros evaluados se pudo hacer un análisis estadístico para ver si hay relación entre ellos. En la Tabla No 18, se muestra el análisis de correlación que existe entre los parámetros evaluados en la producción en lote en fermentador de exopolisacárido obtenido de *Rhizobium loti*.

Cuadro No 1. Correlación de los parámetros monitoreados en fermentador

	D.O	PSB	PROT	PSEPS
D.O.	1.000	0.791	0.701	0.983
P<	0.0	0.0001	0.0012	0.0001
PSB	0.791	1.000	0.87473	0.827
P<	0.0001	0.0	.0001	0.0001
PROT	0.701	0.874	1.000	0.722
P<	0.0012	0.0001	0.0	0.0007
PSEPS	0.983	0.827	0.722	1.000
P<	0.0001	0.0001	0.0007	0.00

Con los datos anteriores se obtuvieron las siguientes ecuaciones que se ajustan a un modelo lineal, el cual predecir la producción en función de los parámetros medidos experimentalmente y en función del análisis estadístico y de la correlación existente entre ellos.

Producción de peso seco de proteínas en función del tiempo.

$$\text{Producción proteínas g/l} = 1.166 + 0.0153 (\text{hora})$$

Producción de peso seco del exopolisacárido en función del tiempo.

$$\text{Producción PSEPS g/l} = -0.402 + 0.0886 (\text{hora})$$

Producción de peso seco bacteriano en función del tiempo.

$$\text{Producción PSB g/l} = 0.256 + 0.0119 (\text{hora})$$

Producción de peso seco bacteriano en función de la D.O

$$\text{Producción PSB g/l} = 0.233 + 0.0811 (\text{D.O.})$$

Producción de peso seco de proteínas en función de la D.O.

$$\text{Producción de Proteínas g/l} = 1.139 + 0.1036 (\text{D.O.})$$

Producción de Peso seco del exopolisacárido en función de la D.O.

$$\text{Producción del PSEPS g/l} = -0.886 + 0.644 (\text{D.O.})$$

#### 4.12. OBTENCION Y PURIFICACION DEL EXOPOLISACARIDO OBTENIDO DE *Rhizobium loti*.

El EPS se obtuvo al centrifugar el medio de cultivo, el sobrenadante se precipitó con 3 veces su volumen de alcohol isopropílico frío, se secó y se dializó por 5 días a 4°C y con cambios periódicos de agua destilada, al final se determinó proteínas por el método de Bradford e inmuno-electroforesis, no encontrándose proteínas por lo que se considero que el EPS estaba puro, libre de contaminantes. Una vez purificado el exopolisacárido se prosigió a realizar el estudio químico de este.

#### 4.13. DETERMINACION DE LAS FRACCIONES y QUE COMPONEN EL BIOPOLIMERO.

El EPS purificado se analizó mediante una Cromatografía Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) en columnas de TSK gel G5000 PWXL (TOSOHAAS), encontrándose que está formado por dos fracciones de diferente peso molecular, los cuales se determinaron en función de los tiempos de retención vs pesos moleculares de estándares. En la tabla No 41 se observa el cromatógrama (CLAE) de los estándares de peso molecular donde se observa que la tiroglobulina bovina presenta un peso molecular de 650,000 d, la cual presenta un tiempo de retención ( $T_R$ ) de 7.95 min, gama-globulina bovina de 158,000 d y un  $T_R$  de 8.76 min, ovoalbumina de gallina con 44,000 d y un  $T_R$  de 9.23 min, mioglobulina de caballo con 17,000 d y un  $T_R$  de 9.63 min y cianocobalamina con 1,350 d y un  $T_R$  de 11.58 min. Las muestras del EPS purificado se analizaron por CLAE, encontrándose dos fracciones, una de bajo peso molecular de 26,750 daltons ( $R_t$  5.10) y la otra de 908,313 daltons ( $R_t$  10.44). Como se muestra en la Figura No 42. El porcentaje del área bajo la curva revela que el 90.25 % del EPS esta compuesto por la fracción de bajo peso molecular y el 9.75% corresponde a la fracción de alto peso molecular.

Figura 41 Cromatograma obtenido por CLAE de los estándares de peso molecular comerciales BIO-RAD.

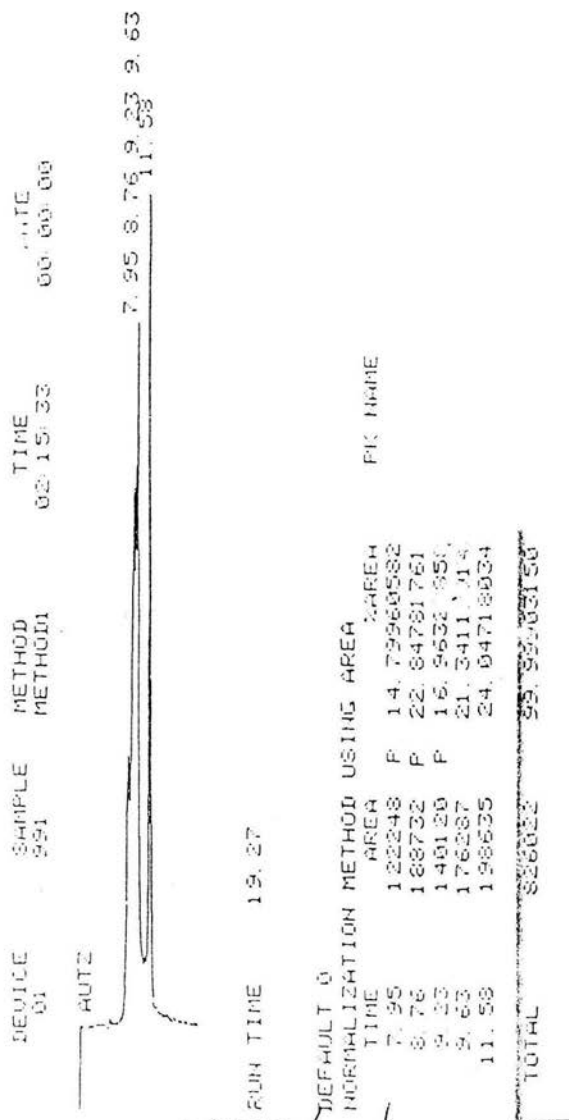
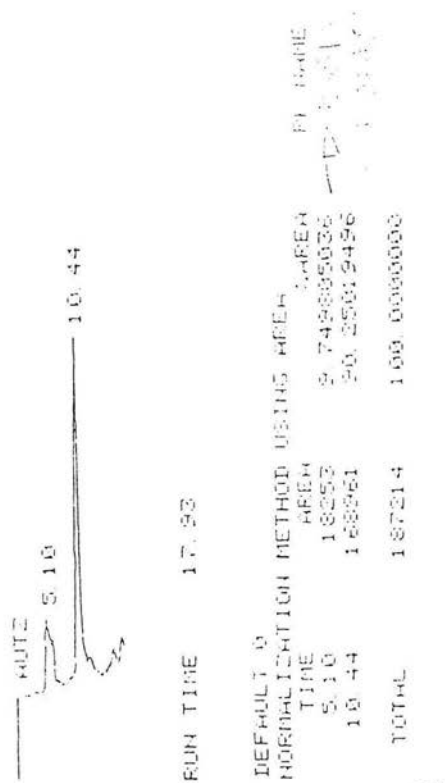


