

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología



“Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos”.

Xavier París Ripoll
Tesis Doctoral, 2009.

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología

Memoria presentada por el Licenciado en Biología
Xavier París Ripoll para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2009.

VºBº Los directores

Fdo. Dr. Ramos Comenzana Alberto

Fdo. Dra. Monteoliva Sánchez Mercedes

El doctorando

Fdo. Xavier París Ripoll

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Xavier Paris Ripoll
D.L.: GR. 2646-2009
ISBN: 978-84-692-4174-5

RESUMEN

En la presente tesis doctoral se describen los procesos de producción de diferentes EPS; xantano, curdlano, succinoglucano y pululano a partir de la utilización del suero y permeatos, subproductos de la industria láctea. Empleados como sustratos de fermentación tratando de optimizar las condiciones de cultivo para el uso completo de lactosa a partir de la hidrólisis con β -galactosidasa para la producción de biopolímeros de interés industrial. Es decir, exopolisacáridos microbianos con un amplio abanico de aplicaciones en industrias como la alimentaria, gracias a sus propiedades como emulsionantes, estabilizantes. Los estudios se centraron en el exopolisacárido producido por *Xanthomonas*, debido a sus enormes propiedades como agente reológico, concretamente el xantano producido por *Xanthomonas campestris*, gracias a sus interesantes propiedades físicas y reológicas que hacen que este exopolisacárido posea un gran potencial de aplicación en diferentes sectores. La producción de xantano, bajo condiciones de laboratorio, se realiza usualmente empleando medios de cultivo definidos, con una elevada relación carbono/nitrógeno para asegurar la máxima conversión de la fuente de carbono a la producción de exopolisacárido, se emplea habitualmente medios de carbono basados en glucosa o sacarosa.

A escala industrial, se usa el mismo principio, pero por motivos económicos se emplean sustratos económicos, generalmente complejos, obtenidos a partir de subproductos de actividades agrícolas. Actualmente, existe una importante problemática debido a la gran cantidad de residuos contaminantes generados por las industrias. Por ejemplo, el lactosuero son residuos generados en grandes cantidades., estos residuos pueden ser utilizados por una gran cantidad de microorganismos (Biorremediación), obteniéndose por una parte la descontaminación y la obtención de productos útiles de interés industrial. Sin embargo, el empleo de desechos industriales como medios de fermentación y fuentes de carbono para la producción de los exopolisacáridos, pueden verse modificadas las propiedades de los exopolisacáridos así como su grado de pureza al compararlas con sus homólogos comerciales.

La lactosa es el azúcar principal encontrado en la leche y en los sueros de quesería y su procesado por hidrólisis se hace necesario, la lactosa no puede ser empleada como fuente de carbono por bacterias como *Xanthomonas campestris*

entre otras, por lo que se debe tratar el lactosuero para la producción de EPS de origen microbiano, mediante la acción de la β -galactosidasa. El suero lácteo contiene aproximadamente entre un 4-5 % de lactosa, 0.8-1 % de proteínas, y una pequeña proporción de ácidos orgánicos, minerales y vitaminas

En este estudio hemos empleado la enzima beta-galactosidasa purificada de *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis* la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa, empleada a una concentración de 1000 ppm.

Se estudio la relación entre la concentración de lactosuero y la producción entre otros parámetros para maximizar la producción de biofermentadores de 2 y 20 litros de volumen. Tras tres días de fermentación a diferentes concentraciones de lactosuero, observamos que la mayor concentración de EPS obtenido, se consiguieron a concentraciones de lactosuero comprendidas entre el 5 y 6 %, alcanzándose producciones de $4,47 \text{ g l}^{-1}$ al 6% (p/v) de lactosuero, y de $7,5 \text{ g/l}$ en medio definido YM en biofermentadores de 2 litros de volumen total con un volumen de trabajo de 1,5 litros. Los rendimientos obtenidos a escala del fermentador de 20 litros son considerables, se consiguieron unas tasas de producción de $15,43 \text{ g/l}$ en medio YM y de $7,54 \text{ g/l}$ en medio lactosuero tratado con biolactasa, transcurridas 96 horas de fermentación.

La viscosidad se considera como el atributo industrial de mayor importancia al tratarse de los exopolisacáridos, por lo que se compararon las propiedades del xantano comercial con los obtenidos a partir de diferentes medios, presentando unas características y propiedades muy similares, pero su poder viscosizante es menor, las viscosidades de las soluciones al 1%(p/v) a 25°C fueron mayores en el xantano comercial con un valor de 865 cp a $39,6 \text{ s}^{-1}$ frente a 650 cp y 780 cp para el xantano producido a partir de lactosuero y medio YM , respectivamente, bajo las mismas condiciones. Las concentraciones de acetato y piruvato encontradas en la goma xantana comercial, son mayores, presentando diferencias de viscosidades en soluciones acuosas con goma xantana obtenida a partir de lactosuero tratado, ya que un exopolisacárido con un contenido alto en acetato y especialmente en piruvato, implican mayores aumentos en la viscosidad de soluciones acuosas al favorecer las asociaciones intermoleculares.

Todas la muestras analizadas de las soluciones acuosas al 1% (p/V) mostraron un alto grado de pseudoplasticidad típico de las soluciones de xantano comercial, es una característica de vital importancia para que los EPS puedan ser empleados en la mayoría de los sistemas alimentarios.

Un parámetro a tener en cuenta en los sistemas alimentarios es el color; el xantano obtenido a partir del lactosuero, presenta la particularidad de no transferir ningún tipo de color, siendo transparente en soluciones acuosas incluso a concentraciones de hasta el 4%(p/V). Los resultados muestran que el xantano obtenido empleando como medio lactosuero tratado con biolactasa es comparable desde un punto de vista industrial a los obtenidos mediante medios definidos.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis we studied a process for the production of xanthan, curdlan, succinoglycan and pullulan from the use of agro-industrial wastes as substrates. These EPS have properties such as high viscosity, stabilizing and emulsifying capabilities which make them attractive to the food industry. Attention has focused on exopolysaccharides from *Xanthomonas* species because of their commercial potential as rheological agents and the exopolysaccharides from *Xanthomonas campestris* are the particular interest because of their carbohydrate structure and consequent physical characteristics. Xanthan, a hetero-polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris*, is the most commercially accepted microbial polysaccharide. Under laboratory conditions, the xanthan production is usually made using culture media defined with a high carbon to nitrogen ratio for an efficient conversion of carbon source to the desired polysaccharide production. For xanthan production, medium containing glucose, sucrose, or starch as a carbon source is normally used. The same principle is used on industrial scale, but due to economic reasons, inexpensive complex substrates and nutrients are used in the xanthan production. The use of agro-industrial wastes as substrates for xanthan production has also reported by many researchers. Utilization of these substrates would seem to be ecologically sound and economically advantageous as they have low or even negative costs. However, the xanthan produced from different substrates may vary in purity and this is more pronounced when agro-industrial wastes are used as a carbon source for fermentation.

Xanthomonas campestris presents low level of β -galactosidase and can not use lactose as an efficient carbon source and produce low quantities of xanthan gum in a medium containing lactose as the sole carbon source. Whey is a by-product of the dairy industry which contains approximately 4-5% lactose, 0.8-1% proteins, minerals, and some small organic molecules. A process for the production of xanthan using whey previously treated with β -galactosidase from *Saccharomyces lactis* or *Kluyveromyces*

lactis was used. For this study the concentration of the enzyme was found take 1ml/l of substratum.

Also was examined the relationship between xanthan production and whey concentration and attempted to maximize the production of xanthan in a 2L and 15L bioreactors. A maximum exopolysaccharide concentration of 7 g /l was obtained in synthetic medium (YM) whereas a maximum concentration of 4.47 g/l was obtained in whey medium in bioreactor of 1,5 l capacity with a working volume of 1,5 l. Meanwhile in the scale up a maximum exopolysaccharide concentration of 15,43 g/l was obtained in synthetic medium (YM) whereas a maximum concentration of 7,54 g/l was obtained in whey medium in bioreactor of 20 l capacity with a working volume of 15 l during 96 hours of fermentation time. The highest viscosities were obtained using a solution (1% w/v) at 25 °C of standard xanthan gum with a value of 865 cp at $39,6 \text{ s}^{-1}$, and the biopolymer produced from whey medium showed a viscosity of 650 cp and from YM medium showed a viscosity 780 cp under the same conditions.

The pyruvic acid content has been suggested as an indicator of some rheological properties. Our results agree with these finding as noted by the lower apparent viscosity of xanthan obtained from 6% (w/v) whey medium than xanthan obtained from YM broth medium, which may be a consequence of the low pyruvic content in the former. All samples from aqueous solutions exhibited a high degree of pseudoplasticity behaviour, typical of xanthan. Indeed, the aqueous solutions were remarkably stable over a broad temperature range and pH. In addition, xanthan gum from whey medium showed a whiter colour in comparison with xanthan obtained from synthetic medium which presented a cream colour.

The results showed that the xanthan obtained from whey is comparable to those in synthetic medium.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1. Polímeros Microbianos | 10 |
| 1.1. Definición. | 10 |
| 1.2. Clasificación de los EPS microbianos. | 12 |
| 1.3. Composición química de los exopolisacáridos | 14 |
| 1.4. Funciones de los exopolisacáridos | 17 |
| 1.5. Aplicaciones de los polisacáridos microbianos | 18 |
| 1.6. Producción de EPS bajo condiciones de estrés hídrico | 21 |
| 2. Gomas | 23 |
| 2.1. Introducción | 23 |
| 2.2. Xantano | 25 |
| 2.3. Goma curdlana y succinoglucano | 35 |
| 2.4. Pululano | 44 |
| 3. Producción de EPS a partir de un medio no convencional. | 46 |
| 3.1 Substratos procedentes de actividades agro- industriales | 46 |
| 3.2 Residuo de la industria quesera: lactosuero. | 47 |
| 4. β-galactosidasa | 53 |
| 4.1. Mecanismo de acción de la β -galactosidasa | 55 |
| 4.2. Origen y actividad de la β -galactosidasa según las fuentes de producción | 57 |
| 4.3. Producción de β -galactosidasa | 58 |
| 4.4. Usos del suero de leche hidrolizado | 59 |
| 5. Reología aplicada a las gomas alimentarias | 61 |
| 5.1. Definición e historia de la reología | 61 |
| 5.2. Aplicaciones del estudio de la reología. Importancia de la reología | 63 |
| 5.3 La viscosidad | 65 |
| 5.4 Tipos de fluidos | 66 |

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 1. Microorganismos y medios empleados | 74 |
| Cepas bacterianas empleadas | 74 |
| Mantenimiento de las cepas | 74 |
| Medios de cultivo empleado en la producción de EPS | 76 |
| 2. Tratamiento del lactosuero con β-galactosidasa | 77 |
| 2.1.Descripción comercial de la Biolactasa ó β - galactosidasa | 77 |
| 2.2. Determinación del comportamiento y grados de hidrólisis de la β -galactosidasa en función de diversos parámetros. | 78 |
| Grado actividad de hidrólisis según T ^a . | 78 |
| Grado actividad de hidrólisis según pH. | 78 |
| Estabilidad durante su conservación | 78 |
| 2.3. Tratamiento del suero con β - galactosidasa. | 78 |
| 2.4. Producción de EPS en matraces con suero lácteo tratado inactivado, tratado sin inactivar y suero sin tratar | 79 |
| 3. Métodos de termización-pasteurización del medio de cultivo lactosuero. | 79 |
| 4. Procesos de extracción de los EPS y biomasa. | 80 |
| 4.1. Proceso de extracción de xantano producido por <i>Xanthomonas campestris</i> | 80 |
| 4.2. Proceso de extracción del curdlano producido por <i>Agrobacterium radiobacter</i> CECT 4067 | 84 |
| 4.3. Proceso de extracción del succinoglucano producido por <i>Agrobacterium radiobacter</i> CECT 4067 | 85 |
| 5. Optimización de la producción de los EPS de interés industrial a partir de lactosuero. | 86 |

| | |
|---|-----|
| 5.1. Estudio en matraces | 86 |
| 5.2. Proceso de producción y escalado en fermentador de 1.5 y de 20 litros del exopolisacárido de <i>Xanthomonas campestris</i> | 92 |
| 6. Caracterización y composición química de los EPS. | 103 |
| 6.1. Análisis colorimétricos. | 103 |
| 6.2. Determinación del contenido de cenizas | 110 |
| 6.3. Porcentaje de humedad del producto. | 111 |
| 6.4. Analisis elemental CHNS | 111 |
| 6.5. Determinación de los componentes de los EPS por HPLC | 112 |
| 7. Propiedades físicas de los EPS. | 113 |
| 7.1. Análisis de la viscosidad en las soluciones acuosas de EPS. | 113 |
| 7.2. Estudio reológico de las soluciones de EPS. | 117 |
| 8. Análisis en sistemas alimentarios de los EPS. | 118 |
| 8.1. Estudio del efecto de la disolución en distintos disolventes. | 118 |
| 8.2. Características físicoquímicas de las soluciones de xantano y sinergismo con otras gomas. | 118 |
| 8.3. Capacidad filmógena, micronización, extensibilidad, grado de hidratación de las soluciones de EPS. | 119 |
| 8.4. Pruebas de sinergismo de los EPS obtenidos con carragenatos en la formación de geles. | 119 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Lactosuero y β - Galactosidasa

| | |
|---|-----|
| 1. Problemática y usos actuales del lactosuero | 123 |
| 2. Estudio y tratamiento del lactosuero con β-galactosidasa | 124 |
| 2.1. Características y consideraciones de la β -galactosidasa | 125 |
| 2.2. Estudio de la actividad de la β - galactosidasa. Según T ^a , pH y concentración | 126 |
| 3. Estudio de los tratamientos de “esterilización –pasteurización” del medio lactosuero. | 132 |
| 3.1. Filtración | 133 |
| 3.2. Tindalización | 133 |
| 3.3. Pasteurización/termización | 133 |

II. Estudio a nivel de matraces

| | |
|---|-----|
| 1. Capacidad de desarrollo de cepas en cultivo sólido | 138 |
| 1.1. Efecto de la concentración de lactosuero tratado sobre el crecimiento de <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> en medio de cultivo sólido suplementado al 2% con agar. | 138 |
| 2. Capacidad de desarrollo de cepas en cultivo líquido | 144 |
| 2.1. Estudio de los tiempos de incubación. Curvas de crecimiento de <i>Xanthomonas campestris</i> | 144 |
| 2.2. Edad y porcentaje del inóculo | 145 |
| 2.3. Estudio de diferentes metodologías para precipitar la goma xantana. | 146 |
| 2.4. Temperatura de incubación y agitación de los cultivos | 150 |
| 2.5. Estudio en matraces del efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>Xanthomonas</i> en diferentes medios: YM y lactosuero tratado. | 151 |
| 2.6. Obtención del curdlano y succinoglicano. | 152 |
| 3. Crecimiento y producción de los microorganismos en condiciones de estrés hídrica. | 158 |
| 3.1. Efecto del potencial matricial y de soluto en el crecimiento de <i>Aureobasidium pullulans</i> . | 158 |
| 3.2. Efecto en la producción de xantano, curdlano y succinoglicano bajo condiciones de estrés hídrico. | 163 |

III. Escalado en la producción de goma xantana

| | |
|---|-----|
| 1. Producción en biofermentador de 1,5 litros. | 166 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| 1.1. Optimización de la producción de los exopolisacáridos | 166 |
| 1.2. Fenómenos de degradación del EPS | 171 |
| 1.3. Cambios dinámicos en concentración celular, producción xantano y carbohidrato consumido durante la fermentación del medio lactosuero tratado por <i>Xanthomonas campestris</i> | 173 |
| 1.4. Condiciones generales de producción en fermentador de 1,5 litros. | 176 |
| 2. Producción en biofermentador de 20 litros. | 177 |
| 2.1. Estudio fermentador 20 litros volumen medio | 177 |
| 2.2. Resultados producción en fermentador de 20 litros. | 178 |
| 3. Procesos postfermentación y método de recuperación del alcohol isopropílico. | 181 |
| 3.1. Recuperación del disolvente por destilación. | 181 |
| 3.2. Métodos alternativos de membranas | 184 |
| | |
| IV. Composición química de los EPS | |
| 1. Composición química de los exopolisacáridos. | 187 |
| | |
| V. Estudio de las propiedades reológicas y análisis en sistemas alimentarios de los exopolisacáridos obtenidos | |
| 1. Propiedades reológicas de los EPS. | 193 |
| 1.1. Comparación de las propiedades reológicas y otros parámetros entre los xantanos obtenidos a partir de diferentes medios con su homólogo comercial. | 193 |
| 1.2. Pseudoplasticidad y características físicas: color de los distintos EPS liofilizados obtenidos a partir de lactosuero | 194 |
| 1.3. Estabilidad frente a la temperatura | 197 |
| 1.4. Estudio del efecto de ciclos de congelación - descongelaciones sucesivas. | 198 |
| 1.5. Estudio de la conservación a 4°C en diferentes soluciones de xantano. | 198 |
| 1.6. Resistencia a la esterilización en autoclave de vapor. | 200 |
| 1.7. Estabilidad frente al pH | 200 |
| 1.8. Estudio de la presencia de sales en la solución de EPS. | 201 |
| 2. Estudios reológicos de los EPS en sistemas alimentarios. | 204 |
| 2.1. Estudios de viscosidad en sistemas alimentarios. | 204 |
| 2.2. Actividad emulgente | 206 |
| 2.3. Importancia del envase con el que se comercializan los EPS. Porcentaje de humedad del producto. | 208 |
| 2.4. Formación de geles. Estudio del sinergismo con carragenatos (tipo Kappa) en sistemas alimentarios. | 209 |
| 3. Aplicaciones de los EPS producidos a partir de lactosuero. Capacidad filmógena, micronización, extensibilidad, grado de hidratación. | 217 |
| | |
| CONCLUSIONES | 221 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 231 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. EPS microbianos de importancia comercial (adaptado de revisiones de Sutherland, 1990 y 1994). | 11 |
| Tabla 2. Fuente: Elaborada a partir de Bobbio y Bobbio (1995); Bobbio y Bobbio (1992); Wishstler y Daniel (1985); Considine y Considine (1983). | 24 |
| Tabla 3. Fuente: Yukihiro (1997). Usos del curdlano en la industria alimentaria. | 41 |
| Tabla 4. Tipos de lactosuero según características físicas y procedencia. | 47 |
| Tabla 5. Composición del lactosuero fluido. | 48 |
| Tabla 6. Cepas productoras de EPS de interés comercial. | 74 |
| Tabla 7. Composición y parámetros del lactosuero empleado. | 76 |
| Tabla 8. Medio "ideal" (García-Ochoa y col., 1992). | 77 |
| Tabla 9. Concentraciones de glicerol empleadas para ajustar el potencial de soluto del medio. | 91 |
| Tabla 10. Calibración del módulo ADI 1030. | 101 |
| Tabla 11. Principales preparados de β galactosidasas comerciales. | 126 |
| Tabla 12. Actividad de la biolactasa en lactosuero (5% de lactosa) según distintos parámetros. | 127 |
| Tabla 13. Parámetros fisico-químicos- microbiológicos del lactosuero y permeato. | 132 |
| Tabla 14. Diámetros coloniales de <i>X. campestris</i> NRRL-B 1459 tras 72 h a 30°C en distintos medios de cultivos. | 141 |
| Tabla 15. Diámetros coloniales de <i>Agrobacterium radiobacter</i> tras 72 h a 30°C en distintos medios de cultivo | 141 |
| Tabla 16. Índices de crecimiento de <i>Aureobasidium pullulans</i> en distintos medios de cultivo | 141 |
| Tabla 17. Crecimiento colonial de <i>Xanthomonas campestris</i> en medio sólido. | 141 |
| Tabla 18. Crecimiento colonial de <i>Agrobacterium radiobacter</i> en medio sólido. | 141 |
| Tabla 19. Índices de crecimiento (mm día ⁻¹) de <i>Aureobasidium pullulans</i> | 141 |
| Tabla 20. Efecto de la temperatura de incubación de <i>X.campestris</i> sobre la producción de EPS y la biomasa celular en matraz a 150 rpm tras 72 horas. | 150 |
| Tabla 21. Efecto de la temperatura de incubación de <i>X.campestris</i> sobre la producción de EPS y la biomasa celular en matraz a 100 rpm tras 72 horas. | 150 |
| Tabla 22. Media de los índices de crecimiento (mm día ⁻¹) con sus desviaciones estándar de <i>A.pullulans</i> en ME (malt extract), lactosuero tratado con galactosidasa y lactosuero sin tratar, bajo la influencia de distintos potenciales osmóticos y matriciales. | 158 |
| Tabla 23. Datos de producción de EPS y PSC de los diferentes medios de cultivo con lactosuero tratado a diferente valores de Aw. | 163 |
| Tabla 24. Efecto de la temperatura de incubación y agitación sobre la producción de EPS y la biomasa celular en fermentador 1,5 litros a 200,400 y 600 rpm al cabo de 72 horas. | 168 |
| Tabla 25. Efecto de las diferentes concentraciones de lactosuero sobre la producción, por <i>Xanthomonas campestris</i> , y su contenido en proteínas y cenizas, en la fracción de polisacárido precipitado con alcohol. | 169 |
| Tabla 26. Condiciones generales de producción del fermentador de 1,5 litros. | 176 |
| Tabla 27. Resultados de los análisis elementales del xantano obtenido de diferentes medios (lactosuero, YM) comparados con su homólogo comercial. | 187 |
| Tabla 28. Composición química del xantano comercial y del xantano procedente del lactosuero tratado. | 190 |
| Tabla 29. Composición química del succinoglicano comercial y del succinoglicano procedente del lactosuero tratado. | 190 |
| Tabla 30. Comparativa de los parámetros de los distintos EPS obtenidos a partir de medio lactosuero y medio YM con su homólogo Xantano comercial. | 194 |
| Tabla31. Estabilidad de los EPS en solución acuosa al 1% (p/v) frente a amplios valores de pH. | 201 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 32. Actividad emulgente. | 207 |
| Tabla 33. Los valores de humedad corresponden a muestras almacenadas durante 3 meses | 209 |
| a temperatura ambiente en placas petri selladas. | 209 |
| Tabla 34. Propiedades físico químicas de las mezclas de los EPS obtenidos a partir de medio lactosuero con carragenatos al 1.5% en diferentes matrices acuosas y lácteas. | 212 |
| Tabla 35. Evaluación de las propiedades de la película de 300 μm formada mediante el extensiómetro. | 218 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Clasificación de los polímeros de acuerdo con su estructura y tipo de monómeros que lo forman. | 13 |
| Figura 2. Estructura química de alguno de los componentes de los EPS microbianos | 14 |
| Figura 3. Diversidad de azúcares encontrados en los EPS. | 15 |
| Figura 4. Estructura del xantano | 30 |
| Figura 5. Residuo interno de α -manosil están siempre acetilado pero solo el 30% de β -manosil están piruvatados en el xantano | 30 |
| Figura 6. Ilustración de la estructura del xantano en tres maneras (a,b,c) | 29 |
| Figura 7. Biosíntesis del xantano (Leigh y Coplin, 1992; Ielpi y col., 1982). | 31 |
| Figura 8. Estructura química del curdlano. Fuente: Funami y col. (1999b) | 37 |
| Figura 9. Microscopía de luz polarizada de un gránulo de curdlano. | 37 |
| Figura 10. Ruta metabólica para la síntesis de curdlano. 1,hexoquinasa;2, fosfoglucomutasa ;3,UDP-glucosa pirofosforilasa;4,transferasa;5,polimerasa. Lipid-P representa lípido isoprenoide fosfatado. | 38 |
| Figura 11. Estructura del succinoglicano. | 42 |
| Figura 12. Blastoconidios de <i>Aureobasidium pullulans</i> . Microscopía de contraste de fases. | 44 |
| Figura 13. Representación esquemática de los procesos de aprovechamiento de sueros de queserías a escala industrial | 50 |
| Figura 14. Hidrólisis de la lactosa por la β -galactosidasa. | 54 |
| Figura 15. Mecanismo de acción de la β -galactosidasa | 56 |
| Figura 16. Clasificación de los fluidos. | 67 |
| Figura 17. <i>Agrobacterium radiobacter</i> | 75 |
| Figura 18. Aspecto de las colonias de <i>Aureobasidium pullulans</i> . | |
| Figura 19. Aspecto de las colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL-B 1459 tras 48 de la siembra en medio YM. | |
| Figura 20. Aspecto de colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> tras 48 horas en medio lactosuero al 5%. | 75 |
| Figura 21. Descripción de la producción de goma Xantana a partir de lactosuero tratado | 82 |
| Figura 22. <i>Xanthomonas campestris</i> en medio lactosuero. | 87 |
| Figura 23. Uso de PEG 8000 para modificar el Potencial matricial. | 91 |
| Figura 24. Fermentador (Electrolab) volumen 2 litros. | 94 |
| Figura 25. Fotografías biorreactor de 20 l Applikon Bio Bench 20 | 98 |
| Figura 26. Valoración de proteínas por el método de Lowry | 107 |
| Figura 27. Rotura de la unión entre el ONP y la galactosa mediante la enzima β -galactosidasa, el ONP liberado soluble en agua forma una coloración amarilla brillante. | 109 |
| Figura 28. Fotografía Balanza COBOS para determinar la humedad. el uso de la balanza para hallar el contenido de humedad es determinante para el control de calidad. | 111 |
| Figura 29. Curvas de hidrólisis con biolactasa – N (substrato lactosuero 5%lactosa, enzima 1g por 1000ml) | 128 |
| Figura 30. Efecto de la temperatura en la actividad de la biolactasa-N a un pH de 6,5 y a 1000ppm de concentración enzimática | 128 |
| Figura 31. Actividad relativa según pH. | 132 |
| Figura 32. Actividad residual según valores de pH | 132 |
| Figura 33. Estabilidad durante el tiempo de almacenamiento a diferente T ^a . | 130 |
| Figura 34. Esquema del proceso de glucosilación no enzimática o glicación. | 130 |
| Figura 35. Crecimiento <i>Xanthomonas campestris</i> en medio solido lactosuero. | 139 |
| Figura 36. Cepas L de <i>Xanthomonas campestris</i> | |
| Figura 37. Crecimiento de <i>Aureobasidium pullulans</i> en medio YM y lactosuero no tratado y lactosuero tratado tras 5 días a 30°C. | 140 |

| | |
|--|-----|
| Figura 38. Pigmentación del micelio de <i>Aureobasidium pullulans</i> tras 7 y 10 días a 30°C en PDA. | 140 |
| Figura 39. Crecimiento de las Colonias de <i>Agrobacterium radiobacter</i> en medio YM y lactosuero tratado (72h a 30°C). | 140 |
| Figura 40. Curvas de crecimiento de <i>Xanthomonas campestris</i> en diferentes medios de cultivo a una temperatura de 30 °C. | 144 |
| Figura 41. Diferentes metodologías empleadas en la precipitación del EPS según diluciones previas acuosas con la adición de diferentes volúmenes de alcohol isopropílico. | 152 |
| Figura 42. Diferentes metodologías empleadas en la precipitación del EPS según diluciones previas acuosas con la adición de diferentes volúmenes de IPA.en medio lactosuero. En todos los casos se adiciono un 4% de ClNa para favorecer la precipitación de los polisacáridos. | 149 |
| Figura 43. Producción de goma xantana en función del tiempo de incubación. | 151 |
| Figura 44. Estado del medio de cultivo tras la adición de 2 volúmenes de IPA, en la parte superior se obtiene el succinoglicano. | 153 |
| Figura 45. Transición de color en condiciones ácidas | |
| Figura 46. Transición de color en condiciones alcalinas | |
| Figura 47. Curvas de crecimiento de <i>A.radiobacter</i> en lactosuero tratado al 5%, y su producción de EPS (goma curdlan y succinoglicano) sin control de pH. | 155 |
| Figura 48. Curvas de crecimiento de <i>A.radiobacter</i> en lactosuero tratado al 5%, y su producción de EPS (goma curdlan y succinoglicano) con control de pH (6 ±0,3). | 156 |
| Figura 49. Curdlano liofilizado obtenido a partir de lactosuero tratado. | 157 |
| Figura 50. Tasas de crecimiento de <i>A. pullulans</i> a distintos valores de potencial de soluto. | 159 |
| Figura 51. Tasas de crecimiento de <i>A. pullulans</i> a distintos valores de potencial de soluto | 159 |
| Figura 52. Hifas de <i>A.pullulans</i> . | 160 |
| Figura 53. Seguimiento de la masa fúngica potencial de soluto de -0,7 MPa. | 161 |
| Figura 54. Seguimiento de la masa fúngica potencial de soluto de -2,8 MPa. | 161 |
| Figura 55. Seguimiento de la masa fúngica potencial matricial -0,7 MPa. | 162 |
| Figura 56. Seguimiento de la masa fúngica potencial matricial -1,4 MPa. | 162 |
| Figura 57. Producción de xantano (g/l) en un fermentador de 1,5 l de volumen según porcentaje de inóculo. | 166 |
| Figura 58. . Efecto de la concentración de lactosuero tratado en la producción de EPS al cabo de 72 horas. | 169 |
| Figura 59. Producción en condiciones de fermentación estandar sin control del pH en medio lactosuero al 5% por <i>Xanthomonas campestris</i> . | 170 |
| Figura 60. En la figura se representa el efecto de la concentración de lactosuero sobre la biomasa y la producción de xantano, la variabilidad de los resultados de producción es muy significativa según concentración del lactosuero existente en el medio. | 175 |
| Figura 61. Producción de EPS y biomasa en fermentador de 20 litros. | 180 |
| Figura 62. Comparativa del rendimiento en la producción de goma xantana en fermentador de 20 litros entre medio YM y lactosuero tratado con β-galactosidasa. | 180 |
| Figura 63. Curvas de equilibrio líquido-vapor a presión atmosférica (Perry y Green, 1997). | 183 |
| Figura 64. Diagrama de flujo de la destilación extractiva para la separación de agua e isopropanol (Sommer y Melin, 2004). | 183 |
| Figura 65. Diagrama del mecanismo de pervoración a través de una membrana. | 185 |
| Figura 66. Pseudoplasticidad de los diferentes xantanos evaluados. | 195 |
| Figura 67. Fotografía xantano a partir de medio lactosuero tratado. | |
| Figura 68. Fotografía xantano a partir de medio YM . | 196 |
| Figura 69. Aspecto del curdlano liofilizado. | 196 |

| | |
|--|-----|
| Figura 70. Estabilidad reologica de los diferentes xantanos evaluados frente a la temperatura. | 197 |
| Figura 71. Conservación de las soluciones de xantano a 4°C. | 199 |
| Figura 72. Principios estructurales para polímeros en solución acuosa, los cuales llevan a la expansión del ovillo y por lo tanto a un incremento en viscosidad. | 202 |
| Figura 73. Relación entre el pH y la viscosidad de la goma xantana procedente de lactosuero. □ goma xantana al 1% en solución acuosa en ausencia de CaCl ₂ ■ goma xantana al 1% en solución acuosa con CaCl ₂ a una concentración de 1mg/ml. | 203 |
| Figura 74. Relación entre el pH y la viscosidad de la goma xantana comercial. □ goma xantana al 1% en solución acuosa en ausencia de CaCl ₂ ■ goma xantana al 1% en solución acuosa con CaCl ₂ a una concentración de 1mg/ml. | 203 |
| Figura 75. Viscosidad del xantano en diferentes sistemas alimentarios. | 205 |
| Figura 76. Viscosidad de las dispersiones del EPS de xantano lactosuero y su homólogo comercial al 1% (p/V) en agua destilada, leche desnatada y leche entera. (Medidas de viscosidad realizadas en un Brookfield LVTDV-II usando un husillo SC4-18 y el adaptador para pequeñas muestras 13R; a una velocidad de cizalla de 39.6 s ⁻¹ y temperatura de 25°C). | 205 |
| Figura 77. Sinergismo de los carragenatos (tipo Kappa) con la goma xantana en agua y en leche entera. | 211 |
| Figura 78. Fotografías de los geles; K carragenato 0,5% + xantana lactosuero 1.5% en agua, K carragenato 0,5% + xantana lactosuero 1.5% en leche entera, K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en agua, K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en leche entera. | 212 |
| Figura 79. Firmeza de gel de las diferentes combinaciones entre K- carragenato, goma xantana y curdlano. | 214 |
| Figura 80. A, b) Fotografía Formación de una película de 300 μm mediante un extensiómetro de goma xantana al 2% obtenida a partir de lactosuero tratado. Observándose una buena capacidad filmógena. | 219 |
| Figura 81. Fotografía: Deficiente película formada a partir de curdlano al 2% | 219 |

INTRODUCCIÓN

1. Biopolímeros Microbianos

1.1. Definición.

Los biopolímeros se definen como compuestos constituidos por monómeros biológicos, tradicionalmente han sido extraídos de plantas y animales, sin embargo, en las últimas décadas ha cobrado una gran importancia la producción de biopolímeros microbianos por su alto valor comercial.

Los biopolímeros microbianos se producen a partir de una fermentación microbiana. Existen tres principales grupos de biopolímeros atendiendo a su interés industrial: polisacáridos, proteínas y PHA'S.

El primer polisacárido descubierto fue el dextrano en 1940, siendo el primero en comercializarse, el segundo fue la goma xantana, obtenido en el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) del departamento de agricultura de USA, cuando se buscaban alternativas a las gomas de origen vegetal (Jeanes, 1974).

Actualmente existen multitud de polisacáridos microbianos, algunos se muestran en la tabla 1, con un gran valor comercial, empleados en múltiples aplicaciones.

Tabla 1. EPS microbianos de importancia comercial (adaptado de revisiones de Sutherland, 1990 y 1994).

| POLISACÁRIDO | MICROORGANISMO PRODUCTOR |
|---------------------|-------------------------------------|
| Acetano | <i>Acetobacter xylinum</i> |
| Curdano | <i>Agrobacterium radiobacter</i> |
| Escleroglucano | <i>Slerotium rolfzii</i> |
| | <i>Schizophyllum commune</i> |
| Dextrano | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| | <i>Streptobacterium dextranicum</i> |
| | <i>Streptococcus mutans</i> |
| Elsinano | <i>Elsinoe leucospila</i> |
| Pululano | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| | <i>Tremella mesenterica</i> |
| | <i>Cyttaria harioti</i> |
| Alginatos | <i>Azotobacter vinelandii</i> |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Emulsanos | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| Gelanos | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> |
| Desulfatoheparina | <i>Escherichia coli K5</i> |
| Acido hialurónico | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | <i>Streptococcus grupos A y C</i> |
| Xantano | <i>Xanthomonas campestris</i> |
| Succinoglucano | <i>Agrobacterium spp.</i> |
| | <i>Rhizobium spp.</i> |
| Polisacáridos de: | <i>Rhizobium</i> |
| | <i>Zooglea ramigera</i> |
| | <i>Pseudomonas marginalis</i> |

1.2. Clasificación de los EPS microbianos.

Los exopolisacáridos microbianos son biopolímeros constituidos principalmente por unidades glucídicas, producidos por microorganismos (bacterias, levaduras, hongos y arqueobacterias) localizados en el exterior de la célula microbiana, en las cubiertas microbianas más externas glicocálix y a veces se encuentran desligados de la célula. La presencia de exopolisacáridos asociados a células microbianas, se pone de manifiesto por la mucosidad de las colonias y la viscosidad en medios líquidos.

La clasificación de los polisacáridos se puede realizar en función de diversos criterios:

- Grados de asociación a la membrana: polisacáridos capsulares, libres.
- Estructura y composición: homopolisacáridos, heteropolisacáridos.
- Microorganismo productor: Bacterias, hongos, levaduras, arqueas.
- Mecanismo de síntesis: extracelular, intracelular.

Grados de asociación a la membrana.

Esta clasificación, no define en la mayoría de los casos los distintos tipos de polímeros. Los polímeros capsulares, se disponen como una capa cohesiva adherida firmemente mediante enlaces covalentes, constituyendo la entidad morfológica denominada cápsula. En otros casos, se encuentran ligeramente unidos o desligados completamente de la célula formando una capa mucilaginosa libre. La distinción entre ambos tipos es difícil, frecuentemente la organización polimérica de la superficie celular sufre cambios drásticos por multitud de causas (factores ambientales, manipulación). Por otro lado manipulaciones y procesos como la centrifugación que se ha empleado para diferenciar ambos tipos de polisacáridos conducen a la liberación del material capsular a la periferia.

Estructura y composición.

Los polisacáridos extracelulares se pueden dividir en homopolisacáridos y heteropolisacáridos, adoptando estructuras ramificadas o lineales), diferenciándose entre sí por el tipo de uniones dadas entre las unidades glucídicas (enlace O-glucosídico y N-glucosídico). Los homopolisacáridos están formados por un único tipo de unidades glucídicas, la mayoría son neutros, aunque en un pequeño número

debido a la presencia de grupos acilo les confiere un carácter polianiónico. Según el tipo de enlace con el que se unen sus monosacáridos se distinguen como se ilustra en la figura 1, en:

- Lineales, constituidos por moléculas neutras, unida mediante un solo tipo de enlace como el curdlano o la celulosa.
- Ramificados con dos tipos de enlace como el pululano.
- Ramificado con tres tipos de enlace como el dextrano.

