



# Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”

## *Yield emulsifiers exopolysaccharides produced by native halophilic bacteria concentrations molasses three Saccharum officinarum L. "sugarcane"*

Ángel Fuentes, Carmen Carreño\*, Cinthya Llanos

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Av. Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

Recibido 12 febrero 2013; aceptado 10 junio 2013

### Resumen

Los exopolisacáridos microbianos con propiedades emulgentes constituyen una alternativa a los polímeros químicos y a los procedentes de algas y plantas. Su producción en melaza como fuente de carbono disminuye el costo y genera un valor agregado a este subproducto de la industria azucarera, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar el rendimiento y productividad de exopolisacáridos emulgentes por bacterias halófilas nativas en melaza. A partir de muestras de agua y suelo de salinas en los distritos de San José y Santa Rosa, en Lambayeque, se obtuvieron 138 aislados de bacterias en medio sintético malta-extracto de levadura con 5 % p/v de sales. Con el 10,8 % de estas bacterias formadoras de colonias gomosas y cultivadas en glucosa como fuente de carbono se recuperaron EPS, cuyos valores máximos de emulsión en las mezclas agua – fase oleosa fueron 63,3 y 56,6 %, después de 1 y 24 horas. El aislado M510<sup>-1</sup> C1 identificado como *Halomonas* sp.M5 sintetizó EPS emulgentes en caldo con 20, 30 y 40 gL<sup>-1</sup> de melaza, alcanzando 0,296; 0,200 y 0,113 gg<sup>-1</sup> de rendimiento Yp/s y 0,016; 0,017 y 0,010 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> de productividad, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre 20 y 30 g L<sup>-1</sup>. Con el control 10 gL<sup>-1</sup> de glucosa se alcanzó un rendimiento Yp/s de 0,171 gg<sup>-1</sup> y una productividad de 0,018 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Se demostró que las bacterias halófilas nativas producen exopolisacáridos emulgentes en melaza como fuente de carbono.

**Palabras clave:** Emulgentes, melaza, *Halomonas* sp., salinas, exopolisacáridos.

### Abstract

The microbial exopolysaccharide with emulsifying properties are an alternative to polymers and chemicals from algae and plants. Its production in molasses as carbon source lowers costs and generates added value to this byproduct of the sugar industry, so the aim of this study was to determine the performance and productivity of EPS emulsifiers by native halophilic bacteria in 20, 30 and 40 gL<sup>-1</sup> of molasses. In MY synthetic medium with 5 % w/v of salts, 138 isolates of bacteria obtained from soil samples of salt water and in the districts of San Jose and Santa Rosa, in Lambayeque. In 10.8 % of these gummy colony forming bacteria and grown on glucose as carbon source EPS recovered whose maximum values of the mixtures in water emulsion - oil phase were 63.3 and 56.6 % after 1 and 24 hours, respectively. The M5 bacteria identified as *Halomonas* C1 10<sup>-1</sup> sp. M5 EPS synthesized emulsifiers molasses broth, reaching yields Yp/s of 0.296 gg<sup>-1</sup> and 0.200 gg<sup>-1</sup> with 20 and 30 gL<sup>-1</sup> of molasses respectively, a productivity of 0.016 and 0.017 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, not differing significantly between them. With 10 gL<sup>-1</sup> glucose was reached Yp/s of 0.171 gg<sup>-1</sup> and a productivity of 0.018 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. It was shown that the EPS produced native halophilic bacteria utilizing molasses emulsifiers as carbon source.

**Keywords:** Emulsifiers, molasses, *Halomonas* sp., exopolysaccharides.

### 1. Introducción

Los polisacáridos de vegetales, algas

marinas y microorganismos son moléculas complejas formadas por unidades simples

\* Autor para correspondencia

Email: crcf1@hotmail.com (C. Carreño)

repetitivas de azúcares, unidas mediante enlaces glicosídicos, originando una estructura lineal o ramificada que puede llegar a estar constituida por miles de monosacáridos. Son interesantes por sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, como agentes viscosizantes, gelificantes y emulgentes. Tradicionalmente los más utilizados son los polisacáridos vegetales como las gomas guar, garrofin y árabiga, procedentes de extractos de semillas, los exudados de plantas tragacanto e indica, las pectinas excretadas como subproductos vegetales, así como los carragenatos y alginatos, producidos por algas rojas y marrones; aunque también existen agentes químicos con las mismas propiedades como el polisacárido 60, Tween 20 y 80 y Tritón X – 100 (Mata, 2006).

Los polisacáridos excretados al medio de cultivo por los microorganismos, denominados exopolisacáridos, EPS, están compuestos principalmente por carbohidratos formando homo o heteropolímeros y pueden contener sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Estos polímeros ofrecen una serie de ventajas, como la gran versatilidad de los microorganismos para sintetizar polisacáridos neutros o con carga negativa, a partir de fuentes renovables, bajo condiciones controladas y posibilidad de manipulación genética, que permite la obtención de productos con mejores propiedades funcionales e incluso mayor calidad. Superan a los polímeros de plantas y algas, que presentan el inconveniente de no estar disponibles siempre con la calidad y propiedades requeridas, debido a la variabilidad estacional y también son mejores que los compuestos químicos, porque son estables en condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad, son biodegradables y se obtienen a partir de fuentes renovables (Bouchotroch *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2003).