Figura 42 Cromatograma del EPS obtenido de *Rhizobium loti*

#### 4.14. PURIFICACION DE LAS DOS FRACCIONES QUE COMPONEN EL EXOPOLISACARIDO.

Una vez concluida la incubación y producción del EPS este se centrifugó y se hizo la obtención de las dos fracciones que lo componen siguiendo la metodología descrita por Amemura (1). Las dos fracciones obtenidas se purificaron, encontrado que cada una de las fracciones están libres de proteínas, por el método de Bradford. Coincidiendo con lo reportado donde se menciona que los principales contaminantes de los polímeros microbianos son restos bacterianos o proteínas (8, 72)

#### 4.15. DETERMINACION DE LA COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL Y CAPA FINA.

En las Tablas No 19, 20,21 se muestran la composición polimérica del EPS total al ser comparado con los estándares y los tiempos de retención ( $T_r$ ). Para cada uno de los tratamientos. Dependiendo de las condiciones de trabajo los componentes que se detectan en cada una de las fracciones difieren. Los monosacáridos son los más comunes que se encuentran en este tipo de polisacáridos (26,30), de ahí que se utilicen estándares de monosacáridos para determinar la composición del polisacárido. Se puede observar que los  $T_r$  de las muestra son iguales o muy cercanos a los que se detectaron para los monosacáridos estándares, como se observa en la tabla 19 donde se encontraron tres  $T_r$  de los cuales dos corresponden a los estándares y el otro no corresponde a ninguno, cuando la muestra fue sometida a hidrólisis ácida y se uso una fase móvil de acetonitrilo:agua y usando como revelador ácido ftálico. En la Tabla 20, cuando se trató a la muestra con una hidrólisis de una hora y el sistema de disolventes de Butanol:piridina:agua y revelados con ácido ftálico, se detectaron en la muestra los monosacáridos ácido glucurónico, galactosa y glucosa no detectándose manosa y ácido galacturónico, siendo este sistema mas eficiente para la detección de la composición del EPS, las condiciones de hidrólisis de una hora a 121°C. En la Tabla



No 21 sólo se detectaron dos componentes en el EPS que fue galactosa y glucosa con un sistema de disolventes etanol:butanol:agua.

Con la información anterior se puede observar que el EPS esta compuesto por Glucosa, Galactosa y ácido galacturónico, no encontrándose manosa la cual es un contaminante común en este tipo de polisacáridos cuando se utiliza extracto de levadura en el medio de cultivo.

Tabla No 19. Componentes del polímero detectados usando el sistema de disolventes Acetonitrilo:agua y como revelador la solución que contiene ácido ftálico

Muestra	Estándares monosacáridos				
	Ac glucurónico	Galactosa	D-galactosa	Glucosa	Manosa
Estándares	0.73	0.63	0.78	0.62	0.59
EPS 1M 2H	-----	0.63	-----	0.63	-----
EPS 2M 2H 0.68	-----	-----	-----	-----	-----

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

H= Horas de hidrólisis

Tabla No 20. Componentes poliméricos detectados en el sistema de disolventes butanol:piridina:agua revelando con ácido ftálico.

Muestra	Estándares monosacáridos				
	Ac glucurónico	Galactosa	D-galactosa	Glucosa	Manosa
Estándares	0.35	0.25	0.46	0.24	0.17
EPS 2M 2H	-----	0.26	-----	0.26	-----
EPS 1M 2H	0.36	0.27	-----	0.27	-----

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

H= Horas de hidrólisis

Tabla No 21. Componentes poliméricos detectados en el sistema etanol: butanol: agua utilizando como revelador ácido ftálico.

Muestra	Estándares monosacáridos				
	Ac glucurónico	galactosa	D-galacturónico	Glucosa	Manosa
Estándares	0.73	0.58	0.76	0.55	0.57
EPS 1M 2H	-----	0.54	-----	0.54	-----
EPS 2M 2H	-----	0.54	-----	0.54	-----

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

H= Horas de hidrólisis

Se realizó la Cromatografía en papel y capa fina de cada una de las fracciones que se obtuvieron del EPS, encontrándose que el polisacárido de bajo peso molecular puede estar compuesto por glucosa y/o galactosa. El polisacárido de alto peso molecular puede estar compuesto por glucosa, galactosa y ácido glucurónico; no encontrándose Manosa, ácido D- galacturónico en ninguna de las dos fracciones. Cuando se trabajo con hidrólisis de 2 horas con ácido sulfúrico 2M sé encontró Tr diferentes a los componentes monosacáridos, lo cual indica una desnaturalización de los componentes del EPS por tiempo y concentración de ácido. A continuación se muestran en las Tablas 22, 23, 24 los tiempos de retención obtenidos para las muestras y los estándares.

Tabla No 22. Resultados obtenidos en Cromatografía en papel.