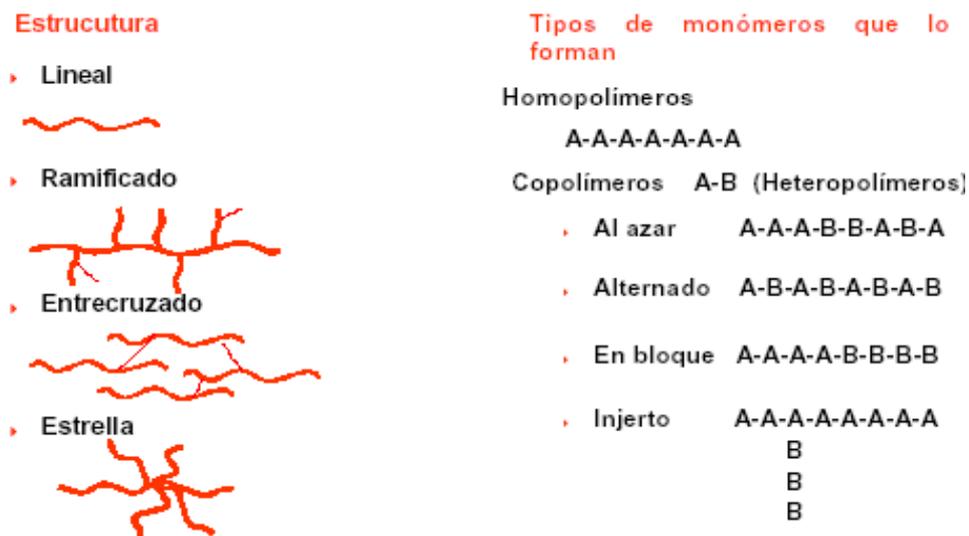
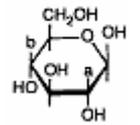
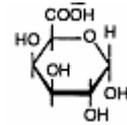


Figura 1. Clasificación de los biopolímeros de acuerdo con su estructura y tipo de monómeros que lo forman.

Los heteropolisacáridos, que representan la mayoría, están compuestos por varios tipos de unidades glucídicas. Generalmente presentan ácidos urónicos, como D-glucurónico, sus esqueletos pueden estar ramificados (Sutherland, 1990; Lindberg, 1990) y son mayormente polianiónicos. Esta diversidad de composición origina una gran variedad estructural y de propiedades físicas, debido en gran parte a los distintos tipos de enlaces (α o β) y también por la naturaleza y conformación de los distintos azúcares (formas piranósicas y furanósicas), como se muestra en la figura 2.

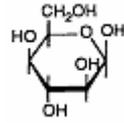


β-D-Glucosa



α-D-ácido galacturónico

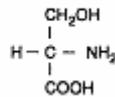
a= posición del hidroxilo en C-2 en D-manosa
b= posición del hidroxilo en C-4 en D-galactosa.



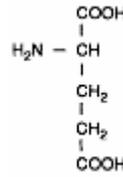
L-glucosa



Ácido pirúvico



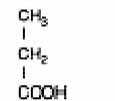
Serina



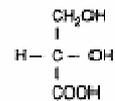
L- ácido glutámico



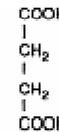
Ácido acético



ácido propiónico



ácido glicérico



Ácido succínico

Figura 2. Estructura química de alguno de los componentes de los EPS microbianos.

Microorganismo productor de EPS: Bacterias, hongos, levaduras, arqueas.

Los microorganismos productores de exopolisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo especies de vida libre saprobios como patógenos de animales y vegetales (Kang y Cottrell, 1979).

1.3. Composición química de los exopolisacáridos

Generalmente, los exopolisacáridos están compuestos en su mayoría por carbohidratos, pudiendo presentar sustituyentes orgánicos e inorgánicos además de azúcares (Sutherland, 1998).

Carbohidratos

En los polisacáridos microbianos encontramos una gran diversidad de carbohidratos, siendo los azúcares D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en su forma piranósica los monosacáridos que más se repiten en estos polímeros. Las 6-desoxihexosas, L-fucosa y L-ramnosa están presentes frecuentemente, ver figura 3.

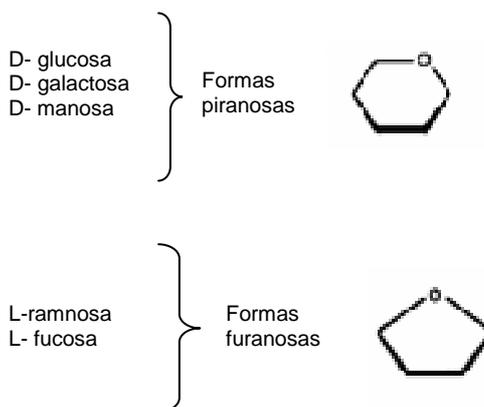


Figura 3. Diversidad de azúcares encontrados en los EPS.

Algunos polisacáridos pueden contener uno o más azúcares raros, tales como L-hexosas o formas furanósicas de las hexosas, glucosa y galactosa (Lemoine y col., 1997).

La naturaleza polianiónica de la mayoría de estos polisacáridos es debida a la presencia de ácidos urónicos, siendo más común el ácido glucurónico. La presencia de ácidos urónicos les confiere la capacidad de unir cationes bivalentes (Sutherland, 1988), pudiendo ser empleados en procesos de detoxificación y tratamiento de aguas residuales.

Sustituyentes orgánicos

El acetato es el componente orgánico más común unido por enlace éster, aunque no contribuye a la carga total de la molécula polisacáridica.

El piruvato está presente en proporciones estequiométricas con los componentes azucarados del exopolisacárido y unido a una hexosa neutra, aunque en ocasiones se encuentra unido a ácidos urónicos, contribuyendo a la carga aniónica de la molécula.

Grupos succinil y acetilo se han encontrado en el exopolisacárido de ciertas especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Amemura y Harada, 1983).

En lo que se refiere al contenido en grupos acilo en algunos polisacáridos, éste puede ser relativamente alto, encontrándose en proporciones estequiométricas relativas a los monosacáridos presentes, aunque en algunas ocasiones los polisacáridos contienen sustituyentes acilo en unidades repetidas alternativamente. En algunos casos, la acetilación puede ocurrir al azar, como por ejemplo en los alginatos bacterianos carentes de una estructura regular, en el que el contenido en estos grupos puede superar el 15-20 % estando acetilados los grupos de ácido manurónico.

El grado de acetilación de los EPS influye en la interacción de los exopolisacáridos con metales, afectando a la capacidad de unión de los polisacáridos con otros biopolímeros o cationes. En el caso de los alginatos, la desacetilación favorece la unión con metales a la vez que puede determinar la selectividad de unión con determinados cationes divalentes o monovalentes (Geddie y Sutherland, 1993; 1994).

Sustituyentes inorgánicos

Los aniones sulfato (SO_4^{2-}) y fosfato (PO_4^{3-}) son sustituyentes inorgánicos junto con los cationes, formando parte de los polímeros polianiónicos. Algunos alginatos llevan fuertemente unido los cationes bivalentes Ca^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+} , estos iones se adhieren al polisacárido durante su producción, aunque pueden ser desplazados por procesos como intercambio iónico, electrodiálisis... permitiendo la conversión de ácido a sal (Sutherland, 1990).

1.4. Funciones de los exopolisacáridos

Protección frente a la deshidratación

Los EPS son estructuras muy hidratadas cuya función entre otras es conferir protección a la célula, es un reservorio de agua facilitando la dispersión de los nutrientes (Roberson y col., 1993).

Adhesión a superficies.

Los EPS permiten a las células adherirse a diferentes superficies, a partir de uniones tanto electroestáticas como hidrofóbicas (Geesey, 1982). Forman los llamados biopelículas, las células crecen y se dividen formando microcolonias (Costerton y col., 1981), con la posibilidad de colonizar diferentes ambientes. En ambientes acuáticos, prácticamente todas las superficies sumergidas desarrollan un recubrimiento limoso, formado mayoritariamente por bacterias.

Los EPS fijan las células a superficies y permiten a los microorganismos mantener una existencia fija en su hábitat posibilitando su supervivencia (Geesey, 1982).

Las biopelículas constituyen comunidades complejas y polímeros extracelulares que se localizan fijas a una superficie, que pueden presentar una especie o un conjunto de especies diferentes (Costerton, 1995; Davey y O'Tool, 2000; Kraigsley y col., 2002). Podemos encontrar biopelículas en todos los medios donde existan bacterias, medio natural, clínico e industrial; la clase de material de superficie parece que tiene poca importancia en el crecimiento de la biopelícula, solo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes.

Infeción y simbiosis

Multitud de bacterias patógenas, tanto de animales como de plantas, son capaces de producir EPS. La cápsula polisacáridica es considerada como un factor de virulencia. Por ejemplo, el marchitamiento de crucíferas, es provocado por el exopolisacárido producido por *Xanthomonas campestris*, originando un fluido muy viscoso impidiendo la circulación del agua (Sutherland, 1988).

Mecanismos de defensa.

Actúan como mecanismos de defensa frente a virus, anticuerpos y agentes antimicrobianos (Costerton y col., 1987).

1.5. Aplicaciones de los polisacáridos microbianos

Su aplicación es diversa y empleada en multitud de campos, debido a que la mayor parte de los exopolisacáridos son solubles o pueden ser dispersados en agua actuando como espesantes (Glicksman, 1982). Además, ejercen un efecto homogenizador - estabilizador, controlan la cristalización, reducen la sinéresis, encapsulan y son formadores de biopelículas (Dziezak, 1990).

Son capaces de interactuar tanto con materiales de origen biológico como sintético, muestran a su vez sinergismo con otros polisacáridos, tales sinergismos son el resultado de múltiples propiedades, biocompatibilidad, hidrofobicidad, biodegradabilidad e inocuidad.

Las aplicaciones de los EPS de origen microbiano las podemos agrupar en cuatro categorías: alimentación, industria, farmacéutica y ambiental.

Aplicaciones en productos alimentarios

Los polisacáridos presentan gran cantidad de propiedades útiles para diversas aplicaciones en el sector alimentario; se emplean como agentes estabilizantes, texturizantes y gelificantes (Sanderson y Clark, 1983). Aunque existen pocos EPS aprobados para el uso en alimentación, se encuentran en la elaboración de gelatinas, golosinas y postres de leche, salsas, almíbares y rellenos de tarta (Nampoothiri y col., 2003; Sutherland, 2001).

Estos compuestos se añaden para el control de la textura del alimento y en la prevención de la formación de cristales de hielo en productos congelados, influyendo en la presentación del producto final comestible, algunos se emplean como saborizantes, existiendo una relación específica entre el polisacárido presente y el sabor de un alimento.

El xantano fue el primer biopolímero en ser aprobado en 1969 (Sutherland, 1990). Más del 60 % de la producción de xantano es de grado alimentario, se emplea en infinidad de productos, tales como en panadería, confitería, salsas, comidas enlatadas etc.

El segundo polisacárido microbiano aprobado por la (FDA) como aditivo alimentario, fue la goma gelano (Dziezak, 1990), producido a partir de la fermentación en un medio rico en glucosa por *Pseudomonas* ATCC 31461. Este polisacárido se emplea como agente texturizante - estabilizante en congelados, glaseados y helados, además de utilizarse en jamón, mermeladas y actuar como sustituto del almidón en el relleno con frutas en pastelería.

Otro biopolímero microbiano de interés comercial es el curdlano, aunque con una aplicabilidad en alimentación muy limitada. Pese a haberse descubierto hace largo tiempo en 1964, tan sólo se ha utilizado en Japón, donde es considerado como un agente gelificante natural (Morris, 1990). En dicho país, se emplea en embutidos, tallarines, confituras... proporcionando estabilidad al producto a bajas concentraciones.

Actualmente, destaca la producción de celulosa de origen microbiano producida por *Acetobacter xylinum* (Roller y Dea, 1992), empleándose en la fabricación de recubrimientos comestibles, como espesante, interaccionando sinérgicamente con goma xantana y carboximetilcelulosa.

Otra de las aplicaciones de los polisacáridos microbianos es la producción de compuestos saborizantes. El furaneol es un agente saborizante producido a partir de desoxiazúcares extraídos de exopolisacáridos microbianos, ampliamente utilizado en comidas y bebidas (Roller y Dea, 1992). Los desoxiazúcares son producidos por bacterias como *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. y *Rhizopus* sp. (Graber y col., 1988).

Aplicaciones industriales

Los polisacáridos microbianos compiten con otros de origen sintético en aplicaciones industriales, con una multitud de aplicaciones industriales (Sutherland, 1990).

En la extracción del petróleo, los EPS microbianos se emplean en el llenado y en el proceso de recuperación del petróleo actuando como viscosificantes. Se requiere el empleo de un fluido con comportamiento pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Durante la operación de perforación, las soluciones deben ser lo suficientemente fluidas para facilitar el bombeo de la mezcla, y cuando la operación se detiene, la viscosidad debe aumentar para que los sólidos se mantengan en suspensión y poder ser estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Tanto la goma xantana como el succinoglucano, se emplean como aditivos en muchas etapas del proceso de perforación, producción, transporte y procesamiento de crudo (Sutherland, 1990).

Otro polisacárido empleado en la industria del petróleo es el emulsano, producido por *Acinetobacter calcoaceticus*, que disminuye la viscosidad del crudo, facilitando el transporte y bombeo (Sutherland, 1990).

Por otro lado, el pululano se emplea en la fabricación de recubrimientos comestibles cuya función es aumentar la vida útil del producto, además de combinarse con polietilenglicol para facilitar y reducir los costes de extracciones enzimáticas. Por otro lado, los alginatos bacterianos se emplean en la industria textil (Sutherland, 1990).

Aplicaciones farmacéuticas y medico- veterinarias

El dextrano, producido por primera vez en 1910 por Bijerinck, es uno de los polisacáridos que desde hace largo tiempo posee una aplicación médica. En la actualidad se produce comercialmente por *Leuconostoc mesenteroides* a partir de la fermentación en un medio basado en sacarosa (Kim y col., 2003).

Otras aplicaciones médicas se basan en la explotación de sus propiedades biológicas, actuando como agentes antivirales y antitumorales. Son de destacar, las líneas de investigación que emplean curdlano modificado (curdlano químicamente sulfatado modificado con un derivado de palmitol) para recubrir vesículas y preparar liposomas recubiertos con derivados de curdlano, con el objetivo de estabilizar los liposomas contra los fluidos gástricos para un potencial uso oral (Moon y Lee, 2005).

Además se emplean en nuevas técnicas para la administración del fármaco de manera local mediante la adición de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION), estas nanopartículas se recubren con carboximetilciclano, para conseguir una buena estabilidad en solución acuosa y reducir los efectos citotóxicos (Moon y col., 2009).

Aplicaciones en biorremediación medioambiental

La mayoría de los biopolímeros muestran una capacidad de biorremediación con uniones y retención de metales pesados. Numerosos estudios demuestran que disoluciones de biopolímeros pueden extraer metales pesados por quelación, reducción, precipitación, intercambio iónico. La capacidad de extracción de metales pesados de *Zooglea ramigera* ha sido ampliamente estudiada. Ésta, es una bacteria productora de exopolisacárido y se encuentra en el tratamiento de aguas residuales. (Bramucci y Nagarajan, 2000; Lin y Lee, 2001).

1.6. Producción de EPS bajo condiciones de estrés hídrico

Los lípidos portadores de isoprenoides además de ácido teicoico, lipolisacáridos y peptidoglicanos están implicados en la biosíntesis de la pared celular (Sutherland, 1982). Se sospecha que la competición por estos lípidos, en condiciones de cultivo en la que se disminuyen las tasas de crecimiento modificando la actividad de agua, y el microorganismo se encuentre en una situación de estrés hídrico, puede originar un incremento en la producción de EPS.

Actividad de agua

La actividad de agua, se define como el cociente entre la presión de vapor del agua en un sustrato (P) y la presión de vapor del agua pura (P₀) a la misma temperatura y presión.

$$a_w = P/P_0$$

El valor de la actividad de a_w del agua pura es 1, por lo que el valor (a_w) en cualquier sustrato será menor que la unidad.

Toda el agua presente en una matriz no está igualmente disponible para los” microbios.” Una medida de disponibilidad es el potencial de agua. Potencial de agua es la energía potencial por unidad de masa de agua del agua. El potencial de agua

(ψ_w) equivale a la suma del potencial de presión (ψ_p), potencial de soluto (ψ_s) y el potencial matricial (ψ_m):

$$\psi_w = \psi_p + \psi_s + \psi_m$$

El agua es retenida por fuerzas de adhesión, está sujeta a la atracción gravitacional y contiene solutos que disminuyen su energía comparada con la energía de agua pura, debido a que se requiere energía para extraer el agua, el potencial de agua, normalmente, es una cifra negativa. El potencial del agua es una medida de energía por unidad masa de agua que es requerida para extraer una cantidad infinitesimal de agua y referirla a agua pura. Para energía potencial por unidad masa, la unidad del potencial de agua es J/kg. Energía por unidad de volumen es J/m³, o N/m² o Pa. Se prefiere J/kg, pero es frecuente observar potencial de agua como kPa o MPa. Un J/kg es numéricamente igual a un kPa.

Muchos factores tienen influencia en el potencial de agua, el más importante, en un contexto biológico, es el potencial matricial. Fuertemente dependiente de las propiedades de la matriz y la cantidad de agua en la matriz.

La actividad de agua a_w se relaciona directamente con el potencial de agua (ψ_w) mediante la fórmula:

$$\psi_w = RT / V_w \ln a_w$$

Donde R es la constante de los gases ideales ($R = 0,08205 \text{ atm.l/}^\circ\text{K.mol}$), T la temperatura absoluta y V_w es el volumen de un mol de agua.

Es necesario conocer todos estos conceptos para relacionar y entender el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones de estrés hídrico. La ventaja de emplear el potencial de agua radica en que se puede dividir en sus componentes matricial y osmótico, estudiando su influencia en el crecimiento y en la fisiología de los microorganismos.

2. Gomas

2.1. Introducción

El xantano es un biopolímero de origen microbiano. En el término biopolímero se incluyen un gran número de moléculas de elevado peso molecular, tales como ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, producidos por una amplia variedad de sistemas biológicos (Higgins y col., 1985). Desde un punto de vista industrial han tenido importancia los biopolímeros denominados “gomas”. En términos prácticos o funcionales, las gomas son compuestos de elevado peso molecular, con propiedades coloidales que, en un disolvente adecuado o agente suspensor, producen geles o suspensiones de elevada viscosidad. En la industria, técnicamente, se emplea el término “goma” referido a polisacáridos obtenidos de plantas o animales, así como a sus derivados, que son dispersables en agua fría o caliente para producir geles o disoluciones viscosas. Consecuentemente, las gomas pueden ser entendidas como polisacáridos de cadena larga, que pueden ser poco, mucho, o nada ramificados, pero que deben interactuar con el agua.

La importancia industrial de las gomas, como se refleja en la tabla 2, se fundamenta en dos características importantes:

- La capacidad para alterar las propiedades de flujo de agua.
- La posibilidad de formar geles capaces de actuar como emulsionantes, adhesivos, floculantes, formadores de película, lubricantes, reductores de fricción.

Tabla 2. Tipos de gomas. Fuente: Elaborada a partir de Bobbio y Bobbio (1995); Bobbio y Bobbio (1992); Wishstler y Daniel (1985); Considine y Considine (1983).

| Nombre | Principales constituyentes | Fuente | Usos | Propiedades características |
|--|---|--|---|--|
| Goma guar | Cadena principal de unidades de D-galactopiranosas, en proporción 2:1, unidos por enlaces glicosídicos | Semillas de <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> | Espesante y estabilizante para helados, salsas y lácteos | Se dispersa en agua fría o caliente para formar un sol. No gelifica. Posee alta viscosidad en bajas concentraciones |
| Goma locuste | Cadena principal de unidades D-manopiranosas ligadas a residuos de D-galactopiranosas | Obtenido de la <i>Ceratonja siliqua</i> de la familia Leguminosae | Estabilizante de emulsiones, espesante de helados y lácteos. Encapsulante | Se dispersa en agua fría o agua caliente formando un sol. Sinergismo con carragenanas. No gelifica |
| Goma arábica | D-galactopiranosas, L-ramnosas, L-arabinofuranosas y ácido D-glucourónico. | Exudado de la <i>Acacia Senegal</i> (L.) Willd, y otras especies de la familia Leguminosae | Estabilizante de emulsiones y encapsulante | Bastante soluble en agua. Debido a su bajo peso molecular (cerca de 250000) y estructura ramificada, forma soluciones poco viscosas |
| Goma tragacanto: - tragantina - basorín | Fracción soluble en agua: residuos de ácido D-galactourónico y D-xilopiranosas. Fracción soluble en agua: L-arabinopiranosas, D-xilopiranosas y ácido D-galactourónico. | Exudado de <i>Astragalus gummifer</i> Labillardier, o de especies asiáticas de <i>Astragalus</i> de la familia Leguminosae | Estabilizante de emulsiones y espesante | En agua forma soluciones altamente viscosas aún a bajas concentraciones. Resiste la acción de ácidos y es una de las pocas gomas exudadas de color casi blanco |
| Agar | Azarosa: D-galactopiranosas 3,6-anhidro-L-galactopiranosas. Agaropectina: D-galactopiranosas, 3,6-anhidro-L-galactopiranosas, ácido D-glucourónico, ácido pirúvico, sulfato. | Algas marinas del género <i>Gelidium</i> | Gelificante para dulces, masas y carnes | Insoluble en agua fría, soluble en agua en ebullición. Forma geles bastante firmes a temperatura ambiente. Sus geles son termoreversibles. Retrógada |
| Carragenina | D-galactopiranosas y 3,6-anhidro-D-galactosas, esterificados con H ₂ SO ₄ | Algas rojas de la familia <i>Rhodophyceae</i> <i>Chondrus crispus</i> y <i>Gigartina mamillosa</i> | Gelificante para lácteos. Espesante y estabilizante en salsas y sopas | Soluble en agua cerca de 80°C. Gelifica con K ⁺ , formando geles termoreversibles |
| Alginato | Cadenas de ácido D-manourónico y ácido L-gulurónico | Algas marrón como <i>Laminaria digitata</i> y <i>Macrocystis pyrifera</i> | Gelificante en lácteos, estabilizante y espesante | Insoluble en agua fría. Soluble en soluciones alcalinas. Forma geles con Ca ⁺² y Al ⁺¹ |

Según la fuente de obtención, las gomas se pueden clasificar en gomas naturales modificadas o semisintéticas y sintéticas. Las gomas naturales son las obtenidas a partir de plantas (semillas, algas, cereales, tubérculos), microorganismos (bacterias, hongos) o animales (leche, huesos). Las gomas semisintéticas se pueden obtener también de plantas y microorganismos, pero la molécula obtenida es modificada químicamente y, por último, las gomas obtenidas por síntesis química o gomas sintéticas.

Entre los biopolímeros que están teniendo mayor potencial de comercialización, se encuentran los polisacáridos de origen microbiano. Desde finales de los 50, se han publicado numerosos trabajos sobre la producción de polisacáridos de origen microbiano, la mayor parte no explotados comercialmente. Las investigaciones que han proporcionado mejores resultados fueron las realizadas por los laboratorios Northern Regional Research Laboratory (NRRL) del departamento de agricultura de USA que a finales de los 50 comenzaron una investigación exhaustiva sobre las aplicaciones industriales de biopolímeros microbiológicos. El dextrano, sintetizado por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, fue el primer polisacárido microbiano producido y utilizado en la obtención de sustituyentes del plasma sanguíneo. A éste le siguió el xantano, que luego cobró mucha mayor importancia, como anteriormente ya se ha mencionado.

2.2. Xantano

Microorganismo productor: *Xanthomonas campestris*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, se aislaron inicialmente de hojas de plantas infectadas por la podredumbre negra. Pammel (1895), aisló las cepas originales de plantas del género *Brassica* afectadas por la podredumbre negra, identificándolas como agente causante de la patogenicidad (William y Mahadevan, 1980).

Son bacilos rectos gram negativos, normalmente de 0,4-0,7 μm de ancho y 0,7-1,8 μm de longitud móviles por un flagelo polar y aerobios obligados. Su metabolismo es de tipo quimiorganótrofo, capaces de utilizar gran variedad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos. Puede degradar la lignina, incluso determinadas cepas pueden emplear compuestos aromáticos como el protocatecato, fenilalanina, sinefrina, pirogalol y ácido quínico (William y Mahadevan, 1980; Lee y col., 1992). En medios sólidos con carbohidratos, forman colonias amarillentas, lisas, redondas y viscosas. La coloración se debe a la producción de xantomonadinas,

pigmentos no difusibles característicos de una composición química especial, derivados bromados de aril octanos. Su crecimiento es rápido, obteniéndose colonias visibles en 24-48 horas a 25° C. No posee prosteca, ni cubierta pero produce una elevada cantidad de EPS xantano. Este polisacárido fue producido en planta piloto en 1960 por la compañía Kelco con el nombre registrado de “Kelzan” y en 1963 se comercializó (Kelco, 1972).

Características de *Xanthomonas campestris*:

- Oxidasa negativa (depende de la cepa).
- Catalasa positiva.
- H₂S a partir de peptona.
- Tolerancia máxima al cloruro sódico 2 - 5%.
- Un flagelo polar.
- Crecimiento mucoso en nutrientes.
- Esculina positiva.
- Temperatura máxima de crecimiento 35 - 39 °C.
- Existen multitud de cepas ATC 13951, 6465S, NRRL-B 1459 (interés industrial).
- Estreptomina resistente.
- Son bacterias no desnitrificantes y no reducen los nitratos.

(Bradbury, 1984 y Bergey's Manual of determinative Bacteriology 9th, 1994).

En cuanto al metabolismo de carbohidratos, oxidan la glucosa, siendo la ruta de EntnerDoudoroff la predominante en el catabolismo de la glucosa, desviando tan sólo de un 8 a un 16% de la glucosa a la ruta de las pentosas fosfato. El ciclo de la hexosa no se emplea de forma significativa. Tanto el ciclo del ácido tricarbónico como el ciclo del glioxilato están presentes en todo el género *Xanthomonas* (Bradbury, 1984).

La especie más ampliamente utilizada para la producción de xantano es *Xanthomonas campestris*. Aunque esta bacteria no es difícil de cultivar en medios estándar de laboratorio, se han observado variaciones en las cepas, tanto en cultivo en continuo (Silman y Rogovin, 1970), como en discontinuo (Cadmus y col., 1976), que afectan a la calidad y al rendimiento del xantano producido.

Se han descrito tres tipos diferentes de cepas de esta bacteria (Slodki y Cadmus, 1978; Cadmus et al., 1976 y 1978; Jeanes, 1974).

- Cepa L (Large): presenta colonias mucoides amarillas brillantes, de 4 a 5mm de diámetro. Proporciona buen rendimiento en xantano y con un nivel alto de piruvato (también influye el medio de producción empleado).
- Cepa Sm (Small): colonias mucoides de color amarillo más oscuro que la cepa L y de unos 2 mm de diámetro. Proporciona menor rendimiento en xantano que la cepa L y con menor contenido en piruvato.
- Cepa Vs (Very Small): produce colonias no mucoides, de color indefinido y de un diámetro máximo de 1mm. No produce xantano apreciablemente y no es muy frecuente.

Parece que las cepas Sm y Vs se producen por degeneración de la cepa L; normalmente debido a un envejecimiento del cultivo, que puede ser acelerado por una conservación deficiente. Por lo tanto, es necesario mantener la bacteria como cepa L, para obtener un xantano con buenas propiedades y con un buen rendimiento.

EPS: Goma xantana propiedades y características.

a) Estructura del xantano

Su estructura primaria es una unidad repetitiva de pentasacárido, formando una cadena principal del tipo de la celulosa (glucosa con enlaces glucosídicos β 1-4). En la posición C_3 de restos de D-glucosilos alternos se unen cadenas trisacáridas laterales de D-manosa y ácido D-glucurónico. La mitad de los grupos D-manosilos se unen directamente a la cadena principal, mediante uniones α - (1-3) el resto se encuentran como grupos terminales no reductores. El término xantano, puede aplicarse a los polímeros compuestos de ciertas estructuras con unidades repetitivas pentasacarídicas, semejantes a la celobiosa, figura 4, la cual presenta una cadena lateral trisacarídica. Como se muestra en la figura 5, según la cepa, condiciones de cultivo y medios empleados, pueden presentar grupos O-acetilos en la posición C_6 del residuo α -D-manosilo interno y grupos cetopiruvatos en el residuo β -D manosilo terminal de la cadena lateral. El manosilo interno está

completamente acetilado, solo un 30% de los terminales contienen piruvatos (Sutherland ,2001).

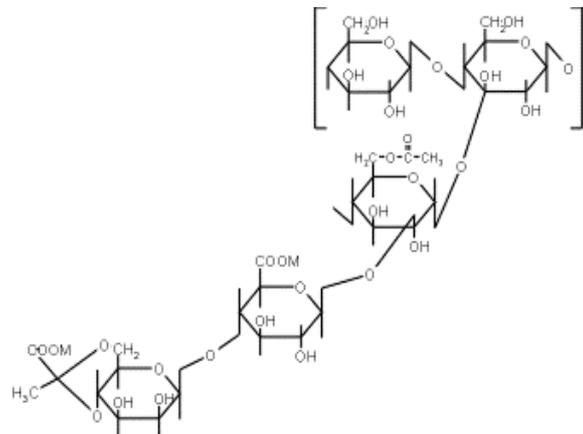


Figura 4. Estructura del xantano. Donde se puede observar la cadena lateral trisacarídica.

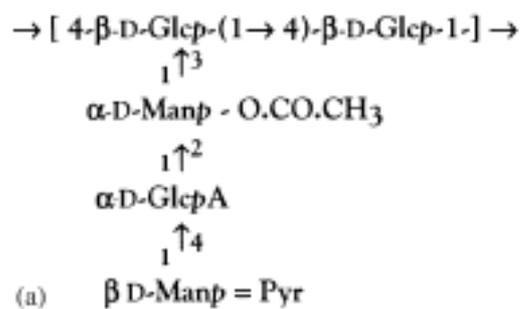


Figura 5. Residuo interno de α -manosil están siempre acetilado pero solo el 30% de β -manosil están piruvatados en el xantano

La estructura del xantano puede variar dependiendo de la cepa, condiciones y medios de cultivo empleados; los grupos acetilo y, principalmente piruvilo, varían según la fuente de carbono y el nutriente limitante en el medio de cultivo, bajas concentraciones de oxígeno dan lugar a una disminución del grado de piruvilación (García-Ochoa, 2000). Determinadas cepas de *Xanthomonas campestris* producen xantano con las cadenas laterales truncadas, sin piruvato ni manosilo, las cadenas laterales son las responsables de conferir solubilidad al polímero.

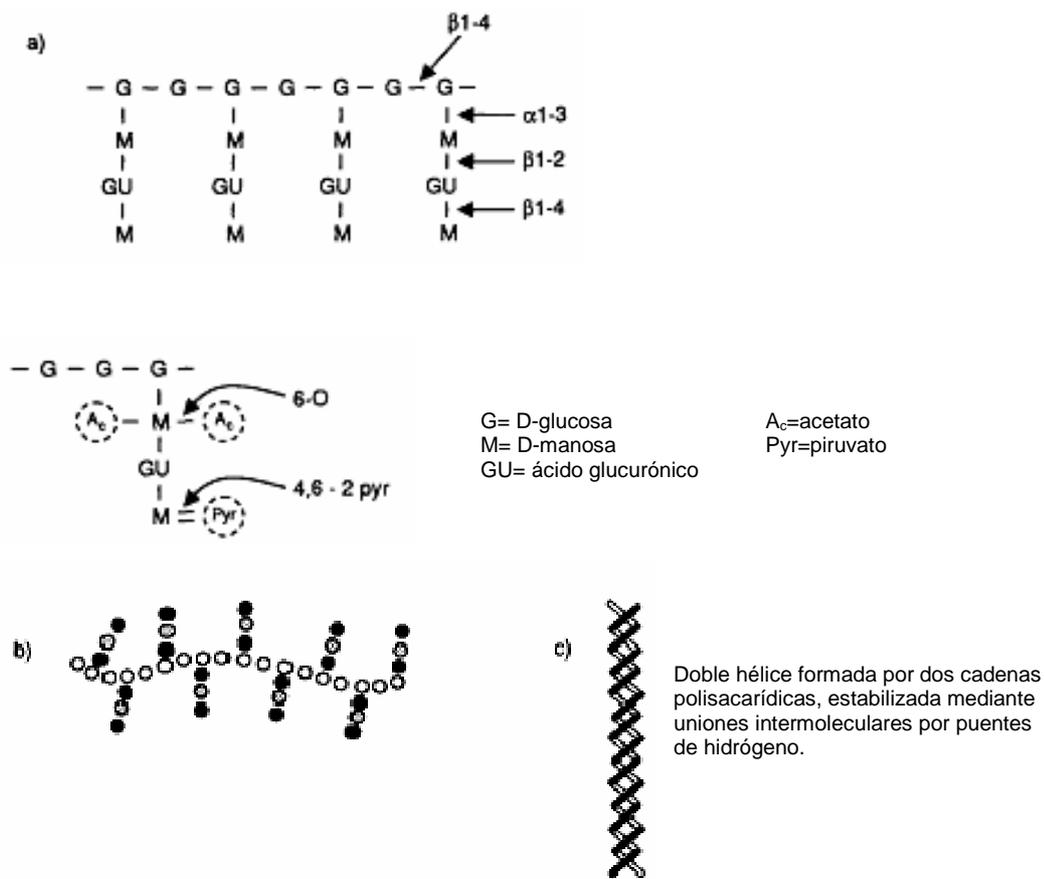


Figura 6. Ilustración de la estructura del xantano en tres maneras (a,b,c)

En algunas preparaciones de xantano se ha observado una posible pérdida de cadenas laterales (Tait y Sutherland, 1989; Vanderslice y col., 1989), parece ser el resultado de una mayor susceptibilidad de ciertas porciones de la molécula a hidrólisis ácida o enzimática.

b) Estructura conformacional: estructura terciaria.

La estructura conformacional y molecular se lleva a cabo por difracción de rayos X de soluciones diluidas de xantano, adoptando una conformación de doble hélice con las dos cadenas dispuestas antiparalelas. Las cadenas laterales trisacarídicas se disponen alineadas con la cadena principal, y en la doble hélice, las moléculas interactúan dando enrejados centrados que originan fibrillas microcristalinas (Okuyama, 1980; Atkins, 1990), ver figura 6.

En el xantano se han detectado dos conformaciones -hélice y ovillo-, en función de la temperatura de disolución (Horton y col., 1985; García-Ochoa y Casas, 1993). El hecho de que se trate de un polisacárido ramificado explica, en parte, la extraordinaria capacidad espesante y de estabilidad que presentan las disoluciones acuosas de esta goma.

Biosíntesis de xantano

En líneas generales, el proceso de biosíntesis comprende las siguientes fases:

1. Síntesis de precursores activados UDP-glucosa, UDP-glucurónico y GDP- manosa, en el citoplasma.
2. Transferencia secuencial de estos azúcares a un lípido transportador para formar las unidades repetitivas pentasacarídicas.
3. Adición de grupos acetilos y piruvatos.
4. Polimerización de las unidades.
5. Transporte del polisacárido hacia la superficie celular.

Los precursores de azúcares activados se transfieren secuencialmente, mediante glucosiltransferasas, al transportador lipídico isoprenoide C₅₅, el bactoprenol (Ielpi y col., 1981), hasta formar un lípido-P-P-pentasacárido (Ielpi y col., 1983). La unión del acetilo al pentasacárido es catalizada por una acetilasa con acetil coenzima A como dador y el piruvato de la manosa terminal se adiciona a partir de un fosfoenol piruvato mediante la correspondiente cetolasa (Ielpi y col., 1981; Marzocca y col., 1991).

La unidad lineal pentasacarídica se polimeriza posteriormente mediante una polimerasa cuya acción no parece ser específica, se ha comprobado que la ausencia de grupos piruvatos o acetilos no afecta a su actividad. El desarrollo de la polimerización se ha estudiado *in vitro* y se realiza por la transferencia de la cadena en crecimiento a un nuevo pentasacárido unido al transportador. Esta reacción, implica la presencia de una glucosa en el extremo reductor de la cadena en crecimiento y una glucosa en la posición no reductora del nuevo pentasacárido formado. Generándose un polímero ramificado con una cadena lateral trisacarídica (Ielpi y col., 1982). El transportador lipídico es eliminado de la molécula en crecimiento durante la reacción de adición por desfosforilación, proporcionando energía para la polimerización. Estas reacciones ocurren en la cara interna de la membrana citoplasmática donde se localiza el lípido transportador, y los precursores sintetizados proceden del citoplasma.

Posterior a la activación de monosacáridos a partir de la formación de azúcares nucleotídicos, se sigue el ensamblamiento de las unidades repetitivas por la adición secuencial de azúcares con lípidos isoprenoides y la adición simultánea de grupos acilo, ver figura 7. La estructura del xantano está formado básicamente, por la adición de D-glucosa -1-fosfato y D-glucosa respectivamente a partir de dos moléculas de UDP-D-glucosa.

Después de la polimerización de las unidades repetitivas, el EPS es excretado a través del complejo membrana/pared de la superficie celular hacia el medio extracelular. Las transferasas, altamente específicas intervienen en la transferencia de los monosacáridos y grupos acilo a moléculas aceptoras lipídicas isoprenoides (bactoprenol, C₅₅-lípidos isoprenoides) localizadas en la membrana citoplasmática. La repetición de unidades oligosacáridicas, con acetilo, pirúvico y acilo, están entonces polimerizados.