Los EPS bacterianos constituyen una alternativa a los agentes vegetales y químicos; sin embargo, el costo de producción es elevado, debido entre otros

factores al uso de glucosa como fuente de carbono, problemática que puede ser solucionada con fuentes de carbono más económicas. En Lambayeque existen diversas empresas agroindustriales que obtienen azúcar como producto y melaza como residuo (de 1 tonelada métrica de caña de azúcar se obtienen entre 30 a 40 kg de melaza). Debido a que la melaza contiene nutrientes, puede ser utilizada por las bacterias halófilas para la producción de EPS. Éstas son heterótrofas, capaces de metabolizar diversos carbohidratos como fuentes de carbono y las condiciones salinas en las que se desarrollan, disminuyen los requerimientos de esterilidad y problemas de contaminación durante el proceso fermentativo (Guzmán y Hurtado, 2011).

Según lo expuesto, se realizó el presente estudio cuyos objetivos fueron aislar bacterias halófilas a partir de muestras de agua y suelo de salinas en los distritos de San José y Santa Rosa en Lambayeque, seleccionar las bacterias halófilas nativas según el porcentaje de emulsión alcanzado por los EPS producidos en glucosa como fuente de carbono y determinar el rendimiento Yp/s y productividad de los EPS emulgentes por una bacteria halófila nativa en tres concentraciones (20, 30 y 40 gL<sup>-1</sup>) de melaza de caña de azúcar.

## 2. Material y Métodos

### Diseño metodológico

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. En la primera fase, con una investigación descriptiva se realizó el aislamiento, detección y selección de bacterias halófilas nativas productoras de EPS, utilizando un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández *et al.*, 2003). En la segunda fase, con una investigación experimental se determinó el rendimiento de EPS emulgentes producidos por una bacteria halófila nativa seleccionada.

### **Muestreo**

Se colectaron 35 muestras, 18 de agua de las salinas y 17 de suelo de los alrededores. Las salinas de San José están ubicadas a 6° 46' 8.26" latitud Sur y 79° 56' 56.78" longitud oeste; mientras que, las salinas de Santa Rosa están a 6° 53' 34.87" latitud Sur y 79° 54' 33.08" longitud oeste en Lambayeque (Guzmán y Hurtado, 2011). Inmediatamente después de la colección, se midió el pH y concentración de cloruro de sodio de las muestras y se transportaron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

### **Aislamiento de bacterias halófilas**

Con cada muestra de agua y suelo se realizaron dos diluciones decimales ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) en solución salina esterilizada (NaCl 5 % p/v), de las que se tomaron alícuotas y se sembraron en agar extracto de malta y levadura, MY, con 5 % p/v de sales, incubando a 32 °C, en aerobiosis, hasta observar el desarrollo de las colonias (1 a 3 días). Éstas fueron agrupadas según su consistencia y color y las representativas fueron cultivadas en agar MY a 32 °C, por 24 a 72 horas, constituyendo los cultivos puros, que fueron mantenidos en refrigeración a 8 °C.

### **Producción de exopolisacáridos en glucosa**

Las bacterias halófilas que desarrollaron colonias grandes cremosas y gomosas fueron seleccionadas como productoras de EPS y cada una fue cultivada en 5 mL de caldo MY con glucosa como fuente de carbono, a 32 °C, en agitación constante (150 rpm), hasta observar crecimiento, con turbidez del medio similar al tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland, después de 18 a 24 horas de incubación. A continuación, los cultivos fueron inoculados en 45 mL (10 % v/v) de caldo MY con 7,5 % p/v de sales y fueron incubados a 32 °C, a 150 rpm, por tiempo suficiente hasta observar por nefelometría entre  $2,4$  a  $2,7 \times 10^9$  cel

mL<sup>-1</sup>. Después, se cuantificó el EPS según la metodología descrita por Mata (2006) y modificada por los autores. Para recuperar el EPS, cada cultivo bacteriano fue centrifugado a 3500 rpm, durante 15 minutos para eliminar la biomasa. Al sobrenadante se le agregaron tres volúmenes de etanol 96 % v/v, se dejó en reposo 12 horas, a 4 °C y luego fue centrifugado a 3500 rpm, durante 10 minutos. El sedimento o EPS fue llevado a estufa a 60 °C, por 12 horas, para eliminar el alcohol y posteriormente fue pesado.

### **Determinación del porcentaje de emulsión**

Para determinar el porcentaje de emulsión alcanzado en las mezclas de los EPS con agua y fases oleosas, según Mata (2006), en tubos de prueba de 10 mL de capacidad se depositaron por triplicado 1,5 mL de una solución de cada uno de los EPS al 0,5 % p/v en agua destilada y después se agregaron independientemente 1,5 mL de los aceites comestibles Girasol, Oliva y Cil. Como control químico se utilizó Tween 80. A continuación, los tubos se taparon herméticamente y se agitaron manualmente con movimientos verticales por 1 minuto. Después, se dejaron en reposo y transcurridas 1 y 24 horas se midió la altura de la fracción emulsionada y el volumen total de la mezcla. El porcentaje de emulsión se determinó dividiendo ambos valores y multiplicando el resultado por 100.