Muestra	Estándares monosacáridos				
	Ac glucurónico	Galactosa	D-galacturónico	Glucosa	Manosa
Estándares	0.73	0.63	0.78	0.62	0.59
PM b 2M2H 0.55	-----	-----	-----	-----	-----
PM b 1M2H	-----	0.63	-----	0.63	-----
PM a 2M2H 0.68	-----	-----	-----	-----	-----
PM a 1M2H	-----	0.63	-----	0.63	-----

PM b = Fracción de EPS de bajo peso molecular

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

PM a = Fracción de EPS de alto peso molecular

H= Horas de hidrólisis

Tabla No 23. Resultados obtenidos en Cromatografía en capa fina (CPF)

	Estándares monosacáridos				
Muestra	Ac glucurónico	Galactosa	D-galacturónico	Glucosa	Manosa
Estándares	0.35	0.25	0.46	0.24	0.17
PM b 2M2H 0.21	-----	-----	-----	-----	-----
PM b 1M2H	-----	0.27	-----	0.27	-----
PM a 2M2H	-----	0.26	-----	0.26	-----
PM a 1M2H	0.36	0.27	-----	0.27	-----

PM b = Fracción de EPS de bajo peso molecular

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

PM a = Fracción de EPS de alto peso molecular

H= Horas de hidrólisis

Tabla N 24. Resultados obtenidos en Cromatografía en capa fina (CPF)

	Estándares monosacáridos				
Muestra	Ac glucurónico	Galactosa	D-galacturónico	Glucosa	Manosa
Estándares	0.73	0.58	0.76	0.55	0.57
PM b 2M2H	-----	-----	-----	0.54	-----
PM b 1M2H	-----	-----	-----	0.54	-----
PM a 2M2H	-----	-----	-----	0.53	-----
PM a 1M2H	-----	-----	-----	0.55	-----

PM b = Fracción de EPS de bajo peso molecular

M= Concentración Molar de ácido sulfúrico

PM a = Fracción de EPS de alto peso molecular

H= Horas de hidrólisis

#### 4.16. DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LOS POLISCARIDOS QUE COMPONEN AL EXOPOLISACARIDO POR CLAE

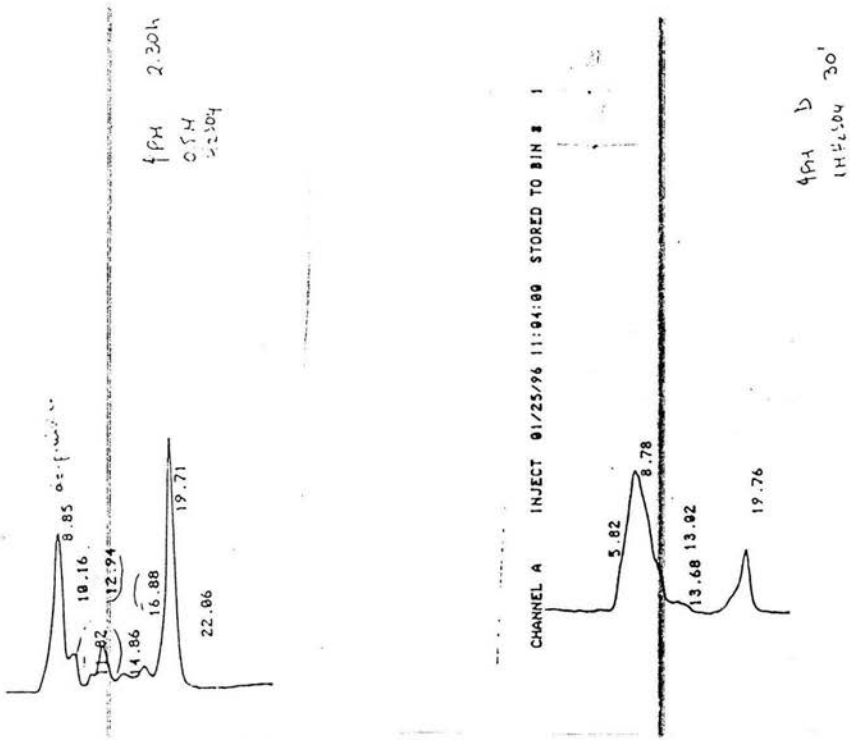
Se estimó la composición química del EPS en CLAE utilizando los datos obtenidos de los cromatogramas en papel y capa fina.

En la Figura No 43 se observa el cromatograma, así como los componentes monosacáridos de la fracción de alto peso molecular los cuales corresponden a glucosa, ácido glucurónico, galactosa y ácido pirúvico, esto al ser comparado con los tiempos de retención de los azúcares estándares, cuando la muestra fue tratada con hidrólisis ácida 2.5 horas a una concentración 0.5M en ácido sulfúrico.

En la Figura No 44 se muestra se muestra la fracción de peso molecular alto donde se observan ácido pirúvico, radicales acetilo los cuales son los radicales más comunes en los polímeros obtenidos del genero *Rhizobium*, también se observa glucosa como componente del exopolisacárido, esto cuando se trata la fracción de alto peso molecular con ácido sulfúrico 1M por 0.5 horas.

En la Figura No 45 se muestra la composición monosacárida de la fracción de bajo peso molecular cuando se trató con una hidrólisis parcial de 3.0 horas con ácido sulfúrico al 0.5 M, esta fracción mostró estar compuesta por 12 residuos de glucosa, estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Amemura, Koizumi, Breedveld y Miller, donde se han encontrado que algunos polisacáridos obtenidos del genero *Rhizobium* pueden llegar a tener un grado de polimerización hasta de 40 residuos de glucosas. Cuando se trato con una hidrólisis total con ácido sulfúrico 1 M se detecto un homopolímero compuesto por glucosa. Estos resultados indican la presencia de  $\beta$ -glucanos cíclicos (7,8) muy comunes en polisacáridos de *Rhizobium*. En la figura No 46 se muestra el cromatograma donde se aprecia únicamente un pico que corresponde a glucosa en la fracción de bajo peso molecular

Figura 43 Cromatograma de CLAE de la composición monosacárida de la fracción de alto peso molecular del EPS.



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Figura 44 Cromatograma de CLAE donde se observa los radicales de la fracción del EPS de alto peso molecular.



Figura 45 Cromatograma de CLAE de la composición monosacárida de la fracción de bajo peso molecular del EPS.

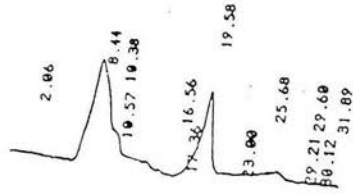
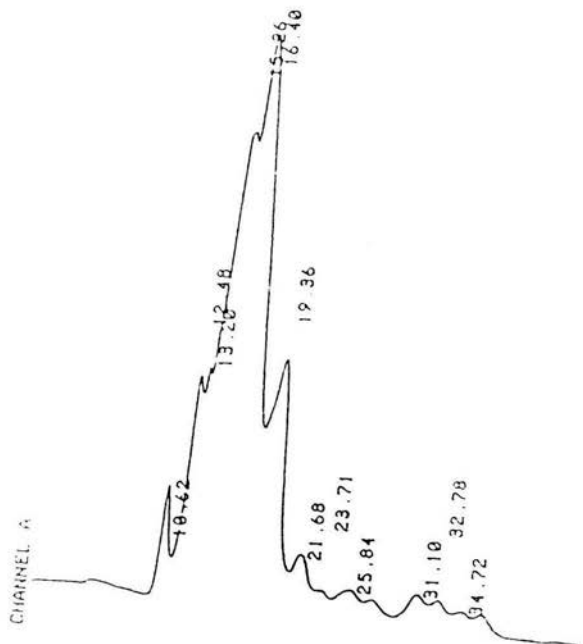


Figura 46 Cromatograma de la fracción de bajo peso molecular del EPS.