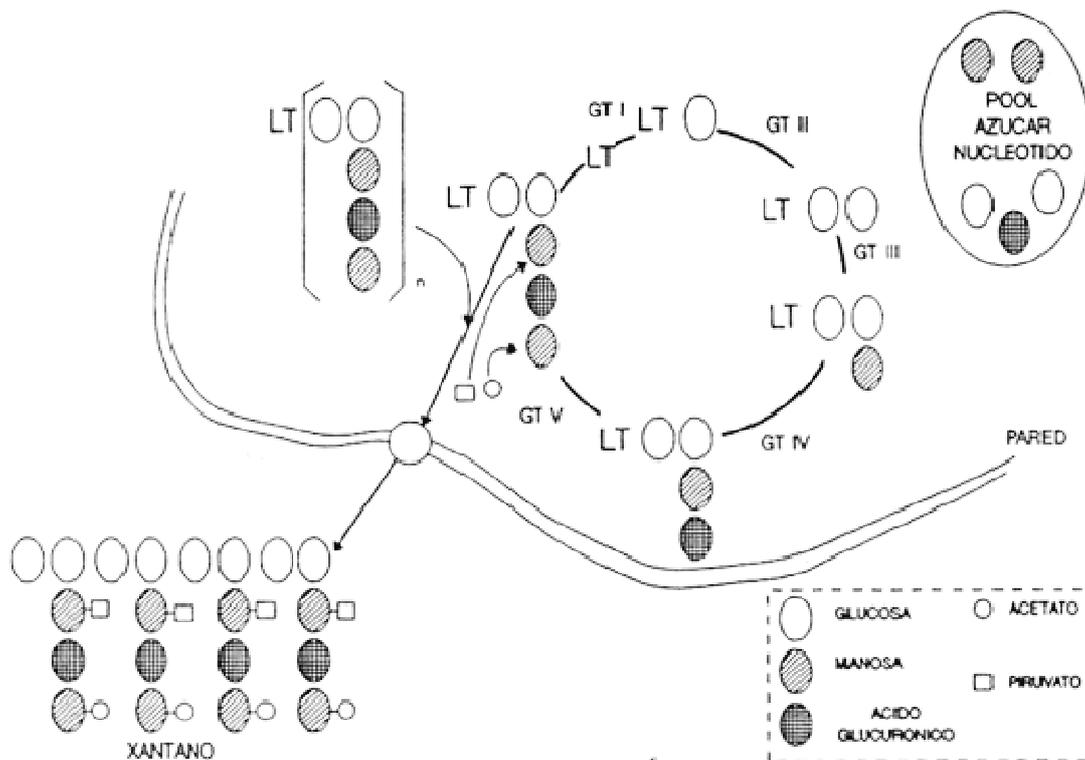


Figura 7. Biosíntesis del xantano (Leigh y Coplin, 1992; Ielpi y col., 1983).

Abreviatura LT = lípido transportador; GT= glucosil transferasas

La regulación del proceso de síntesis es compleja e implica una regulación tanto positiva como negativa (Leigh y Coplin, 1992). Parece ser que los sistemas implicados forman parte de los regulones de virulencia y de forma coordinada regulan enzimas que se exportan con el xantano (Osbourne y col., 1990). La característica común en la biosíntesis de los EPS es la participación de dos componentes

reguladores que consisten en un sensor ambiental de naturaleza proteínica localizado en las membranas del citoplasma y un efector proteínico localizado en el citoplasma (Stock y col., 1989). Estos sistemas ajustan la producción de los EPS en función de las necesidades bacterianas específicas durante la patogénesis o para aumentar su supervivencia en el ambiente. Los mecanismos globales también modifican la producción de exopolisacárido según el estado fisiológico general de la célula.

Aplicabilidad y funciones del xantano.

El exopolisacárido obtenido a partir de *Xanthomonas campestris* es el mayor biopolímero comercial, con una producción media anual de 30000 toneladas correspondiente a un mercado de 408 millones de dólares (Kalogiannis y col., 2003). Actualmente, los mayores productores de xantano son Merck y Pfizer en Estados Unidos, Rhône Poulenc y Sanofi-Elf en Francia, y Jungbunzlauer en Austria.

El xantano, posee unas propiedades pseudoplásticas especiales, alta viscosidad y solubilidad, utilizado como agente homogenizador, emulsificador, espesante y estabilizante en las industrias alimenticia, cosmética, farmacéutica, textil y papelera, estable en un amplio rango de pH y temperatura, capaz de variar propiedades funcionales y reológicas de multitud de productos. Su masa molecular varía de 0,9 a $1,6 \cdot 10^6$ daltons (Shatwell y col., 1990), aunque se han descrito valores mucho mayores incluso de 47 a $120 \cdot 10^6$ daltons, la diferencia entre los diferentes pesos moleculares dependen de multitud de factores como la técnica empleada y la tendencia del xantano a formar agregados en presencia de iones, células bacterianas y de proteínas (Sutherland, 1990), esta variación puede ser debida a que el peso molecular incrementa a lo largo del proceso de fermentación.

Uso de goma xantana en la industria alimentaria

Los estabilizantes son en su amplia mayoría gomas o hidrocoloides regulando la consistencia del producto (Rosell y col., 2001), debido a que una vez hidratados forman enlaces o puentes de hidrógeno formando una red a través de todo el producto, reduciendo la movilidad del agua restante.

El biopolímero (goma xantana), cumple casi todas las funciones de un estabilizante:

- Estabiliza la proteína durante los tratamientos térmicos.
- Disminuye la sedimentación y aumenta la homogeneidad de los ingredientes.
- Aumenta la viscosidad o fuerza de gel.
- Modifica la textura: firmeza, brillo, cremosidad...
- Reduce el contenido de sólidos brindando las mismas características.
- Además la sinergia de la goma xantana y los galactomananos, produce un gel muy elástico.

El xantano presenta una gran cantidad de aplicaciones industriales, debido a la alta viscosidad que proporciona en disolución, incluso a bajas concentraciones, siendo la consistencia de dichas disoluciones muy estable en amplios intervalos de temperatura, pH y pK. Por esta razón, presenta un amplio abanico de aplicaciones en gran cantidad de industrias.

Por ejemplo en la industria alimentaria, utilizado en un grupo importante de productos alimenticios en los que los componentes lipídicos, agua y otros elementos son procesados para la elaboración de salsas, sopas y cremas, productos comercializados como tales o bien deshidratados como en el caso de sopas instantáneas. Durante el proceso de elaboración y en su reconstitución con agua en los productos deshidratados se requiere la adición de polisacáridos (Dickinson, 2003) con una función estabilizadora, el xantano posee un importante papel en este campo. Previniendo que los constituyentes reviertan a las fases separadas iniciales asegurando una larga estabilidad, a lo que se suma la capacidad de disgregarse en agua fría o caliente originando dispersiones tixotrópicas que pueden ser posteriormente calentadas o refrigeradas además de presentar una gran estabilidad frente a un amplio rango de pH (Kierulf y Sutherland, 1988).

En general, las casas comerciales establecen dos calidades del producto: grado alimentario y grado técnico. Su presentación generalmente es en forma de polvo micronizado, aunque en aplicaciones específicas en el campo de la recuperación del petróleo utilizan caldos de fermentación clarificados. De cualquier forma, el xantano debe cumplir una serie de requisitos referentes a sus características físicas y químicas.

Usos de la goma xantana en la industria textil

La industria textil origina una gran cantidad de sustancias químicas que se utilizan en el proceso de tinción y deslavado provoca que las descargas de agua residual de las fábricas de teñido y procesado de prendas textiles contenga una cantidad considerable de compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos al ambiente. Entre estos compuestos se encuentran los colorantes los cuales aun en pequeñas cantidades son visibles y dan un aspecto indeseable al agua en la que están contenidos. La estructura de los colorantes es de naturaleza orgánica su degradación es lenta y difícil puesto que los organismos presentes en la naturaleza no poseen mecanismos adecuados para realizar su descomposición rápida y esto genera que se acumulen en el ecosistema generando fuentes de contaminación.

Se han aplicado diferentes métodos (químicos, físicos y biológicos) la remoción de los colorantes ha sido en forma parcial, los costos son demasiado altos y/o se generan problemas de disposición y confinamiento al cambiarlos de la matriz acuosa al estado sólido.

La goma xantana está formada por unidades de azúcares como β -D-glucosa, α -D-manosa (M), ácido β -D-glucurónico (GA) y α -D-manosa, además posee cierto grado de acetilación y de contenido de grupos piruvato, poseen estructuras de unidades repetitivas que son potenciales sitios de unión para colorantes.

En estudios recientes, se ha observado que los biopolímeros remueven a los colorantes empleados en la industria textil de la solución acuosa en forma significativa. La investigación de que grupos funcionales participan en el proceso de bioadsorción proveerá de la información necesaria para entender mejor la formación del complejo biopolímero-colorante (Nigam y col., 2001).

2.3. Goma curdlana y succinoglucano

β -D-glucano. Características

El curdlano fue descubierto por Harada y col. (1968), se empezó a comercializar en 1989 en Japón empleado ampliamente en alimentación. El 16 de diciembre de 1996, fue aprobada por la FDA para uso como aditivo alimentario en Estados Unidos, producida y comercializada con el nombre de "Pureglucan" por Takeda USA Inc. Nueva York (Pszczola, 1997).

Es un polisacárido producido por bacterias como *Alcaligenes faecalis* variedad *Myxogenes* (identificada como *Agrobacterium* biovar 1) (Yukihiko y col., 1991; Yukihiko, 1997) y *Agrobacterium radiobacter* (Kim y col., 2000).

Los β -(1-3)-D glucanos están presentes en una enorme variedad de sistemas vivientes tales como hongos, bacterias, levaduras, algas y plantas superiores. Las características principales de los glucanos son:

- Son macromoléculas, polímeros de la glucosa.
- A la categoría de los glucanos pertenecen numerosos substitutos, en algunos casos se pueden obtener estos micro-organismos de plantas más desarrolladas.
- Los glucanos difieren entre sí, no sólo en su estructura química, sino también en sus correlaciones que involucran estructura, propiedades y efecto.

El curdlano, es un polisacárido (1-3)- β -D- glucano soluble en álcali se produce a partir de *Agrobacterium radiobacter*, posee un grado de polimerización de 450 y un peso molecular medio en NaOH 0.3 N entre un rango de $5.3 \cdot 10^4$ a $2.0 \cdot 10^6$ daltons (Nakata y col., 1998).

Es un exopolisacárido microbiano compuesto casi exclusivamente por enlaces glicosídicos β -(1-3), ver figura 7, capaces de formar geles irreversibles por inducción térmica (Harada y col., 1968) característica muy valorada por la industria de la

alimentación. Además de ofrecer como toda la familia de betaglucanos buenas propiedades beneficiosas para la salud con un marcado efecto inmunoestimulador.

El rasgo característico de los glucanos activos es la β -(1→3) cadena, compuesta de moléculas de la glucosa. Estos glucanos se describen como los betaglucanos. Sin embargo, los betaglucanos en general son moduladores deficientes, si no tienen ramificaciones de las β -(1→3)-cadenas con moléculas solas de glucosa o cadenas de glucosa. Glucanos con estas ramas específicas se llaman (1→3), (1→6)- β -D-glucanos. Sólo este grupo de glucanos puede activar el sistema inmunológico, son moduladores inmunológicos. Pero incluso entre los (1→3), (1→6)- β -D-glucanos existen divergencias sustanciales con respecto al número y longitud de las ramas o cadenas, por eso existen grandes diferencias en la eficiencia de betaglucanos.

(1→3) (1→6)- β -D-glucanos activan el sistema inmunológico de humanos y animales a través de un tipo específico de células blancas en la sangre: los macrófagos. El factor decisivo para el efecto estimulante de (1→3),(1→6)- β -D glucanos es la estructura química: (1→3)-cadenas principales con una longitud específica, combinada con (1→6)-cadenas con ramas características.

Para glucanos con cadenas moleculares de glucosa de combinación (1→4) no se han descubierto ningún efecto para el sistema inmunológico.

Estructura de la goma curdlan

Multitud de estudios se han realizado para determinar la estructura molecular del curdlano en sistemas acuosos determinándose tres conformaciones, hélice simple, triple hélice y random coil. Estudios del comportamiento conformacional del curdlano empleando dispersores rotatorios ópticos, viscosidades intrínsecas y flujos de birrefringencia en soluciones alcalinas, demostraron que a concentraciones bajas de hidróxido sódico, el curdlano posee una estructura helicoidal, significativamente este cambio conformacional sucede a una concentración de NaOH de 0.19-0.24 N. Cuando la concentración supera los 0.2 N, el curdlano es completamente soluble adoptando una estructura desordenada o random coil, pero si el polímero es neutralizado adopta un estado ordenado compuesto principalmente por simples y triples hélices (Saito y col., 1977). Al incrementarse la concentración de sales el punto de transición conformacional se alcanza con una mayor concentración de álcali (Ogawa y col., 1973) y la adición de 2- cloroetanol, dioxan o agua a una solución de dimetilsulfoxido (DMSO) cambia la conformación a una estructura rígida y ordenada (Ogawa y col., 1973), concluyendo que el contenido de formas ordenadas incrementan

con el grado de polimerización siendo constante a valores de DP cercanos a 200. Comparaciones con el microscopio electrónico de la estructura molecular del curdlano con diferentes grados de polimerización muestran que el curdlano con un alto índice de DP pueden formar geles por calentamiento (Koreeda y col., 1974). La estructura química del curdlano se muestra en la figura 8.

La conversión de triple hélice a simple hélice es mediada por diferentes tratamientos físicos y químicos.

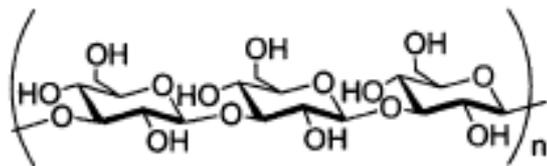


Figura 8. Estructura química del curdlano. Fuente: Funami y col. (1999a)

En estado natural probablemente es que se encuentre en forma cristalina adoptando la forma de un gránulo de almidón, ver figura 9.



Figura 9. Microscopia de luz polarizada de un gránulo de curdlano. El gránulo de curdlano es insoluble en agua destilada, en alcohol y en muchos solventes orgánicos, aunque se disuelve fácilmente en solución alcalina diluida debido a la ionización de los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Cheeseman y Brown Junior., 1995; Funami y col., 1999b ; Spicer y col., 1999).

Síntesis de curdlano

Aunque la ruta metabólica para la síntesis del curdlano se detalla en la figura 10, la biosíntesis de polisacáridos extracelulares se generaliza en tres pasos, (Sutherland, 1994).

- 1) Entrada del sustrato carbohidrato a la célula por transporte activo.
- 2) Formación intracelular del polisacárido.
- 3) Extrusión desde la célula.

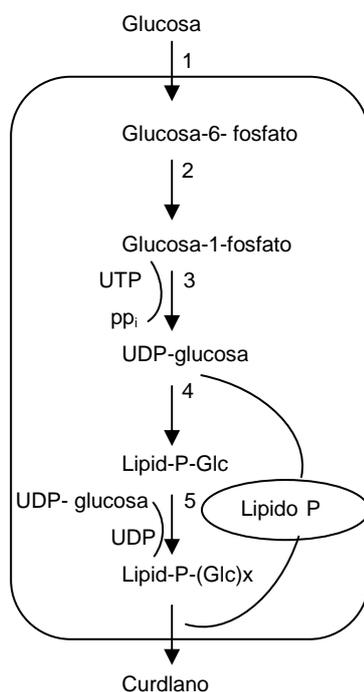


Figura 10. Ruta metabólica para la síntesis de curdlano.1,hexoquinasa;2, fosfoglucomutasa ;3,UDP-glucosa pirofosforilasa;4,transferasa;5,polimerasa. Lipid-P representa lípido isoprenoide fosfatado.

Producción de curdlano

a) Fuente de carbono

Multitud de factores afectan a la producción del curdlano, los cuales han sido estudiados ampliamente, incluido la fuente de carbono, nitrógeno, fosfato, aireación y pH. En la industria es prioritario el empleo de fuentes de carbono económicas para la producción del curdlano, como pueden ser productos residuales provenientes de industrias como el lactosuero y las melazas de caña de azúcar. En la producción de

curdlano por las cepas de *Agrobacterium* se alcanza una máxima producción (60g/l) siendo la sacarosa la fuente de carbono más eficiente, con una productividad del 0.5 g L⁻¹ h⁻¹.

b) Efecto del nitrógeno

Pocas cepas de *Agrobacterium* y *Alcaligenes* son bien conocidas por ser productoras de curdlano. La producción de curdlano se asocia a la fase post estacionaria de escasez de nitrógeno, con una producción inicial de biomasa seguida de la producción de curdlano.

Es importante determinar la concentración inicial de nitrógeno debido a que es un factor limitante en el crecimiento celular durante la fermentación (Kim y col., 2000) afirmando que la tasa de crecimiento celular decrece al aumentar la concentración de amonio. Se debe determinar la óptima concentración de amonio para favorecer una apropiada concentración celular mientras se minimiza el efecto inhibitorio del ión amonio.

C) Aireación

Las cepas productoras de curdlano son aerobias estrictas siendo un factor clave en la producción el suministro de aire durante la fermentación. El curdlano al ser insoluble en agua provoca que el caldo de cultivo sea de relativa baja viscosidad, ofreciendo una baja resistencia en la transferencia de oxígeno a la célula. Aunque se requiere un alto contenido de oxígeno disuelto para la máxima productividad como consecuencia de la formación de una capa del exopolisacárido insoluble alrededor de las células. En la fermentación realizadas en frascos Erlenmeyer se produce que al aumentar el volumen decrece las tasas de producción, indicando que los cultivos están limitados por la baja capacidad de transferencia del oxígeno. Se han realizado varios experimentos para el estudio y desarrollo del proceso de producción del curdlano especialmente en el diseño de reactores (Lawford y Rouseau, 1989, 1992). En dichos trabajos se emplearon dos tipos de modelos de palas de agitación: uno de flujo radial, y otro de palas rectas y planas. El de flujo radial fue el más efectivo en la transferencia de oxígeno incrementándose la producción de curdlano, pero el curdlano producido poseía unas cualidades inferiores en términos de fuerza de gel térmicamente inducido.

Un birreactor con modelos de palas de agitación de flujo radial produce menos efecto de cizalla y más burbujeo. Con unos diseños apropiados puede lograrse una alta tasa de transferencia volumétrica de oxígeno.

D) Efecto del fosfato

La concentración de fosfato debe de tenerse en cuenta ya que posee una influencia en el crecimiento celular y en la producción del exopolisacárido. El efecto del fosfato en la producción de exopolisacáridos es variable, (Kim y col., 2000) se ha investigado la influencia de la concentración de fosfato inorgánico en la producción de curdlano por especies de *Agrobacterium*. En condiciones limitantes de nitrógeno que permitan la producción de curdlano, la concentración de fosfato permanece constante. La concentración residual de fosfato óptimo para la producción de curdlano se sitúa entre 0.1-0.5 g L⁻¹. Parece ser que bajas concentraciones de fosfato son óptimas en la producción de curdlano, en cambio sin fosfato la producción es extremadamente baja.

Un incremento en la concentración de fosfato en las células de 0.42 a 1.68 g L⁻¹, la producción de curdlano se incrementa desde 0.44 a 2.80 g L⁻¹. Además, la concentración óptima de fosfato no depende de la concentración celular y la tasa de producción específica se sitúa en torno a 70 mg de curdlano por g de células h⁻¹, independientemente de la concentración de células.

E) Efecto del pH

El pH es uno de los factores más importantes influyendo tanto en el crecimiento celular como en la producción de curdlano. La viscosidad del caldo de cultivo puede ser un problema pudiendo ser paliado por un pH ligeramente ácido donde el curdlano en estas condiciones es insoluble. El proceso de fermentación en la producción de curdlano se divide en dos fases: el óptimo de crecimiento celular se sitúa a un pH 7 en cambio en la producción a un pH 5.5, obteniéndose unos mayores rendimientos de producción 64 g L⁻¹ en comparación cuando el pH en el proceso es constante (36 g L⁻¹).

Usos de curdlano

El curdlano en combinación con el carbón activo puede emplearse en procesos de filtración de alimentos y bebidas, por ejemplo en la separación de metales pesados en hierbas orientales. La filtración puede ser controlada mediante el tamaño de poro ajustando el ratio carbono –curdlano (Moon y Lee., 2004).

En la industria alimentaria se emplean a concentraciones que varían desde 0,1 % al 1%, aunque no contribuye a dar aroma o valor nutritivo, modificando o estabilizando propiedades físicas del producto (Yukihiro, 1997), como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Fuente: Yukihiro (1997). Usos del curdlano en la industria alimentaria.

| ALIMENTOS | FUNCIÓN | DOSIS % |
|--------------------------------------|---|---------|
| Uso como aditivo alimentario | | |
| Carnes procesadas | Modificación de textura, retención de agua. | 0.1-1.0 |
| Alimentos liofilizados | Modificación de textura, auxiliar de rehidratación. | 0.5-1.0 |
| Alimentos precocidos | Modificación de textura. | 0.2-2 |
| Uso como ingrediente esencial | | |
| Geles | Agente gelificante. | 1.0-5.0 |
| Alimentos procesados | Agente gelificante. | 1.0-1.0 |
| Biopelículas comestibles | Formación de biopelícula. | 1.0-1.0 |
| Alimentos bajos en calorías | Fibra dietética. | 1.0-1.0 |

Succinoglicano.

El succinoglicano es producido por especies de *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* presenta además de sustituyentes O-acetato y piruvato, grupos O-succinato (Sutherland, 1999; 2001).

En el caso del succinoglicano producido por *Agrobacterium radiobacter*, se obtienen unos niveles óptimos de producción al emplearse sacarosa (Stredansky y col., 1998).

El succinoglicano difiere de la goma curdlan debido a que es soluble en agua compuesto por unidades repetidas octosacarídicas. Contiene d-glucosa y d-galactosa en un ratio molar 7:1. Unidos al azúcar diferentes grupos acil acetato, ésteres succinato y grupos piruvato. La síntesis de succinoglicano es un proceso muy eficiente donde apenas existe pérdida de energía en el proceso de crecimiento bajo condiciones de exceso de la fuente carbonada.

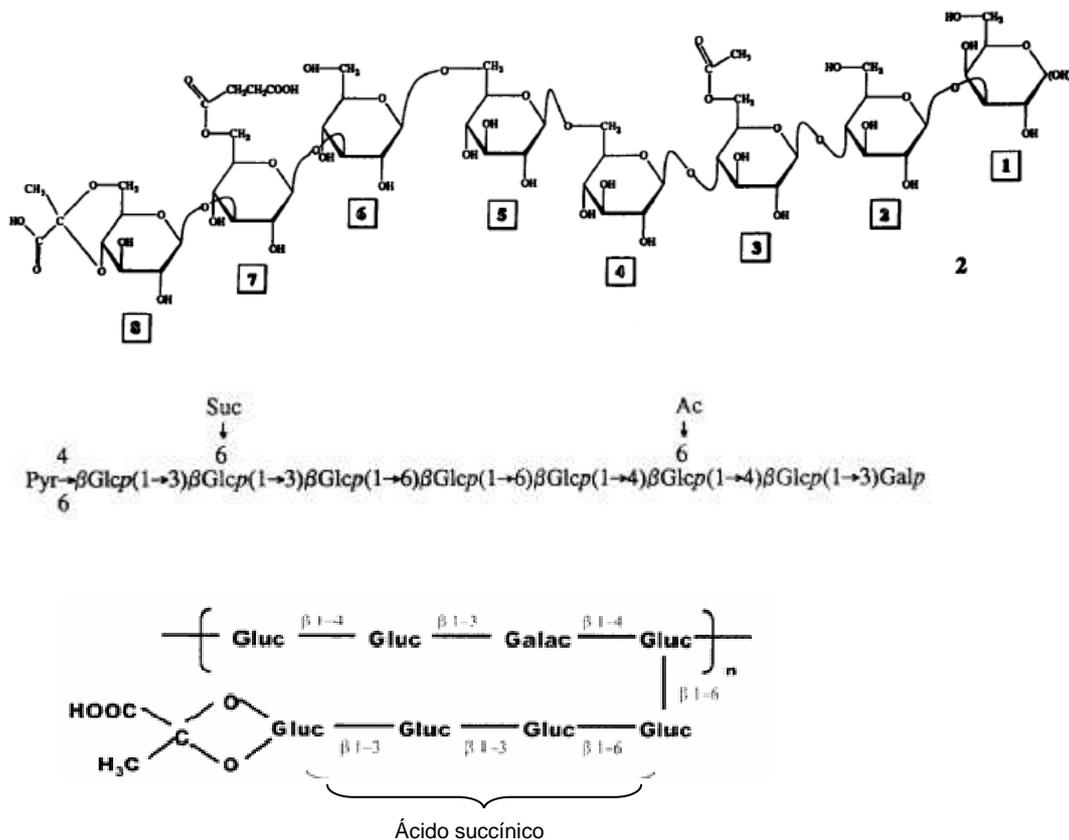


Figura 11. Estructura del succinoglicano.

Una fuente de nitrógeno poco común para la producción de exopolímeros microbianos aunque con excelentes resultados en el caso del succinoglicano, es la lisina. Con este sustrato se obtienen los mayores niveles de producción de este

polisacárido en presencia de CaCO_3 que actúa como tampón evitando la acidificación del medio (Stredansky y col., 1998).

La adición de un surfactante no iónico como el Brij® 76 al medio de producción de succinoglicano permite obtener un producto de mayor masa molecular (Stredansky y col., 1998). La producción de succinoglicano se encuentra estimulada a una molaridad moderada de NaCl, y a mayor salinidad la cantidad de exopolisacárido sintetizada es menor (Breedveld y col., 1990). Así, parece ser que una elevada presión osmótica puede afectar a la producción de exopolímero, tal y como se ha constatado en varios estudios (Lloret y col., 1995; Lloret y col., 1998). Este fenómeno también ha sido descrito para la producción de maurano por *Halomonas maura* S30 (Arias y col., 2003), aunque en este caso, la máxima producción de polímero se produce a una concentración del 5% (p/v) en sales.

El succinoglicano se comporta de modo similar al nuestro polímero. Entre 60-70°C se produce una caída notable de su viscosidad, fenómeno que se ha relacionado con una transición conformacional de dicho polímero (Stredansky y col., 1999).

2.4. *Pululano*

Microorganismo productor

Aureobasidium pullulans es un hongo dimorfo que presenta micelio pigmentado con hifas de las que nacen de forma sésil numerosos conidios hialinos (de 2-3 μm) y piriformes, los cuales, una vez libres, forman por gemación otros más pequeños, ver figura 12.



Figura 12. Blastoconidios de *Aureobasidium pullulans*. Microscopía de contraste de fases, x450 aumentos.

Muestra en cultivo con una amplia variedad de formas y colores desarrollándose a 25 °C. colonias blancas o cremosas, pero también pueden ser amarillas, rosas o parduscas. Posteriormente se van ennegreciendo hasta casi ser completamente negras. Esta especie tiene dos variedades: *Aureobasidium pullulans* variedad *pullulans*, con colonias que permanecen amarillas, rosas o parduscas durante tres o más semanas, y *Aureobasidium pullulans* variedad *melanogenum*, con colonias que adquieren muy pronto un color negro o gris oscuro.

A pesar que se caracteriza como saprófito, su principal hábitat se encuentra en las partes aéreas de las plantas, localizándose preferentemente en las hojas. Crecen en capas superficiales de muchos tipos de suelos donde posteriormente a su crecimiento se provoca una fertilización nitrogenada. Esta especie ha sido aislada de sedimentos acuáticos, rizosfera de la hierba, semillas, panales, nidos, plumas de pájaros, cuero, fábricas de algodones, pinturas, plásticos, lentes ópticas y nódulos linfáticos humanos.

La mayoría de las cepas poseen un crecimiento óptimo a 25°C, siendo sensibles al calor, no obstante se han aislado cepas adaptadas a crecer a bajas y altas temperaturas (Domsch y col., 1980).

Estructura pululano, problemática y usos.

El pululano, es un homopolisacárido con una estructura lineal, compuesto de unidades maltotriosa unidas por enlaces α (1 \rightarrow 6). La alternancia regular de enlaces α (1 \rightarrow 4) y α (1 \rightarrow 6) (en ratios 2:1) dan lugar a propiedades distintivas, como flexibilidad, mayor solubilidad en agua y unas excelentes propiedades filmógenas (Catley, 1973).

Además de ser comestible y biodegradable, presenta otras numerosas ventajas siendo un material muy útil, ya que sus propiedades físico-químicas permiten un amplio rango de aplicaciones en alimentación, cosméticos y en productos farmacéuticos. Aunque el pululano ha sido comercializado por Hayashibara Co.,Ltd. durante cerca de 30 años, el precio de mercado 25 \$/Kg.(unos 3500 yenes japoneses) constituye la principal barrera para muchos usos potenciales.

Este polisacárido se sintetiza bajo condiciones de aerobiosis, *Aureobasidium pullulans* emplea substratos azucarados como fuente principal de carbono para el crecimiento celular y biosíntesis del pululano, producido principalmente durante los últimos estadios cuando el nitrógeno se encuentra como factor limitante (Audet y col., 1996).

El pululano, puede emplearse como ingrediente en comidas no calóricas y forma películas claras, inodoras e insípidas en solución acuosa además de ser impermeables al oxígeno, empleándose como agente de recubrimiento en productos farmacéuticos y aplicaciones poscosecha en el tratamiento de frutos, incluso como agentes para retardar la oxidación (Robyt, 1998) (Young y Novell., 1991).

El pululano acetilado se emplea para encapsulación de medicamentos para vía oral (Kun y col., 2006; Recka y Sharma., 2007).

3. Producción de EPS a partir de un medio no convencional.

3.1 Substratos procedentes de actividades agro- industriales

La producción de EPS, en condiciones de laboratorio, se realiza usualmente empleando medios de cultivo definidos, con una elevada relación carbono/nitrógeno, donde la cantidad de nitrógeno induce a la limitación del crecimiento y estimula la producción de EPS cuando el ratio C/N es menor (Casas, 2000). Como fuente de carbono se emplea habitualmente la glucosa, aunque también se puede emplear sacarosa (Papagianni, 2001).

A escala industrial, se usa el mismo principio, pero por motivos económicos se emplean substratos económicos, generalmente complejos, obtenidos a partir de subproductos de actividades agrícolas.

Por ejemplo, en la producción de xantano se puede emplear: hidrolizados ácidos o enzimáticos del almidón, licor de macerado de maíz, melaza, jarabe de azúcar, alpechín, lactosuero (López, 2004). *Xanthomonas campestris* gracias a que es capaz de producir una amplia variedad de enzimas: celulosas, pectinasas, amilasa y proteasas, es flexible en sus requerimientos para su crecimiento y puede crecer en medios de cultivo complejos. Se ha propuesto, el uso de cítricos completos o hidrolizados como sustitutos de la glucosa obteniéndose buenos resultados. Como fuente nitrogenada empleándose principalmente los licores de macerado de maíz que además estimulan el crecimiento y la producción de xantano y provocan una disminución del tiempo de incubación. Se pueden emplear también los solubles de destilería y el hidrolizado de levadura de cerveza.

Actualmente, existe una importante problemática debido a la gran cantidad de residuos contaminantes generados por las industrias. Por ejemplo, el alpechín y el lactosuero son residuos generados en grandes cantidades., estos residuos pueden ser utilizados por una gran cantidad de microorganismos (Biorremediación), obteniéndose por una parte la descontaminación y la obtención de productos útiles de interés industrial.

3.2 Residuo de la industria quesera: lactosuero.

a) Proceso en quesería.

El suero es la porción acuosa que se separa del cuajo durante la manufacturación del queso y en la coagulación de la caseína. Se estima que por cada Kg de queso Cheddar se producen 9 Kg. de lactosuero. El suero, posee un alto contenido en proteínas que se extraen para emplearse en alimentación humana. El residuo remanente, contiene aproximadamente entre un 4-5 % de lactosa, 0.8-1 % de proteínas (lactoalbúmina, lactoglobulina), y una pequeña proporción de ácidos orgánicos, minerales y vitaminas (Charles y col., 1977).

b) Composición y características del lactosuero.

No todos los lactosueros son iguales, una de las principales diferencias entre ellos está en su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso sino, de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada. En la tabla 4, se presentan los rangos de pH en que se encuentran los tres tipos de lactosuero generados durante el proceso de elaboración de queso; de éstos, el lactosuero dulce se eligió por sus características como medio de producción.

Tabla 4. Tipos de lactosuero según características físicas y procedencia.

| Tipo de lactosuero | Procedencia | pH |
|--------------------|--|-----------|
| Lactosuero dulce | Se obtiene el lactosuero dulce como subproducto de la elaboración de quesos duros, semiduros y ciertos quesos blandos en los cuales es utilizado el cuajo como insumo principal. | 5.6 – 6.3 |
| Lactosuero ácido | Obtenido al precipitar la caseína y formar el cuajo mediante adición de ácido láctico. | 4.4-5.1 |
| Lactosuero salado | Se genera al añadir sal a la leche o al mismo lactosuero durante el proceso de elaboración del queso. | |

En la composición del lactosuero intervienen los siguientes factores:

- La tecnología de elaboración del queso.
- La composición de la leche.
- El tratamiento del calor del lactosuero.
- El almacenamiento del lactosuero.
- El tipo de queso a procesar.

En términos generales, la calidad del lactosuero está dada por los componentes que contiene. La tabla 5, detalla la información aproximada de los componentes del lactosuero donde se destacan elementos nutritivos, minerales y vitaminas.

Tabla 5. Composición del lactosuero fluido.(Composition of foods Dairy and Egg products. Raw Processed prepared. Agricultura Handbook No. 8-1. United States Department of Agricultura Research service. 1976).

| Componente | Unidades aproximadas | Cantidad en 100 gramos |
|--------------------------|----------------------|------------------------|
| NUTRIENTES | | |
| Agua | g | 93,12 |
| Energía | Kcal | 27 |
| | | |
| Proteína (N *6.38) | g | 0,85 |
| Grasa | g | 0,36 |
| Carbohidratos | g | 5,14 |
| Fibra | g | 0 |
| Cenizas | g | 0,53 |
| MINERALES | | |
| Calcio | mg | 47 |
| Hierro | mg | 0,06 |
| Magnesio | mg | 8 |
| Fósforo | mg | 46 |
| Potasio | mg | 161 |
| Sodio | mg | 54 |
| Zinc | mg | 0,13 |
| VITAMINAS | | |
| Ácido ascórbico | mg | 0,10 |
| Tiamina | mg | 0,036 |
| Riboflavina | mg | 0,158 |
| Niacina | mg | 0,074 |
| Ácido pantoténico | mg | 0,383 |
| Vitamina B ₆ | mg | 0,031 |
| Folacina | mg | 1 |
| Vitamina B ₁₂ | mg | 0,277 |
| Vitamina A | UI | 16 |
| COLESTEROL | mg | 2 |

c) Precio del lactosuero

El lactosuero es considerado en el ámbito mundial como un producto residual indeseable, algo negativo para el medio ambiente. Tradicionalmente, una parte del lactosuero producido se utiliza para la alimentación de ganado, el resto es vertido al mar, a los ríos, canteras, minas u otros lugares inadecuados. Generalmente, las industrias lácteas poseen pilas de recolección de lactosuero. El precio que el suero tiene, se debe principalmente a los costos de almacenamiento, que están dados por la infraestructura necesaria para mantenerlo refrigerado antes de ser trasladado a la planta procesadora. Los equipos que se requieren para ello son:

- Tanques de almacenamiento refrigerado (incluye todo el equipo de refrigeración) ó tanques enchaquetados que mantengan el suero a una temperatura muy baja, para lo cual se requiere de un banco de hielo.
- Red de tuberías de acero inoxidable.
- Sistema de bombeo sanitario de las tinajas de proceso donde se genera el suero hacia los tanques.

La instalación de estos equipos, reduce el impacto ambiental que ocasiona la mala disposición del suero, de modo que la inversión se justifica mediante el paso que se da en el cumplimiento de la legislación que afecta a las queserías. Una vez instalado el sistema, se debe incurrir en los costos operativos de energía, lavado de los tanques y mantenimiento de todo el sistema, además de la mano de obra destinada a su control.

El lactosuero, es un desecho de la industria láctea, producida en grandes cantidades constituyente un producto contaminante medioambiental, con una demanda biológica de oxígeno de 40,000 a 45,000 mg l⁻¹. Por ejemplo, una quesería que procese cerca de 100.000 L de leche / día genera, tanta contaminación como la de una población de 55.000-65.000 habitantes (Verruga, 2001), ya que la lactosa es un azúcar muy reductor. Este residuo posee una regulaciones durante su eliminación y vertido registradas desde enero 1988 (Disposal of Whey Regulation regulation 90/88 R).

d) Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero

Existen diversas alternativas para el aprovechamiento del suero de quesería, con la excepción del empleo inmediato y en crudo para alimentación animal, aunque no son rentables en el caso de fábricas pequeñas y relativamente aisladas.

En la figura 13, se muestran esquemáticamente algunas de las posibilidades de aprovechamiento del suero de quesería.