### **Selección de bacterias por su crecimiento y producción de EPS en melaza**

Para la preparación del agar melaza se pesaron 20, 30, 40, 50 y 60 g de melaza y luego se agregó agua destilada hasta completar 1000 g. Para eliminar las impurezas según León y Soplopucó (2007), las soluciones de melaza fueron tratadas por decantación en refrigeración a 8 °C, durante 12 horas, luego centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos y filtración del sobrenadante. El filtrado

fue completado a 1 L con agua destilada y después se midieron los grados °Brix con un refractómetro Modelo RHB – 82 y se cuantificó la sacarosa ( $\text{gL}^{-1}$ ) con un polarímetro Carl Zeiss modelo 207. Según los resultados, las concentraciones 2, 3, 4, 5 y 6 %, equivalentes a 20, 30, 40, 50 y 60  $\text{gL}^{-1}$  de melaza presentaron 16, 25, 33, 40 y 48 °Brix, así como 12,87; 20,68; 27,29; 33,07 y 39,68  $\text{gL}^{-1}$  de sacarosa, respectivamente. Con las soluciones de melaza previamente tratadas se preparó el agar melaza, tomando como base el caldo MY con 7,5 % p/v de sales, donde la glucosa fue reemplazada por 20, 30, 40, 50 y 60 g de melaza  $\text{L}^{-1}$ . El agar melaza fue esterilizado en autoclave, a 121 °C, 1 atmósfera de presión, por 15 minutos. Después, cada bacteria productora de EPS fue sembrada en agar melaza y fue incubada a 32 °C por 48 horas, seleccionándose las que desarrollaron colonias en más del 50 % del área del agar melaza. A continuación, estas bacterias fueron cultivadas en caldo melaza con 20, 30 y 40  $\text{gL}^{-1}$ , a 32 °C, durante 4 días, a 150 rpm y se determinó el porcentaje de emulsión de los EPS producidos, seleccionándose e identificándose para la fase experimental la bacteria con el mayor porcentaje de emulsión en las mezclas de sus EPS con agua y fases oleosas.

#### **Acondicionamiento de biorreactores tipo tanque con aireación**

Los biorreactores tipo tanque, con flujo de aire descendente y en número de 12 estuvieron constituidos por frascos de 1 L de capacidad, cuyo extremo superior estuvo cubierto por una tapa de goma que presentó dos orificios. A través del primer orificio ingresó un difusor de aire (1 volumen/volumen/minuto, vvm), generado por una compresora Elite 803 de 4 watts y esterilizado por un sistema de burbujeo en solución de cloruro de sodio al 20 % p/v. A su vez, por el segundo orificio ingresó una cánula taponada en su extremo superior con algodón para permitir la salida de gases. Los frascos de vidrio fueron

esterilizados en horno (180 °C x 2 horas) y el material de plástico y goma fueron remojados en hipoclorito de sodio 5 % durante 24 horas y posteriormente fueron irradiados con luz ultravioleta durante 30 minutos.

#### **Proceso fermentativo**

Para la obtención del inóculo, la bacteria halófila seleccionada, se cultivó en 5 mL de caldo con 20, 30 y 40  $\text{gL}^{-1}$  de melaza y 10  $\text{gL}^{-1}$  de glucosa, a 32 °C y 150 rpm, hasta alcanzar  $10^7$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Luego se tomaron 2,5 mL (10 % v/v) y se inocularon en erlenmeyers con 22,5 mL de caldo, su respectiva concentración de melaza y glucosa y se incubaron a 32 °C y 150 rpm, hasta alcanzar  $10^7$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Para el proceso fermentativo en 12 biorreactores tipo tanque, con flujo de aire descendente y conteniendo 225 mL de caldo melaza con tres concentraciones de melaza y un control con glucosa (10  $\text{gL}^{-1}$ ) se depositaron 25 mL (10 % v/v) de cada inóculo bacteriano y se incubaron a 32 °C, durante 96 horas. A partir de la inoculación (hora 0) y cada 6 horas se tomaron muestras de 10 mL para cuantificar la biomasa, el sustrato consumido y EPS producidos, a los que se les determinó el porcentaje de emulsión alcanzado en las mezclas agua y fases oleosas. A continuación, se calculó el coeficiente de rendimiento de producto con respecto al sustrato,  $Y_p/s$  o cantidad de producto obtenido por cantidad de sustrato consumido ( $\text{gg}^{-1}$ ) y la productividad o gramos de producto por litro por hora ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

#### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El estudio fue conducido en un diseño completamente aleatorio (DCA), con cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones, totalizando doce unidades experimentales. Los tratamientos correspondieron a las concentraciones 20, 30 y 40  $\text{gL}^{-1}$  de melaza de caña de azúcar y 10  $\text{gL}^{-1}$  de glucosa como testigo. Se realizó el análisis de varianza de la

productividad ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de significación múltiple de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para comparar las medias entre ellas (Hernández *et al.*, 2003). Para estos análisis estadísticos se utilizó el software SPSS versión 15,0.