## 5.0 DISCUSION

Se trabajo con una cepa de *Rhizobium loti* fijadora de nitrógeno, de los tres medios de cultivos Morris, Vincent y Base calculado se eligió el medio Base calculado para realizar la optimización del medio de cultivo, en este medio se encontró una mayor velocidad específica de crecimiento y un menor tiempo de duplicación, así como una mayor producción del EPS.

De la evaluación de las diferentes fuentes de carbono para la producción del EPS en el medio base calculado se encontró que en el manitol se adapta mejor la bacteria teniendo un crecimiento mas rápido alcanzando su máximo al segundo día de incubación y la glucosa al tercero y sacarosa al cuarto día como se observa en la Figura 5, con respecto a la producción del EPS con el manitol se obtiene una producción de 0.69 g/l/día mayor que con los otros azucares, siendo la producción con sacarosa de 0.6 g/l/día, por lo que se puede obtener en un momento dado también la sacarosa aunque por costos es mas barato manitol que sacarosa y con esto se pueden disminuir los costos de producción.

El efecto que presento en el crecimiento y la producción del EPS las dos fuentes de nitrógeno evaluadas fue muy significativo ya que con el sulfato de amonio suplementado con biotina no se observo crecimiento cuando este fue medido en forma indirecta por la D.O. y la producción del EPS máxima alcanzada fue de dos gramos a diferencia de cuando se probó el Ext. de Lev. donde la D.O. fue de casi 3.7 y la producción del EPS de un poco mas de 4g/l, el porque de que con sulfato de amonio existiera producción del EPS y no incremento en la D.O podría deberse a que en este caso la fuente de carbono funciona también como fuente de energía y al encontrarse con limitaciones la bacteria esta produjo EPS que en un momento dado este le protegería en condiciones mas adversas

Los diferentes niveles de fuente de carbono evaluados nos muestran que si se aumenta o disminuye la cantidad de manitol adicionado al medio de cultivo podemos encontrar el mismo comportamiento en el crecimiento de la bacteria, al adicionarse 25 g/l de manitol a al medio base la D.O. que se obtiene es mayor a diferencia de los otros niveles, la producción del EPS mayor que se alcanza es de 8.69 g/l con un nivel de manitol en el medio de cultivo de 20 g/l existiendo una diferencia con respecto a la curva de crecimiento donde se esperaría que a mayor cantidad de bacterias habría una mayor producción del EPS, el que hay una mayor densidad óptica no quiere decir que haya mayor cantidad de bacterias que produzcan EPS por lo que se podría decir que la D.O. se incremento no por el numero de Microorganismos, con 15 y 25 g/l de manitol la producción del EPS es muy similar, también es de mencionar que se observan dos picos en las Figuras 9 y 10 los que podría indicar la producción de mas de un tipo de polisacáridos lo cual coincide con otros autores (58,60,68). Si bien el manitol es la mejor fuente de carbono para la producción del EPS es necesario adicionar la cantidad adecuada para obtener el 50% rendimiento en el proceso el redimiendo es de 4.35 muy cercano al rendimiento teórico.

El comportamiento de la bacteria en la producción del EPS cuando se evaluaron niveles de extracto de levadura de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/l en el medio base calculado, encontrado que los niveles donde se obtiene una mayor D.O. es con 1.5 y 2.0 g/l lo cual coincide con otros trabajos (66,73) donde se dice que 2.0 g/l es lo mas recomendable para el crecimiento de este tipo de bacterias, la mayor producción del EPS de 8.48 g/l, se alcanzo con 1.5 g/l de extracto de levadura y cuando se aumenta la concentración de Ext. de Lev. En el medio disminuye la producción. Esto puede estar influenciado a que el polisacáridos que se produce en este tipo de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo hacen como respuesta a la concentración de oxigeno en el medio, por ello la fijación de nitrógeno atmosférico se lleva acabo en condiciones anaeróbicas para proteger a la enzima nitrogenasa (17, 23,28). La cantidad de nitrógeno en el medio es importante para que se pueda dar la fijación de nitrógeno. En la fase

estacionaria se disminuyen los nutrientes y las condiciones para el crecimiento son desfavorables por lo que la bacteria empieza a protegerse con la producción del EP

La evaluación de los diferentes niveles de sulfato de magnesio no afectan el crecimiento y producción del EPS, no observándose ningún cambio significativo en las cinéticas de crecimiento y producción de *Rhizobium loti*, esto podría deberse a que se puede encontrar como contaminante de los otros componentes del medio de cultivo, el magnesio es un elemento que si no es esencial para la bacteria si se requiere como cofactor en varias reacciones enzimáticas para tener un mejor crecimiento bacteriano (61). La concentración de sulfato de magnesio utilizada fue de 0.4 g/l de medio de cultivo ya que con este nivel encontramos una producción de 7.14 g del EPS/l de medio de cultivo, esta concentración coincide con varios autores donde recomiendan utilizar entre 0.2 y 0.5 g/l de magnesio dependiendo del genero bacteriano que se utilice (72, 7, 26,24). Algunos autores ha encontrado un efecto negativo del magnesio en la producción de biopolímeros, pero para el EPS obtenido de *Rhizobium loti* y la goma xantana no se presenta este efecto (51,56).

Con el medio Base y con los niveles de manitol, sulfato de magnesio y extracto de levadura óptimos se estudio el comportamiento que presenta la temperatura sobre la producción del EPS, encontrando en las cinéticas de producción y crecimiento que la temperatura optima es de 32 °C, algunos autores reportan que a temperaturas mayores el EPS realiza lleva acabo su función de protección en contra de la desecación de la bacteria así como su funcione de osmoregulador (7,25) , a temperaturas mayores la bacteria muere, por lo que si se maneja un sistema en donde la bacteria se incuba a una temperatura de 30 °C para la producción de biomasa y posteriormente se cambia la temperatura a 32°C la producción del EPS se podría incrementar, con una temperatura de 32°C se obtuvo 9.6 g/l del ESP, temperaturas menores a 30 °C no pudieron ser controladas en el laboratorio por eso no se probaron, y con 34°C no hay crecimiento de *Rhizobium*.