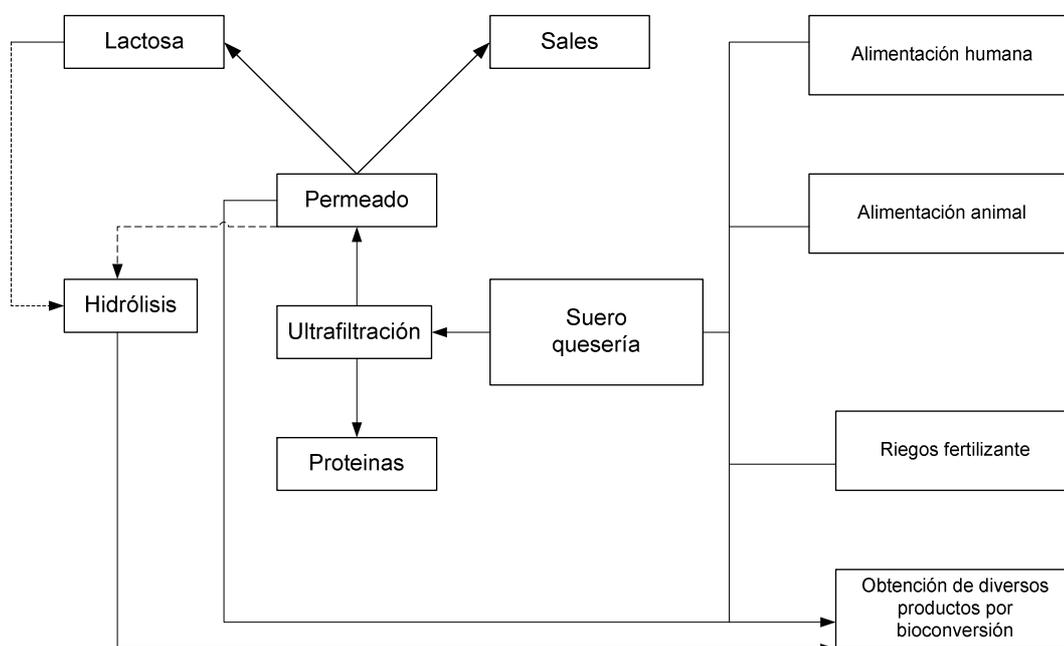


Figura 13. Representación esquemática de los procesos de aprovechamiento de sueros de queserías a escala industrial.

Debido a que en estos procesos junto a la fracción proteica se retiene una gran cantidad de lactosa, es un azúcar poco atractivo por sus características de baja solubilidad, presenta un escaso poder edulcorante y muchas personas tienen problemas para digerirla, no se ha podido aprovechar toda la capacidad instalada en las industrias lácteas para obtener fracciones de alta concentración. Una forma para resolver este inconveniente puede ser la producción de la hidrólisis enzimática de la lactosa durante el proceso de concentración (Bernal y Pavel, 1985; Carminatti y col., 2003; Foda y López-Leiva, 2000; Axelsson y Zacchi, 1990). El lactosuero contiene un alto valor nutritivo y tradicionalmente se destina para la alimentación porcina, cuando no se utiliza y se desecha, es un alto contaminante del medio ambiente.

El aprovechamiento del lactosuero eleva la rentabilidad de la operación de los queseros. Existe una amplia variedad de productos que pueden obtenerse a partir del lactosuero, como ricotta, queso tipo mysost, concentrados proteicos, suero en polvo y bebidas energéticas. El nivel de aprovechamiento de este efluente se relaciona con la factibilidad de elaboración de estos productos y la utilización de sus componentes.

Una de las aplicaciones más sencilla del suero es emplearlo como fertilizante, para riegos de terrenos agrícolas, mejorar la estructura del suelo reduciendo su erosión (Gary y col., 2008) pero la cantidad aplicada por unidad de superficie y la frecuencia de aplicación deben ser muy controladas para evitar una excesiva salinización de los suelos. Por otro lado, otra operación más sencilla consiste en hacer bebidas refrescantes a partir de ella por dilución del agua y la saborización de la mezcla, aunque cabe destacar el escaso mercado que existe hoy en día para este tipo de producto. La elaboración de una bebida energética en presentación líquida aprovecha todos los componentes del suero y diseña un proceso integral para la obtención de productos de alto valor energético. Requiere los mismos equipos utilizados en la industria láctea en general, y presenta una tecnología de procesamiento sencillo. En virtud a la creciente demanda de bebidas energéticas, y a la experiencia de países como Estados Unidos, donde el procesamiento del lactosuero ha dado como resultado mayores utilidades para los productores queseros, las bebidas isotónicas en base a lactosuero aparecen como productos altamente prometedores que se prevee que alcancen buenas cuotas de mercado en pocos años. En general, las bebidas isotónicas están dirigidas a niños, deportistas y mujeres embarazadas, son productos formulados para mitigar la sed, restaurar electrolitos y proveer energía. Recientemente, investigadores de la universidad de Braga (Portugal), han desarrollado una bebida alcohólica (35.4% v/v etanol) a partir de la destilación del caldo de fermentación obtenido a partir de suero lácteo por *Kluyveromyces marxianus* (Dragone y col., 2008). El desarrollo de productos de estas características resalta las propiedades intrínsecas del suero lácteo y lo convierte en materia prima ideal para elaboración de este tipo de bebidas.

Para su aprovechamiento, en los últimos años se ha desarrollado la alternativa de la recuperación de los nutrientes de alta calidad, mediante la aplicación de procesos de membranas.

En años recientes, los productos de valor añadido del lactosuero han tenido mucho interés. Una de estas áreas es la producción de biopolímeros microbianos. La mayoría de los trabajos publicados emplean suero diluido con un contenido de lactosa

inferior al 1% (p/v), o el polímero producido era de valor comercial desconocido. La obtención de un biopolímero producido en la fermentación del suero o del permeato por una bacteria puede resultar ventajosa. Tales bacterias metabolizarían completamente el sustrato de lactosa. Esto puede ser beneficioso por tres razones: puede mejorar este residuo industrial para producir un producto de valor añadido, puede ayudar a disminuir el problema de contaminación ambiental, y puede eliminar los costos del tratamiento requerido para el suero antes de desecharlo.

Por consiguiente, es importante que la industria quesera tenga un portafolio de opciones para usar el lactosuero como base de alimentos, preferentemente para el consumo humano, con el fin adicional de no contaminar el medio ambiente y de recuperar, con creces, el valor monetario del lactosuero.

4. β -galactosidasa

Actualmente existen dos aplicaciones biotecnológicas principales para esta enzima en la industria láctea, eliminación de la lactosa de la leche para producir productos destinados a la población intolerante a la lactosa y por otro lado, la producción de galacto-oligosacáridos para el empleo de alimentos probióticos (Karasová-Lipovová y col., 2003).

Muchos microorganismos son lactosa negativa (no pueden emplear la lactosa como fuente de carbono) y el suero contiene una gran cantidad de lactosa, el residuo debe ser tratado previamente con β -galactosidasa, capaz de hidrolizar el disacárido en glucosa y galactosa, fácilmente asimilable por los microorganismos.

La lactosa no puede ser empleada como fuente de carbono por bacterias como *Xanthomonas campestris* entre otras, por lo que se debe tratar el lactosuero para la producción de EPS de origen microbiano, mediante la acción de la β -galactosidasa.

La biolactasa aislada a partir de *Saccharomyces lactis* o bien la biolactasa -N (β galactosidasa) obtenida a partir de una cepa seleccionada de *Kluyveromyces lactis*, es capaz de hidrolizar en pocas horas la lactosa (disacárido) en glucosa y galactosa (monosacáridos), ver figura 14.

La β -galactosidasa posee una enorme importancia desde el punto de vista comercial, cataliza la hidrólisis de β -D- galactopiranosides como la lactosa, evita la cristalización de la lactosa en congelados, minimiza los problemas de las personas intolerantes a la lactosa (Kim y Rajagopal, 2000). En la catalización de la conversión de lactosa a glucosa y galactosa, la β - galactosidasa también cataliza la reacción de transgalactosilación: la lactosa actúa donador galactosil y un aceptor di - tri o más galacto oligosacáridos. (Wallenfels y Weil, 1972; Prenosil y col a., 1987).

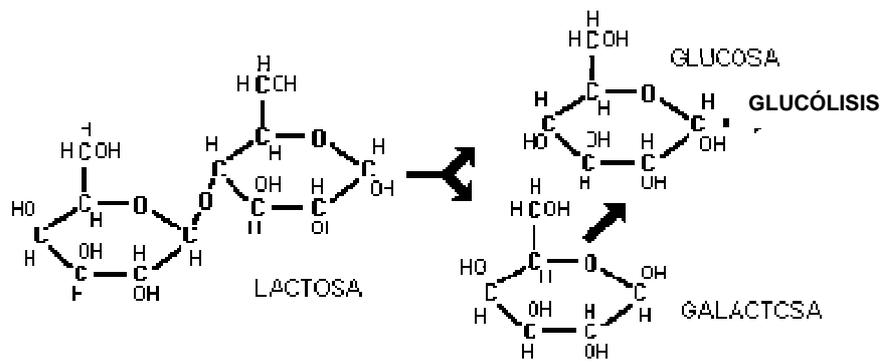


Figura 14. Hidrólisis de la lactosa por la β - galactosidasa.

Después de la hidrólisis de la lactosa, se forma una mezcla de lactosa, glucosa y galactosa, según el grado de hidrólisis alcanzado.

$$\text{Grado de hidrólisis} = \frac{g \text{ (glucosa + galactosa)}}{g \text{ (lactosa inicial)}} * 100$$

La lactosa es mucho menos soluble que la lactosa hidrolizada. A una temperatura de 25° C una solución acuosa saturada, contiene aproximadamente 20% de lactosa, mientras que la glucosa y la galactosa se disuelven más fácilmente.

La lactosa es el principal azúcar encontrado en la leche y en los sueros de quesería y su procesado por hidrólisis es necesario desde distintos puntos de vista. En primer lugar, al ser un disacárido de gran masa molecular, su adsorción directa al intestino es deficiente, por lo que su hidrólisis en azúcares más sencillos es fundamental para mejorar su aprovechamiento metabólico. Esta hidrólisis tiene lugar principalmente por acción de enzimas con actividad β -galactosidasa. Aunque la mayoría de los mamíferos (los seres humanos entre ellos) tienen niveles adecuados de la β -galactosidasa durante la infancia, en estado adulto la insuficiencia intestinal en β -galactosidasas de grandes grupos de población en el mundo se traduce en una incapacidad para digerir leche u otros productos de origen lácteo, provocando grandes trastornos intestinales, la conocida intolerancia a lactosa. En el intestino delgado existe un gradiente de actividad de la β -galactosidasa media en el duodeno, aumenta en el yeyuno, alcanza el máximo valor en la parte próxima del íleo y desciende distalmente. Hay también diferencias según su ubicación en la vellosidad intestinal, siendo mínima la actividad en la cripta y máxima en el ápice de la vellosidad (Caredu, 1977). Cuando la actividad de la lactasa (β -galactosidasa) es deficiente, la mayor parte de la lactosa ingerida pasa al intestino grueso, donde se convierte en un excelente nutriente para las bacterias presentes. Estas descomponen el azúcar en ácido láctico, hidrógeno, dióxido de carbono y metano. Además la presencia de lactosa en el intestino atrae agua. Este cuadro provoca la imposibilidad de la persona intolerante al consumo de

productos con lactosa, con unos severos síntomas que pueden incluso conducir a la muerte del consumidor.

Por otro lado, incluso la metabolización no adecuada de este producto presenta una serie de serios problemas para el consumidor de leche deficiente en las β - galactosidasas intestinales y en la incapacidad de usar este disacárido como fuente de energía (la lactosa representa el 30% de las calorías que aporta la leche entera y el 60% de la aportación de la leche desnatada).

En cuanto a la preparación de derivados lácteos (p.e., helados) se ve muy dificultada por causa de la baja solubilidad de la lactosa, que hace que la lactosa cristalice muy fácilmente, produciendo problemas en las propiedades textuales del producto final.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la presencia de este disacárido extremadamente reductor en el suero de leche, (p.e., subproducto en la elaboración de quesos), generando un enorme problema de contaminación medio ambiental. Este problema se ve acentuado por las enormes cantidades de este subproducto, que se producen (unos 10 l de suero por kg de queso) y por la enorme demanda bioquímica de oxígeno que produce (en muchos casos, por encima de 400 DBO).

4.1. Mecanismo de acción de la β -galactosidasa

Aunque el resultado más simple y conocido de la lactasa es la hidrólisis del disacárido, esta enzima es realmente una galactosil-transferasa, pudiendo ceder el residuo transferido al agua (lo que correspondería la hidrólisis de la lactosa) a otros azúcares (lo que conduce a la síntesis de oligosacáridos) (Shukla, 1975; Gekas y López-Leiva, 1985; Rouwenhorst y col., 1989; Pivarnik y col., 1995).

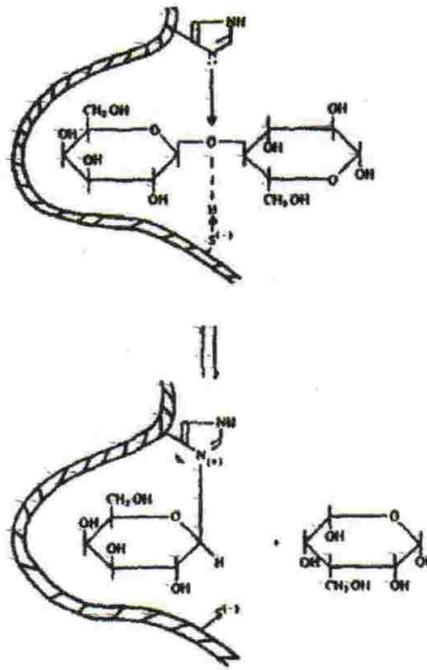


Figura 15. Mecanismo de acción de la β-galactosidasa.

El sitio activo de la enzima tiene un grupo sulfhidrilo y otro imidazol, a los que se une la lactosa, ver figura 15. Del complejo enzima-lactosa, se libera primero la glucosa y luego la galactosa, gracias a una molécula de agua que cede el H⁺ al grupo —SH de la enzima y el OH⁻ al C-1 de la galactosa.

Quien puso nombre a la lactasa fue Beijerinck, quien en 1889 obtuvo un extracto de células que fermentaban lactosa, proveniente de un cultivo de levaduras a las que denominó *Saccharomyces kefir* (ahora *Kluyveromyces marxianus*). El efecto hidrolítico de la enzima, sin embargo, se caracterizó más tarde en 1894 por Fischer (Rouwenhorst y col., 1989).

Extensamente estudiada en *E. coli*, su actividad se evidencia generalmente con un sustrato artificial denominado O - nitrofenil - β - D -galactopiranosido (ONPG) que tras la hidrólisis libera nitrofenol, de color amarillo, detectable colorimétricamente. Menos empleadas son otras técnicas calorimétricas, cromatografías crioscópicas, que utilizan el sustrato natural y miden los monosacáridos liberados (Dahlqvist, 1984; Pivarnik y col., 1995). Cuando la enzima se encuentra ubicada intracelularmente (caso de levaduras y bacterias), el ONPG debe atravesar la membrana plasmática para ser hidrolizado; el paso de esta barrera es lento debido a la baja afinidad que tiene por este sustrato la permeasa implicada en el transporte de la lactosa (Flores y col., 1994; Dickson y Markin, 1980).

La lactasa puede diferir en su localización, por ejemplo en los mohos la secretan extracelularmente, mientras que en levadura y bacterias se encuentra confinada intracelularmente (Shukla, 1975; Castillo, 1990; Zadow, 1992). Los solventes orgánicos (cloroformo, tolueno, etanol, combinados) han sido empleados frecuentemente como agentes permeabilizantes para levadura y bacterias, generalmente a concentraciones del 2% (Serrano y col., 1973; Mahoney y col., 1974; Fenton, 1982; Champluvier y col., 1988; Flores y col., 1994; Siso y col., 1994; Stredansky y col., 1993); también se emplean para este fin detergentes, como Tween 80, Oxygall, Brij 35, Triton X-100, SDS, (sodio dodecil sulfato) CTAB (bromuro deciltrimetilamonio) (Flores y col., 1994; Somkuti y Steinberg, 1994; Bachhawat y col., 1996) o surfactantes como la digitonina (Joshi y col., 1989). Como método enzimático se ha ensayado la utilización de glucanasas, que destruyen la pared y propician la lisis celular (Zomer y col., 1987). Como métodos físicos se ha empleado la ruptura celular por cizalla (Schütte y Kula, 1988), la sonicación (Decleire y col., 1987), y la ruptura por determinados procedimientos de congelación (Flores y col., 1994).

4.2. Origen y actividad de la β -galactosidasa según las fuentes de producción

En el ámbito comercial, la β -galactosidasa se obtiene generalmente a partir de determinadas levaduras y mohos, en las que en la propia célula la enzima está autorizada para el consumo humano o animal por estar incluida en las listas de sustancias "Generalmente Reconocidas como Inocuas" (GRAS) de los Estados Unidos (Gekas y López-Leiva, 1985; Kilara y Patel, 1992; Zadow, 1992; Galarraga y Rocandio, 1997). Las especies más utilizadas como fuente enzimática son *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *K. lactis*, *K. marxianus* (Richmonyd y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Pivamik y col., 1995). Se obtiene también a partir de *E. coli*, pero su uso está limitado a aplicaciones analíticas, estando autorizado su empleo en alimentos (Richmonyd y col., 1981; Gekasy y López-Leiva, 1985). Otros microorganismos de los que se obtiene lactasa son algunas bacterias lácticas (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcusladis*, *Streptococcus thermophilus*) (Shukla, 1975; Galarraga y Rocandio, 1997; Axelsson, 1998) y determinadas especies del género *Bacillus* (Mozaffar y col., 1985; Gekas y López-Leiva, 1985; Pivarnik y col., 1995).

La lactasa puede estar constituida por una o varias subunidades; mientras que *E. coli* posee 4 subunidades (Richmond y col., 1981), se han encontrado de 9 a 10 en *K. marxianus* (Mahoney y Whitaker, 1978); y 2 idénticas en *K. lactis* (Cavaille y Combas, 1995). Los intervalos óptimos de pH varían según el origen y demás

condiciones de reacción (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Gekas y López-Leiva, 1985). Las variantes procedentes de levaduras y bacterias son más activas a pH neutro (6,5- 7) temperatura entre 35 y 40° C, por lo que están indicadas para el uso en leche y sueros dulces. Las de origen fúngico, sin embargo, operan mejor a pH ácido (2,5- 6) y temperaturas superiores a 50° C, y por ello son más adecuadas para el tratamiento de sueros ácidos (Shukla, 1975; Geikas y López-Leiva, 1985; Zadow, 1992; Cavaille y Combas, 1995; Pivarnik y col., 1995). Las enzimas de *K. marxianus*, *K. lactis*, suelen requerir la presencia de algunos cofactores catiónicos, K⁺ Na⁺ o el Mg⁺⁺ según las especies (Davies, 1964; Wendorff y Amundson, 1971; Sonawat y col., 1981; Castillo, 1990; Cavailles y Combas, 1995), y se inhiben en presencia de metales pesados (Wendorff y Amundson, 1971; Itoh y col., 1982; Castillo y Moreno, 1983; Pivarnik y col., 1995). En cambio, las enzimas de *A. niger* y *A. oryzae* parecen menos dependientes de iones activadores (Pivarnik y col., 1995). Las enzimas de ambas frentes se inhiben competitivamente por galactosa no por glucosa (Wendorff y Amundson, 1971; Gekas y López-Leiva, 1985; Cavaille y Combas, 1995; Pivarnik y col., 1995). La elección de un tipo u otro de enzima y su rendimiento, dependen del medio en que se pretenda hidrolizar la lactosa y de las condiciones presentes (Gekas y López-Leiva, 1985; Pivarnik y col., 1995). Para la mayoría de las aplicaciones comerciales se considera aceptable un porcentaje entre un 75 y 85% de hidrólisis de lactosa (Prenosil et col., 1987b; Coton, 1980).

4.3. Producción de β -galactosidasa

La producción industrial de organismos fuente de lactasa casi siempre se ha realizado mediante cultivos sobre subproductos líquidos de la fabricación de alimentos, por ejemplo de productos lácteos (sueros, mazadas, etc.) (González Siso, 1996).

En los cultivos de levaduras en suero para la producción de β -galactosidasa, es frecuente la suplementación con fuentes de nitrógeno, fósforo, minerales traza y/ o vitaminas para mejorar el rendimiento de enzima (Wendorff y col., 1970; Bales y Castillo, 1979; Barbosa y col., 1985; Sánchez y Castillo, 1980; Castillo, 1990). Además, los óptimos de temperatura 20° C y pH (3- 4.5) para obtener el máximo de lactasa suelen ser inferiores a los empleados en la obtención de biomasa (Wendorff y col., 1970).

4.4. Usos del suero de leche hidrolizado

El empleo de leche con la lactosa hidrolizada puede acortar los tiempos de fabricación, proporcionando más sustrato a algunos de los componentes de la microbiota responsable de la maduración de los quesos (Labuschagne y Nieuwoudt, 1978; Farahat y col., 1985; Thakar y col., 1988; Thakar y col., 1992). Muchos microorganismos son incapaces de fermentar la lactosa del suero crecen rápidamente en los productos de su hidrólisis, permitiendo así la obtención de distintos derivados del suero (González Siso, 1996). Este es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* otras levaduras empleadas en la industria agroalimentaria para producir etanol, que son incapaces de fermentar la lactosa si no se hidroliza previamente. El suero hidrolizado se puede emplear, como otras fuentes de azúcares, para enriquecer masas de panadería reduciendo el tiempo de fermentación mejorando las propiedades de aroma y textura (Drobot y Kudrya, 1981; Matveeva y col., 1983; Polandova y col., 1983). El suero hidrolizado se puede emplear también en la fabricación de cerveza, sustituyendo parte a la malta (Henning, 1998; Kosminskiyicol., 1991), y en la fabricación de vinos (Roland y Alm, 1975; Castillo, 1990). También es considerado como un buen sustrato para la producción de goma xantana por parte de *Xanthomonas* (Kilara y Patel, 1992), y para la producción de ácidos orgánicos (propiónico y acético), con *Propionibacterium* (Haddadin y col., 1996). Es posible también producir jarabes de glucosa, fructosa y galactosa, hidrolizando el suero con lactasa de *K. lacti* y añadiendo glucosa isomerasa para transformar parte de la glucosa en fructosa, que es más dulce (Abril y Stull, 1989). Muy diversos microorganismos lactasa-negativos pueden ser cultivados en suero hidrolizado para ser empleados como biomasa (Peciulis y col., 1979; Stineman y col., 1978; Peciulis y col., 1982), o como fuente de aminoácidos (Ko y Chipley, 1983).

Con dichas aplicaciones, se consiguen dos beneficios: valorizar el suero o su permeato y minimizar el efecto contaminante que provoca el vertido de lactosa. La acción de la galactosidasa, sin embargo, no se limita a la hidrólisis. Esta enzima cataliza reacciones de transgalactosidación, transfiriendo O, ya se ha indicado, residuos de galactosa al agua o a distintos azúcares, de manera que se pueden sintetizar galacto oligosacáridos (Gal-OS). La formación de Gal-OS es conocida desde los años 50 (Aronson, 1952; Pazur, 1953) y ha sido estudiada por numerosos autores durante la hidrólisis de la lactosa, tanto con lactasas microbianas, como por hidrólisis ácida (Shukla, 1975; Richmond y col., 1981; Olano y col., 1983; Mozaffar y col., 1985; Kwak y Jeon, 1986; Prenosil y col., 1987a; Prenosil y col., 1987b; Hussein y col., 1989; Zárate y López-Leiva, 1990; Zadow, 1992; López-Leiva y Guzmán, 1995). La

formación de oligosacáridos es mayor durante el proceso de hidrólisis, cuando los tiempos de reacción son cortos y al emplearse altas concentraciones de lactosa y/o sales, temperaturas elevadas o pH alcalino. Se ha observado que las enzimas inmovilizadas producen más oligosacáridos que la lactasa soluble. Incluso la procedencia de la enzima influye sobre la tasa de formación de estos compuestos; las lactasas de mohos parecen producir mayor cantidad de Gal-OS que las de levaduras.

Actualmente, se están empleando lactasas tanto solubles como inmovilizadas, aunque la formación de oligosacáridos ha sido considerada sobretodo como un inconveniente en los tratamientos de hidrólisis, últimamente y debido a sus cualidades como prebióticos (sustancias capaces de estimular la proliferación de la fracción beneficiosa de las bacterias intestinales), los oligosacáridos están adquiriendo gran interés utilizándose, principalmente en Japón, como ingredientes alimentarios en la formulación de alimentos funcionales (Yang y Silva, 1995; López-Leiva y Guzmán, 1995; Onishi y Tanaka, 1998).

5. Reología aplicada a las gomas alimentarias

5.1. Definición e historia de la reología

En 1678 Robert Hooke fue el primero que habló de la reología en su libro “Verdadera teoría de la Elasticidad”. Dicha teoría se resumía en lo siguiente: “Si se dobla la tensión, se dobla deformación”. Nueve años después, Isaac Newton publicó en “Philosophiae Naturalis Principia Mathematica” una hipótesis asociada al estado simple de cizalladura (o corte): “La resistencia derivada de la falta de deslizamiento de las partes de un líquido es proporcional a la velocidad con que se separan unas de otras dentro de él”. Esta necesidad de deslizamiento es lo que ahora se denomina “viscosidad”, sinónimo de fricción interna. Dicha viscosidad es una medida de la resistencia a fluir.

La fuerza por unidad de área que se requiere para el movimiento de un fluido se define como F/A y se denota como “ σ ” (tensión o esfuerzo de cizalla). Según Newton la tensión de cizalla o esfuerzo cortante es proporcional al gradiente de velocidad (du/dy), o también denominado como D . Si se duplica la fuerza, se duplica el gradiente de velocidad:

$$\tau = \mu \cdot \frac{du}{dy} = \mu \cdot D$$

Esta fórmula se denomina *ley de Newton*, que es aplicable actualmente aún para unos fluidos determinados (Newtonianos). La glicerina y el agua son ejemplos muy comunes que obedecen la ley de Newton. Para la glicerina, por ejemplo, la viscosidad vale 1000 mPa·s, en cambio para el agua la viscosidad vale 1 mPa·s.

En esta época apareció la ley de Hooke que fue de aplicación para el estudio de la reología de sustancias sólidas:

$$\sigma = G \cdot \gamma$$

Siendo: σ : esfuerzo cortante (Pa)

G : módulo de rigidez (Pa).

γ : deformación (%).

La fórmula nos dice que si se aplica una carga σ sobre un cuerpo sólido, éste va a sufrir una cierta deformación γ . El valor de dicha deformación se mantendrá hasta que cese el esfuerzo aplicado. Es decir, establece que la fuerza aplicada es directamente proporcional a la deformación.

Hace 300 años los estudios relacionados con la reología se reducían a aplicar la ley de Newton para líquidos y la ley de Hooke para sólidos. Fue a partir del siglo XIX cuando los científicos comenzaron a tener dudas acerca de la validez universal de estas leyes lineales.

En 1835 W. Weber llevó a cabo una serie de experimentos con gusanos de seda y vio que no eran perfectamente elásticos. Lo que observó fue que una carga longitudinal producía una extensión inmediata, seguida de un posterior alargamiento conforme transcurría el tiempo. Al eliminar la carga se producía una contracción inmediata, seguida de una contracción gradual de la longitud hasta llegar a la inicial. Estas características se asocian a la respuesta de un líquido, exhibiendo propiedades viscosas y elásticas simultáneamente.

En 1867 J.C Maxwell, en su artículo “Sobre la teoría dinámica de los gases”, incluido en la Enciclopedia Británica, propuso un modelo matemático para describir los fluidos que poseen propiedades elásticas, es decir, elementos asociados a la respuesta de un sólido:

$$\sigma = \beta \cdot \gamma$$

donde β es un parámetro semejante al módulo de rigidez (parámetro no-nulo). Tanto la conducta que observó Weber en sólidos como Maxwell en líquidos se denominó posteriormente “Viscoelasticidad”.

Después de Maxwell no profundizó más en el estudio hasta la segunda década del siglo XX, apareciendo una serie de modelos lineales (flujo plástico y punto de fluidez) y no lineales de comportamiento.

A partir de la segunda guerra mundial, la reología cobró mucha importancia con la búsqueda de materiales viscoelásticos para lanzallamas. Aparecieron poco a poco modelos que asumieron que tanto el módulo de rigidez podían variar con la

tensión aplicada. Además se observó que la viscosidad también dependía del tiempo (tixotropía y reopexia) y se profundizó en que los materiales reales pueden presentar comportamiento viscoso, elástico, o una combinación de ambos.

En 1945 M. Reiner definió el número de Deborah, D_e como:

$$D_e = \frac{\tau}{T}$$

En donde “ τ ” es el tiempo característico del material y “ T ” el tiempo característico del proceso de deformación. Si D_e era muy alto se consideraba al material como un sólido elástico, y si D_e era muy bajo se le consideraba como un líquido viscoso.

A partir de ese año, el interés por la reología fue aumentando con la aparición de las fibras sintéticas, plásticos, detergentes, aceites multigrado, pinturas y adhesivos entre otros, estudiándose para ello suspensiones newtonianas tanto diluidas como concentradas.

La reología ha sido muy importante y lo seguirá siendo para el desarrollo de múltiples industrias, como por ejemplo la industria farmacéutica y alimentaria, así que es de gran relevancia un estudio minucioso de ésta.

5.2. Aplicaciones del estudio de la reología. Importancia de la reología

La importancia de la reología en la industria es vital ya que se aplica en :

- Control de calidad de los alimentos: el control se realiza en la propia línea de producción. Es determinante para la aceptación de productos como patatas fritas, cereales, quesos, aperitivos, yogures, dulces, chocolates, cremas, etc.
- Estudio de la textura y consistencia de productos alimenticios: dichas propiedades son muy importantes a la hora de que un producto sea del agrado del consumidor.

- Producción de pegamentos: el estudio de su plasticidad, de la forma de fluir dentro del recipiente que lo contiene, etc.
- Producción de pinturas: una pintura debe ser esparcida de forma fácil pero sin que escurra.
- Producción de productos cosméticos y de higiene corporal: la duración de una laca sobre el pelo, la distribución de la pasta de dientes por toda la boca, la forma de cómo se esparce una crema, etc. Todas estas características se estudian con la reología para obtener la mayor eficacia del producto.
- Producción de medicamentos: se estudia su estabilidad química, su tiempo de caducidad y su facilidad de extrusión, entre otras.
- Estabilidad de emulsiones y suspensiones.

Por otro lado, el conocimiento adecuado de las propiedades reológicas de los alimentos es muy importante por numerosas razones, entre las que destacan las aplicaciones que se detallan a continuación:

- **Diseño de procesos y equipos en ingeniería:** el conocimiento de las propiedades de comportamiento al flujo y de deformación de los alimentos son imprescindibles en el diseño y dimensionado de equipos tales como cintas transportadoras, tuberías, tanques de almacenamiento, pulverizadores o bombas para el manejo de alimentos (Odigboh y Mohsenin, 1975, Boger y Tiu, 1974; Gorbatov y Gorbatov, 1974). Además, la viscosidad se utiliza para la estimación y cálculo de los fenómenos de transporte de cantidad de movimiento, calor y energía (Jiménez y col., 1987; Gekas, 1992; Saravacos, 1995).
- **Evaluación sensorial:** los datos reológicos pueden ser muy interesantes para modificar el proceso de elaboración o la formulación de un producto final de forma que los parámetros de textura del alimento se encuentren dentro del rango considerado deseable por los consumidores (Shama y Sherman, 1973; Rao y Sureshkumar., 2001; Kokini, 1985).

- **Obtener información sobre la estructura del alimento:** los estudios reológicos pueden aportarnos información que facilite una mejor comprensión de la estructura o de la distribución de los componentes moleculares de los alimentos, especialmente de los componentes macromoleculares, así como para predecir los cambios estructurales durante los procesos de acondicionamiento y elaboración a los que son sometidos (Borwankar y col., 1992; Sherman, 1970).
- **Control de calidad:** las medidas de la viscosidad en continuo son cada vez más importantes en muchas industrias alimentarias con objeto de controlar el buen funcionamiento del proceso productivo, así como la calidad de las materias primas, productos intermedios y acabados. (Kramer y Twigg, 1970; Bourne, 1992).

5.3 La viscosidad

La *viscosidad* se puede definir como una medida de la resistencia a la deformación del fluido, relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad).

$$\tau = \mu \cdot D \quad (\text{ecuación 1})$$

donde,

τ : esfuerzo cortante [mPa].

μ : viscosidad [mPa·s]

D: velocidad de deformación [s^{-1}]

Tipos de viscosidad

Existen tres tipos de viscosidad: la viscosidad dinámica, la viscosidad cinemática y la viscosidad aparente.

La *viscosidad dinámica o absoluta*, denominada " μ " se ha visto anteriormente en la ecuación 1

La *viscosidad aparente* " μ " se define como el cociente entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. Este término es el que se utiliza al hablar de "viscosidad" para fluidos no newtonianos.

El término de viscosidad " ν " denominado *viscosidad cinemática*, que relaciona la viscosidad dinámica con la densidad del fluido utilizado.

La viscosidad puede estar muy afectada por variables como el gradiente de velocidad de deformación, la temperatura y la presión entre otros, siendo éstas las más importantes.

5.4 Tipos de fluidos

Un esquema conciso de los tipos de fluidos existentes en reología es el siguiente:

- Fluidos newtonianos. (proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación).
- Fluidos no newtonianos. (no hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación)
 - Independientes del tiempo
 - Plásticos de Bingham
 - Seudoplásticos
 - Dilatantes
 - Dependientes del tiempo
 - Fluidos tixotrópicos
 - Fluidos reopéticos
 - Fluidos viscoelásticos. (se comportan como líquidos y sólidos, presentando propiedades de ambos).

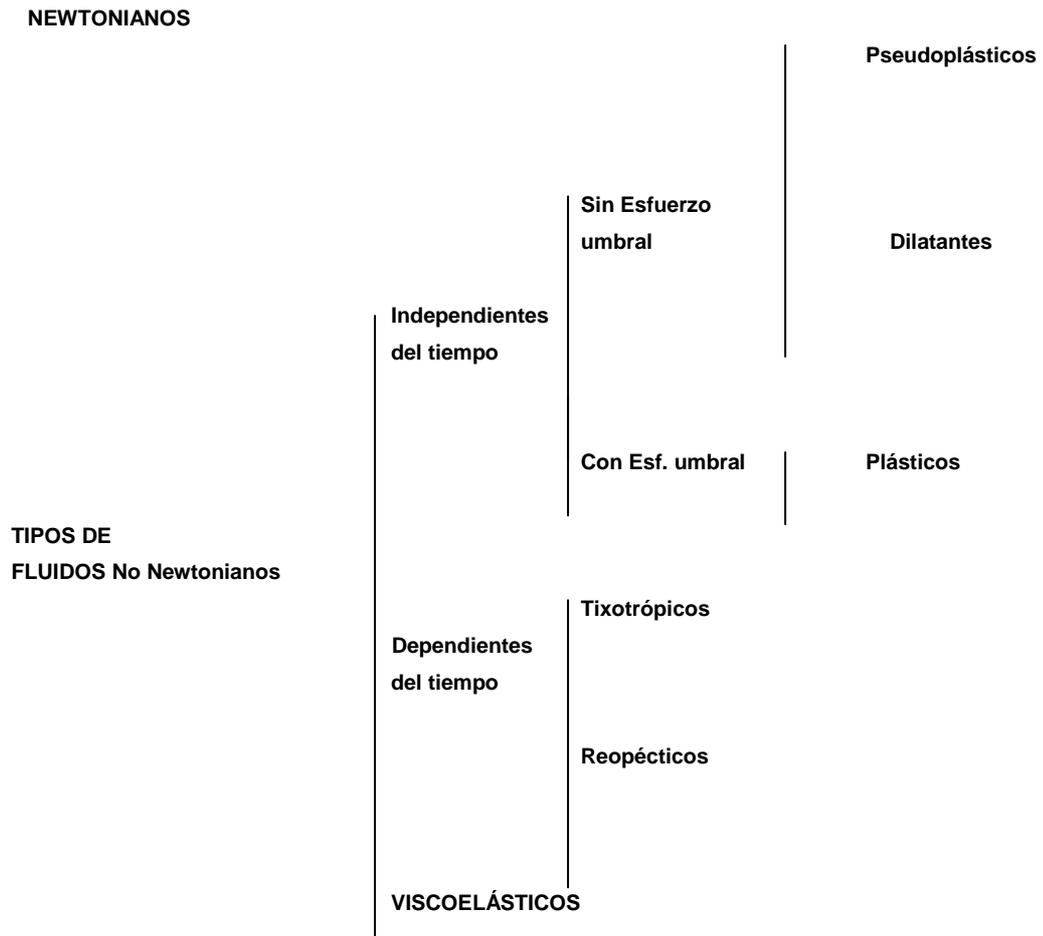


Figura 16. Clasificación de los fluidos.

Fluidos newtonianos

Un fluido newtoniano se caracteriza por cumplir la ley de Newton, es decir, que existe una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación (ecuación anterior). Si por ejemplo se triplica el esfuerzo cortante, la velocidad de deformación se va a triplicar también. Esto es debido a que el término μ (viscosidad) es constante para este tipo de fluidos y no depende del esfuerzo cortante aplicado.

Hay que tener en cuenta también que la viscosidad de un fluido newtoniano no depende del tiempo de aplicación del esfuerzo, aunque sí puede depender tanto de la temperatura como de la presión a la que se encuentre.