### 3. Resultados y discusión

Las muestras de agua y suelo de las salinas en Lambayeque presentaron una concentración de hasta 28,05 g/100 mL de NaCl, un pH de 8,03 y en el 100 % de ellas se aislaron bacterias halófilas, obteniendo 138 cultivos puros. Las salinas son aguas de mar estancadas que se evaporan lentamente por acción del sol (Ramírez *et al.*, 2004), constituyendo hábitats que contienen una elevada concentración de sal (Mata, 2006). Por su procedencia las bacterias aisladas a partir de las salinas son categorizadas como halófilas extremas. Según Madigan *et al.* (2004), los microorganismos que tienen una dependencia específica del ión sodio y requieren entre 2,5 a 5,2 M de NaCl (15 a 32 % p/v) son halófilos extremos; no obstante, tomando en cuenta la concentración 5 g/100 mL de sales del medio de aislamiento y 7,5 g/100 mL del medio de producción de EPS, las bacterias en este estudio son halófilas moderadas, debido a que presentaron un crecimiento óptimo entre 6 a 15 % NaCl. Los resultados coinciden con Quillaguamán *et al.* (2004), Mata (2006), Guzmán y Guzmán (2008) y Guzmán y Hurtado (2011), quienes también aislaron bacterias en ambientes con elevadas concentraciones de NaCl y donde los estudios moleculares han demostrado que las bacterias constituyen un grupo significativo de la microbiota (Díaz, 2007).

El 50,7 % de las bacterias halófilas nativas formó colonias grandes (4-5 mm de diámetro), constituidas por bacilos Gram negativos y fueron seleccionadas como productoras de EPS, por cuanto la

presencia de EPS asociados a las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias gomosas en medios sólidos o por el aumento de la viscosidad e incluso la formación de un gel en medios líquidos (Luque *et al.*, 2010).

En las condiciones del presente estudio se recuperó y cuantificó EPS (Figura 1) en el 34,3 % de las bacterias seleccionadas, de las que 70,8 % fue aislado de agua y 29,2 % de suelo. En las bacterias provenientes de agua, la concentración de EPS osciló entre 0,09 y 1,2  $\text{gL}^{-1}$  y en las aisladas de suelo, los valores oscilaron entre 0,09 y 0,95  $\text{gL}^{-1}$ . Se coincide con Bouchotroch *et al.* (2001), Arias *et al.* (2003), Martínez *et al.* (2004) y Mata (2006), quienes demostraron la presencia de bacterias productoras de EPS en ambientes hipersalinos, identificando especies de *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alteromonas*, *Salipiger* y *Palleronia*. A su vez, el valor máximo de 1,2  $\text{gL}^{-1}$  de EPS producidos por la bacteria M510<sup>-1</sup>C<sub>1</sub> después de 4 días se acerca a 1,3  $\text{gL}^{-1}$  reportado por Calvo *et al.* (2003) para *H. eurihalina* H96; sin embargo, es inferior a 3,8  $\text{gL}^{-1}$  alcanzado por *H. maura* S-30, después de 5 días de incubación (Arias *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Colonia (a) y exopolisacárido (b) sintetizado por una bacteria halófila nativa.

El 70,6 % de los EPS producidos por las bacterias aisladas de agua presentó actividad emulgente (Tabla 1). Después de 1 hora, los valores máximos del porcentaje de emulsión de los EPS sobre aceite de Girasol, Oliva y Cil fueron 63,3; 53,3 y 56,6 % y después de 24 horas fueron 56,6; 50,0 y 53,3 %, respectivamente. Por su

parte, con Tween 80 fueron 60,0; 56,6 y 60,0 % después de 1 hora, así como 60,0; 53,3 y 53,3 % después de 24 horas. A su vez, el 42,9 % de los EPS producidos por las bacterias halófilas aisladas de suelo presentó actividad emulgente (Tabla 2). Después de 1 hora, los valores máximos del porcentaje de emulsión de los EPS fueron 50,0; 53,3 y 53,3 % y después de 24 horas los valores fueron 36,6; 40,0 y 43,3 %, respectivamente. A su vez, con Tween 80 los valores fueron 56,6; 60,0 y 60,0 % después de 1 hora, así como 53,3; 53,3 y 50,0 % después de 24 horas.