Con respecto al pH del medio de cultivo se encontré que con un pH de 8.0 la bacteria prolonga su fase de crecimiento por 6 días, esto se debe a que las bacterias de crecimiento rápido como *Rhizobium loti* acidifican rápidamente el medio de cultivo por la degradación del carbohidratos presentes en el medio de cultivo y esto hace que a un pH alcalino que la bacteria pueda soportar no se inhiba el crecimiento, las graficas muestran que a pH ácido o alcalino la bacteria crece, teniendo diferencias en el tiempo que dura la fase exponencial, con respecto a la producción del EPS presenta el mismo comportamiento, alcanzándose una mayor producción del EPS de 9.11 g/l al noveno día de incubación. El pH por lo general funciona como un inhibidor del crecimiento en las bacterias y es una de las causas para que la fase logarítmica del crecimiento pase a ala fase de deceleración o a la fase estacionaria, inhibiéndose de esta forma el crecimiento y la producción de los metabolitos.

Las bacterias del género *Rhizobium* son aerobias por lo que la presencia del aire en el medio favorece su crecimiento, cuando se evaluó el efecto que presenta en el medio de cultivo la cantidad de aire que se encuentra en el medio de cultivo para que pueda haber un intercambio de gases oxígeno por bióxido de carbono producto del metabolismo bacteriano se encontró que a mayor cantidad de aire hay un mejor crecimiento bacteriano por lo tanto también una mayor producción de EPS, con 200 ml de medio de cultivo base optimizado a pH de 8.0 y una temperatura de 32°C se encontró que se puede producir 1.12 g del EPS por día de incubación, El EPS lo utilizan lo producen las bacterias para proteger a la enzima nitrogenasa, la cual tiene la función de captar el nitrógeno atmosférico en condiciones anaerobias, de ahí que se produzca mayor cantidad de EPS cuando hay mayor presencia de aire en el medio y no tanto por el crecimiento bacteriano, cuando se disminuyo el nivel de aire incrementando la cantidad de medio de cultivo la bacteria por ser aerobia no tubo un buen crecimiento, la bacteria crece con niveles mayores de 60 % de aire en el medio, coincidiendo con los autores de que cuando se trabaja en sistemas en lote con bacterias aerobias hay que cuidar la relación tres a uno de aire con respecto del medio de cultivo para tener un buen desarrollo (10,13,17, 27, 38).

Una de las funciones del calcio en el medio de cultivo es como un amortiguador de pH, neutralizándole exopolisacárido ácido producido por el género *Rhizobium*, esto ha sido ya reportado en otros polisacáridos comerciales, por otras bacterias (56,29). Cuando se estudió el efecto que presenta el calcio en el crecimiento y producción del EPS obtenido de *Rhizobium loti* se encontró que gráficamente no hay diferencia si se adiciona o no el carbonato de calcio en el crecimiento bacteriano, con respecto a la producción del EPS se puede observar que la fase exponencial de la producción se mantiene hasta el día 8 de incubación con una producción de 1.017 g de EPS / día y si no se adiciona calcio al medio de cultivo se tubo una producción de 0.85 g de EPS/día, con dos gramos se produce 1.033 g lo cual no es significativamente diferente si se adiciona 1.0 g de carbonato de calcio por lo que se decidió en adicionar 1.0 g al medio de cultivo y de esta forma no incrementar el costo del medio de cultivo, se ha reportado que dependiendo del tipo de exopolisacárido y de la bacteria que se trate se puede adicionar desde 0.4 a 10.0 g de calcio/l de medio de cultivo (7, 26, 72)

Algunos autores recomiendan el uso del manganeso en el crecimiento celular, ya que se requiere para un sin fin de reacciones metabólicas, cuando se adiciono diferentes niveles de sulfato de manganeso al medio de cultivo optimizado se encontró un crecimiento similar si se adiciona o no se adiciona, lo mismo ocurre con la producción del EPS, estos puede deberse a los niveles de manganeso que se evaluaron los cuales se encuentran en micromoles, puede que este cation se encuentre como contaminante en algunos componentes del medio de cultivo y por eso no se observe el efecto cuando no se adiciona, en los resultados de producción del EPS, se encontró que si no se adiciona manganeso se obtiene 0.849 g de EPS/día mayor cantidad que si se adiciona encontrando un efecto negativo si se adiciona.

Esperando incrementar la producción del EPS se evaluaron tres antibióticos con mecanismo de acción a nivel de pared celular y a nivel de membrana, a concentraciones no toxicas para *Rhizobium*, no se encontró ningún efecto favorable

en la producción, algunos autores han utilizado a los antibióticos para hacer mas flexible la pared celular o la membrana y que de esta manera los metabolitos excretados por las bacterias se han mas fácilmente excretados en este caso para el EPS no fue favorable.

Cuando se obtuvieron los niveles óptimos de los componentes evaluados del medio de cultivo base, las condiciones ambientales así como los otros componentes adicionales al medio de cultivo (carbonato de calcio, sulfato de manganeso) se realizo la corrida en el fermentador, encontrando que la producción del EPS obtenido de *Rhizobium loti* fue de 10.41 g/l de medio de cultivo, esta cantidad se obtuvo a los cinco días de incubación debido a lo viscoso del medio de cultivo e imposibilidad del equipo para poder agitar y mezclar el aire, por lo que se tuvo que detener la cinética de producción, no se pudo terminar ni saber cual habría sido la cantidad máxima de exopolisacárido obtenida a las condiciones del fermentador, para poder continuar con la cinética en el fermentador se debió de trabajar con un sistema de agitación combinado uno primero que nos permitiera tener un flujo laminar para la producción de biomasa el cual funcionaria los primeros 4 días de incubación y posteriormente un flujo turbulento capaz de mezclar el medio altamente viscoso debido a la producción del EPS y de esta manera la aireación del medio seria favorable, se determino el peso seco bacteriano, proteínas bacterianas, la D.O., y la producción de EPS, contra el tiempo de incubación y se saco la relación existente entre estos parámetros encontrando que si se puede predecir la producción del EPS en función del tiempo de fermentación, D.O. proteínas bacterianas y peso seco bacteriano. Obteniéndose ecuaciones lineales que predicen el comportamiento entre los diferentes parámetros evaluados (22.24, 35,9, 46)

Como no se pudo concluir la fermentación en el fermentador se realizo otro cinética de producción en matraces para obtener el EPS a las condiciones establecidas por los 11 días que dura la producción y de esta se realizo el análisis químico del EPS obtenido de *Rhizobium loti* que es una segunda parte de este trabajo experimental, encontrando que este se encontraba sin contaminantes comunes que son las proteínas

y la manosa cuando se extraía del medio de cultivo con la metodología descrita, las proteínas su origen podría ser bacteriano y la manosa su origen puede ser el extracto de levadura y en este caso no se encontró, se realizó el análisis de CLAE para determinar por cuantas fracciones estaba compuesto encontrando que eran dos de peso molecular diferentes una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular, algunos autores mencionan que este tipo de género bacteriano pueden además producir un octosacarido lineal el cual no fue el caso, con la metodología de Amemura et al. Se pudo separar las dos fracciones que componen el EPS y determinar por cromatografía de papel y de capa fina el sistema de disolventes, los reveladores y la composición monosacárida de cada una de las fracciones, lo cual fue comprobado por cromatografía líquida de alta eficiencia, hacen falta más análisis químicos para poder dilucidar la estructura química pero con la información obtenida con el análisis químico realizado es suficiente para este trabajo experimental.