Fluidos no newtonianos

Los fluidos no newtonianos son aquellos en los que la relación entre esfuerzo cortante y la velocidad de deformación no es lineal. Estos fluidos a su vez se diferencian en *dependientes e independientes del tiempo*.

Independientes del tiempo

a) Fluidos sin esfuerzo umbral

a.1. Fluidos pseudoplásticos: (shear-thinning)

Este tipo de fluidos se caracterizan por una disminución de su viscosidad, y de su esfuerzo cortante, con la velocidad de deformación. Debido a que cuando tiene lugar una agitación progresiva, las cadenas poliméricas se desenredan y las partículas se alinean a lo largo de líneas de corriente, lo que provoca una disminución de la fricción interna, y de la viscosidad aparente del sistema (Ferguson y Kemblowski, 1991), (Vidal-Bezerra, 2000).

a.2. Fluidos dilatantes: (shear-thickening)

Los fluidos dilatantes son suspensiones en las que se produce un aumento de la viscosidad con la velocidad de deformación, es decir, un aumento del esfuerzo cortante con dicha velocidad. La representa las curvas de fluidez y viscosidad para este tipo de fluidos:

El fenómeno de dilatancia se produce debido al fase dispersa del fluido. En dicho fluido tiene lugar un empaquetamiento de las partículas, dejando a la fase continua casi sin espacio.

Si a continuación se aplica un esfuerzo, el empaquetamiento se altera y los huecos entre las partículas dispersas aumentan. Además, conforme aumenta la velocidad de deformación aplicada, mayor turbulencia aparece y más difícil es el movimiento de la fase continua por los huecos, dando lugar a un mayor esfuerzo cortante (la viscosidad aumenta).

b) Fluidos con esfuerzo umbral, llamados también plásticos (viscoplastic)

Este tipo de fluido se comporta como un sólido hasta que sobrepasa un esfuerzo cortante mínimo (esfuerzo umbral) y a partir de dicho valor se comporta como un líquido.

La razón por la que se comportan así los fluidos plásticos es la gran interacción existente entre las partículas suspendidas en su interior, formando una capa llamada de solvatación. Están formados por dos fases, con una fase dispersa formada por sólidos y burbujas distribuidos en una fase continua.

En estos fluidos, las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno, producen una atracción mutua entre partículas. También aparecen fuerzas de repulsión debidas a potenciales de la misma polaridad.

En este tipo de fluidos se forman coloides cuyas fuerzas repulsivas tienden a formar estructuras de tipo gel. Si las partículas son muy pequeñas poseen entonces una gran superficie específica, rodeados de una *capa de adsorción* formada por moléculas de fase continua. Gracias a esta capa, las partículas inmovilizan gran cantidad de fase continua hasta que no se aplica sobre ellas un esfuerzo cortante determinado

Los fluidos plásticos, a su vez, se diferencian en la existencia de proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación, a partir de su esfuerzo umbral. Si existe proporcionalidad, se denominan fluidos plásticos de Bingham y si no la hay, se denominan solo plásticos.

Fluidos dependientes del tiempo de aplicación

Este tipo de fluidos se clasifican en dos tipos: los fluidos *tixotrópicos*, en los que su viscosidad disminuye al aumentar el tiempo de aplicación del esfuerzo cortante, recuperando su estado inicial después de un reposo prolongado, y los fluidos *reopécticos*, en los cuales su viscosidad aumenta con el tiempo de aplicación de la fuerza y vuelven a su estado anterior tras un tiempo de reposo.

a) Fluidos tixotrópicos

Los fluidos tixotrópicos se caracterizan por un cambio de su estructura interna al aplicar un esfuerzo. Esto produce la rotura de las largas cadenas que forman sus moléculas.

Dichos fluidos, una vez aplicado un estado de cizallamiento (esfuerzo cortante), sólo pueden recuperar su viscosidad inicial tras un tiempo de reposo. La viscosidad va disminuyendo al aplicar una fuerza y acto seguido vuelve a aumentar al cesar dicha fuerza debido a la reconstrucción de sus estructuras y al retraso que se produce para adaptarse al cambio. Aparece un fenómeno de *histéresis*.

Las razones de este comportamiento son diversas. Si se considera al fluido como un sistema disperso, se debe tener en cuenta que las partículas que hay en él poseen diferentes potenciales eléctricos y tienden a formar tres estructuras variadas dependiendo de cómo sea la fase dispersa.

Estos cambios estructurales hacen que disminuya la viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación y que ésta esté muy influenciada por el tiempo. La estructura puede volver a recuperar su forma inicial dejándola un tiempo en reposo. Para diferenciar de forma sencilla un fluido tixotrópico, se aumenta la velocidad de deformación hasta un determinado valor y luego se disminuye hasta el reposo, observando entonces un fenómeno de histéresis, que ayuda a comprender la variación de la viscosidad.

b) Fluidos reopécticos

Los fluidos reopécticos, en cambio, se caracterizan por tener un comportamiento contrario a los tixotrópicos, es decir, que su viscosidad aumenta con el tiempo y con la velocidad de deformación aplicada y presentan una histéresis inversa a estos últimos.

Esto es debido a que si se aplica una fuerza se produce una formación de enlaces intermoleculares conllevando un aumento de la viscosidad, mientras que si cesa ésta se produce una destrucción de los enlaces, dando lugar a una disminución de la viscosidad.

Fluidos viscoelásticos

Los fluidos viscoelásticos se caracterizan por presentar a la vez tanto propiedades viscosas como elásticas. Esta mezcla de propiedades puede ser debida a la existencia en el líquido de moléculas muy largas y flexibles o también a la presencia de partículas líquidas o sólidos dispersos.

OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación se ha caracterizado a lo largo de los últimos años en el seguimiento y realización de una serie de estudios de biorremediación y en el empleo de desechos industriales como medios de cultivos para producir productos de fermentación de valor industrial (Morillo y col., 2007; Morillo y col., 2006; López y Ramos-Cormenzana, 1996; Ramos-Cormenzana y col., 1995), como el alpechín. En anteriores trabajos de otros grupos de investigación, se han ensayado coproductos como el jarabe, la melaza y la pulpa desecada de remolacha, obteniéndose buenos resultados al ser empleados como medios de cultivos para la obtención de EPS microbianos (Aguilera y col., 2008; López y col., 2001).

El principal propósito de este estudio es investigar la posibilidad de mejorar la utilización del suero y permeatos, subproductos de la industria láctea, empleados como sustratos de fermentación, tratando de optimizar las condiciones de cultivo para el uso completo de lactosa a partir de la hidrólisis con β -galactosidasa para la producción de biopolímeros de interés industrial. Es decir, exopolisacáridos microbianos con un amplio abanico de aplicaciones en industrias como la alimentaria, la farmacéutica o en la de extracción del petróleo. Dichos hidrocoloides presentan un elevado precio en el mercado, por lo que se evalúa su producción a partir de materias primas procedentes del proceso de manufacturación del queso, disponibles a bajo o nulo coste.

Se plantearon los siguientes objetivos parciales para la elaboración de esta tesis:

- 1. Estudio de distintas especies productoras de exopolisacáridos, capaces de generar biopolímeros de interés comercial (xantano, curdlano, succinoglucano, pululano), a partir de lactosuero previamente tratado con β galactosidasa.**
- 2. Optimización del proceso de producción del xantano a partir del medio lactosuero tratado con β - galactosidasa.**
- 3. Escalado en la producción del xantano desde nivel de matraz a fermentadores de 1,5 y 20 litros.**
- 4. Análisis de la composición química, propiedades físicas y características de los exopolisacáridos obtenidos con sus homólogos comerciales.**
- 5. Evaluación de la viabilidad económica de los procesos estudiados en comparación con el método de producción tradicional.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y medios empleados

1.1. Cepas bacterianas empleadas

En el presente trabajo de investigación se emplearon las siguientes cepas microbianas detalladas en la tabla 6.

Tabla 6. Cepas productoras de EPS de interés comercial empleadas en el presente trabajo a partir de lactosuero como medio de cultivo.

| Cepa | EPS producido |
|--|---------------|
| <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL 1459 | Goma xantana |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> CECT 4067 (Beijerinck and van Delden 1902) | Curdano |
| <i>Aurobasidium pullulans</i> ATTC 9348 (de Bary) | Pululano |

1.2. Mantenimiento de las cepas

Para la conservación y el mantenimiento de las cepas de *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459 y *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067 se describen en la literatura dos procedimientos (Jeanes y col., 1976).

- Conservación a largo plazo: es un tipo de conservación no propagativa (la bacteria no crece ni se reproduce). Este tipo de conservación se recomienda realizarla liofilizando una pequeña parte del cultivo que se encuentra en condiciones óptimas. También se han descrito otras técnicas como la congelación y la conservación en tiras de papel (Jeanes y col., 1976).

- Conservación a corto plazo: este tipo de conservación es semipropagativa (la bacteria crece y se reproduce). Se realiza en slants (tubos con medio sólido), pero requiere una renovación del cultivo cada quince días (De Vuyst y col., 1987) ya que si no se realizan transferencias del cultivo más o menos frecuentes, la cepa puede degenerar a Sm (Cadmus y col., 1976).



Figura 17.
Aspecto de las colonias *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067 tras 48 horas de la siembra en medio YM-agar.



Figura 18.
Aspecto de las colonias *Aureobasidium pullulans*



Figura 19.
Aspecto de las colonias *X. campestris* NRRL-B 1459 tras 48h de la siembra en medio YM.



Figura 20.
Aspecto de colonias de *Xanthomonas campestris* tras 48 horas en medio lactosuero al 5%.

Las cepas se mantuvieron según el método recomendado por Jeanes y col. (1976), mediante resiembra semanal en tubos de YM - agar (Difco), incubados a 28° C durante 24h. Los tubos y placas inoculadas, se mantuvieron a 4° C. Además, las cepas se liofilizaron para su conservación a largo plazo.

En el mantenimiento de la cepa y en la preparación de inóculos se empleó medio YM Broth (figura 17,19) con una composición por litro de:

| | |
|----------------------|-----|
| Extracto de levadura | 3g |
| Extracto de malta | 3g |
| Peptona | 5g |
| Dextrosa | 10g |

Y M-Agar: Posee la misma composición de YM-Broth suplementado al 2 % (p/v) de agar bacteriológico.

Las cepas de *Aurobasidium pullulans* (figura 18) se mantuvieron a 4°C en agar patata dextrosa (PDA):

(Harrigan y Mc Cance, 1979). Composición PDA:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Extracto patata concentrado | 200ml |
| Glucosa | 20g |
| Agar | 15g |
| Agua destilada | 1l |

Ajustar el pH del medio a 5,5.

1.3. Medios de cultivo empleado en la producción de EPS

En lo que se refiere a los medios de cultivo diseñado para la producción de los EPS, se emplearon:

- Lactosuero tratado con β galactosidasa procedente de la quesería Sierra Sur (Jaén).
- Lactosuero tratado con β galactosidasa procedente de la mezcla de lactosuero en polvo y agua, la composición y parámetros del suero en polvo se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Composición y parámetros del lactosuero en polvo empleado. Fabricante Proláctea, S.A.

| | |
|----------------|------|
| Humedad | 5% |
| Proteína bruta | 12% |
| Cenizas | 11% |
| Lactosa | 65% |
| Cloruros-NaCl | 4,9% |

- Lactosuero sin tratar con β galactosidasa procedente de la quesería Sierra Sur (Jaén).

- Lactosuero sin tratar con β galactosidasa procedente de la mezcla de lactosuero en polvo y agua.
- Medio "ideal" (García-Ochoa y col., 1992) se detalla en la tabla 8.

Tabla 8. Medio "ideal" (García-Ochoa y col., 1992) El pH se ajustó a 7 añadiendo NaOH.

| | |
|--|---|
| Sacarosa 40g /l | Acido cítrico 2,1 g/l |
| NH ₄ NO ₃ 1,144 g/l | KH ₂ PO ₄ 2,866 g/l |
| MgCl ₂ 0,507 g/l | Na ₂ SO ₄ 0,089 g/l |
| H ₃ BO ₃ 0,006 g/l | ZnO 0,006 g/l |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O 0,020 g/l | CaCO ₃ 0,020 g/l |
| HCl 0,13 ml/l | Agua destilada 1000 mL |

- Medio YM (yeast malt).

2. Tratamiento del lactosuero con β -galactosidasa

2.1. Descripción comercial de la Biolactasa ó β - galactosidasa

En este estudio hemos empleado la enzima beta-galactosidasa purificada de *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis*, reconocidas como seguras (GRAS) y aceptadas por agencias de control de alimentos y drogas como la Food and Drug Administration (FDA).

Conocida con el nombre comercial de Biolactasa, se comercializa en forma líquida de color ámbar con unas 50 000 unidades ml⁻¹. Los preparados comerciales de la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa, lactasa o B-galactosidasa, disponibles para usar en alimentación proceden en gran parte de las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces fragilis*. A pesar de los numerosos estudios realizados, la producción y utilización industrial de esta enzima resulta todavía problemática debido a los elevados costos de extracción, pues es intracelular, así como a su baja estabilidad (Gekas y López-Leiva., 1985).

2.2. Determinación del comportamiento y grados de hidrólisis de la β -galactosidasa en función de diversos parámetros.

Grado actividad de hidrólisis según la temperatura

Su efecto se comprobó con preparaciones de enzimas a distintas temperaturas 40, 20, 10, 5 y 0 °C empleando como substratos ONPG y lactosuero, midiendo la actividad a distintos intervalos de tiempo. Se determinaron las curvas de hidrólisis de la lactosa contenida en lactosuero. La concentración final de lactosa fue del 5 % en el lactosuero tratado.

Además, se realizó un exhaustivo estudio para determinar la actividad óptima; a partir de las variables temperatura y tiempo para determinar el grado de hidrólisis de la lactosa presente en el lactosuero tratado, a una concentración de enzima de 1000ppm.

Grado actividad de hidrólisis según el pH.

Se midió la capacidad de hidrólisis a temperatura ambiente de la β -galactosidasa a distintos pH's comprendidos entre 5-8 ajustándolo con solución de HCl y NaOH. Así como su estabilidad a diferentes pH a una temperatura de 30°C con un tiempo de incubación de 5 horas, determinando la actividad residual.

Estabilidad durante su conservación

Para determinar la estabilidad de la β galactosidasa en periodos de almacenaje, se realizaron diferentes medidas de la actividad a diferentes temperaturas de conservación 15, 30, 37 y 0° C a tiempos de 0, 50, 100 y 150 días.

2.3. Tratamiento del suero con β - galactosidasa.

El tratamiento del lactosuero se llevo a cabo en un fermentador o cuba que contenía 25 litros de lactosuero, calentándose hasta los 40° C, posteriormente se añadió la biolactasa manteniéndose a una temperatura de 40° C, durante 4 horas en agitación constante. Posteriormente, se procedió a inactivar la galactosidasa, alcanzando una temperatura de 80 - 85° C durante varios minutos.

2.4. Producción de EPS en matraces con suero lácteo tratado inactivado, tratado sin inactivar y suero sin tratar.

Se realizó un estudio comparativo del suero lácteo tratado con biolactasa sin inactivar térmicamente la enzima y con suero tratado y posteriormente inactivando la enzima por choque térmico. Por otro lado, otra porción de lactosuero no se trató con β -galactosidasa.

3. Métodos de filtración, termización-pasteurización del medio de cultivo lactosuero.

Se ensayaron distintos procesos de esterilización húmeda y filtración para la esterilización-pasteurización de lactosuero tratado como medio de cultivo para la producción de EPS.

1. Filtración: Se procedió a calentar el medio hasta una temperatura 65°C y se filtró a través de filtros estériles con un tamaño de poro comprendido entre $0,45$ y $0,22\mu\text{m}$.
2. Tindalización. El medio lactosuero se calentó entre 80 y 100°C una hora durante tres días con sucesivos periodos de incubación, con la finalidad de que las esporas resistentes germinen durante los periodos de incubación y en la siguiente exposición al calor, las células vegetativas sean destruidas.
3. Pasteurización- termización en autoclave regulando la temperatura entre 85°C - 90°C durante 45 minutos. Se ensayaron a diferentes temperaturas y a distintos tiempos para evitar procesos degradativos y la caramelización del medio.

Las pruebas de esterilización del medio se realizaron por triplicado para cada temperatura y tiempos, en tubos de 10 ml de medio lactosuero. Evaluándose la efectividad del proceso y analizando la esterilidad del medio en placa.

4. Procesos de extracción de los EPS y biomasa.

4.1. Proceso de extracción de la goma xantana producida por *Xanthomonas campestris*

a) Extracción y purificación del EPS y la biomasa.

Una vez obtenido el xantano, queda bastante diluido en el caldo de fermentación, y se encuentra mezclado con una gran variedad de compuestos; componentes del medio utilizado que no ha empleado el microorganismo (sales y nutrientes), las propias células, etc.

La composición de un caldo resultante de una fermentación en la producción de xantano es una mezcla de xantano, de células y de sales y azúcares no consumidos. Además, debido a la presencia de xantano, el medio es muy viscoso, unos 100 Kg/ ms. Por todo ello, la recuperación del xantano del caldo de fermentación no es sencilla, ya que se debe de eliminar cerca del 95% del caldo. Para conseguir este fin se pueden emplear tanto métodos físicos como químicos (Kennedy y Bradshaw, 1984), dentro de los que se encuentran:

- Tratamientos preliminares, enfocados a la degradación y eliminación de las células.
- Precipitación del polisacárido.
- Etapas finales, como son lavado, secado, molienda y envasado.

b) Recuperación del EPS

Al finalizar el periodo de incubación anteriormente descrito en el apartado 5.1 de materiales y métodos, los cultivos bacterianos previamente diluidos, añadiendo 3 volúmenes de agua destilada por uno de cultivo, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos (Centrífuga Sorvall RC-5B, rotor GSA).

Al sobrenadante se le incorpora un 4 % de ClNa, antes de la adición de dos volúmenes de Isopropanol 96% (v/v) frío a - 20 ° C, dejándolo en reposo overnight a 4° C. Se recogió parte del precipitado del material extracelular (EPS) enrollándolo con

una varilla de vidrio, no obstante, se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos para obtener todo el EPS posible y eliminar el alcohol del sobrenadante.

El precipitado se solubilizó en agua destilada, el material extracelular se purificó mediante ultracentrifugación a 50.000 rpm durante 60 minutos (ultracentrífuga Beckman L8-M rotor 50 Ti). Posteriormente, el sobrenadante se sometió de nuevo a un proceso de purificación a través de membranas de diálisis Medicell (Medicell International Ltd, size 7Inf Día 30/32 “– 23.8 30M aprox. MWCO-12-14000 Daltons de tamaño de poro), durante 48 horas. Para finalizar, se realizó un proceso de liofilización durante 48 horas (liofilizador Telstar), para eliminar el agua y poder determinar por gravimetría la producción resultante, todo el proceso de obtención del exopolisacáridos se resume esquemáticamente en la figura 21.

El producto purificado resultante fue el empleado posteriormente, en los estudios químicos y reológicos en el presente estudio.

c) Análisis de biomasa

- Se centrifuga a 10000 rpm durante 30 minutos del cultivo previamente diluido, añadiendo igual volumen de agua destilada. Se recoge el pelet que conforma la biomasa.
- El sobrenadante EPS se conserva a -15° C para análisis posteriores.
- La biomasa de células (pelet) se lava con una solución de KCl 0,2 % peso/volumen con sucesivas centrifugaciones a 7000 rpm durante 20 minutos.
- Se determina el peso seco celular tras la liofilización del pellet.

Método extracción EPS/biomasa

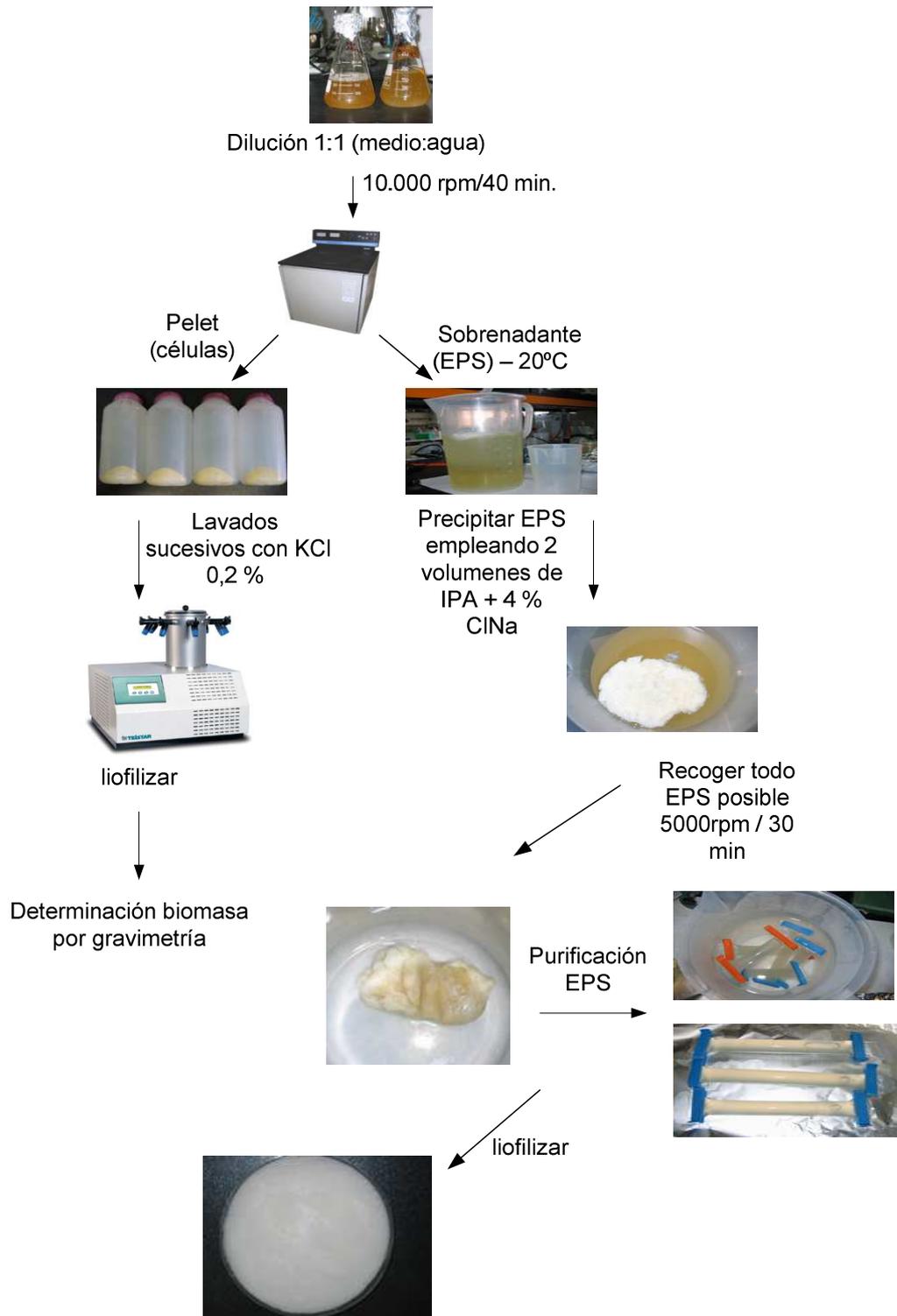


Figura 21. Descripción de la producción de goma xantana a partir de lactosuero tratado

d) Estudio de diferentes metodologías para precipitar la goma xantana.

Con el objetivo de adicionar la menor cantidad de alcohol isopropílico para precipitar la goma xantana, se realizó un estudio comparativo de la eficiencia de diferentes solventes orgánicos polares en la recuperación del xantano, empleando como medio de cultivo lactosuero. A partir de diferentes diluciones con agua destilada, se estudiaron distintos solventes orgánicos: etanol, acetona e isopropanol, mostrándose las distintas proporciones de los solventes empleados en el cultivo para la precipitación de la goma xantana:

- Cultivo sin diluir.
- Cultivo diluido (1:3) con agua destilada.
- Cultivo diluido 1:1 (vol.cultivo: vol. agua destilada).
- Cultivo diluido 1:1 (vol.cultivo: vol. agua destilada), adición de IPA 1:1.
- Cultivo diluido 1:1 (vol.cultivo: vol. agua destilada) adición de IPA 2:1.
- Cultivo diluido 1:3 (vol.cultivo: vol. agua destilada), adición de IPA 1:1.
- Cultivo diluido 1:3 (vol.cultivo: vol. agua destilada) adición de IPA 2:1.
- Cultivo sin diluir, adición de IPA 1:1.
- Cultivo sin diluir, adición de IPA 2:1.

Determinándose posteriormente la producción específica de EPS en las diferentes metodologías aplicadas según el procedimiento descrito en el apartado 4.1 de materiales y métodos.

e) Estudio de la adición de sales en la precipitación del xantano.

La adición de sales al medio reduce notablemente la cantidad de alcohol necesaria para la precipitación del xantano, aunque hay una gran diferencia entre utilizar sales monovalentes, divalentes o trivalentes, cuanto mayor es la carga del catión, menor es la cantidad de alcohol necesaria para obtener la precipitación del xantano.

El tipo de agente empleado depende del uso final del xantano, generalmente el más empleado es el isopropanol en combinación con sales de cationes monovalentes (Sutherland, 1990).

h) Recuperación del alcohol isopropílico tras su empleo.

Para la recuperación del alcohol isopropílico a partir de los caldos de cultivo diluidos, se emplea una destilación al vacío fraccionada rotacional mediante un aparato Bohlin con baño termostático, a partir de un matraz de un volumen de 1 litro y una capacidad de 400 ml, a una temperatura de 40 °C durante 20 minutos.

4.2. Proceso de extracción del curdlano producido por *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067

Se realizaron pruebas con diferentes protocolos de extracción con el fin de determinar el método más eficaz para la extracción del curdlano.

Método A

- 1) Se diluye la muestra con un volumen apropiado de agua destilada y se centrifuga a 5000g a 4°C durante 30 minutos.
- 2) El pellet obtenido conforma las células y el EPS se lava con 0.01 N NaOH y posterior centrifugación.
- 3) Posteriormente, se solubiliza el curdlano añadiendo 0.5N NaOH durante 1h.
- 4) Las células se separan por centrifugación a 5000g durante 30 min.
- 5) El curdlano presente en el sobrenadante se precipita en condiciones ácidas con un volumen apropiado de 2.0 N HCl.

El procedimiento de extracción se basa en la transición conformacional al producirse cuando la concentración de alcali supera 0.2 N.

Método B

1. Al finalizar el proceso de fermentación en matraz Erlenmeyer con un volumen de 100 ml de medio, se añade al caldo de cultivo 100ml de 1 N de NaOH para disolver el curdlano. Posteriormente el caldo se neutraliza con HCl 5N a fin de precipitar el curdlano.
2. Se centrifuga a 8000g durante 10 min a 4 °C obteniéndose el pellet formado por células y las hebras del EPS.
3. 10 ml de 0.1 N NaOH se añade para disolver selectivamente el curdlano. La solución se agita en vórtex durante 10 min. Recuperando el máximo EPS posible y centrifugándose a 8000g durante 10 min.
(Harada, T., & Misaki, A.1968.)

4.3. Proceso de extracción del succinoglucano producido por *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067

1. Posteriormente al proceso de fermentación, el caldo de cultivo se diluye con agua destilada (1:1 v/v).
2. Se centrifuga a 8000g durante 30 min. a 4 °C.
3. El succinoglucano se precipita a partir del sobrenadante mediante la adición de 2 volúmenes de alcohol isopropílico.
4. El succinoglucano se separa por centrifugación 8000g durante 10 min a 4 °C.
5. El EPS se lava dos veces con alcohol isopropílico.
6. Posteriormente, se somete a un proceso de secado, a 45 °C durante 36 horas para finalmente liofilizar.

5. Optimización de la producción de los EPS de interés industrial a partir de lactosuero.

5.1. Estudio en matraces

Se realizaron estudios previos de la producción de EPS en matraces a partir de distintas condiciones de cultivo del medio lactosuero tratado.

A continuación se detallan las condiciones estándar aplicadas:

Cultivos en matraces erlenmeyer de 500ml de volumen con 100ml de medio lactosuero, incubación a 30° C y 150 rpm durante 72 horas. Cada matraz se inoculó con 10% de inóculo (Densidad óptica 1 y 1,2 a una longitud de onda de 600nm).

Cada ensayo se realizó por triplicado determinándose producción de EPS (g/L) y biomasa celular (PSC/l).

Cámara de flujo

Para la manipulación de microorganismos en condiciones estériles se ha trabajado en una cámara de flujo laminar vertical de la firma TELSTAR modelo MICRO-V, capaz de desarrollar una velocidad de impulsión de 0,45 m/s.

Espectrofotómetro de absorción UV/VIS

La medida de la absorbancia de las muestras se ha realizado mediante el espectrofotómetro PERKIN ELMER, modelo 552 13V/ VIS.

Capacidad de desarrollo de cepas en cultivo sólido

Los inóculos para los ensayos a realizar, se obtuvieron a partir de uno de estos cultivos de microorganismos con una antigüedad no mayor a cuatro días. A partir de una suspensión de células de cada cepa, en tubos con solución estéril, hasta ajustar su densidad óptica a 0,5 en la escala M^cFarland. Empleando estas suspensiones se tomaron 0,1ml, inoculando mediante espátula de Driglasky placas de lactosuero a diferentes concentraciones suplementadas con agar al 2 % (medio sólido) por triplicado. Las placas inoculadas se incubaron a 28° C, realizándose lecturas de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas.

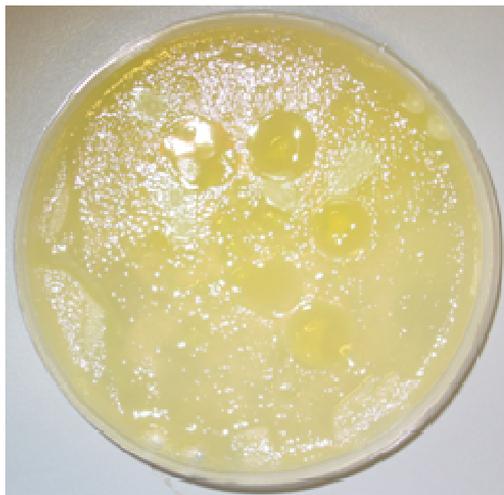


Figura 22. *X. campestris* en medio lactosuero.

Medidas de los diámetros coloniales en medio sólido.

El diámetro de las colonias se midieron transcurridos 72 horas de incubación a 30°C en placas suplementadas YM agar, lactosuero sin tratar (5%), lactosuero tratado (5%). Los resultados obtenidos representan la media de tres repeticiones.

Métodos analíticos en cultivos de lactosuero.

Crecimiento: La viabilidad de las cepas al final del cultivo en medio lactosuero se determinó con la siembra de 0,1 ml en placas agar YM. Incubándose a 30 °C y realizando lecturas a las 24, 48 y 72 horas.

Determinación biomasa: Se determinó gravimétricamente según el método de Moraine y Rogovin (1966). El cultivo se centrifugó a 10000 rpm durante 40 min. En centrifuga Sorvall RC 5B. El sedimento se resuspende en 10 ml de agua destilada con 0,2 ml de KCl en centrifugaciones sucesivas a 7000 rpm durante 20 min. Obteniéndose el sedimento el cual se resuspendió en 5ml de agua destilada transfiriéndose a crisoles tarados, manteniéndose en horno a 105° C durante 12 horas. Posteriormente se pesó en balanza de precisión.

Peso del EPS: El EPS se midió gravimétricamente según el método de Cadmus y col. (1976).

Desarrollo de las cepas en cultivo líquido

En un principio, se realizaron ensayos con matraces Erlenmeyer con el objetivo de estudiar el crecimiento y la viabilidad en la producción de EPS a partir de lactosuero líquido.

Se prepararon matraces de 500ml de capacidad con 90ml a distintas concentraciones de lactosuero en polvo. Se inocularon con 10ml de un cultivo joven (18- 24 horas) en caldo YM, obtenidos a partir de un cultivo incubado a 30° C tras 48h en medio YM agar. Los matraces inoculados se incubaron en agitador orbital durante 72 horas a 30° C y 150 rpm.

Finalmente se determinó mediante las técnicas descritas en la figura 21 , el peso seco de biomasa y EPS, pH y crecimiento en placa se realizaron por triplicado.

Optimización del inóculo.

a) Tiempo de incubación. Curvas de crecimiento

Para la optimización del inóculo y el seguimiento de la biomasa se realizaron curvas de crecimiento de las cepas en los distintos medios de cultivo; medio "ideal", lactosuero tratado, medio YM, a partir de un método turbidimétrico; método óptico basado en la absorbancia que presentan las bacterias en longitudes de onda del espectro visible.

Se prepararon suspensiones de la bacteria en tubos con 10 ml de solución isotónica salina estéril y se compararon con la turbidez equivalente con el tubo número 5 de Mac Farland (concentración celular 10^6 UFC ml⁻¹, a partir de esta suspensión se tomo 1 ml inoculándose a 100ml de los diferentes medios a evaluar. Se realizaron curvas de crecimiento, a partir de la variación de absorbancia medida a distintos tiempos de incubación a una longitud de onda de 600nm, determinado el tiempo en que se encuentra en el punto medio de la fase logarítmica de crecimiento exponencial. Se realizaron tres determinaciones independientes.

Como el crecimiento bacteriano es logarítmico, se calculó el logaritmo después de 24 h de incubación a 30° C, se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro (log10UFC/mL). Se realizaron medidas en las

variaciones de absorbancia, para determinar en que medio presentaba un mayor crecimiento y adaptación.

En la toma de muestras se diluyen con agua destilada, de modo que la absorbancia medida se encuentre dentro de la región lineal de la curva de calibrado. El valor de absorbancia obtenido a 600nm es convertido a concentración mediante la ecuación, que luego es corregida de acuerdo a la dilución realizada previamente.

b) Porcentajes del inóculo

Se ensayaron distintos porcentajes de inóculo (5-20%), la preparación del inóculo se realizó tanto en medio YM como en lactosuero tratado al 5% de lactosa.

c) Efecto de la edad y porcentaje del inóculo.

La edad del inóculo empleado es un parámetro de suma importancia en cualquier estudio de fermentación.

El rango de porcentaje de inóculo estudiado fue de 5-20%. Determinándose la concentración de inóculo más efectiva tanto en matraz como en fermentador.

Producción de EPS a diferentes concentraciones de lactosuero tratado

Se ensayaron las siguientes concentraciones en medio lactosuero tratado 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5,6, 8 y al 10 % (p/V) empleadas para la producción de EPS en un biorreactor de 2 litros a una temperatura de 30 °C. Adicionando un inóculo al 10% (v/v) de un cultivo joven a cada uno de los substratos. Evaluando al cabo de tres días de fermentación, por triplicado, la producción específica para cada una de las concentraciones de lactosuero tratado empleadas como cultivos.

Producción de EPS en función de temperaturas incubación y velocidades de agitación.

a) Temperatura de incubación

A partir de lactosuero al 5% de lactosa tratada, se ensayó la influencia en la incubación en matraces Erlenmeyers a distintas temperaturas: 25, 30 y 33° C durante 72 horas.

b) Agitación

Se ensayaron el efecto de diferentes velocidades de agitación en orbital entre 100-150 rpm en los cultivos desarrollados en matraces, en comparación con cultivos incubados en reposo.

Por otro lado se estudiaron distintas velocidades de agitación 200, 400 y 600 rpm en biorreactor de 1,5 litros de volumen de trabajo, donde la transferencia de oxígeno es un factor limitante a diferencia de la fermentación llevada a cabo en matraces.

Crecimiento de *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium radiobacter*, *Aureobasidium pullulans* y producción de EPS en condiciones de estrés hídrico.

En los siguientes ensayos se procedió a analizar la respuesta en la producción de EPS al reducir la actividad de agua, además del crecimiento del microorganismo en situación de estrés hídrico.

Para reducir la actividad de agua libre en el medio de cultivo, se adicionó diferentes concentraciones de L-prolina (Sigma 99%), ajustando los valores de A_w a 0.98, 0.96 y 0.94 tanto en medio YM como en lactosuero. Se estudio la influencia en el crecimiento y la producción de EPS bajo distintas condiciones de estrés hídrico.

En la segunda parte de este estudio, se realizaron varios ensayos modificando el potencial de agua del medio mediante la adición de glicerol (soluto no iónico) y manipulando el potencial matricial a partir de la adición de PEG8000 (polímero no iónico de larga cadena).

Posteriormente de esterilizar los medios, los valores del potencial de agua y del agua libre (a_w), se midieron con un WP4 Dewpoint PotentialMeter un método fiable y preciso ($\pm 0,1$ Mpa), compuesto por un cámara donde se deposita la muestra, un espejo y un sistema que detecta la condensación de agua en un espejo por una célula fotoeléctrica. Cuando se proyecta un haz de luz sobre el espejo se refleja a la célula del fotodetector, detectando si se ha producido o no dicha condensación, la temperatura es controlada por un cooler termoeléctrico (Peltier).

El Ψ_s se modificó mediante la adición de un soluto no iónico (glicerol) modificándose a unos valores de -2,8 y -0,7 MPa, con una actividad de agua (a_w) de 0.98, 0.95, ver tabla 9.

Las concentraciones de soluto empleadas para modificar la actividad de agua (a_w) o el potencial de agua, fueron obtenidas a partir de los trabajos de Dallyn y Fox, 1980.