En general, el 62,5 % de los EPS obtenidos presentó actividad emulgente, correspondiendo al 10,8 % de las bacterias halófilas nativas, las mismas que fueron seleccionadas para la fase experimental del trabajo. Se coincide con Bouchotroch *et al.* (2001),

Calvo *et al.* (2003) y Martínez *et al.* (2004), quienes determinaron que el EPS H96 producido por *H. eurihalina* tiene actividad emulsificante sobre hidrocarburos y otras sustancias lipídicas, así como el maurano de *H. maura* S-30 tiene propiedades viscosizantes y emulsificantes, muy similares al xantano, que es el agente de este tipo más ampliamente utilizado en la industria de alimentos. Según Mata (2006) algunos EPS provocan una disminución no tan marcada de la tensión superficial de las interfases y fundamentalmente estabilizan las emulsiones al aumentar la viscosidad y reducir la movilidad de las gotículas, por lo que son considerados bioemulgentes estabilizadores. En este grupo están los emulsanos de *Acinetobacter* spp., EPS acetilados de *H. eurihalina* y EPS sulfatados de *H. maura*.

**Tabla 1**

Porcentaje de emulsión de mezclas agua y fases oleosas con EPS producidos en glucosa como fuente de carbono por bacterias aisladas de agua

Bacterias	Tiempo (h)					
	1			24		
	Girasol	Oliva	Cil	Girasol	Oliva	Cil
M110-1 C1	50,0	43,3	53,3	36,6	33,3	40,0
M5 10-1 C1	63,3	53,3	56,6	56,6	50,0	53,3
M2 10-2 C1	50,0	30,0	36,6	26,6	23,3	30,0
M210-2C4	50,0	33,3	53,3	30,0	26,6	36,6
M9 10-1 C1	50,0	40,0	46,6	36,6	26,6	33,3
M4 10-1 C1	50,0	33,3	33,3	33,3	23,3	26,6
M1 10-1 C4	33,3	40,0	30,0	26,6	26,6	20,0
M4 10-1 C3	50,0	33,3	50,0	36,6	26,6	43,3
M8 10-1 C1	36,6	30,0	33,3	33,3	23,3	26,6
M2 10-1 C6	46,6	43,3	43,3	33,3	36,6	33,3
M6 10-1 C2	33,3	33,3	40,0	30,0	26,6	33,3
M2 10-2 C3	53,3	43,3	46,6	40,0	33,3	36,6
Tween 80	60,0	56,6	60,0	60,0	53,3	53,3

**Tabla 2**

Porcentaje de emulsión de mezclas agua y fases oleosas con EPS producidos en glucosa como fuente de carbono por bacterias aisladas de suelo

Bacterias	Tiempo (h)					
	1			24		
	Girasol	Oliva	Cil	Girasol	Oliva	Cil
M <sub>20</sub> 10 <sup>-2</sup> C <sub>2</sub>	43,3	53,3	53,3	36,6	40,0	43,3
M <sub>19</sub> 10 <sup>-2</sup> C <sub>3</sub>	50,0	40,0	36,6	36,6	33,3	30,0
M <sub>17</sub> 10 <sup>-2</sup> C <sub>1</sub>	36,6	40,0	30,0	26,6	33,3	23,3
Tween 80	56,6	60,0	60,0	53,3	53,3	50,0

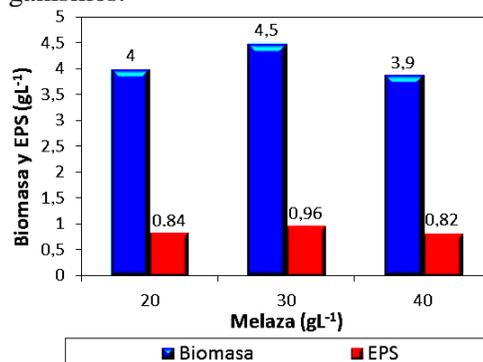
La predominancia de las bacterias productoras de EPS en muestras de aguas, tanto en número de aislados como en cantidad de EPS y porcentaje de emulsión en las mezclas agua y fases oleosas puede ser explicado porque en los ambientes acuosos estos exopolímeros permiten la adhesión y crecimiento de las bacterias, favoreciendo la retención de nutrientes que normalmente están diluidos en el agua. Los microorganismos son inmovilizados sobre un sustrato y están embebidos en una matriz de polímero orgánico, constituyendo las biopelículas, que se forman con rapidez en sistemas acuosos y que proveen un aporte regular de nutrientes (Mata, 2006).

El valor máximo que alcanzaron los EPS en los porcentajes de emulsión fue 63,3 %, superior al control químico Tween 80 (60 %). Se coincide con Arias *et al.* (2003) quienes observaron que el maurano emulsifica varios aceites comestibles, más eficientemente que algunos surfactantes químicos. Así mismo, Mata (2006) determinó que todos los EPS ensayados estabilizaron en mayor o menor medida mezclas oleoacuosas, en las que la fase oleosa era un hidrocarburo, aceite vegetal o mineral, destacándose los EPS B100 de *H. maura* y B33 de *P. marisminoris*, mucho más eficientes que los químicos Triton x-100, Tween 20 y Polisorbato 6. En cuanto al mecanismo de acción de los EPS emulgentes obtenidos, se determinó que son estabilizadores y no bio-surfactantes, porque no disminuyeron la tensión superficial. La estabilidad de las emulsiones originadas por los EPS bacterianos se comprobó después de 24 horas, cuando se alcanzó un valor máximo de 56,6 %. Según Garti y Leser (2001) los EPS forman una especie de gel rodeando las gotículas de la fase oleosa, que actúa como barrera, impidiendo la coalescencia y rotura de la emulsión.