A continuación se presenta una comparación del medio Base Calculado y el medio optimizado.

Cuadro comparativo del medio base calculado y optimizado.

COMPOSICION	MEDIO BASE CALCULADO	MEDIO OPTIMIZADO PARA EPS
Manitol	10.0 g/l	20 g/l
Extracto de levadura	1.0 g/l	1.5 g/l
Sulfato de magnesio	0.76 g/l	0.4 g/l
Cloruro férrico	0.1 g/l	0.1 g/l
Cloruro de sodio	0.26 g/l	0.26 g/l
Fosfato dibásico de potasio	1.66 g/l	1.66 g/l
Carbonato de calcio	-----	1.0 g/l
Sulfato de manganeso	-----	120 µM/l
Con. Ambientales	pH 7.0, 30 °C 200 rpm	pH 8.0 30°C 200rpm

Se obtuvo un rendimiento de 10.6 g/l EPS peso seco, en el medio optimizado a diferencia del que se obtenía en el medio base de 4,6 g/l EPS peso seco en 11 días de incubación. En el fermentador se obtuvo 10.61 g/l de EPS en 5 días de incubación, y podría aumentar si se tuviera un sistema alterno de agitación (turbulento).

Falta determinar exactamente el grado de polimerización del EPS de bajo peso molecular, determinar la estructura química de los polímeros que conforman el EPS de ***Rhizobium loti***, estudios reológicos y estudiar las diferentes aplicaciones que puede tener el EPS en diferentes áreas industriales como sustituto de agar bacteriológico en medios de cultivo, inmunoestimulante, a nivel industrial en farmacia, cosméticos y en la industria de alimentos como análogo de queso, helado, confituras, etc. o sustituto de otros polisacáridos de origen microbiológico, de plantas, animales o sintéticos.



## 6.0 CONCLUSIONES

- El medio de cultivo que se optimizó fue el medio Base Calculado por dar la mayor producción de EPS, mayor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y un menor tiempo de duplicación (tD).
- La fuente de carbono con la que se obtuvo mayor producción del EPS fue el manitol.
- Con extracto de levadura se obtuvo una mayor producción del EPS.
- De la optimización de los componentes del medio de cultivo que se evaluaron se encontró que a concentraciones de 20 g/l de manitol, 1.5 g/l de extracto de levadura, 0.4 g/l de sulfato de magnesio, 1.0 g/l de carbonato de calcio y 120  $\mu$ M/l hay una mayor producción del EPS.
- Las condiciones ambientales a las que se encontró un mejor rendimiento fueron: pH 8.0, temperatura 30°C y una agitación de 200 rpm.
- Con el medio optimizado se obtuvo un rendimiento de 10.6 g/l en 11 días de incubación del EPS a diferencia de 4.6 g/l que se obtenían con el medio base calculado
- En fermentador se obtuvo un rendimiento de 10.61 g/l en cinco días de incubación.
- El EPS obtenido de *Rhizobium loti* está compuesto por dos fracciones una de peso molecular de 93,000 d, y otra de 25,000 d.
- La fracción de alto peso molecular está compuesta por residuos de glucosa, galactosa y ácido glucurónico, y sustituyentes laterales de ácido pirúvico y acético.
- La fracción de bajo peso molecular está compuesta por glucosa encontrándose 12 residuos, unidos por enlaces  $\beta$ -1,2- glucosídicos.
- Falta concluir el análisis químico para poder dilucidar la estructura, determinar exactamente el grado de polimerización de la fracción de bajo peso molecular, estudios de reología y sus aplicaciones en diferentes áreas industriales.

## 7.0 BIBLIOGRAFIA

1. Amemura, A., Hisamatsu, Mitani, H. Y Harada, T. Cyclic (1,2)-beta-D-glucan and the octasaccharides-repeated units of extracellular acidic polysaccharides produced by *Rhizobium*. *Carbohydr. Res.* 1983, 114:277-285.
2. Aman Per., McNeil Michael, Franzen Lars-Erik, Darvill Alan G. and Arbershilm Peter. Structural Elucidation, Using H.P.L.C.-M.S. and G.L.C.-M.S., of The Acidic Polysaccharide Secreted by *Rhizobium meliloti* Strains 1021. *Carbohydrate Research*. Vol. 95 (1985) 263-282.
3. Amemura Akinori, Footrakul Praphaisri, Koizumi Kyoko, Utamura Toshiko and Taguchi Hisaharu. Isolation of (1, 2)-β-D-Glucan from Tropical Strains of *Rhizobium* and Determination of Their Degrees of Polymerization. *J. Ferment. Technology*. Vol. 63 (1985) 115-120.
4. Bailey R. W. Greenwood R. M. and Craig A. Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium* Strains Associated with *Lotus* species. *Journal of General Microbiology*. Vol. 65 (1971) 315-324.
5. Batista S., Castro S., Ubalde M. And Martinez-Drets G. Effect of divalent cations on succinate transport in *Rhizobium tropici*, *R. Legumiinosarum* by phaseoli and *R. loti*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 10 (1994) 249-255.
6. Bhagwat Arvind A. and Keister Donald L. Synthesis of β-Glucans by *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium fredii*. *Can J. Microbiol.* Vol. 38 (1992) 510-514.
7. Breedveld M. W. Zevenhuizen L. P. T. M. and Zehnder A. J. Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. *Journal of General Microbiology*. Vol. 136 (1990) 2511-2519.
8. Breedveld Michael W., Hadley Jill A. and Miller Karen J. A Novel Cyclic β-1, 2-Glucan Mutant of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. (1995) November, 6346-6351.
9. Breedveld Michaël W., Zevenhuizen L. P. T. M. and Zehnder Alexander J. B. Osmotically-Regulated Trehalose Accumulation and Cyclic β-(1,2)-Glucan Excretion by *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolii* TA-1. *Arch Microbiol.* Vol. 156. (1991) 501-506.
10. Breedveld W. Michael, Canter Cremers Hayo C. J., Batley Michael, Posthumus Maarten A., Zevenhuiizen Ludovicus P. T. M., Wijffelman Carel A. and Zehnder Alexander J. B. Polysaccharide Synthesis in Relation to Nodulation Behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, (1993) February, 750-757.