Tabla 9. Concentraciones de glicerol empleadas para ajustar el potencial de soluto del medio (Dallyn .H., Fox. A, 1980).

| MPa | Actividad de agua(a_w) | concentración (g glicerol/100ml) |
|-------|----------------------------|-------------------------------------|
| - 0,7 | 0,995 | 2,76 |
| - 2,8 | 0,982 | 9,2 |

Además el medio de cultivo se modifico a diferentes Ψ_m con polietilenglicol 8000 (PEG 8000), en la figura 23, se muestra como se modifica el potencial matricial al adicionar PEG. Se conoce que el PEG actúa predominantemente por fuerzas matriciales (Steuter y col., 1981).

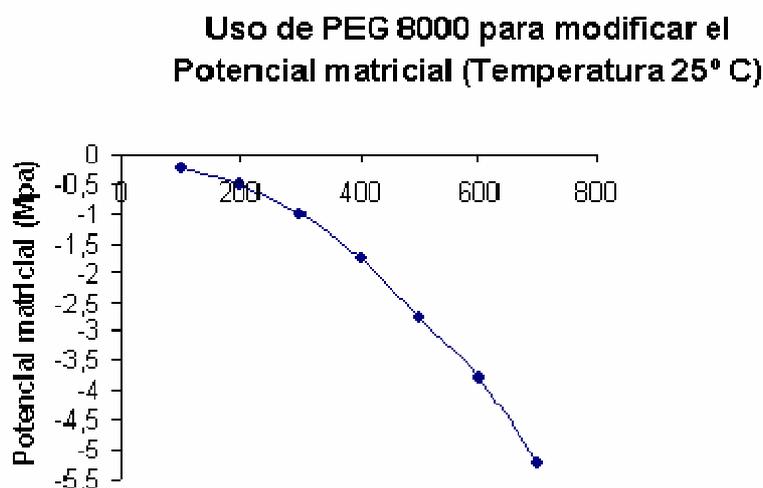


Figura 23. Uso de PEG 8000 para modificar el potencial matricial (Temperatura 25°C) Valores del potencial matricial según concentraciones de PEG 800.

Para modificar el potencial de soluto o matricial del medio de cultivo (Ψ_s , Ψ_m), se emplearon placas petri de 9 cm de diámetro que contenían unos 15 ml de medio YM ó lactosuero, previamente modificado por la adición de compuestos anteriormente

mencionados(L prolina, PEG 8000, glicerol) que varían la actividad de agua. Se prescindió del empleo de agar y se utilizaron discos esteriles absorbente por capilaridad (Nortene; 8,5 cm de diametro, 2mm de grosor), además de discos estériles de poliester empleados como soporte durante el crecimiento micelial de hongo, para posteriormente facilitar la recogida de la masa fúngica. Ambos materiales fueron cubiertos con láminas circulares de celofan estériles.

Las placas se inocularon con agar de 3 mm de diámetro aisladas a partir de un cultivo de 7 días a 25 °C, colocándose en el centro en cada réplica y tratamiento. Las placas se incubaron durante 14 días a 25 °C. Se realizó un seguimiento en el crecimiento tomando regularmente la medidas de los diámetros en ángulos rectos durante un mes, para calcular el índice de crecimiento así como el porcentaje de reducción del crecimiento en relación a los valores de actividad de agua (Mswaka y Magan, 1999). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, una vez evaluados los datos obtenidos, se determino el índice de crecimiento a partir de la parte lineal de la recta de regresión.

5.2. Proceso de producción y escalado en fermentador de 1.5 y de 20 litros del exopolisacárido de Xanthomonas campestris

Producción en fermentador de 1,5 litros de xantano.

Para obtener los datos experimentales necesarios para modelizar la producción de xantano se han realizado experimentos en un biorreactor comercial, empleando una incubadora orbital para la preparación de los inóculos. Además de estos equipos, ha sido necesaria la utilización de otros para conseguir la esterilidad de los medios y las temperaturas programadas en el mantenimiento y crecimiento del microorganismo. También ha sido necesario utilizar y disponer de un buen número de aparatos de medida para analizar la evolución de los diferentes componentes del proceso objeto de estudio.

A partir de los medios descritos anteriormente se llevó a cabo la producción de EPS, en un fermentador de tanque agitado BIOSTAT B (Braun- Biotech, Melsungen AG, Germany) con un vaso de 2 L de volumen constituida por una doble pared de vidrio con camisa para baño termostatizado, ver figura 24, controlando de forma

automática todas las condiciones de cultivo Sistema de Medida y Control de Temperatura: el fermentador BIOSTAT B lleva un controlador PID, con un alto grado de eficacia. La temperatura del medio de cultivo se controla mediante un sensor de temperatura Pt-100, a la vez que un segundo sensor mide la temperatura del fluido calefactor que circula a través de la camisa del reactor. Ambas señales son llevadas al regulador de temperatura que opera sobre el sistema mediante una resistencia de 500 W. La temperatura de operación se selecciona y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de $0,10^{\circ}$ C. La velocidad de agitación se mide por un tacómetro, ajustable entre 0 y 1000 r. p. m., con una resolución de 10 r. p. m. El valor fijado se presenta en un indicador digital y se regula mediante un controlador PI. Sistema de agitación y aireación: la unidad de agitación está formada por un motor de 70 W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de cuatro palas rectas. Este sistema garantiza una velocidad de agitación adecuada en procesos en los que se llega a alcanzar una elevada viscosidad en el caldo.

El pH del medio de cultivo es analizado en línea mediante un electrodo esterilizable, se controla a 7 ± 0.05 , regulado por la acción del controlador sobre sendas bombas de alimentación de álcali o ácido (a partir de las disoluciones de NaOH y HCl 1N), a una temperatura de 28° C \pm 0.1 y agitación de 400 r.p.m. manteniéndose constante durante todo el proceso de fermentación de una duración de 80h.

Se adiciona 1 mL de Polipropilenglicol P2000 al medio de cultivo para evitar la formación excesiva de espuma.

La aireación del medio de cultivo se suministra mediante un compresor, filtrándose a través de una membrana de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Millipore) consiguiendo la esterilización del aire que se introduce en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal, ajustando el caudal de aire mediante una válvula y medido por un rotámetro.

La unidad de fermentación se “esterilizó”/ termizó en autoclave a 90° C durante 45 minutos junto con el medio de producción.

Una vez establecidas los parámetros del cultivo en el fermentador, se adiciona el inóculo obtenido a partir de un preinóculo. Tubos con 10mL de medio de cultivo fueron sembrados con una colonia obtenida por aislamiento en una placa de YM-Agar o lactosuero al 2% agar tras 48 horas de cultivo a 30° C (colonias amarillentas y de

aspecto mucoso). El preinóculo se adicionó a un matraz con 90mL de medio de producción cultivado durante aproximadamente 48 horas constituyendo el inóculo para un volumen final de 1 l en fermentador.

Durante el proceso de fermentación se realiza un seguimiento a 24, 48, 72 y 96 horas.



Figura 24. Fermentador (Electrolab) volumen 2 litros.

Se emplea como medio lactosuero (5%) volumen de 1,5 l a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, agitación 400 RPM, con un flujo de aire 4 -2 l/min (primeras 42 h ,4 l/min posteriormente a 2 l/min).Tiempo total de fermentacion 72 h. Se inoculo 140 ml (aproximadamente 10% del volumen total) de un cultivo joven (24 h) en medio YM.

Durante las 36-42 horas transcurridas del inicio del proceso de fermentación, se produce un considerable aumento de la espuma en el medio de cultivo, requiriendo la adición de antiespumantes. En esta etapa existe un rápido crecimiento adquiriendo el medio una intensa coloración amarillenta como se muestra en la fotografía 24. Al comparar los cultivos desarrollados en matraces con las fermentaciones llevadas a cabo con biorreactores, existen notables diferencias en el medio desde su coloración a la viscosidad, siendo mayores en los reactores.

Efecto del pH en la producción de goma xantana.

Para determinar la importancia del control del pH en fermentador de 2 litros durante todo el proceso de producción de EPS. Se realizaron fermentaciones por

triplicado, en fermentadores con lactosuero tratado como medio de cultivo donde no se controlaba el pH.

Aireación y agitación

Debido a que *Xanthomonas campestris* es una bacteria estrictamente aerobia, la transferencia de oxígeno en la fermentación se convierte en una variable de gran trascendencia. En cada tipo de reactor las variables de operación que pueden afectar a la citada transferencia de oxígeno son diferentes. El reactor más empleado para la producción de xantano es el tipo tanque agitado, las condiciones de operación que más influyen son el caudal de aire y la agitación.

Los valores del caudal de aire empleados son dispares (de 0,3 a 1,5 L/ L/ min), todos los autores mantienen constante la citada variable. Por tanto, la transferencia del oxígeno en el caldo depende únicamente de la velocidad de agitación. Sobre esta última variable citada, hay dos tendencias: por una parte hay autores que la mantienen constante durante toda la fermentación (Souw y Demain, 1980; Pinches y Pallent, 1986; Shu y Yang, 1990 y 1991), mientras que otros la van aumentando a medida que aumenta la viscosidad del caldo (Rogovin y col., 1961 y 1965; Moraine y Rogovin, 1971; Cadmus y col., 1978; Kennedy y col., 1982; Funahashi y col., 1987; De Vuyst y col., 1987; Schweickart y Quinlan, 1989; Pons y col., 1990; Santos, 1993). Ya que según estos últimos, la velocidad de agitación empleada debe ir incrementándose a medida que aumenta la viscosidad del caldo, para mejorar la transferencia del oxígeno, debido a que los microorganismos se encuentran recubiertos de una capa de polisacárido que evita su rotura por efecto de la elevada velocidad de agitación, que es necesario alcanzar para mantener la concentración de oxígeno disuelto a niveles adecuados. Para un caudal de aire constante de 1 l/ min, la velocidad de agitación inicial debe ser de 210 r. p. m. y tiene que ir aumentando a medida que crece la viscosidad del caldo en el biorreactor, hasta alcanzar un valor entre 800 y 1000 r.p.m. En nuestro caso adoptamos una solución de compromiso y optamos por mantener constante la velocidad de agitación a 400 rpm.

Precipitación del xantano

En la etapa de precipitación del xantano, se llevaron a cabo pruebas comparativas disminuyendo la solubilidad de la goma a partir de la adición de alcoholes o cetonas de bajo peso molecular: metanol (Smith, 1983), etanol e

isopropanol (Smith, 1983; Inkson,1979;), acetona (Smith, 1983). Se emplearon tanto individualmente y en combinación con sales (KCl o NaCl).

Ultrapurificación del xantano

Posterior a la obtención de la goma xantana por centrifugación se procede a la evaporación del alcohol isopropílico residual contenido en el sedimento. Se resuspende en 15 ml de agua destilada a una temperatura de 30°C para favorecer su dispersabilidad. Posteriormente, la solución se sometió a un proceso de ultracentrifugación (mediante una centrifuga Beckman L8-M, rotot 50 Ti) a 50000 rpm durante 45 min con el fin de eliminar las impurezas presentes. Seguidamente el sobrenadante se dializó mediante membranas medicell durante 24 horas en agua destilada. Finalmente, se liofilizó resultando un producto purificado empleándose para posteriores análisis y estudios.

Preparación de membranas de diálisis

En la preparación de las membranas de diálisis medicell (Medicell International Ltd, size 7Inf Día 30/32 “– 23.8 30M aprox. MWCO-12-14000 Daltons de tamaño de poro), se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Se cortaron las membranas de diálisis a una longitud de 20-25 cm.
- Se hirvió durante 10 minutos en agua destilada con 2 % de NaHCO₃ y 1mM EDTA (0.0372 %).
- Se lavó con agua destilada.
- Nuevamente se hirvió con 1mM de EDTA en agua destilada.
- Se lavó con agua destilada.
- Las membranas se almacenaron a 4° C en etanol al 70 % o bien dejarlas en la solución anterior (agua destilada con 1mM de EDTA), su almacenamiento en tales condiciones no debe ser superior a un mes, evitando así posibles contaminaciones.
- Antes de su empleo se lavó con abundante agua destilada.

Experimentos de producción de los EPS. Inóculo, proceso de producción del EPS, aireación y características finales del producto resultante.

El inóculo puede prepararse indistintamente con medio YM o lactosuero. La producción de xantano se realiza tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase estacionaria. La mayor producción de xantano se sitúa generalmente al final de la fase exponencial.

En un matraz de un volumen de 500ml que contenía 90ml de medio se le inoculó 10ml (cultivo joven 24h en medio YM), incubándose durante 72h a una temperatura de 30° C en un agitador orbital a 150 rpm, siendo este el inóculo del fermentador.

Pruebas con el biorreactor de 20 l applikon bio bench 20

El escalado de 20 litros se realiza con un fermentador applikon bio bench, ver figura 25, equipado con un Biocontrolador ADI 1030 con la siguientes características:

- Sensor de pH (Z510202010) rango 0-14 pH
Precisión $\pm 0,01$ pH
 $R_{in} > 10^{15} \Omega$
- Sensor de temperatura rango 0-150 °C
Precisión $\pm 0,1$ °C
- Sensor de oxígeno disuelto (electrodo galvánico)
Rango 0-500%(aire)
Precisión $\pm 0,1\%$

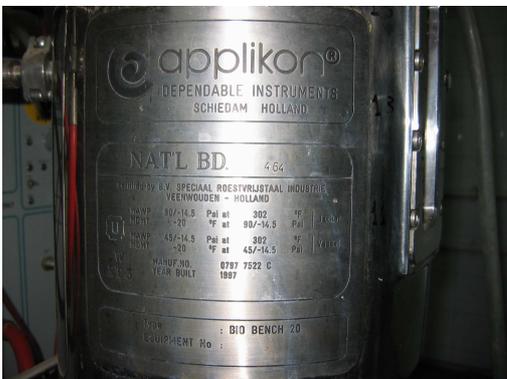


Figura 25. Fotografías biorreactor de 20 l Applikon

Bio Bench 20

Protocolo general de preparación de los biorreactores

Para la preparación e inoculación en el fermentador, se parte de un tubo inclinado del microorganismo inferior a tres días, que mediante asa de siembra se transfiere al medio de crecimiento, formando el inóculo (Erlenmeyer o tubo de ensayo, según proceda). El medio de crecimiento inoculado se cultiva en condiciones óptimas durante 30 - 40 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación del inóculo, de forma estéril se toma una pequeña cantidad para realizar soluciones y conocer las concentraciones de biomasa obtenida, siendo imprescindible para la repetitividad de los resultados obtenidos en diversos experimentos.

Para realizar el proceso de esterilización del fermentador, antes de esterilizar, se colocan los filtros, tanto como para la entrada de aire como para la salida del refrigerante, cubriéndose con papel de aluminio y sellándose mediante cinta adhesiva. Cubriéndose con papel de aluminio el electrodo de oxígeno disuelto, así como todas las entradas de las sondas.

Posteriormente, se termiza a 90°C durante 40 minutos el fermentador junto al medio lactosuero previamente tratado con β galactosidasa en su interior, se deben pinzar las gomas de salida y entradas evitándose así pérdidas del medio. Una vez finalizado el proceso en autoclave, se conecta el fermentador a las unidades de control y al cuerpo. Posteriormente se acopla la entrada y salida del agua a la camisa del reactor y se abre la válvula de llenado. Finalmente se ponen en marcha el agitador, los electrodos y la bomba peristáltica, fijándose todos los parámetros una vez que la temperatura es la deseada.

Finalmente se realiza la inoculación, a través de una membrana preparada al efecto mediante una jeringa estéril.

Protocolo de uso del APPLIKON BIO BENCH 20

Para la calibración del módulo ADI 1030, para el APPIKON BIO BENCH de 20 litros de volumen se sigue el siguiente protocolo:

- 1) Se procede a calibrar el electrodo de pH.
 - Se debe calibrar el electrodo antes de rellenar el biorreactor de medio.
 - Se deben medir la temperatura de los tampones pH4 y Ph7.
 - Se programa dicha temperatura en el ADI 1030 para la corrección y se calibra.
- Manual
 - Calibrar
 - pH
 - Execute/edit
 - T^a buffer: corregir/enter
 - Cont: continuar pide el primer tampón 4.
 - Edit
 - Measuring/Calibr. pH4. Para el segundo tampón no pide T^a de corrección.
 - Cont: pide 2^o buffer 7
 - Edit/measuring/Calibr. pH=7.

- 2) La sonda de T^a se autocalibra.
- 3) Para el electrodo de O₂, se realiza un 0 y 100 teórico. El 0 después de esterilizar y antes de que entre aire. El 100 % antes de inocular, cuando el cultivo está totalmente oxigenado.
- 4) Aireación.
 - Se abre la llave de paso del aire hasta una presión de 1,5 bares.
 - Se abre la llave de entrada de aire al reactor.
 - Se abre la llave de venteo (solo se cierra esta llave para y durante la esterilización y para el test de presión) y la llave de purga del filtro. Esta llave está abierta para la salida de gases, por eso siempre se debe de tener una presión por encima de 0 (1/2 atmosferas) en el reactor para evitar la contaminación externa.
 - Se abre las válvulas que dejan entrar directamente el **aire** al reactor (aireación inferior mediante el sparging **S**, lo ideal es dejarla abierta al máximo). Es preferible la aireación por la parte superior de la cúpula para evitar la subida de espuma dejándola medio abierta.
 - Rotámetro manejo manual entrada de aire.

Tabla 10. Calibración del módulo ADI 1030.

| Control REMOTO Pin-nbr | Función |
|-------------------------------|---------------------|
| 1 | Bomba 1 |
| 2 | Bomba 2 |
| 3 | Bomba 3 o alarma |
| 4 | Rotámetro válvula 1 |
| 5 | Rotámetro válvula 2 |
| 6 | Rotámetro válvula 3 |
| 7 | Rotámetro válvula 4 |
| 8 | Calentador |
| 9 | Enfriador |
| 10 | Alarma |
| 11 | - |
| 12 | - |

Realización del test de presión

Es muy importante realizar el test de presión antes de esterilizar.

- Se mantiene la temperatura controlada a 37 °C (para ello, abrir la entrada de agua de la válvula y conectar la toma de agua a un máximo de 500 KPA (0,5 BAR, 7 PSI) y poner en posición de FERMENT. Se programa el setpoint de T^a a 37 °C PROCESS/SETPOINT/EDIT/37°C/enter.start.
- Se agita al 50 % (500 rpm).
- Al alcanzar los 37°C se cierran todas las llaves de purga y venteo, y se abre la válvula de aire y la de entrada al reactor.
- Se esoera hasta que alcance una presión de 1,2 bar.

- Cerrar la válvula de entrada de aire.
- Esperar 10-15 min. Vigilando la presión, verificar que no existen escapes y se mantiene la presión.
- Superado el test abrir la llave del condensador suavemente.

Proceso de esterilización

- Desconectar las mangueras del refrigerante del ADI (primero la de abajo y posteriormente la de arriba) vaciarla de agua.
- Cerrar todas las válvulas de aire excepto la del venteo que se deja entreabierta.
- Agitación del 50 %.
- Controlar 123 °C
 - PROCESS /SETPOINT/Tª/EDIT 123 °C /enter.
 - Parar todos los controladores
 - Conectar modo esterilización
 - Abrir válvula de vapor (vacío de la camisa es automático)
 - No sobrepasar la presión de entrada a 2 (válvula de seguridad de 2 bares) y la entrada no superior a 1,5 bares.
- Dejar subir la Tª a 105 °C.
- Abrir la válvula del filtro del aire (válvula verde esterilización 5 minutos).
- Cerrar válvula de venteo para alcanzar 123 °C.
- Abrir las válvulas de aireación durante 5 min. para esterilizar conductos.
- Al llegar a 121°C contar 20 minutos.
- Cerrar llave de venteo.
- Abrir tomas pH, antiespumante para esterilizar.
- Antes de que se enfríe el medio calibrar sonda oxígeno.
- Cambiar el interruptor a la posición ferment.
- Cambiar Tª a 30 °C.
- Al bajar a 105 °C purgar los filtros de venteo y aire Durante 5 min. Para evitar contaminación y después cerrar. Cerrar ambas válvulas tras el purgado.

- La llave de entrada del aire abierta por si el sistema cae la presión en ese caso abrir las llaves de la cúpula.
- Cuando esté por debajo de 100°C Conectar el refrigerante gomas del condensador.
- Abrir la válvula de venteo, asegurándose de que existe una presión positiva.

6. Caracterización y composición química de los EPS.

Se evaluaron las características de los EPS obtenidos a partir de los distintos procesos de producción en matraz y fermentador.

6.1. Análisis colorimétricos.

Determinaciones espectrofotométricas.

Determinación de carbohidratos totales (Dubois y col., 1956).

En la realización de la curva patrón se emplearon soluciones de glucosa con una concentración máxima de 100 µg/mL. Los reactivos empleados fueron fenol al 5% y ácido sulfúrico al 97 %.

La hidrólisis del polisacárido se produce por ácido sulfúrico, reaccionando los monómeros con el fenol, dando una coloración amarillenta anaranjada midiéndose la absorbancia a 490 nm. Cuantificándose los monómeros mediante técnica colorimétrica.



Las muestras de EPS se analizan inmediatamente para evitar disminuciones de los rendimientos de la medida.

El máximo de absorbancia para las hexosas es de 485-490 nm, también mediante este método pueden detectarse pentosas, metil pentosas y ácidos urónicos, cuyo máximo de absorbancia es de 480 nm, por lo que con el fin de evitar transferencias, se midieron las muestras a 490 nm.

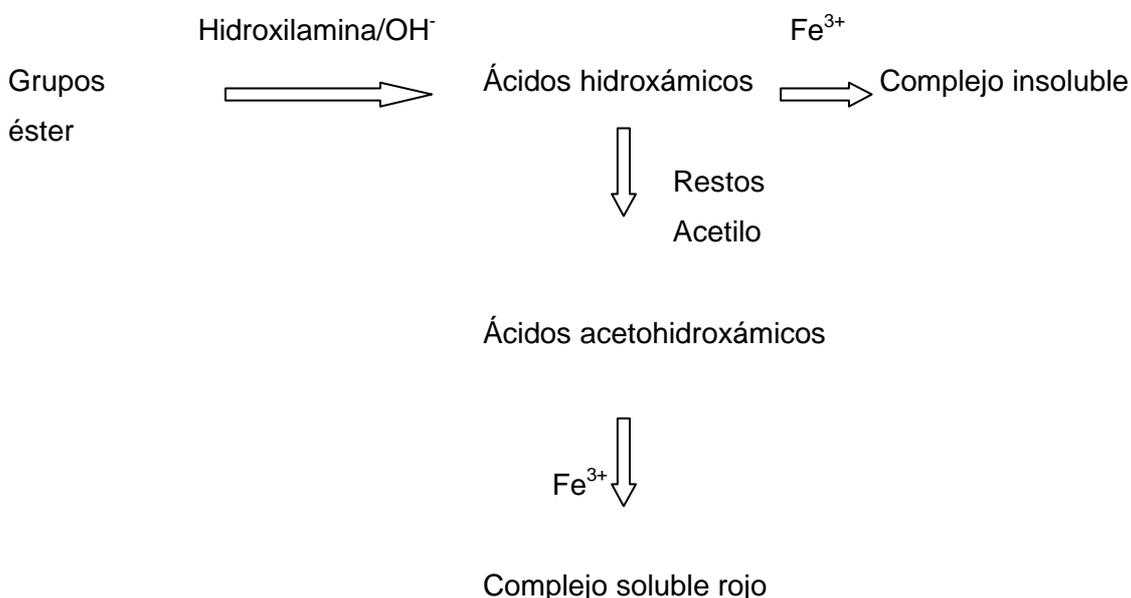
Determinación de grupos acetilo (Hestrin, 1949).

Para el patrón de este ensayo se empleó acetilcolina en forma de clorhidrato (Sigma) tomando una solución inicial de 1mg/ml, a partir de la cual se prepararon diluciones de 100 a 1000 µg/ml. La concentración de las muestras de EPS eran de 1% (p/V).

Los reactivos empleados fueron Clorhidrato de hidroxilamina 1M en NaOH 1.75N; FeCl₃ 0.185 M en HCl 0.1 N y solución de 2V de HCl 35 % y 1V de H₂O.

A 1ml de agua destilada (blanco), solución patrón y muestra, a las concentraciones descritas, se añadió 2 ml del reactivo alcalino de hidroxilamina, se agito y se dejo 5 minutos en reposo. Posteriormente se lleva a pH 1.2 con 1 ml de una solución de HCl:H₂O (2:1 V/V) , añadiendo finalmente 1ml de reactivo FeCl₃ midiendo la absorbancia a 540 nm tras 20 minutos de la adición del reactivo.

Los grupos acetilo reaccionan con la hidroxilamina en medio alcalino originando hidroxamato, que en presencia de FeCl₃ forma un compuesto de color cuya medida a 540 nm es directamente proporcional al contenido de grupos acetilo.



La ley de Lambert-Beer se cumple hasta una concentración de acetilos de 420 µg. Los reactivos deben ser añadidos en el orden estricto descrito en la técnica.

Determinación de ácidos urónicos (Dische, 1962)

Se empleó el método carbazol-ácido sulfúrico, con D-glucurónico lactona (Sigma) como patrón a una concentración de 100µg/mL.

Los reactivos utilizados fueron: tetraborato de sodio al 0,95 % (p/V) en ácido sulfúrico concentrado y carbazol al 0.125 % (p/V) en etanol absoluto.

A 0.25 ml de blanco (agua destilada), patrón o muestra se adiciona en baño de hielo 1.5 ml del reactivo tetraborato de sodio previamente enfriado. La mezcla se agita y se calienta a 100 °C durante 15 minutos. Finalmente se deja enfriar a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 525 nm.

El sulfúrico – tetraborato provoca la hidrólisis del polisacárido y la liberación de los ácidos urónicos, estos reaccionan con el carbazol produciendo el cromógeno cuyo máximo de absorbancia se produce a 525 nm.

Determinación de hexosaminas (Johnson, 1971)

Clorhidrato de glucosamina se emplea como patrón preparándose soluciones de 10 a 100µg/ml.

Los reactivos constituyentes son: acetilacetona (2, 4-pentanodiona) al 4 % (V/V) en solución de Na₂CO₃ 1,5 N, p-dimetilaminobenzaldehído al 2,67 % en una solución de etanol: HCl (1:1V/V) y etanol 95%.

Previamente las muestras se hidrolizan con HCl a 4N a 100° C durante 4 horas. Se evapora a sequedad en atmosfera de argón. Las muestras se preparan a concentraciones de 500 µg/ml.

A 0,2 ml de blanco, patrón y muestra se añade 0,2 ml del reactivo de acetilcetona, se calentó la mezcla a 100° C durante 30 min y se enfría a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona 1ml de etanol, se agita y se añade 0,2 ml del reactivo de p-dimetilaminobenzaldeído, agitando y midiendo la absorbancia a 529 nm.

Determinación de ácido pirúvico (Sloneker y Orentas, 1962).

Como patrón se emplea ácido pirúvico preparando soluciones de 10 a 100µg/ml. Los reactivos son: una solución al 0,5 % (p/V) de 2, 4- dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 2 M, acetato de etilo y una solución de carbonato sódico al 12 % (p/V).

El polisacárido (1mg/ml) se hidroliza en 5 mL de ácido clorhídrico 1 M a 100 °C durante 3 h. Una alícuota de 2 ml, así como el blanco (agua destilada) y los patrones, se mezclan con 1ml del reactivo de 2, 4- dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 2 M durante 5 min, formándose la 2, 4 dinitrofenilhidrazona del ácido pirúvico. La mezcla de reacción se extrae con 5 ml de acetato de etilo se obtiene con 3 porciones de 5 ml de una solución de carbonato sódico.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realiza a partir de la producción de un compuesto de color azulado gracias a la formación de un compuesto entre las proteínas y el reactivo de azul de Comassie.

Valoración de proteínas por el método de Lowry

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas, figura 26:

- 1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
- 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

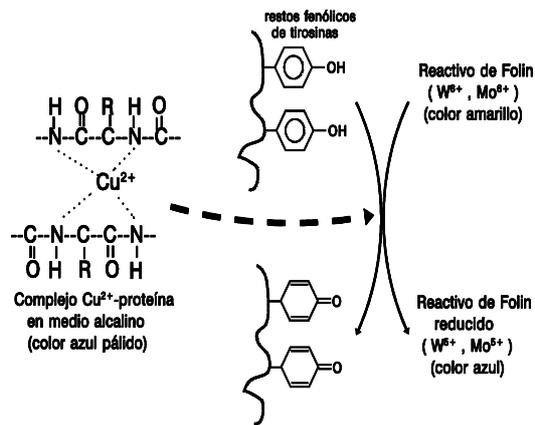


Figura 26. Valoración de proteínas por el método de Lowry.

Reactivos empleados:

- Reactivo A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0,1 M
- Reactivo B₁: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%
- Reactivo B₂: tartrato sódico-potásico al 2%
- Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B₁ y B₂ en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen)
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a 1/4
- Solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración 2 mg/ml
- Muestra problema

Procedimiento experimental

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construye una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón BSA (2 mg/ml). La concentración que tienen las muestras problema se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El tubo 0, que sólo contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del colorímetro a cero de absorbancia.

El método de Lowry para la determinación de la concentración de la proteína es ampliamente utilizado, no obstante puede estar alterado por interferencias de muchas sustancias y productos químicos.

Productos químicos que se sabe que interfiere con el análisis de Lowry: Barbitol

- CASQUILLOS
- Cloruro del cesio
- Citrato
- Cysteine
- Diethanolamine
- Dithiothreitol
- EDTA
- EGTA
- HEPES
- mercaptoethanol
- Nonidet P-40
- Fenol
- Pyrrolidone polivinilo
- Deoxycholate del sodio
- Salicylate del sodio
- Thimerosol
- Tricine
- TRIS
- Tritón X-100

Referencias del método de Lowry Lowry y otros. Biol del J. Quím. 193:265 - 275 (1951).

Determinación de la actividad y concentración de la β -galactosidasa

Para determinar la actividad de la β -galactosidasa se emplea un análogo de la lactosa, ONPG (orto-nitro-fenil-galactosidasa) de acuerdo con el método descrito por Nagy y col. (2001, como se muestra en la figura 27. Este análogo posee en vez de un monosacárido glucosa un "ONP". Al producirse la rotura de la unión entre el ONP y la galactosa mediante la enzima β -galactosidasa, el ONP liberado soluble en agua forma una coloración amarilla brillante.

La actividad de la β -galactosidasa se determina según la cantidad de ONP's liberados mediante técnicas espectrofotométricas. Concentraciones de lactosa y galactosa en suero fueron determinadas por ensayos enzimáticos. La reacción compuesta por 0.5 ml de extracto enzimático y 0.5 ml de o-nitrofenil β -D-galactopiranoside (ONPG) 15mM en tampon fosfato 0.03 M (pH 6.8). Transcurridos 10 minutos a 37 ° C, se añaden 2ml de carbonato sódico 0.1 M para detener la reacción.

La absorbancia se determina a 420 nm con un espectrofotómetro. La actividad de β -galactosidasa es expresada como unidades (μmol de o-nitrofenol liberado por minuto bajo condiciones estándar).

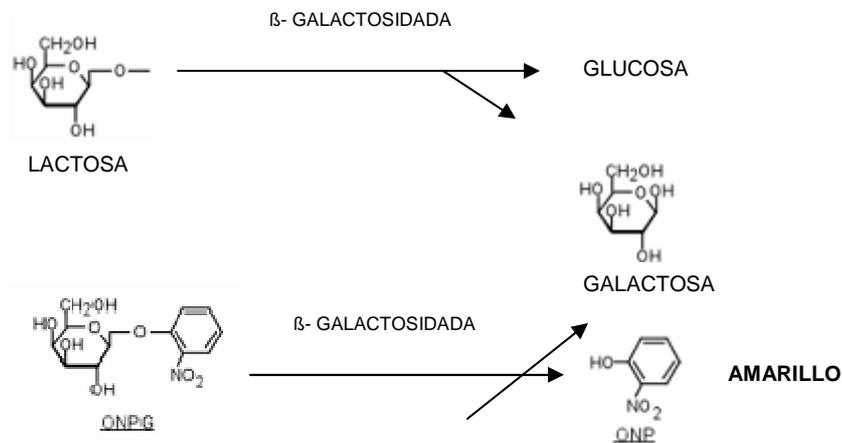


Figura 27. Rotura de la unión entre el ONP y la galactosa mediante la enzima β -galactosidasa, el ONP liberado soluble en agua forma una coloración amarilla brillante.

Reactivos empleados de grado analítico.

Orto-Nitrofenol-beta –galactopiranoside (ONPG) en laboratorio se emplea como un sustituto de la lactosa. Es un compuesto fenólico debe ser manipulado con precaución con la medidas necesarias de seguridad,

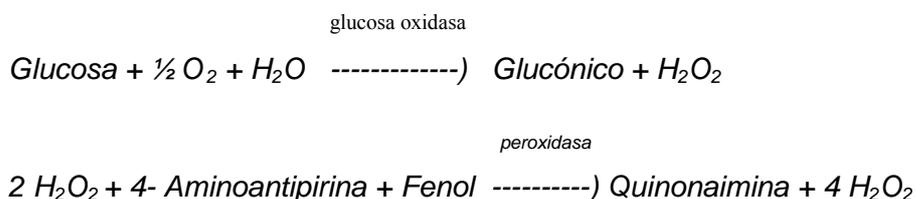
Lactosa $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$

Carbonato sódico

Tampón

La actividad de la β -galactosidasa se mide en sustrato suero lácteo, la cantidad de lactosa hidrolizada se determina con el uso de un Kit de detección de glucosa basado en el Trinder reagent. Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 mmol de glucosa bajo las condiciones de ensayo. La actividad de la enzima fue medida siguiendo la reacción de hidrólisis de lactosa, considerando que se cumple la estequiometría de la reacción, obteniéndose sendas moléculas de glucosa y galactosa por molécula de lactosa hidrolizada. De la misma manera, el grado de hidrólisis se determina midiendo la concentración de glucosa liberada por el método glucosa oxidasa/peroxidasa , empleando para ambos casos un

kit de reactivos para determinación enzimática (Biosystems), midiendo la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic Genesys 5 y comparando con un estándar (Trinder, 1969).



6.2. Determinación del contenido de cenizas

Se denomina así a la materia inorgánica que forma parte constituyente de los productos (sales minerales). Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica del alimento. La calcinación debe efectuarse a una temperatura adecuada, que sea lo suficientemente alta como para que la materia orgánica se destruya totalmente, pero tenemos que observar que la temperatura no sea excesiva para evitar que los compuestos inorgánicos sufran alteración (fusión, descomposición, volatilización o cambio de estructura).

El contenido de cenizas se determina gravimétricamente mediante diferencia de pasada tras desecación de la muestra (EPS liofilizado) en horno a 500°C tras 4 horas.

Equipo y materiales empleados

- 1.- Mufla.
- 2.- crisoles de porcelana.
- 3.- Balanza analítica.
- 4.- Disgregador y pinzas.

Detalles experimentales:

- 1.- Se pesó 2 g de muestra de EPS en un crisol previamente tarado y deshumedecido.
- 2.- El crisol y su contenido se calcinan, primero sobre una llama baja, evitando en lo posible la formación excesiva de hollín, hasta que se carbonice y luego en un horno de mufla a 500° C.
- 3.- Se calcinó en la mufla durante 4 horas. El método más seguro es calcinar hasta peso constante, asegurándose que la ceniza sea blanca o parda. Previamente, al cumplirse los primeros 30 minutos de calcinación, el crisol se dejó enfriar, con el se rompieron las partículas incineradas en forma uniforme y cuidadosamente, nuevamente se

introdujo el crisol en la mufla hasta completar la calcinación durante el tiempo antes mencionado.

4.- Transcurrido el tiempo requerido, el crisol se enfrió a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en un desecador y luego se pesó.

Cálculos

$$\% \text{ CENIZAS} = \frac{\text{CC} - \text{C}}{\text{W}} \times 100$$

Donde: CC = Peso del crisol más la ceniza. C = Peso del crisol vacío. W = Peso de la muestra.

6.3. Porcentaje de humedad del producto.

Se determinaron los contenidos de humedad de los diferentes biopolímeros obtenidos, mediante balanza Cobos (figura 28) que obtiene el contenido de humedad (en porcentaje) de las muestras secándolas por rayos infrarrojos y midiendo los cambios en la masa (muestra) debido a la evaporación.



Figura 28. Fotografía Balanza COBOS para determinar la humedad. el uso de la balanza para hallar el contenido de humedad es determinante para el control de calidad.

6.4. Analisis elemental CHNS

El análisis elemental del EPS obtenido a partir de lactosuero tratado, se realiza en un analizador elemental Fison's Instruments Carlo Erba EA 1108 CHNS O del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que permite la detección simultánea del porcentaje de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en 15 minutos.

Este analizador está compuesto por:

Muestreador automático

Horno

Sistema de detección TCD

Columna cromatográfica

Detector de trazas de azufre

Sistema informático de control, cálculo y tratamiento de datos

Microbalanza de precisión METTLER M-3

Para la determinación, se pesan 2 mg de muestra, se envuelven en una lámina de estaño y se queman al horno a 1.000° C. El estaño al oxidarse hace subir la temperatura a 1.800°C. Los productos de esta reacción se tratan con óxido de wolframio para lograr la oxidación completa de la muestra. Posteriormente, los gases obtenidos se conducen a través de finos alambres de cobre para la obtención de N₂ CO₂ H₂O SO₂. Los gases resultantes se hacen circular por una columna cromatográfica para separarlos, generando una señal en un detector de conductividad térmica (TCD), la información se procesa informáticamente para obtener los resultados definitivos.