Con los EPS bacterianos y Tween 80 se observó disminución en el porcentaje de emulsión después de 24 horas, coincidiendo con Mata (2006); sin

embargo, las emulsiones permanecieron estables sin mostrar signos de floculación, coalescencia o sedimentación. La capacidad de emulsionar fases oleosas por los EPS producidos por las bacterias halófilas nativas es de interés en la industria alimentaria, donde las emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite son muy comunes. En salsas, cremas y patés, los aceites, compuestos lipídicos y otros ingredientes son incorporados conjuntamente. La adición de EPS emulgentes impide la separación de las fases constituyentes del producto, asegurando una prolongada estabilidad (Mata, 2006).

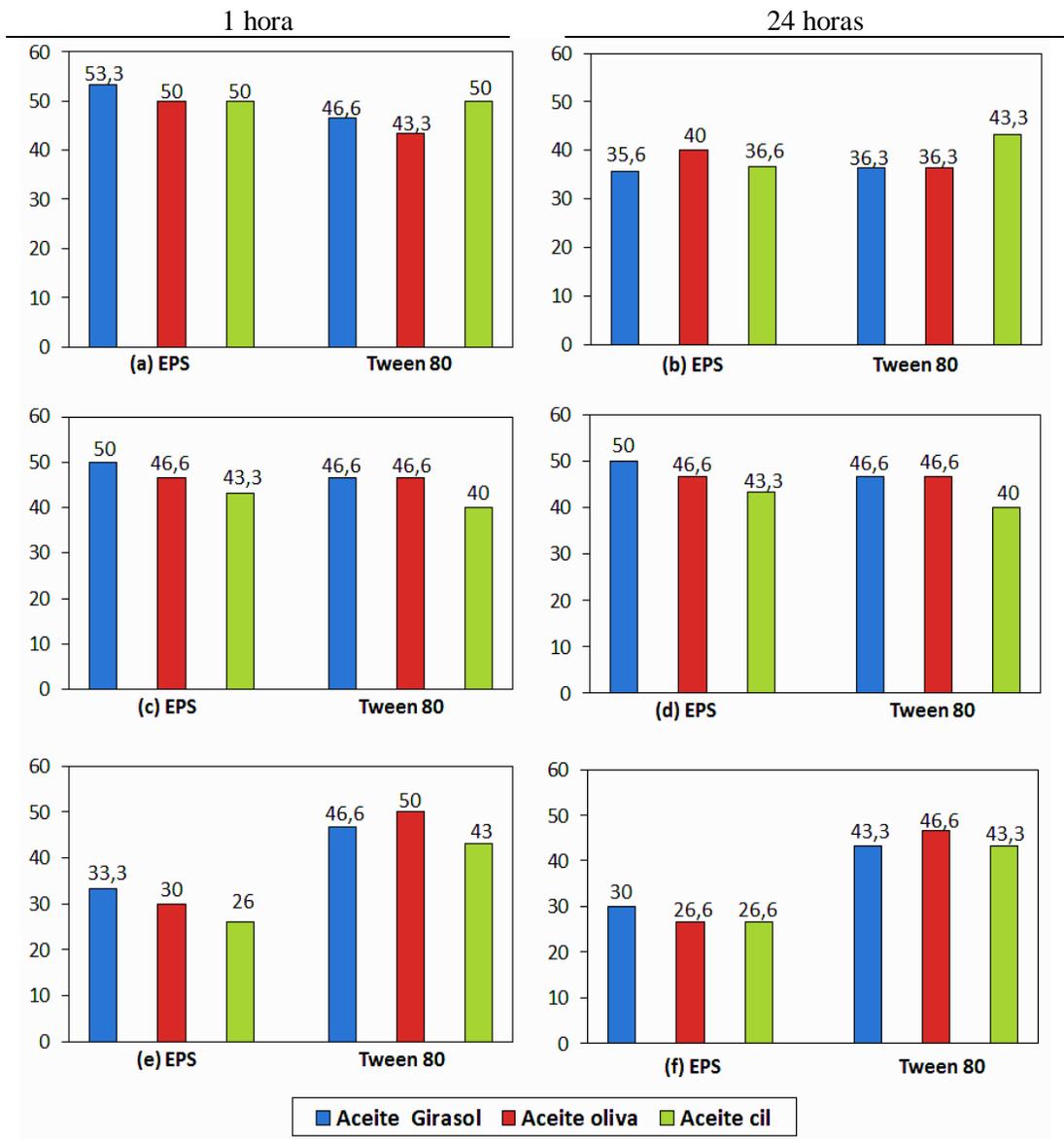
Los porcentajes de bacterias halófilas que desarrollaron colonias en más del 50 % del área de agar melaza fueron 73,3; 86,7 y 66,7 % para 20, 30 y 40 gL<sup>-1</sup> de melaza. El 6,6 % desarrolló en un área menor al 50 % del agar con 50 gL<sup>-1</sup> de melaza y no se observó desarrollo bacteriano con 60 gL<sup>-1</sup>. Se coincide con Esparza (2003) y León y Soplopucó (2007), quienes utilizaron melaza para la producción de los EPS xantano y dextrano por *Xantomonas campestris* y *Leuconostoc mesenteroides*, respectivamente. Según Fajardo y Sarmiento (2007), la melaza de caña de azúcar contiene en promedio 65 % de azúcares totales, que incluyen azúcares fermentables no reductores como la sacarosa y reductores como la glucosa y fructosa, que sirven como fuentes de carbono y energía para los microorganismos.