11. Bull M. J. Progress in Industrial Microbiology. Elsevier Scientific Publishing Company. Vol. 15 (1979).
12. Carlson Russell W. And Lee Ru-Po. A comparison of the surface polysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* 128C53 sm rif with surface polysaccharides from its exo mutant. *Plant Physiol.* (1983) 71, 223-228.
13. Coronado C., Sanchez-Andújar B. And Palomares A. J. *Rhizobium* extracellular structures in the symbiosis. *World Journal Microbiology and Biotechnology.* Vol. 12 (1996) 127-136.
14. 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. 32:519-536
15. Courtois Bernard, Courtois Josiane, Heyraud Alain and Rinaudo Marguerite. Effect of Biosynthesis Conditions on the Chemical Composition of the Water Soluble Polysaccharides of Fast-Growing Rhizobia. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 32 (1986) 519-526.
16. Chen Hancai, Gray James X., Nayudu Murali, Djordjevic Michael A., Batlye Michael, Redmond John W. and Rolfe Barry G. five Genetic Loci Involved in The Synthesis of Acidic Exopolysaccharides are Closely Linked in The Genome of *Rhizobium spp* strain NGR234. *Mol Gen Genetic.* Vol. 212 (1988) 310-316.
17. Dazzo Frank B. and Brill Winston J. Bacterial Polysaccharide which Binds *Rhizobium trifolii* to Clover Roots Hairs. *Journal of Bacteriology.* (1979) May, 1362-1373.
18. Dazzo Frank B. and Hollingsworth Rawie E. Trifoliin A and Carbohydrate Receptors as Mediators of Cellular Recognition in The *Rhizobium trifolii*-Clover Symbiosis. *Biol. Cell.* Vol. 51 (1984) 267-274.
19. De Leizaola, M. Y Dedonder, R. Estude de quelque polyoisides products par des souches de *Rhizobium*. *C.R. Acad. Sci.* 1955, 240:1825.
20. Dudman, W. F. Structural studies the extracellular polysaccharides of *Rhizobium Japonicum* strains 71A, CC708 and CB1795. *Carbohydr. Res.* 1978, 66:9-23
21. Dudman, W. F. The extracellular polysaccharides of *Rhizobium Japonicum*. Compositional studies. *Carbohydr. Res.* 1976, 46:97.110
22. Funahashi Hitoshi, Yoshida Toshiomi and Taguchi Hisaharu. Effect of Glucose Concentration on Xantana Gum Production by *Xanthomonas campestris*.

23. Garcia-de Los Santos, Brom s. and Romero D. *Rhizobium* Plasmids In Bacterial-Legume Interactions. World Journal of Microbiology & Technology Vol. 12 (1996) 119-125.
24. Garcia-Ochoa F., Santos V. E. and Fritsch A. P. Nutritional Study of *Xanthomonas campestris* in Xathan Gum production by Factorial Design of Experiments. Enzyme Microb. Technol. Vol. 14 (1992) December, 991-996.
25. Geremias, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N, Olivares, J. Y Ugalde, R. A. A *Rhizobium melliloti* mutans that from ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolisaccharides but fails to form  $\beta$ -(1,2)-glucan. J. Bacteriol, 1987., 169:880-884
26. Ghai Suresh, Hisamatsu Makoto, Amemura Akinori and Harada Tokuya. Production and Chemical Composition of Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium*. Journal of General Microbiology. Vol. 122 (1981) 33-40.
27. Gray X. J. Y Rolfe G. B., Exopolisaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. Mol. Microbiol. 1990. 10:1425-1481.
28. Hebbar K. P., Gueniot B., Heyraud A., Collin-Morel P., Heilin T., Balandreau J. and Rinaudo M. characterization of Exopolysaccharides Produced by rhizobacteria. Appl. Microbiol. Vol. 38 ( 1992) 248-253.
29. 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.
30. Hollingsworth Rawie, Smith Eustace and Ahmad M. H. Chemical Composition of Extracellular Polysaccharides of Cowpea rhizobia. Arch Microbiol. Vol. 142 (1985) 18-20.
31. Humphrey Beverley A. and Vincent J. M. Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium*. Journal General Microbiology. Vol. 21 (1959) December, 477-483.
32. Jansson, P. E., Kenne L., Lindberg B., Ljungren H., Lonngren J., Ruden V. Y Svenssom A. Demonstration of an octasaccharides repeating unit in the extracellular polysaccharides of *Rhizobium melliloti* by sequential degradations. J. Amer. Chem. Soc. 1977, 99:3812-3815-
33. Jones William T., McDonal Pauline E., Jones Stephen and Pankhurst Clive E. Peptidoglycan-bound Polysaccharide Associated with Resistance of *Rhizobium loti* Strain NZP2037 to *Lotus pedunculatus* Root Flavolan. Journal of General Microbiology. Vol. 133 (1987) 2617-2629.