6.5. Determinación de los componentes de los EPS por HPLC

La composición en monosacáridos de los exopolisacáridos purificados se determina en base al método propuesto por Chaplin (1982). El polímero purificado (100 g) se somete a metanólisis, consistente en la adición de 200 µ de ácido clorhídrico metanólico 0,9 M y calentamiento de las muestras a 80° C durante 16 horas. La mezcla resultante de metilglicósidos se lleva a sequedad en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. A continuación se somete a un proceso de re-N-acetilación, para lo cual se adicionaron 50 µ de metanol seco, 5 µ de piridina y 5 µ de ácido acético anhidro. Tras el secado de las muestras bajo atmósfera de nitrógeno, se trata con 15 µ de trimetil-silil-imidazol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los glicósidos N-acetilados y transformados se analizan con un cromatógrafo Peri 2000 GLC-FID (Perichom), empleando un gradiente de temperatura de 120-240° C, con un

programa de 6,1° C/min, seguido de elución isotérmica, equipado de una columna BP1 (BP1 fused-silica capillary column, 25m x 32 mm, SGE), y b) con un espectrómetro de masas 8060/MD (Fisons Instruments), equipado de una columna PTE (PTE 5 fused-silica capillary, 30m x 32 mm, Supelco); en este caso el programa del horno incluye una temperatura inicial de 80° C durante 2 minutos, seguido de un aumento de temperatura hasta los 235° C, a razón de 20° C/min, seguido de elución isotérmica. Antes del análisis en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, las muestras se disuelven en 200 µ de hexano y se centrifugan 5 minutos a 5000 rpm.

7. Propiedades físicas de los EPS.

7.1. Análisis de la viscosidad en las soluciones acuosas de EPS.

El EPS empleado para las pruebas reológicas procedieron de muestras purificadas obtenidas a partir de diferentes condiciones de producción, valorándose la utilidad del producto en sistemas alimentarios.

El comportamiento reológico de los EPS afecta a diversos aspectos de la producción a escala industrial, como influencia sobre los fenómenos de transferencia de masa, característica de mezcla durante el proceso de fermentación, recuperación y separación del producto.

Las condiciones generales de fermentación son las siguientes :

- T^a 30° C, pH 7, 400 rpm.
- Medio lactosuero al 5 %.
- Aireación 1,5 L/min de flujo.
- Tiempo en fermentador 72 horas.
- Preinóculo: 10 ml de cultivo YM o lactosuero tratado en fase estacionaria.
- Inóculo :100mL de cultivo lactosuero en fase estacionaria.

Viscosímetros y reómetros empleados.

Los ensayos de reología se llevaron a cabo con el viscosímetro Brookfield LVTDV-II empleando el husillo SC4-18 y el adaptador para pequeñas muestras 13R. Calculándose la velocidad de cizalla a partir de la fórmula 1.32 N, significando N las r.p.m prefijadas en el aparato.

Además del empleo de un reómetro Bohlin CSR 10 de estrés controlado para los barridos de velocidad de cizalla. Los resultados de viscosidad se expresaron en Pa*s siendo $1\text{Pa}\cdot\text{s} = 1\text{ P} = 100\text{ cP}$.

En todos los ensayos realizados se seleccionó el sistema de medida para pequeñas muestras (small simple cell; SSC)

Medidas de viscosidad de los EPS

Se procede a comparar las propiedades reológicas (viscosidades) de la goma xantana comercial (Kelco®), con la obtenida en medio YM y en lactosuero tratado con biolactasa.

A partir de una solución de 1% (p/V) de goma xantana; se vierten 392 ml agua destilada en un vaso de precipitados se adiciona 4 g de cloruro potásico (KCl).

Se utiliza un agitador de hélice. Continuando la agitación a 5000 rpm se adiciona 4g de goma xantana. A medida que aumenta la viscosidad aumenta también la velocidad de agitación, agitándose durante 30 minutos.

La viscosidad se determina a 25° C utilizando un viscosímetro Brookfield LVTDV-II. Cilindro 3,60 medida a 60 rpm, el husillo empleado es el 3 LV. Los resultados son expresados en cP.

7.1.1. Estudio de los parámetros que afectan la viscosidad de las soluciones acuosas de los EPS.

Las propiedades reológicas de los polisacáridos se ven afectadas por variaciones de una serie de factores químicos y físicos:

- Temperatura.
- Concentración del polisacárido.
- pH.
- Disolución en distintos solventes.
- Presencia de sales inorgánicas.

- Efecto de sucesivas congelaciones/descongelaciones.
- Presencia de azúcares y ácidos.

Estudio del efecto de la concentración

Se analizaron las viscosidades y las propiedades reológicas de una serie de soluciones a concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.50 % (p/V) a una temperatura de 25 ° C.

Efecto del pH

Las soluciones de xantano al 1 % (p/V) en agua destilada se llevaron a distintos pH con soluciones de HCl y NaOH hasta valores de pH de (2,3,5,6,7,8,9,10,11) midiéndose la viscosidades de las soluciones a una velocidad de cizalla 39,6 s⁻¹.

Efecto de la temperatura.

Se prepararon disoluciones de xantano al 1% (p/V) alcanzándose distintas temperaturas termostalizadas de (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C) midiéndose su viscosidad con el fin de conocer el grado de termoestabilidad del EPS.

Estudio de la presencia de sales en la solución.

Existen algunos polímeros que producen soluciones muy viscosas en agua destilada que pueden mostrar una significativa disminución de la viscosidad en presencia de sales, debido a la alteración conformacional molecular (Sutherland, 1982), confirmándose grupos cargados en el EPS (Berg y col., 1995).

Se estudio el efecto de la presencia de sales como CNa, KCl y CaCl₂ al 1% (p/V), realizándose un reograma a dichas soluciones determinando la viscosidad a distintas velocidades de cizalla.

Estudio del efecto de conservación a 4°C de diferentes EPS.

A partir de una solución de xantano al 1 % (p/V) se midió la viscosidad (cP) a distintas velocidades de cizalla. Las soluciones se conservaron a 4° C, realizando un seguimiento a los 20, 40, 60 días midiéndose las viscosidades (cP) a temperatura ambiente.

Estudio del efecto de congelación a -20° C y descongelaciones sucesivas.

A partir de disoluciones de xantano al 1 % (p/V) en agua destilada, se determinaron la viscosidad inicial, posteriormente se congelaron realizándose una serie de medidas de la viscosidad tras periodos de congelación y descongelación cada 4 días.

Efecto de esterilización al vapor.

Se estudiaron los efectos de la esterilización de una solución de xantano al 1% (p/V) en autoclave a 112° C durante 30 min., midiéndose la viscosidad inicial y posterior al proceso de esterilización.

7.1.2. Relación entre la viscosidad del caldo con la concentración de xantano

Para relacionar la viscosidad del caldo con la concentración de xantano en el mismo, se realizó el calibrado del método. Según las características del xantano disuelto, la relación entre la viscosidad de la disolución y la concentración de xantano puede ser muy diferente (Casas, 2000); en consecuencia, para calibrar este método de análisis se empleó el propio xantano obtenido en cada experimento para realizar el calibrado. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se toma un caldo resultante de la fermentación y se añade un volumen conocido de alcohol isopropílico (IPA), precipitando el xantano y quedándose en suspensión las bacterias. La relación caldo: IPA es normalmente superior a 1:2,3, debido a que no se empleó ninguna sal para no falsear la medida por pesada. Después de filtrar, lavar y secar, se mantiene en una estufa a temperatura de 50°C, hasta pesada constante. Por otra parte se realizan varias diluciones del caldo de fermentación y se mide su viscosidad a 25 ° C y 30 r. p. m.

7.2. Estudio reológico de las soluciones de EPS.

Tixotropía

Para la determinación del comportamiento tixotrópico de las soluciones de EPS, se sometieron a un gradiente de deformación elevado de 90 s^{-1} durante 5 minutos disminuyendo este hasta 3 s^{-1} durante 10 minutos. Se someten las soluciones a dos ciclos, sin interrupción, durante un periodo de 30 minutos, midiéndose las viscosidades simultáneamente.

Pseudoplasticidad

El estudio del carácter pseudoplástico de las distintas preparaciones de EPS se evaluó mediante el ajuste de los reogramas a un modelo empírico que establece que establece la relación de cizalla (σ) y el gradiente de deformación ($\dot{\gamma}^0$).

El modelo es la ley de potencia o de Ostwald de Waele, según la cual

$$\sigma = K \dot{\gamma}^{0n}$$

Siendo K el índice de consistencia, el cual da idea de la viscosidad del fluido, a mayor más viscosidad, y n es el índice de de pseudoplasticidad, que indica el alejamiento del fluido del comportamiento newtoniano ($n=1$ para fluidos newtonianos perfectos).

Se estudio el efecto de la concentración del polímero y temperatura sobre los parámetros K y n , para los cual se realizó el ajuste de los reogramas obtenidos a distintas concentraciones de polímero (0,5, 0,6, 0,8, 1%) para este modelo empírico y diferentes temperaturas (25, 35, 45 ,55, 70, 90) utilizando el programa del reómetro Bohlin CSR-10.

Fenómeno de histéresis.

El estudio del fenómeno de histéresis se realizó, a partir de una solución de xantano al 1 % (p/V) aumentando y disminuyendo la velocidad de cizalla para estudiar el fenómeno de histéresis. En los todos los ensayos realizados se seleccionó el sistema de medida para pequeñas muestras (small sample cell; SSC).

8. Análisis en sistemas alimentarios de los EPS.

8.1. Estudio del efecto de la disolución en distintos disolventes.

Se llevaron a cabo una serie de experiencias complementarias para comprobar la solubilidad del polisacárido en distintos solventes estudiándose simultáneamente la influencia del factor de agitación en la facilidad de disolución y en la viscosidad de las muestras.

Para analizar mejor las propiedades del polímero se realizaron diversos estudios utilizando como disolvente la leche. Se estudió el comportamiento del exopolisacárido en distintos disolventes como: agua destilada, leche entera y leche desnatada en soluciones preparadas con EPS al 1% (p/V) y las mediciones de viscosidad se realizaron a 30 rpm (39.6 s⁻¹) y temperatura de 25° C. Posteriormente, se hizo un barrido de velocidad de cizalla con la leche entera y las soluciones de EPS al 1 % (p/V) en agua, leche desnatada y entera. Es importante especificar la proporción utilizada ya que el comportamiento reológico del polímero depende de la concentración a la cual se realiza el estudio.

8.2. Características físicoquímicas de las soluciones de xantano y sinergismo con otras gomas.

Se estudió y se realizó un estudio comparativo de las características físicoquímicas de las soluciones de xantano obtenidas a partir del lactosuero y de la goma xantana comercial. Los parámetros generales estudiados fueron los siguientes :

Características organolépticas y color determinadas inmediatamente después de realizar la disolución del xantano.

El pH de las soluciones medido con el aparato de electrodo CRISON pH meter GLP21 con agitación constante.

La solubilidad se clasificó con una puntuación de 0 a 5 de menor a mayor solubilidad, 0 corresponde a muy baja solubilidad y 5 a una alta solubilidad.

La viscosidad se determinó a temperatura ambiente (25° C) mediante un viscosímetro Brookfield LVDV-II.

8.3. Capacidad filmógena, micronización, extensibilidad, grado de hidratación de las soluciones de EPS.

Para el estudio de la capacidad filmógena de las soluciones acuosas al 2% de los diferentes EPS obtenidos y comerciales a evaluar, se realizaron extensiones en cristal mediante un extensiómetro capaz de formar películas de unas 300 µm de espesor.

Es muy importante valorar la capacidad filmógena de los distintos EPS para así poder valorar la aplicación potencial en diferentes sectores de la alimentación. Además de ensayar una serie de propiedades relacionadas, como es la micronización y estabilización de los diferentes componentes no solubles, facilidad de extensión del producto, así como su grado de hidratación determinándose el tiempo de rehidratación de la película en cristal al sumergirse en agua.

8.4. Pruebas de sinergismo de los EPS obtenidos con los carragenatos en la formación de geles.

Desde un punto de vista industrial cabe destacar los carragenatos producidos a partir de las algas rojas, polisacárido con una amplia capacidad de formar geles y estabilizar.

La firmeza de los geles fue analizada objetivamente por un ensayo mecánico de compresión entre dos platos de acuerdo con Mitcham y col. (1998), utilizando un Instron Food Testing Instrument mod. 4501 a una velocidad constante de deformación de 100 mm·min⁻¹, determinando la pendiente (N·mm⁻¹) de la curva fuerza deformación.

Para la formación de los geles se añadió 0,5 g de EPS más 1,5 g de κ-carragenato refinado en 100ml de agua y por otro lado en 100ml de leche entera. Hasta alcanzar una temperatura de 80 °C durante unos minutos, favoreciéndose posteriormente en el enfriamiento la formación de consistencia de gel.

La composición de los k-carragentaos empleados en polvo, contenían mezcla de los siguientes cationes K (6.8%), Ca₂ (2.4%), y Na (0.6%).

Estudio reológico de las soluciones de xantano.

El comportamiento reológico del xantano es de gran importancia, afectando a diferentes aspectos tanto de la producción a escala industrial como su posterior aplicación industrial. Destaca la influencia sobre fenómenos de transparencia de masa, características de mezcla durante el proceso fermentativo, recuperación y separación del producto y la estabilidad de las soluciones de xantano frente a cambios de pH, temperatura, fuerza iónica entre otros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte I

LACTOSUERO Y β- GALACTOSIDASA

1. Problemática y usos actuales del lactosuero

Actualmente uno de los problemas más significativos, como ya se ha comentado anteriormente, respecto a la economía y al impacto medioambiental enfrentados por las industrias lácteas es la disposición del suero de quesería. El lactosuero, contiene un poco más del 25 % de las proteínas de la leche, cerca del 8 % de la materia grasa y del 95 % de la lactosa original. Como es lógico su aprovechamiento es vital, por su alto contenido en nutrientes y evitar contaminaciones al medio ambiente, en términos de composición y de valor energético, los sólidos del lactosuero son comparables a la harina de trigo (Jelen, 1979).

Existen múltiples aplicaciones que posibilitan el aprovechamiento del lactosuero y eleva la rentabilidad de la operación de los queseros. Una de estas áreas, sería el empleo de lactosuero en la producción de polímeros microbianos, con el objetivo de mejorar este residuo industrial para producir un producto de valor añadido, ayudar a disminuir el problema de contaminación ambiental, y eliminar los costos del tratamiento requerido para el suero y su permeato antes de desecharlo.

Por otro lado debemos mencionar el alto coste de los procesos asociados a su aprovechamiento, haciéndolo inviable en muchas queserías de pequeño y mediano tamaño. Es aquí donde deberían intervenir las autoridades competentes, mediante un apoyo económico en la recogida en camiones cisterna de ese lactosuero generado haciendo posible su aprovechamiento al trasladarlo a plantas o queserías dotadas con suficientes medios para procesarlo.

En la industria a diferencia del laboratorio, donde únicamente se busca emplear sustratos que permitan una producción adecuada de EPS, existen otros intereses prioritarios como es la elección de sustratos de bajo coste. La aplicación final del producto sintetizado también condiciona la selección de los sustratos, de ahí que se tienda a utilizar aquellos que sean de adecuada calidad y que contengan el mínimo porcentaje de impurezas (Sutherland, 1990). De acuerdo con estos criterios y junto con los resultados anteriormente comentados, el lactosuero ha sido la fuente de carbono seleccionada por nosotros para la producción de nuestros EPS y para realizar posteriores estudios.

La lactosa se encuentra aproximadamente en un 4,8% en el lactosuero, constituye el azúcar principal tanto en el lactosuero y permeato, aunque no puede ser

empleada como sustrato por muchos microorganismos. *Xanthomonas* es lactosa negativa por lo que no posee unos elevados niveles de β -galactosidasa y el suero empleado como medio de cultivo, contiene una gran cantidad de lactosa como fuente de carbono. Razón por la cual, el residuo debe ser tratado previamente con biolactasa, degradando la lactosa en glucosa y galactosa siendo asimilable por la bacteria *Xanthomonas campestris*, y por otros microorganismos de interés industrial, por tanto su degradación in situ puede ser un tratamiento adecuado, si se realiza a bajo precio.

Con este propósito se ha evaluado la capacidad y el rendimiento de distintos microorganismos en la producción de EPS de interés comercial a partir de lactosuero y permeatos previamente tratados con β -galactosidasa.

En el caso del xantano, y a pesar de que *Xanthomonas campestris* puede utilizar un gran número de fuentes de carbono (Becker y col., 1998), la elección en el mayor número de estudios de producción realizados, así como en los procesos de fermentación industrial es la glucosa, por su coste y fácil biodisponibilidad. Donde los resultados de productividad son mejores que con otros sustratos ensayados, como sacarosa, lactosa, maltosa, fructosa, xilosa o polioles como el inositol y sorbitol (Leela y Sharma, 2000). No obstante como se demuestra en el presente trabajo, aunque obtenemos unos buenos rendimientos en la fermentación de los EPS de interés industrial evaluados, se consigue una menor productividad volumétrica al compararlos con los medios convencionales que se basan en la glucosa como fuente de carbono principal.

Dadas las amplias y diversas posibilidades de utilización que presenta el lactosuero cuya rentabilidad depende de la coyuntura socioeconómica de cada país, este material puede dejar ya de considerarse como un residuo pues ha pasado a constituir un sustrato versátil para las industrias de biotecnología, como queda patente en este trabajo.

2. Estudio y tratamiento del lactosuero con β -galactosidasa

El procesado por hidrólisis de la lactosa que se encuentra en el lactosuero, se hace necesario desde distintos puntos de vista; esta no puede ser empleada como sustrato por muchos microorganismos, además su degradación in situ puede ser un tratamiento adecuado, si se realiza a bajo precio. Con este propósito se ha evaluado la

capacidad y el rendimiento de distintos microorganismos en la producción de EPS de interés comercial a partir de lactosuero y permeatos previamente tratados con β -galactosidasa. Obteniendo unos buenos rendimientos en la fermentación de los EPS, aunque se consigue una menor productividad volumétrica en comparación con los medios convencionales que se basan en glucosa como fuente de carbono principal. Las concentración de 1000 ppm de biolactasa-N con 50.000 unidades comerciales y los parámetros óptimos de actuación de la β -galactosidasa, (T^a 40°C, pH 6,5, tiempo de actuación 4 horas), se determinaron desde un punto de vista de compromiso técnico-económico, siendo un proceso viable a nivel industrial. Con el que se consiguen porcentajes del 94% de hidrólisis total de la lactosa presente en el lactosuero o en el permeato.

2.1. Características y consideraciones de la β -galactosidasa

En este estudio hemos empleado la enzima beta-galactosidasa purificada de *K. fragilis* ya que presenta mayor estabilidad ante variaciones de temperatura y de la concentración de iones que la enzima purificada de la especie *K. lactis* (Mahoney y John, 1978), por lo que resultaría más conveniente utilizar la primera para la hidrólisis de la leche y productos derivados de ella en la industria alimentaria. Además, su aplicabilidad involucra mayoritariamente sistemas alimenticios, por lo que resulta idóneo trabajar con enzimas generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y aceptadas por agencias de control de alimentos y drogas como la Food and Drug Administration (FDA). Actualmente el estatus GRAS es validado sólo para las β -galactosidasa de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* (García y col., 1998).

Incluso, en la actualidad muchos autores aún siendo obsoleto, emplean el término de "lactasa", preferentemente a la nomenclatura galactosidasa. Dicha enzima puede provenir de diversas fuentes aunque la especificidad de esta es muy semejante. Según varios autores (Kulp, 1975) las mejores enzimas comerciales incluyen: *E.coli*; *A.niger* y a partir de la fermentación levaduras (*K.fragilis*, *K.lactis*). El pH y temperatura óptima de actividad varían según las diversas preparaciones comerciales, tabla 11.

Tabla 11. Principales preparados de β -galactosidasas (lactasas) comerciales.

| |
|---|
| Kluyveromyces |
| Gist-Brocades, Holland, (Maxillat). |
| Nutritional Biochemicals Co.Ltd. Cleveland, USA |
| Tokyo Tanabe Co. Ltd. Japan. |

2.2. Estudio de la actividad de la β - galactosidasa. Según T^a , pH y concentración.

Los factores más importantes que afectan a la actividad de la enzima son la concentración de enzima, de sustrato y de productos (inhibidores y activadores), el pH y la temperatura.

Optimización de la concentración de la β - galactosidasa en función del tiempo y temperatura del proceso.

En una primera fase, se procedió a establecer la concentración óptima de β -galactosidasa *K. fragilis* a emplear para hidrolizar el medio lactosuero. Se realizaron estudios previos para determinar y ajustar la dosis viable desde un punto de vista técnico - económico.

El tiempo y la concentración de la enzima se determinaron con el objetivo de obtener un mayor porcentaje de hidrólisis a una temperatura determinada en el menor tiempo posible. Los datos más representativos, se incluyen en la tabla 12.

Tabla 12. Actividad de la biolactasa en lactosuero (5% de lactosa) según distintos parámetros.

| Concentración de BIOLACTASA (ml / l) | Tiempo de reacción (horas) | Temperatura de Reacción (° C) | Grado de Hidrólisis (%) |
|---|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1 | 30 | 20 |
| 1 | 1 | 40 | 50 |
| 1 | 2 | 40 | 87 |
| 1 | 4 | 40 | 94 |
| 1 | 1 | 45 | 60 |
| 1 | 2 | 45 | 90 |
| 1 | 4 | 45 | 95 |

La concentración de la enzima elegida fue de 1 ml l⁻¹ de sustrato (biolactasa-N 50.000 unidades comerciales), debido a que a menores concentraciones la reacción de hidrólisis se ralentizaría demasiado, y a mayores concentraciones el proceso tendría una repercusión económica importante desde un punto de vista industrial y comercial, lo cual podría limitar su aplicabilidad.

Observamos, que la hidrólisis no es completa en ningún caso, incluso a mayores concentraciones enzimáticas, debido a que el principal problema es el elevado grado de inhibición provocada por los dos productos de la reacción, glucosa (inhibidor no competitivo) y la galactosa (inhibidor competitivo). Dada la gran concentración de lactosa inicial, los efectos inhibitorios llegan a ser muy significativos en las últimas etapas de la reacción, dificultando que la reacción pueda llegar a progresar hasta el 100% de hidrólisis de la lactosa.

En aproximadamente dos horas, se hidroliza aproximadamente el 87% de la lactosa del lactosuero, a una concentración de 1000 ppm de sustrato a una temperatura de 40° C.

Curvas de hidrólisis con BIOLACTASA-N 50.000

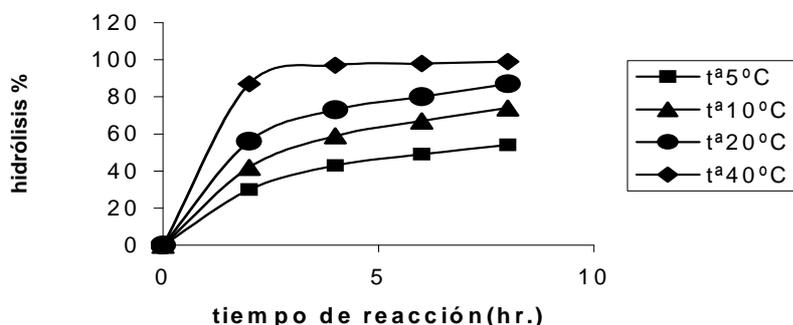


Figura 29. Curvas de hidrólisis con biolactasa – N
(substrato lactosuero 5%lactosa, enzima 1g por 1000ml)

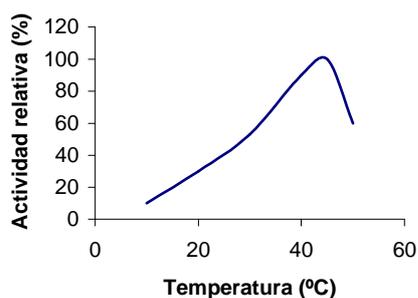


Figura 30. Efecto de la temperatura en la actividad de la biolactasa-N a un pH de 6,5 y a 1000ppm de concentración enzimática

En las reacciones catalizadas por enzimas, y en el caso de una enzima en disolución, al igual que en otras reacciones químicas, la velocidad a la que transcurre el proceso de transformación de los sustratos es mayor al aumentar la temperatura, dado que al incrementar la energía cinética de las especies reactivas al aumentar la temperatura, se produce un mayor número de complejos activos por unidad de tiempo. Su actividad óptima se sitúa a una temperatura de 45°C, como se muestra en la figura 30. La actividad de la biolactasa disminuye en gran medida cuando la temperatura se aleja de su valor óptimo. No obstante, para este estudio se estableció la Tª de trabajo a 40 °C. La reacción de hidrólisis es más rápida en los primeros estadios (1 hora) a 45 °C (ver tabla 12, aunque transcurridas 4 horas de tratamiento los valores de hidrólisis alcanzados son equivalentes en ambas temperaturas 45 y 40 °C. La actividad de la enzima depende de una estructura terciaria muy ordenada mantenida principalmente

por enlaces no covalentes y que permite que el sustrato se acople a la enzima en el sitio activo, si la molécula adquiere suficiente energía estos enlaces no covalentes pueden romperse (desnaturalización), perdiéndose la configuración de la estructura terciaria y, por lo tanto, la actividad catalítica (Henley y Sadana, 1986).

Actividad de la β - galactosidasa en función del pH.

En general, las enzimas son activas en un rango limitado de pH, pudiéndose encontrar dentro de estos valores un pH óptimo. Presenta una actividad máxima a un pH comprendido entre 6 y 6,5 (ver figura 31), al igual que en el caso de la temperatura los valores de pH, que se alejan de su óptimo decrece considerablemente su actividad hidrolítica, presentando mayor estabilidad a un rango de pH comprendido entre 6 y 7, como se representa en la figura 32.

Este comportamiento es debido a la presencia de grupos ionizables de la enzima, de tal forma que los cambios de pH pueden alterar la conformación activa, su capacidad de unión con el sustrato y/o la actividad catalítica de los grupos que conforman el centro activo. Los grupos ionizables del sustrato también pueden ser afectados por el pH, lo que puede resultar importante durante la formación del complejo enzima-sustrato, o el mismo complejo puede protonarse evolucionando hacia una forma inactiva. El pH óptimo para la enzima utilizada se encuentra alrededor de 6,5, coincidiendo con el pH del lactosuero a tratar, adoptándose el mismo como pH de trabajo.

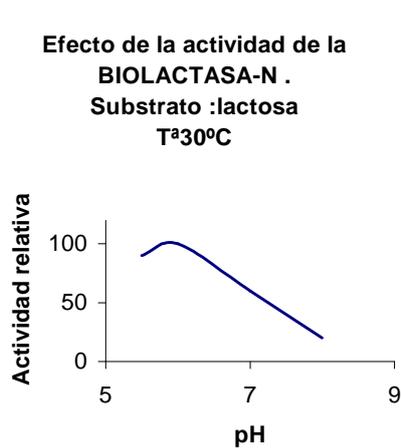


Figura 31. Actividad relativa según pH.

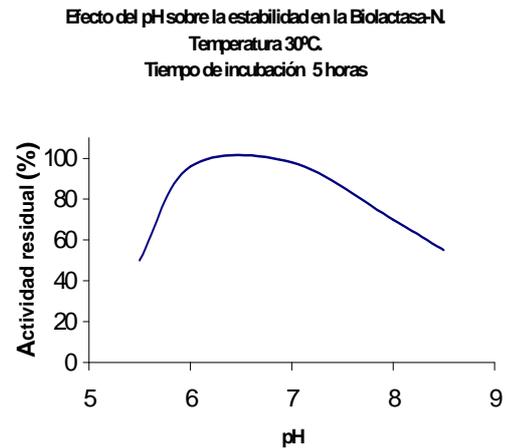


Figura 32. Actividad residual según valores de pH

Estabilidad de almacenamiento de la β - galactosidasa en función del tiempo de conservación.

La β -galactosidasa es estable durante su almacenamiento a una temperatura de aproximadamente de 15° C durante un periodo de cinco meses. En cámara mantiene su actividad normal durante 12 meses. En la figura 33, se representan los valores residuales de actividad de la enzima libre, considerando el valor inicial de la actividad como del 100%.

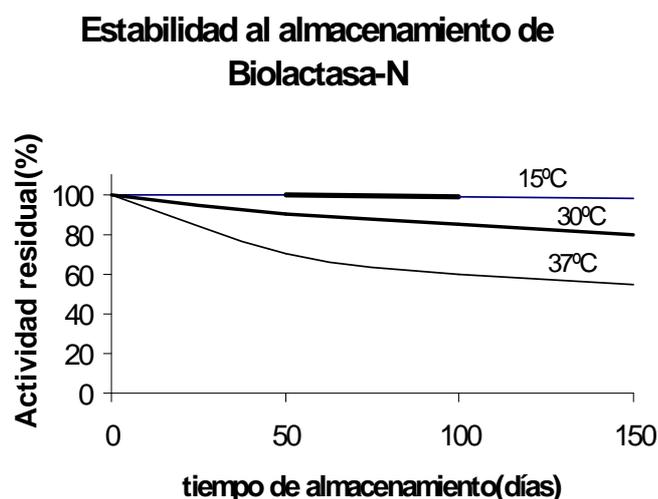


Figura 33. Estabilidad durante el tiempo de almacenamiento a diferente Tª.

A una temperatura de conservación de 30°C, la actividad residual al transcurrir 5 meses desciende en un 20%, cuando la temperatura es de 37 °C el porcentaje se

sitúa entorno al 40%. La pérdida de actividad residual por tanto está estrechamente ligada a temperaturas elevadas de conservación.

Proceso de tratamiento del lactosuero con β -galactosidasa

El tratamiento del lactosuero se llevo a cabo según lo descrito en el apartado 2.3 de materiales y métodos

Una parte del lactosuero, se trató con β -galactosidasa aunque no se procedió a la inactivación térmica de la enzima. Además, una porción de lactosuero no fue tratada con biolactasa, para posteriores ensayos de producción de EPS.

Es importante mencionar, que en una primera fase se realizaron las pruebas con el lactosuero procedente de la quesería de Jaén, aunque existían diferencias de concentración de lactosa entre unos lotes y otros, por lo que finalmente se decidió trabajar con una mezcla de lactosuero en polvo con un 5% en contenido de lactosa, siendo las pruebas de fermentación más fiables al no introducir variables externas en cuanto a la composición del medio.

3. Estudio de los tratamientos de “esterilización – pasteurización” del medio lactosuero.

Como cualquier otro medio de cultivo, antes de iniciarse la fermentación se hace necesario realizar un tratamiento de esterilización o pasteurización del lactosuero. Estos tratamientos, deben ser lo más ajustados para que no desencadenen reacciones indeseables, por ejemplo; pirólisis de los azúcares monosacáridos o caramelización de los azúcares y las reacciones de Maillard. Por esta razón, se ensayaron diferentes estrategias de esterilización; tinalización, filtración y termización, siendo esta última la adoptada. Con una temperatura óptima de esterilización-pasteurización en autoclave entre $85\pm 5^{\circ}$ C durante 35-40 minutos se alcanzaron las condiciones de “esterilidad” requeridas, sin afectar ni degradar el medio lactosuero.

En la tabla 13, se exponen las principales diferencias entre el lactosuero y el permeato. Como vemos la carga microbiológica del lactosuero es considerable en comparación a la del permeato.

Tabla 13. Parámetros físico-químicos- microbiológicos del lactosuero y permeato.

| | SUERO | PERMEATO |
|---------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| pH | 6,5-6,7 | 6,4-6,6 |
| Lactosa(mM) | 100-132 | 110-120 |
| Galactosa(mM) | - | 1-1,5 |
| Proteína(g/l) | 6,9-9,57 | 0,5-0,9 |
| DQO(mg/l) | 72500-7500 | 45000-55000 |
| Microorganismos totales(ufc/ml) | $6,4 \cdot 10^2$ - $7,8 \cdot 10^4$ | 0 |
| Bacterias lácticas | $8,1 \cdot 10^1$ - $1,5 \cdot 10^3$ | 0 |

Es necesario que antes de ser empleado como medio de cultivo, reduzcamos la carga microbiológica del lactosuero al mínimo, para evitar posibles contaminaciones cruzadas durante el proceso de fermentación.

Hay que tener en cuenta que en la industria, es necesario un tratamiento conveniente, para eliminar la contaminación microbiana. Aunque estos tratamientos, deberán ser lo más ajustados para que no desencadenen una serie de reacciones no deseables, como son:

- Destrucción de componentes de importancia nutritiva del medio.
- Aceleraciones de las reacciones entre los azúcares y aminoácidos libres.
- Caramelización de los azúcares.
- Formación de productos tóxicos.

A partir de los diferentes métodos ensayados de esterilización-pasteurización por calor húmedo y filtración del lactosuero, descritos en el apartado 3 de Materiales y Métodos, obtuvimos los siguientes resultados:

3.1. Filtración

A través de este método, los microorganismos quedan retenidos en parte por el pequeño tamaño de los poros del filtro y por adsorción a las paredes del poro, durante su paso a través del filtro debido a la carga eléctrica del filtro y de los microorganismos. Constituyendo un método inviable por generar problemas de contaminación durante la manipulación y por la fácil obturación de los filtros debido a la elevada viscosidad del medio de cultivo.

3.2. Tindalización

Aunque los resultados obtenidos en los ensayos de esterilización fueron esperanzadores, resultó ser un proceso largo y costoso desde un punto de vista energético, con un requerimiento de unas instalaciones complejas y gran demanda de estocaje del medio. Por lo tanto, se concluyó que este método era inviable a nivel industrial.

3.3. Pasteurización/termización

La temperatura óptima de esterilización-pasteurización en autoclave, tras numerosas pruebas se estableció en 85°-90° C. Se ajustaron las variables tiempo - temperatura en busca de la mayor eficiencia, resultando que a una temperatura de 85° C durante 35-40 minutos se lograban las condiciones de "esterilización" requeridas, sin afectar ni degradar el medio lactosuero.

Los problemas originados al aplicar mayores temperaturas que las anteriormente citadas, derivan en una serie de reacciones complejas en el medio. Los

hidratos de carbono, sufren isomerizaciones por las que se forman dobles enlaces y estructuras cíclicas. La presencia de estas estructuras va a dar lugar a condensaciones, compuestos con alto peso molecular polimerizados, que tienen un color marrón que hacen que aparezca un color parduzco, con la consecuente degradación del medio. Esta variación de color se produce principalmente por caramelización, y también debido a las reacciones de Maillard, un complejo grupo de reacciones que dan lugar a la formación de una serie de compuestos pardos denominadas melanoidinas.

La caramelización o pirólisis de los azúcares monosacáridos se da cuando se calienta por encima de su temperatura de fusión, con reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, formándose derivados furanósicos que por polimerización forman pigmentos oscuros. Por lo tanto si se trata de disacáridos (lactosa) debe existir una hidrólisis previa. Los derivados furanósicos como el furfural o el 5-hidroximetilfurfural pueden a su vez reaccionar con compuestos amínicos (reacciones de Maillard RM, figura 34).

La lactosa al tratarse del principal azúcar reductor puede reaccionar con la lisina proteica, dando lugar a la formación de derivados de la desoxicetoxil-lisina, sin que al principio se produzca reacción alguna de pardeamiento.

La reacción de Maillard, implica interacciones entre el grupo carbonilo (en este caso de la lactosa) y un grupo amino (en alimentos generalmente es el grupo E-NH, de la lisina) dando lugar a la formación de una lactulosil.lisina primer componente de la RM que se forma por el reordenamiento de Amadori de la lactulosil.lisina. En etapas más avanzadas los derivados de las desoxicetosas se descomponen dando lugar a premelanoidinas, posteriormente estas se polimerizan para formar melanoidinas solubles e insolubles, que son las responsables del pardeamiento de los alimentos tratados térmicamente y conferirles malos sabores y olores

Mientras que las reacciones de Maillard son deseadas en muchos productos alimentarios por ejemplo en café, en panadería, patatas fritas, etc. en productos lácteos como es el caso del lactosuero, constituyen reacciones negativas debido a la formación de malos olores y sabores, pardeamiento enzimático, pérdida de valor nutritivo entre otros factores.

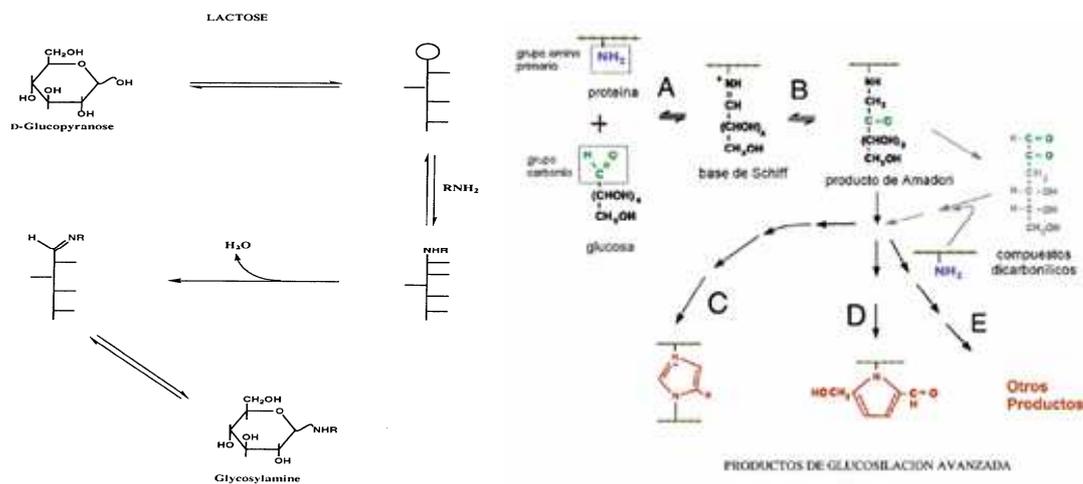


Figura 34. Esquema del proceso de glucosilación no enzimática o glicación. Las primeras etapas reversibles corresponden al reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas iminas (A) Formación de la base de Schiff (B) furanos, piridinas, etc) que constituyen los AGE_s.