**Figura 2.** Valores máximos de biomasa y EPS producidos por bacterias halófilas nativas en caldo melaza.

Las bacterias halófilas nativas en caldo melaza alcanzaron 4,0; 4,5 y 3,9 g L<sup>-1</sup> de biomasa, así como 0,84; 0,96 y 0,82 g L<sup>-1</sup> de EPS (Figura 2) en 20, 30 y 40 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. El porcentaje de EPS con actividad emulgente no estuvo directamente relacionado con la concentración de melaza, tal que los valores fueron 63,6; 76,9 y 40 % para 20, 30 y 40 g L<sup>-1</sup>. El valor máximo de 53,3 en el porcentaje de

emulsión se alcanzó con 20 g L<sup>-1</sup> de melaza, superior a 30 g L<sup>-1</sup> de melaza y Tween 80 (Figura 3). Con 40 g L<sup>-1</sup> de melaza el valor máximo fue 33,3 %, frente a 50,0 % del Tween 80. En cuanto al tiempo, los mayores valores se alcanzaron después de 1 hora, observándose una tendencia a la disminución a las 24 horas incluso en el control químico.



**Figura 3.** Valores máximos del porcentaje de emulsión de mezclas agua, fase oleosa y EPS sintetizados en 20 (a, b), 30 (c, d) y 40 g L<sup>-1</sup> (e, f) de melaza.

Para determinar la cinética del crecimiento y producción de EPS emulgentes fue seleccionada la bacteria  $M_5 10^{-1} C_1$ , debido a que alcanzó los mayores valores de EPS en las tres concentraciones de melaza y porcentajes de emulsión en las mezclas de agua y fases oleosas con los EPS producidos en 20 g L<sup>-1</sup> de melaza. Esta bacteria fue identificada como *Halomonas* sp. M5. Se coincide con Arias *et al.* (2003) y Luque *et al.* (2010), quienes mencionaron que algunas especies de *Halomonas* producen EPS, destacando el EPS de *H. eurihalina* por su capacidad de formar geles y el de *H. maura* por sus propiedades viscosizantes y emulgentes.

Al observar la cinética de la producción del EPS por *Halomonas* sp. M<sub>5</sub> se aprecia que con melaza y glucosa los valores se incrementaron hasta un máximo y después disminuyeron gradualmente conforme transcurrió el tiempo (Figura 4). Según Mata (2006) la disminución de los niveles de EPS en tiempos prolongados de incubación es consecuencia de una degradación enzimática o de un cambio en los parámetros físicos del cultivo. Esta disminución es bastante frecuente en los EPS bacterianos como el gelano, habiéndose demostrado la presencia de glicohidrolasas en los extractos celulares y fracciones extracelulares, cuya actividad se acentúa en cultivos de mayor edad, debido a que se produce lisis celular con liberación de enzimas.

Arias *et al.* (2003) informaron que existe un tiempo óptimo para la recuperación del EPS, en términos de cantidad y potencial viscosizante. Estos investigadores obtuvieron cantidades significativas de maurano después de 3 y 5 días; sin embargo, éste no presentó la calidad óptima de viscosidad a

los 5 días, concluyéndose que el tiempo de incubación y la concentración de sal fueron los dos factores que mayoritariamente influenciaron la cantidad de maurano producido, así como el potencial viscosizante.

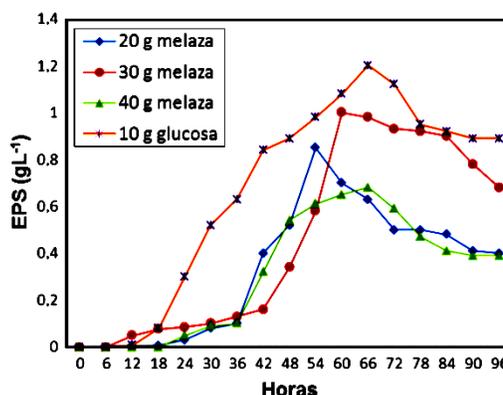


Figura 4. Cinética de la producción de EPS emulgentes por *Halomonas* sp. M<sub>5</sub>.

Conforme aumentó la melaza, se incrementó la concentración del EPS emulgente; alcanzando el máximo con 30 g L<sup>-1</sup>; sin embargo, disminuyó con 40 g L<sup>-1</sup> de melaza (Tabla 3). Mata (2006) observó que con el incremento de la glucosa en el medio de cultivo (más de 10 % p/v) disminuyó la producción de EPS e inclusive el crecimiento de las bacterias halófilas. Por su parte, la concentración de melaza estuvo inversamente relacionada con el rendimiento Y<sub>p/s</sub>, alcanzando el máximo con 20 g L<sup>-1</sup> de melaza.