34. Kannerberg Elmar L. and Brewin Nicholas J. Host-Plant Invasion by *Rhizobium*: The Role of Cell-Surface Components. Trends in Microbiology. Vol. 2 (1994) August, 277-283.
35. Kennedy John F. Jones Peter and Barker S. Alan. Factors Affecting Microbial Growth and Polysaccharide Production During the Fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures.
36. Klimek J. and Ollis D. F. Extracellular Microbial Polysaccharides: Kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, and *Aureobasidium pullulans* Batch Fermentations. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 22 (1980) 2321-2342.
37. Koizumi K., Okada K., Okada Y., Horiyama S., Utamura T., Hisamatsu M., y Amemura A. Separation of cyclic (1-29-b-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.
38. Leigh John A. and Coplin David L. Exopolyccharides in Plant-Bacterial Interactions. Ann. Rev. Microbiol. Vol. 46 (1992) 307-346.
39. Leigh John A., Signer Ethan R. and Walker Graham C. Exopolysaccharide-Deficient Mutant of *Rhizobium meliloti* that Form Ineffective Nodule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82 (1985) September, 6231-6235.
40. Lopez-Lara Isabel, Orgambine Guy, Dazzo B. Frank, Olivares Jose and Toro Nicolas. Characterization and Symbiotic Importance of Acidic Extracellular Polysaccharide of *Rhizobium* sp. Strain GRH2 Isolated from Acacia Nodules. Journal of Bacteriology, (1993) May, 2826-2832.
41. Morris F. J. Bacterial Polysaccharides for Use Food and Agriculture. Biotechnology and Polymers. Vol. 12 (1991) 135-144.
42. Müller Peter, Hynes Michael, Kapp Dieter, Nichaus Karsten and Pühler Alfred. Two Classes of *Rhizobium meliloti* Infection Mutants Differ in Exopolysaccharide Production and in Coinoculation Properties with Nodulation
43. Olalde-Portugal V. and Peña Cabriales J. J. Poblaciones Nativas de *Rhizoobium meliloti* en el Bajío, México. II: Competencia Saprofítica. Rev. Lat-amer, Microbiol. Vol.31 (1989) 285-291.
44. Pankhurts C. E., Craig A. S. and Jones W. T. Effectiveness of *Lotus* Roots Nodules. Journal of Experimental Botany. Vol. 30 (1979) 1085-1093.

45. Paul François, Morin André and Monsan Pierre. Microbial Polysaccharides with Actual Potential Industrial Applications. *Biotech. Adv.* Vol. 4 (1986) 245-259.
46. Rajeshwari K. V., Prakash G. and Ghosh P. Improved Process for Xanthan Production Using Modified Media and Intermittent Feeding Strategy. *Letter in Applied Microbiology*. Vol. 21 (1995) 173-175.
47. Randi Somme. Chemical analysis of exocellular, acidic polysaccharides from seven *Rhizobium* strains. *Carbohydrate Res.* 1974 33.89-96
48. Robertsen Borre K., Aman Per., Darvill Alan G., McNeil Michael and Albersheim Peter. Host-Symbiotic Interactions<sup>1</sup>. *Plant Physiol.* Vol. 67 (1981) 389-400.
49. Roller S. and Dea I. C. M. Biotechnology in the Production and Modification of Biopolymers for Foods. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 12(3) (1992) 261-277.
50. Roseiro J. Carlos, Emery Nick A., Simoes P., Estevao F. and Amaral-Collaco M. Production of Xathan by In-Flow Cultures of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 38 (1993) 709-713.
51. Roth L. Evans and Stacey Gary. *Rhizobium-Legume* Symbiosis. *Microbial Cell-Cell Interactions*. (1991) 255-291.
52. Sandford Paul A., Cottrell Ian W. and Pettitt David J. *Microbial Polysaccharides: New Products and Their Commercial Applications*. *Pure & Appl. Chemical*. Vol. 56
53. Sanford Paul A. *Exocellular Microbial Polysaccharides*. *Advances in Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*. Vol. 36 (1979) 266-312.
54. Sinsky Anthony, Jamas Spiros, Easson David jr. And Rha ChoKyun. *Biopolymers and Modified Polysaccharides*. *Biotechnology in Food Processing*. Noyes Publications (1986) 73-110.
55. Skorupska Anna, Mieczyslawa derylo and Lorkiewicz. Role of noncarbohydrate substitution of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch Microbiol* Vol. 143 (1985) 307-310.
56. Slodki M. E. and Cadmus M. C. Production of Microbial Polysaccharides. *Advances and Applied Microbiology*. Vol. 23 (1978) 19-47.
57. Somme. Randi. Chemical Analysis of Exopolysaccharides from Seven *Rhizobium* Strains. *Carbohydrate Research*. Vol. 33 (1974) 89-96.

58. Soto G. Alberto N. Optimización de un medio de cultivo para la cepa nativa de *Rhizobium leguminosarum* biovariedad *viciae* FESC-L1 para la elaboración de un inoculante, Tesis UNAM. Agosto de 1994.
59. Sutherland Ian W. Biosynthesis and Composition of Gram-Negative Bacterial Extracellular and Wall polysaccharides. *Ann. Rev. Vol.39* (1985) 243-270.
60. Sutherland, Y. W. In: Extracellular polysaccharides. Edit American Chemical Society 1979, 1-330.
61. Sutherland. Y. W. In Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Edit Cambridge University Press. 1990, 1-163.
62. Tena-Castorena M. G. and Martinez Ramos A. Identificación de los Monosacáridos Componentes de los Exopolysacáridos de *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Trifolii*. *Rev. Lat-amer, Microbiol. Vol. 31* (1989) 299-303.
63. Tully Raymond E. and Terry Maurice E. Decreased Exopolysaccharide Synthesis by Anaerobic and Symbiotic Cells of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Vol. 79* (1985) 445-450.
64. Van Rhijn Pieternel and Vanderleyden Jos. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews. (1995) Mar, 124-142.*
65. Venkatasubramian K. and Vieth W. R. Immobilized Microbial Cells. World Headquarters.
66. Vincent J. M., Manual practico de Rhizobiología In: Hemisferio sur (ed) B. Aires 1-200
67. Weiss Rebecca M. and Ollis David F. Extracellular Microbial Polysaccharides. (Substrate, Biomass, and Product Kinetic Equations for Batch Xanthan Gum Fermentation). *Biotechnology and Bioengineering. Vol. 22* (1980) 859-873.
68. Whitfield Chris. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J. Microbiol. Vol. 34* (1988) 415-420.
69. Zevenhuizen L. P. T. M. cellular Glycogen,  $\beta$ -1,2-glucan, Poly- $\beta$ -Hydroxybutyricacid and Extracellular Polysaccharide in Fast-Growing Species of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek. Vol. 47* (1981) 481-497.
70. Zevenhuizen L. P. T. M. Methylation Analysis of Acidic Exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. *Carbohydrate Research. Vol. 26* (1973) 409-419.

71. Zevenhuizen, L.P.T.M. and Scholten-Koerselman H.J. Surface carbohydrates of *Rhizobium*. L.  $\beta$ -1, 2-glucan. *J. Microbiol. Serol.*, 1979, 45.165-175.
72. Zevenhuizen, L.P.T.M. Gel-forming capsular polysaccharide os fast-growing rhizobia: occurrence and reological properties. *Appl, Microbiol. Biotechnol.* 1984, 20:393-399
73. Zevenhuizen L. P. T. M. Selective synthesis of Polysaccharides by *Rhizobium trifolii* Strain TA-1. *Fems Miicrobiology Letter.* Vol. 35 (1986) 43-47.