Los mayores rendimientos Y<sub>p/s</sub> de 0,296 y 0,200 gg<sup>-1</sup>, equivalentes a 29,6 y 20,0 % correspondieron a 20 y 30 g L<sup>-1</sup> de melaza, valores superiores al control glucosa. Así mismo, la productividad de 0,016 y 0,017 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente, fue significativamente igual a 0,018 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> del control.

Tabla 3

Coefficiente de rendimiento y productividad de EPS por *Halomonas* sp. M<sub>5</sub>

Sustrato melaza	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Tiempo (h)	EPS (g L <sup>-1</sup> )	Sacarosa Consumida (g L <sup>-1</sup> )	Y (p/s) (gg <sup>-1</sup> )	(%)	Productividad g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
20	12,87	54	0,850	2,87	0,296	29,6	0,016 a
30	20,68	60	1,000	4,98	0,200	20,0	0,017 a
40	27,29	66	0,680	6,00	0,113	11,3	0,010 b
Glucosa	10,00	66	1,200	7,00	0,171	17,1	0,018 a

#### 4. Conclusiones

Se obtuvieron 138 aislados de bacterias halófilas a partir de muestras de agua y suelo de las salinas de los distritos de San José y Santa Rosa en Lambayeque. Con el 10,8 % de estas bacterias cultivadas en glucosa como fuente de carbono se recuperaron EPS, cuyos porcentajes de emulsión en las mezclas agua-fase oleosa fueron 63,3 y 56,6 %, después de 1 y 24 horas, respectivamente. El aislado M510<sup>-1</sup> C1 identificado como *Halomonas* sp.M5 sintetizó EPS emulgentes en caldo con 20, 30 y 40 gL<sup>-1</sup> de melaza, alcanzando 0,296; 0,200 y 0,113 gg<sup>-1</sup> de rendimiento Yp/s y 0,016; 0,017 y 0,010 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> de productividad, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre 20 y 30 g L<sup>-1</sup>. Con el control 10 gL<sup>-1</sup> de glucosa se alcanzó un Yp/s de 0,171 gg<sup>-1</sup> y una productividad de 0,018 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Se concluye que 20 gL<sup>-1</sup> de melaza de caña de azúcar es el sustrato adecuado para la producción de EPS emulgentes por *Halomonas* sp. aislada de salinas.

#### Referencias bibliográficas

- Arias, S.; Del Moral, A.; Ferrer, M.; Tallon, R.; Quesada, E.; Béjar, V. 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7: 319-326.
- Bouchotroch, S.; Quesada, E.; Izquierdo, I.; Rodríguez, M.; Béjar, V. 2000. Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 24(6): 374-378.
- Bouchotroch, S.; Quesada, E.; Moral, A.; Llamas, I.; Béjar, V. 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide – producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1625 – 1632.
- Calvo, C., Ferrer, M.; Martínez, F.; Béjar, V.; Quesada, E. 2003. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella euhialina*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55 (1): 45-54.
- Esparza, M. 2003. Efecto de la concentración de melaza en la producción de xantano por *Xantomonas campestris* en un biorreactor aireado y agitado. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Díaz, S. 2007. NAD – glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*: clonaje, secuenciación y expresión. Purificación y propiedades de la enzima nativa y recombinante. Tesis de Doctorado. Universidad de Alicante, España.
- Fajardo, E.; Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Gartí, N.; Leser, M. 2001. Emulsification properties of hydrocolloides. *Polymers for Advanced Technologies* 12(2): 123– 135.
- Guzmán, M.; Guz, H. 2008. Producción de plásticos biodegradables obtenidos de bacterias halófilas aisladas de la laguna Blanca-Potasí. Centro de Biotecnología de la Universidad Mayor de San Simón, Bolivia.
- Guzmán, C.; Hurtado, A. 2011. Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2003. Metodología de la Investigación. Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A., México.
- León, E.; Soplopoco, C. 2007. Efecto de la concentración de sacarosa contenida en el extracto de vainas de algarrobo (*Prosopis pallida*) en la producción de exopolímeros por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Luque, R.; Quezada, E.; Béjar, V.; Llamas, J. 2010. Aislamiento de cepas del género *Alomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *Pharmaceutica* 15(3): 453-462.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2004. Brock Biología de los microorganismos. 10<sup>ma</sup> ed. Pearson Educación, S.A., España.
- Martínez, J.; Quesada, E.; Martínez, F.; Béjar, V. 2004. A Taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharide - producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *International Journal Current Microbiology* 48: 348-353.
- Mata, J. 2006. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España.
- Quillaguamán, J.; Hatti, R.; Mattiasson, B.; Alvarez, M.; Delgado, O. 2004. *Halomonas bolivienses* sp. nov. an alkalitolerant moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 721 – 725.
- Ramírez, N.; Sandoval, A.; Serrano, J. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 24: 1-2.