Fuente <http://www.ciencia.cl/cienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/index.html>

En conclusión, optamos por la “termización / pasteurización” como el método ideal para tratar el medio lactosuero a partir del cual producir por fermentación diferentes EPS microbianos de interés industrial.

Parte II

ESTUDIO A NIVEL DE MATRACES

Previamente, se deben realizar los estudios oportunos de optimización de la producción de exopolisacáridos microbianos para posteriormente permitir su utilización a nivel industrial. Todo ello comprende un proceso largo y tedioso que normalmente comienza con la producción del polímero en matraces de laboratorio. Según Sutherland (1990; 1998), el microorganismo debe ser cultivado bajo diferentes condiciones, para seleccionar aquellas que determinan una producción óptima y rentable desde el punto de vista de los sustratos empleados y el grado de conversión de los mismos hasta el exopolisacárido, así como unas propiedades adecuadas del biopolímero que se correspondan con un producto final de calidad y competitivo.

Son muchos los estudios llevados a cabo para optimizar la producción y mejorar las propiedades físicas de polisacáridos de interés comercial. Concretamente, la optimización de las condiciones de cultivo y el diseño de un proceso de producción adecuado ha sido objeto de múltiples estudios en el caso del biopolímero por excelencia y de mayor aceptación, el xantano (García-Ochoa y col., 1995, 1997; Umashankar y col., 1996 a y b; Amanullah y col., 1998 a y b; Azuaje y Sánchez, 1999; Casas y col., 2000; Rao y Sureshkumar, 2001).

Debido a la importancia de esta etapa previa a la producción de los exopolisacáridos a nivel industrial, hemos estandarizado las condiciones óptimas de producción para cada polímero objeto de este estudio, teniendo en cuenta básicamente varios criterios de selección, el rendimiento y rentabilidad en la producción.

1. Capacidad de desarrollo de cepas en cultivo sólido

1.1. Efecto de la concentración de lactosuero tratado sobre el crecimiento de *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium radiobacter*, *Aureobasidium pullulans* en medio de cultivo sólido suplementado al 2% con agar - agar

Los estudios se centraron en *Xanthomonas campestris* NRBBL-1459, *Agrobacterium radiobacter* y *Aureobasidium pullulans*, debido a su mayor interés para la producción de EPS a nivel industrial, se inicio el proceso de optimización en la producción de los EPS empleando como medio, lactosuero tratado con β -galactosidasa en medio sólido suplementado con agar- agar al 2%

En la tabla 14, se muestran los resultados del crecimiento colonial de la cepa *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459 en los diferentes medios de cultivo sólido ensayados. Las colonias presentes tanto en medio YM agar como lactosuero tratado con agar, con un color amarillento opaco y de consistencia mucosa, mostraron un tamaño colonial considerable, representando Cepas L (Large, mostradas en las figuras 35 y 36) proporcionando un buen rendimiento en xantano y con un nivel alto de piruvato. Por el contrario, las cepas desarrolladas en medio lactosuero sin tratar con agar, mostraron diámetros coloniales muy inferiores de menos de 1mm, además sin apenas producción de xantano. Estas cepas, llamadas Sm se producen por degeneración de las cepas L, debido a que en el medio lactosuero sin tratar no poseen los nutrientes y fuentes de carbono necesarios para su crecimiento y desarrollo, por lo que existe un envejecimiento y degeneración temprano del cultivo.

Tabla 14. Diámetros coloniales de *X. campestris* NRRL-B 1459 tras 72 h a 30°C en distintos medios de cultivo

| | YM agar | Lactosuero tratado al 5% con agar | Lactosuero sin tratar agar |
|---------------------------|---------|-----------------------------------|----------------------------|
| Diámetros coloniales (mm) | 4,5±0,2 | 4,0±0,3 | 0,9±0,2 |

Tabla 15. Diámetros coloniales de *Agrobacterium radiobacter* tras 72 h a 30°C en distintos medios de cultivo

| | YM agar | Lactosuero tratado al 5% con agar | Lactosuero sin tratar con agar |
|---------------------------|---------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Diámetros coloniales (mm) | 3,1±0,2 | 2,5±0,2 | 1,8±0,2 |

Tabla 16. Índices de crecimiento de *Aureobasidium pullulans* en distintos medios de cultivo.

| | YM agar | Lactosuero tratado al 5% con agar | Lactosuero sin tratar con agar |
|--|---------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Índices de crecimiento (mm día ⁻¹) | 2,4±0,3 | 2,3±0,2 | 0,4±0,2 |



Figura 35. Crecimiento de *X.campestris* (72h), medio lactosuero (5%) suplementado con un 2 % de agar. Formación de grandes colonias convexas amarillentas de *X.campestris*



Figura 36. Cepa L (large): presentan colonias mucoides amarillas brillantes, de 4 a 5 mm de diámetro, *X.campestris*.



Figura 37. Crecimiento de *Aureobasidium pullulans* en medio YM y lactosuero no tratado y lactosuero tratado tras 5 días a 30°C.

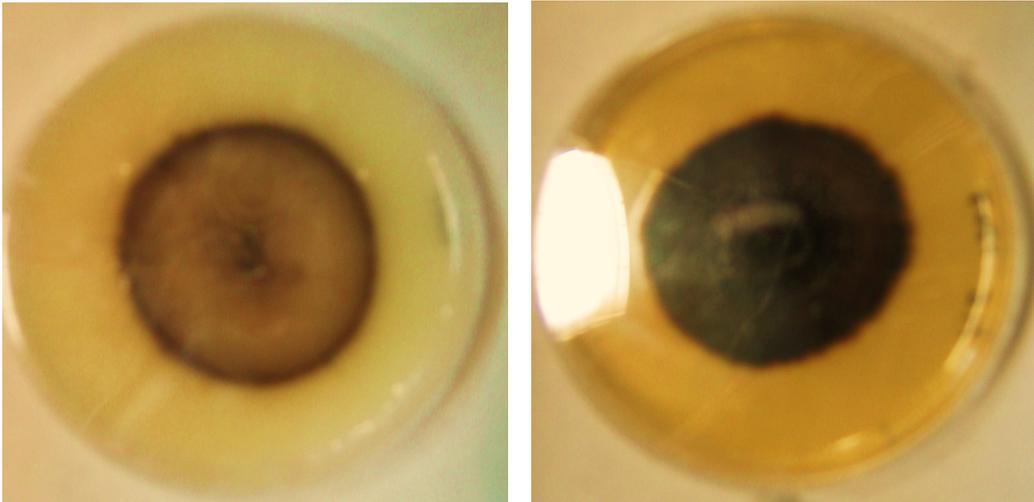


Figura 38. Pigmentación del micelio de *Aureobasidium pullulans* tras 7 y 10 días a 30°C en PDA.



Figura 39. Crecimiento de las Colonias de *Agrobacterium radiobacter* en medio YM y lactosuero tratado (72h a 30°C).

En las siguientes tablas vemos la evolución a lo largo del tiempo de las colonias mucosas de *Xanthomonas campestris* y *Agrobacterium radiobacter* (figura 39) en medio lactosuero sólido a diferentes concentraciones.

Observamos que la bacteria *X. campestris* necesita un periodo mínimo de 24 horas a una temperatura de 30° C para que las colonias sean visibles a concentraciones de lactosuero con un 5% de lactosa hidrolizada, mientras que a concentraciones de lactosa del 2 y 10 % se necesita esperar un mínimo de 48 horas.

Tabla 17. Crecimiento colonial de *Xanthomonas campestris* en medio sólido.

Concentración de lactosuero (V/V) en medio sólido.

¹ Colonias mucosas pequeñas de diámetro inferior a 3mm.

Símbolos: T = tiempo incubación en horas.
+ = crecimiento (+ small) (++)large) (+++very large)
- = no crecimiento

| T(h) a 30°C | 2,5 % lactosuero | 5% lactosuero | 10% lactosuero |
|--------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 24 | - | + | - |
| 48 | + | ++ | + |
| 72 | + | ++ | + |

Tabla 18. Crecimiento colonial de *Agrobacterium radiobacter* en medio sólido.

Concentración de lactosuero (V/V) en medio sólido

¹ Colonias mucosas pequeñas de diámetro inferior a 3mm.

Símbolos: T = tiempo incubación en horas.
+ = crecimiento (+ small) (++)large) (+++very large)
- = no crecimiento

| T(h) a 30°C | 2,5 % lactosuero | 5% lactosuero | 10% lactosuero |
|--------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 24 | - | + | + |
| 48 | + | ++ | ++ |
| 72 | + | ++ | +++ |

Tabla 19. Índices de crecimiento (mm día⁻¹) de *A. pullulans*

Concentración de lactosuero (V/V) en medio sólido

| T(h) a 30°C | 2,5 % lactosuero | 5% lactosuero | 10% lactosuero |
|--|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| Índices de crecimiento (mm día ⁻¹) | 1,4±0,25 | 2,3±0,25 | 2,5±0,25 |

El crecimiento colonial, es mucho mayor a concentraciones de lactosuero con 5 % de lactosa hidrolizada, desarrollándose colonias de más de 4mm de diámetro transcurridas 72 horas. Por el contrario, no se logran crecimientos coloniales mayores

de 2 mm a concentraciones del 2,5 % y al 10%. En un estudio llevado a cabo con el xantano, se evaluó el efecto del porcentaje de glucosa sobre la producción de biopolímero, y se puso de manifiesto que el aporte óptimo de dicha fuente de carbono para la producción de xantano está entre el 1 y 5% (p/v), de modo que mayores porcentajes de este componente resultan inhibitorios y no se produce un aumento en la producción de EPS posiblemente debido a una represión catabólica (Leela y Sharma, 2000). De hecho, *Xanthomonas campestris* metaboliza los azúcares mediante una ruta metabólica central en la que, una vez que se añade la glucosa, se produce primeramente una fosforilación para dar glucosa-6- fosfato que puede incorporarse o bien al metabolismo central en el que es catabolizada hasta piruvato y gliceraldehído 3-fosfato, o bien ser incorporada y utilizada para la producción de polímero. En condiciones de exceso de glucosa en el medio, se induce la activación de una ruta metabólica alternativa consistente en la oxidación directa de la glucosa a gluconato (Lessie y Phibbs, 1984). Bajo estas condiciones es de esperar una disminución de los niveles y con ello menor disponibilidad de glucosa-6-fosfato, necesaria para la producción de EPS, de ahí que el rendimiento en la producción de xantano sea menor. A causa de este fenómeno, los procesos de optimización de producción de xantano han de incluir estrategias que eviten una acumulación excesiva de glucosa en el medio (Lettisse y col., 2001). Otra explicación para el comportamiento de la gran mayoría de bacterias frente a elevados porcentajes de glucosa, podría ser el que a elevadas concentraciones de la fuente de carbono, la bacteria sufra una plasmólisis que provoque que la captación de nutrientes no sea lo suficientemente efectiva. Este fenómeno podría evitarse, y con ello hacer que la bacteria tolere mayores cantidades de azúcar, incorporando de forma gradual concentraciones crecientes de la misma al medio en el que crece el microorganismo cada cierto intervalo de tiempo (Sutherland, comunicación personal). A ello hay que sumar el hecho de que un incremento de la concentración de azúcar puede además traducirse en una utilización ineficaz de la misma al aumentar la síntesis de otros metabolitos en detrimento de la producción de exopolisacárido (Farres y col., 1997).

Sin embargo, otros microorganismos suponen una excepción a este comportamiento general descrito anteriormente frente a la concentración de glucosa. En este caso, a medida que aumentamos la concentración de glucosa en el medio de cultivo, aumenta el crecimiento celular y la producción de exopolisacárido, al igual que se ha descrito, por ejemplo, para *Pediococcus damnosus* IOEB8801 (Walling y col., 2005). Parece que una concentración inicial elevada de glucosa en el medio, estimula la producción de polímero, no sólo por una mejora en el crecimiento celular, sino también porque hay más glucosa disponible para la síntesis de EPS.

En el caso de *A. radiobacter*, las colonias presentaron mayores tamaños al crecer a concentraciones de lactosuero elevadas 10 %, aunque no existen diferencias significativas al crecer a concentraciones del 5%, fotografía 44. *Agrobacterium radiobacter*, es una bacteria aerobia gram negativa que puede emplear una gran cantidad de azúcares como fuente de carbono como sustrato para su crecimiento. Aunque, como se muestra en la tabla 15 puede crecer en medios donde el azúcar mayoritario es la lactosa, por ejemplo, en lactosuero no tratado los crecimientos coloniales son mucho mayores en comparación con *Xanthomonas campestris*, ya que posee unos niveles muy bajos de β galactosidasa. El transporte de lactosa en *A. radiobacter* se realiza vía proteína de unión dependiente del sistema activo de transporte (en contraposición a H⁺ symport y a sistemas fosfotransferasas encontradas en otras bacterias), la expresión de este sistema de transporte está estrechamente unido a la β galactosidasa (Greenwood y col., 1990).

El otro microorganismo evaluado, *Aureobasidium pullulans* es un hongo polimórfico, adoptando formas alargadas filamentosas, grandes clamidosporas y formas celulares como pequeñas elipses como si fuesen levaduras. Una de las características indeseables del hongo, es la producción de pigmentos oscuros, ver fotografía 38, en principio de color verde oscuro virando posteriormente a color negro. Por otro lado, en los cultivos líquidos cuando el proceso de fermentación avanza, la viscosidad del cultivo disminuye debido a una disminución del peso molecular medio del pululano extracelular acumulado. Por último, cabe destacar que no existen diferencias significativas entre los índices de crecimiento de *Aureobasidium pullulans* cuando se desarrollan en diferentes medios, como YM o lactosuero tratado (tabla 16) y cuando crecen a concentraciones de 5 y 10 % de lactosuero tratado (tabla 19).

2. Capacidad de desarrollo de cepas en cultivo líquido

2.1. Estudio de los tiempos de incubación. Curvas de crecimiento de *X. campestris*

Se realizaron curvas de crecimiento, a partir de la variación de absorbancia medida a distintos tiempos a $600 \text{ nm } \lambda$. Como referencia en T0 se empleó la escala Mc Farland (4), usando los medios YM, medio "ideal" y lactosuero tratado con un 5% lactosa inicial. Observándose las diferencias de crecimiento establecidos en los distintos medios.

La producción de xantano está parcialmente ligada al crecimiento celular, se produce durante todas las fases de crecimiento de la bacteria, con un máximo cuando se sitúa en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano (Sutherland, 1990, 1993). La fase de síntesis del xantano ocurre en todas las fases de crecimiento, obteniéndose un máximo una vez que el crecimiento bacteriano se ha estacionado. Se ha comprobado que en las distintas fases de crecimiento el xantano es distinto en cuanto a su masa molecular y su grado de ramificación de la cadena, por tanto el EPS resultante final es una mezcla proveniente de la producción en las diferentes etapas.

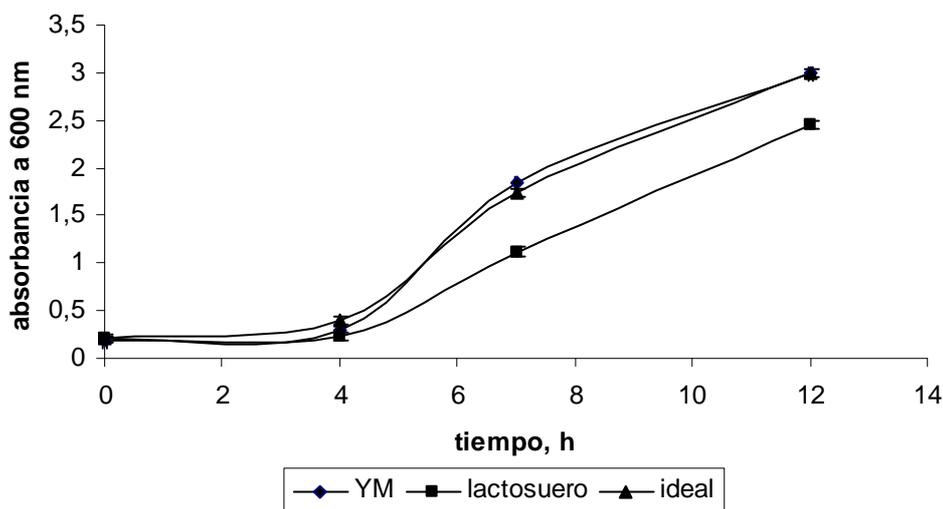


Figura 40. Curvas de crecimiento de *Xanthomonas campestris* en diferentes medios de cultivo a una temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las curvas de crecimiento, figura 40, nos indican el rápido crecimiento de *Xanthomonas campestris* en medio lactosuero tratado con β -galactosidasa. Aunque el crecimiento de *Xanthomonas* en lactosuero tratado, es menor en comparación que

cuando la cepa se incubaba en medio YM o en medio "ideal", presenta un crecimiento considerable y bastante rápido, alcanzándose a las 12 horas de incubación en medio lactosuero una concentración de 0,24 gramos/l en biomasa, en comparación con 0,35 gramos/l tanto en YM como en el medio "ideal".

Estos resultados tan esperanzadores nos alentaron a seguir trabajando y a realizar nuevas pruebas y estudios en la producción de EPS de interés industrial, empleando como medio lactosuero tratado con β -galactosidasa.

2.2. Edad y porcentaje del inóculo

El principal objetivo en el desarrollo del inóculo, es un rápido incremento de la concentración celular minimizando la producción de gomas xantana, debido a que su producción, alrededor de las células, impide el aporte y transporte de nutrientes prolongando la fase de crecimiento celular.

En cualquier estudio de fermentación, la edad del inóculo es un parámetro muy importante y decisivo para la obtención de altos rendimientos en el menor tiempo posible.

La concentración celular fue máxima cuando los tiempos de fermentación de los inóculos estaban comprendidos entre 30-48 horas. Los tiempos de incubación ideales en medio YM se sitúan en 30 horas, mientras que la incubación llevada a cabo en medio lactosuero tratado es de 48 horas.

Los inóculos preparados en medio lactosuero tratado deben adaptarse al medio complejo, por lo que necesitan un periodo más prolongado para lograr la misma concentración celular. En cualquier caso, al transcurrir más de 48 horas, en ambos medios la concentración de EPS es menor, debido a la disminución en la actividad del crecimiento celular por muerte celular.

Otro factor de vital importancia para conseguir buenos rendimientos en el proceso de fermentación, es el porcentaje de inóculo a añadir. Las pruebas iniciales en matraces indicaban mayores rendimientos cuando se incorporaba un 10 % de inóculo al cultivo. Este porcentaje se constató en todos los cultivos (*Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium radiobacter*, *Aureobasidium pullulans*).

Posteriormente, en el caso de *Xanthomonas campestris*, se realizaron ensayos en biofermentador de 2 litros en medio lactosuero tratado para la goma xantana, obteniéndose los mismos resultados que en los realizados en matraz.

2.3. Estudio de diferentes metodologías para precipitar la goma xantana.

Existen varios métodos para la recuperación del EPS a partir de los caldos de fermentación:

- 1) Precipitación a partir de la adición de disolventes seguida de una posterior liofilización o atomización.
- 2) Por otro lado, mediante ultrafiltración.

Generalmente, el método empleado depende del tipo de aplicación dada al EPS, generalmente la industria alimentaria requiere un producto en polvo, mientras que para otro tipo de aplicaciones tales como recuperación de petróleo, se requiere un producto líquido prefiriéndose el método de ultrafiltración para concentrar el EPS.

Un aspecto a tener muy en cuenta en la metodología de trabajo para su viabilidad económica e industrial, es la evaluación del coste energético en los diferentes procesos de recuperación del xantano a partir de los caldos de cultivo diluidos, empleando la precipitación con alcohol o bien la ultrafiltración. En este trabajo se empleó el método de la adición de disolventes, tanto para la obtención de goma xantana, succinoglicano y pululano para finalmente obtener un producto en polvo tras el proceso de liofilización. Las razones de emplear este método, se basaron en:

- El empleo mayoritario para el EPS correspondería a usos alimentarios, con la necesidad de disponer de un producto en polvo o liofilizado.
- El proceso de ultracentrifugación, puede suponer un ahorro energético entorno al 80%, si se compara con la adición de solventes como el alcohol isopropílico (Yan-Ming-Lo y col., 1996). No obstante el proceso de ultrafiltración es ventajoso cuando obtenemos concentraciones de xantano en el medio de cultivo entre 2,5% y 7%, en este estudio las concentraciones obtenidas fueron

bastante inferiores, por tanto este método, no resultaría ventajoso económicamente en nuestro caso.

- La adición del alcohol cumple una doble misión, por un lado la dilución de los caldos, provocando una notable disminución en su viscosidad, y por otro actuar como un biocida, destruyendo la actividad bacteriana, así como, en muchos casos, su pared celular.

En la mayoría de los trabajos anteriores, el disolvente empleado es isopropanol (Smith, 1983; Inkson y Wilkinson, 1981; Bouinot, 1976), en cantidades referidas a volumen de caldo entre 1,8: 1 y 2,5: 1 (v alcohol isopropílico/ v caldo). Por otra parte, otros autores (Patton y Holman., 1968; Pace y Righelato, 1981; Albretch y col, 1962; Kenedy y col., 1982) han propuesto la adición de cationes polivalentes a las soluciones de xantano, realizándose la precipitación del xantano debido al carácter polielectrolítico del polisacárido. Se puede realizar la precipitación por la adición de sales de calcio (Patton y Holman, 1968) a pH básico (entre 8,5 y 12) o por sales de aluminio (Albretch y col., 1962) a pH ácido (entre 4 y 4,5). De este modo se obtiene una sal de xantano insoluble, que debe de ser transformado en un compuesto soluble, en forma de sal sódica o potásica, para su empleo comercial.

Otra posibilidad, es el empleo combinado de ambos efectos (debido al disolvente y a la presencia de cationes en la disolución). Smith (1983) señaló la posibilidad de añadir al caldo sales de calcio, magnesio y cinc así como isopropanol, disminuyendo en gran manera la cantidad de disolvente necesaria para llevar a cabo la precipitación. El empleo de sales polivalentes se debe a que, cuanto mayor es la carga del catión empleado, menor es el volumen necesario de disolvente para conseguir la precipitación de la misma cantidad de xantano. Las etapas finales empleadas dependen de las propiedades comerciales y los usos a los que se vaya a dedicar el xantano purificado

Es de destacar, la influencia de la concentración de sales empleada sobre el volumen de alcohol isopropílico necesario para la precipitación del xantano. El empleo de sales como cloruro potásico y cloruro sódico son utilizadas en la precipitación de los polisacáridos microbianos. Las sales de cationes monovalentes pueden ser las elegidas para fermentación. La naturaleza polielectrolítica del xantano obliga a estabilizar su conformación en disolución, por adición de pequeñas cantidades de sal (generalmente NaCl), siendo esta la única forma de obtener resultados reproducibles y evitar así posibles comportamientos tixotrópicos o de agregación de moléculas. Se

concluyó que adicionando un 4% de NaCl se conseguía reducir notablemente la adición de alcohol isopropílico para lograr la precipitación del xantano. Por tanto, la adición de sales al medio reduce la cantidad de alcohol necesaria para la precipitación del xantano, siendo determinante la carga del catión cuando mayor sea se requiere una menor cantidad de alcohol isopropílico.

El volumen total de solvente necesario para la precipitación del polímero depende del agente. Según estudios previos comparativos entre el uso del metanol, etanol, acetona e isopropanol, comprobamos que era necesaria una menor cantidad al emplearse el isopropanol seguida de acetona y etanol.

El xantano se separa del medio por precipitación al adicionar más cantidad de alcohol o alcohol y sales, siendo el alcohol isopropílico el agente más adecuado. Se confirmó que el método consistente en diluir previamente el medio 1:3 (vol. medio lactosuero: vol. agua destilada) con la adición posterior de 2 volúmenes de isopropanol era el óptimo industrialmente (figura 41 y 42), ya que generaba un menor coste en disolventes y de gran eficacia, pues aunque cantidades similares de acetona produce la misma separación, tanto por la cantidad requerida como, sobre todo, por su menor toxicidad, es preferible el empleo de alcohol isopropílico. Además, este comportamiento es bastante parecido a distintas concentraciones de xantano en disolución.

La precipitación del xantano obtenido mediante este método, es comparable al obtenido a nivel industrial en comparación con la textura y color.

El uso final del xantano, dependerá del tipo de solvente utilizado, por ejemplo, el precipitado con metanol no sería apto en aplicaciones y procesos alimentarios, debido a su toxicidad. Con el empleo de isopropanol, se conseguía precipitar el xantano con menor cantidad de solvente, tanto en medio YM como en lactosuero, además de ser apto para su uso alimentario,

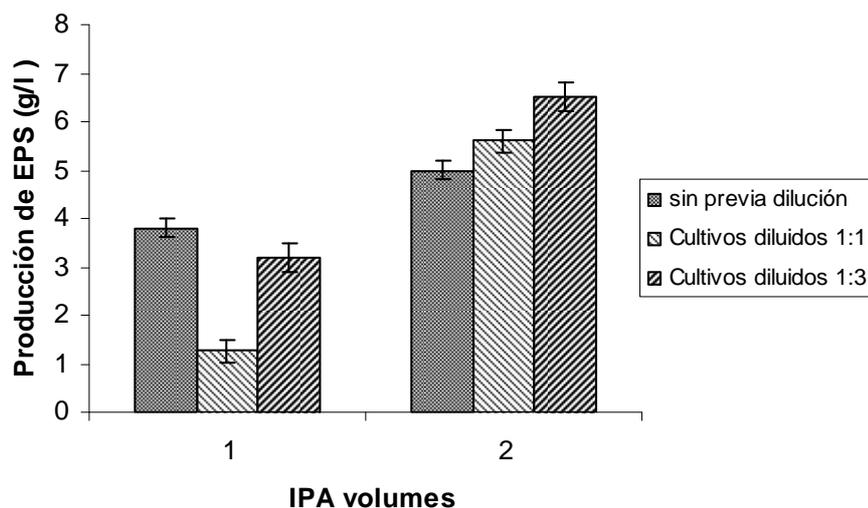


Figura 41. Diferentes metodologías empleadas en la precipitación del EPS según diluciones previas acuosas con la adición de diferentes volúmenes de alcohol isopropílico. En medio YM. En todos los casos se adiciono un 4% de CINA para favorecer la precipitación de los polisacáridos.

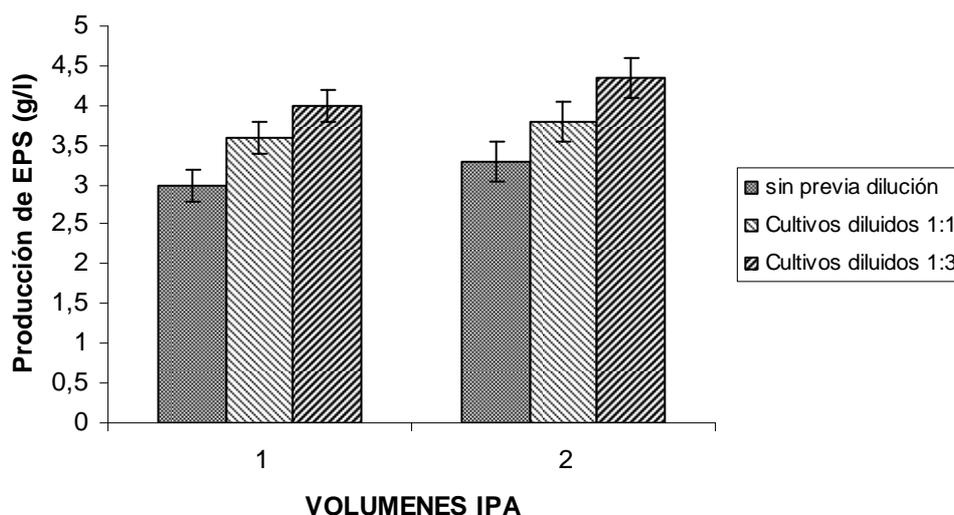


Figura 42. Diferentes metodologías empleadas en la precipitación del EPS según diluciones previas acuosas con la adición de diferentes volúmenes de alcohol isopropílico. en medio lactosuero. En todos los casos se adiciono un 4% de CINA para favorecer la precipitación de los polisacáridos.

Se realizaron diferentes tipos de extracciones del EPS para valorar su rendimiento:

- A) Cultivo sin diluir
- B) Dilución del cultivo al 50% con agua destilada.
- C) Dilución del cultivo 1:3 (1 parte de lactosuero y 3 partes de agua destilada).

El protocolo de extracción es el mismo para A, B y C variando la dilución del cultivo

2.4. Temperatura de incubación y agitación de los cultivos

Para continuar con la selección de las condiciones óptimas de producción de los EPS, fijamos la temperatura de incubación y la agitación de los cultivos en primer lugar en matraces y posteriormente en fermentador de 2 l.

Si bien, la temperatura óptima para la producción de xantano es de 28° C, se ha experimentado a diferentes temperaturas 25, 30 y 33 ° C, para tratar de describir la influencia de esta variable.

Tabla 20. Efecto de la temperatura de incubación de *Xanthomonas campestris* sobre la producción de EPS y la biomasa celular en matraz a 150 rpm tras 72 horas.

| MATRAZ | | | | | | | | | |
|--------|-------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| | 25 °C | | | 30°C | | | 33°C | | |
| MEDIO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO |
| YM | 0,3 | 0,12 | 2,50 | 0,4 | 0,13 | 3,07 | 0,37 | 0,13 | 2,85 |
| LACT. | 0,25 | 0,11 | 2,27 | 0,35 | 0,12 | 2,92 | 0,32 | 0,14 | 2,29 |

Tabla 21. Efecto de la temperatura de incubación de *X.campestris* sobre la producción de EPS y la biomasa celular en matraz a 100 rpm tras 72 horas.

| MATRAZ | | | | | | | | | |
|--------|-------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| | 25 °C | | | 30°C | | | 33°C | | |
| MEDIO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO |
| YM | 0,23 | 0,12 | 1,91 | 0,32 | 0,11 | 2,91 | 0,28 | 0,10 | 2,8 |
| LACT. | 0,20 | 0,11 | 1,82 | 0,28 | 0,10 | 2,8 | 0,25 | 0,11 | 2,27 |

La velocidad de agitación afecta extensamente a los caldos de fermentación de la goma xantana, se trata de una variable fundamental a controlar en el proceso para la obtención de un biopolímero de calidad y con rendimientos óptimos.

Como observamos, en las tablas 20 y 21, la velocidad de agitación es un parámetro fundamental tanto a escala de matraces como de fermentador.

En lo que respecta a las pruebas en matraz, obtuvimos en líneas generales mayores rendimientos de EPS al trabajar con velocidades de agitación más elevadas (150 rpm), ver tabla 20. Determinando que a la velocidad de agitación anteriormente mencionada y a 30 °C se lograron los mejores resultados en lo referido a productividad, 0,4 gEPS/100ml en medio YM y 0,35 gEPS/100ml. Es de considerar los valores de rendimiento obtenidos en matraces debido principalmente a que a volúmenes de trabajo de 100ml, no existe un factor limitante respecto al suministro de

oxígeno, como es el caso del trabajo en fermentadores donde la variable aireación es un factor limitante a los volúmenes de trabajo.

2.5. Estudio en matraces del efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *Xanthomonas* en diferentes medios: YM y lactosuero tratado.

Como se observa en la figura 43, la formación de xantano es un producto asociado al crecimiento del microorganismo. El mayor incremento en la concentración se produce cuando el microorganismo se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, se observa la estrecha relación entre la formación del producto y el consumo de la fuente carbonada.

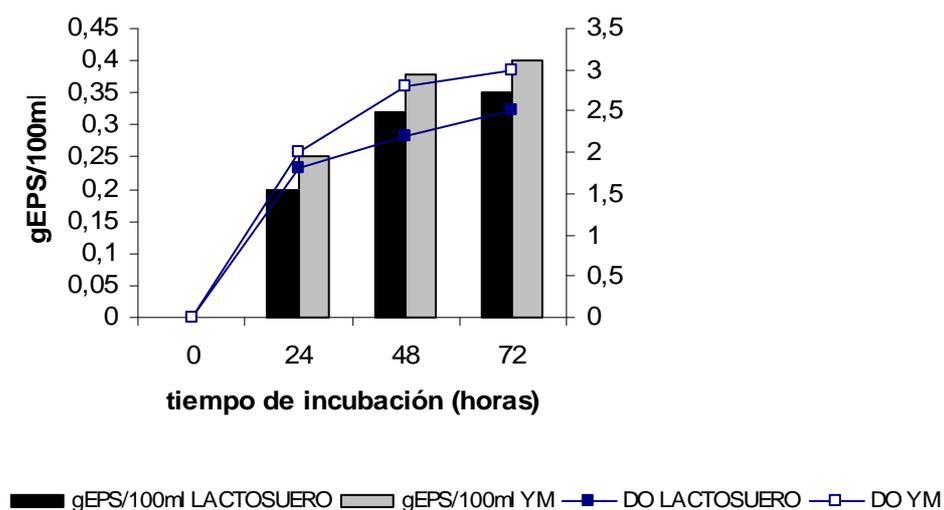


Figura 43. Producción de goma xantana en función del tiempo de incubación.

Es interesante observar que la producción del polisacárido prácticamente se inicia una vez finalizado el crecimiento exponencial y prosigue durante la fase estacionaria.

La producción de los biopolímeros aumenta progresivamente durante la fase logarítmica y alcanza un máximo en la fase estacionaria, alrededor de las 60 horas de incubación de los cultivos de *Xanthomonas* en matraz.

Este hecho es indicativo de que la producción de EPS por parte de las bacterias de *xanthomonas* que hemos estudiado es un proceso parcialmente asociado

con el crecimiento de la bacteria, ya que si bien tiene lugar mientras que la bacteria crece, es máximo una vez que el crecimiento se ha estacionado (Sutherland, 1990). Estos resultados podrían indicar que una multiplicación celular eficiente resulta esencial para que después se produzca de forma correcta la síntesis del exopolisacárido (Walling y col., 2005). Es como si durante la fase de crecimiento celular óptima, los precursores activados disponibles se emplean fundamentalmente para la síntesis de biomasa; después, cuando el crecimiento se ha estabilizado, estos se encuentran disponibles para la síntesis del exopolisacárido (Petry y col., 2000; Ramos y col., 1995). La fase de crecimiento durante la cual tiene lugar la producción de exopolisacárido difiere de unos microorganismos a otros. La síntesis de EPS puede estar asociada al crecimiento, como en el caso del pululano producido por *Aureobasidium pullulans*, el alginato bacteriano sintetizado por *Azotobacter vinelandii* o los heteropolisacáridos producidos por muchas bacterias del ácido láctico (De Vuyst y Degeest, 1999 ; Weldman y Maddox, 2003). Más raramente, la producción de exopolisacárido tiene lugar únicamente cuando el crecimiento ha cesado totalmente, tal y como ocurre con el curdlano de *Alcaligenes faecalis* (Sutherland, 1990) o para el exopolisacárido producido por *Aeromonas salmonicida* (Bonet y col., 1993).

En el caso del xantano, la síntesis ocurre, en todas las fases de crecimiento, obteniéndose el máximo una vez que el crecimiento bacteriano se ha estacionado (Sutherland, 1990, 1993). Se ha comprobado que en las diferentes fases de crecimiento, el xantano producido es distinto en cuanto a su masa molecular y grado de ramificación de la cadena; por tanto el producto extraído al final del proceso representa una mezcla del EPS producido en las diferentes etapas (Becker y col., 1998).

2.6. Obtención del curdlano y succinoglicano.

Protocolos de extracción del curdlano y del succinoglicano.

Obtuvimos resultados más repetitivos y con mayores tasas de producción empleando el método B, descrito en el apartado 4.2 de materiales y métodos en la separación y extracción del curdlano.

El protocolo para la obtención del succinoglicano, que se muestra en la figura 44, consiste en el paso final de la adición de dos volúmenes de alcohol isopropílico al medio de cultivo diluido, favoreciendo así la separación y recogida del succinoglicano, realizándose de la misma forma que para el xantano.



Figura 44. Estado del medio de cultivo tras la adición de 2 volúmenes de IPA, en la parte superior se obtiene el succinoglicano.

Durante el proceso de extracción del curdlano, observamos que al añadir NaOH 1 N (protocolo número 2), la coloración del medio vira a un naranja rojizo. Al neutralizar el pH mediante la adición de HCl el medio torna a la coloración original. Este fenómeno puede ser debido a un cambio transicional de las cadenas (ordenación del polímero), al encontrarse en unas condiciones básicas (ver fotografías 45 y 46).



Figura 45. Transición de color en condiciones ácidas



Figura 46. Transición de color en condiciones alcalinas

Influencia del pH durante el proceso de fermentación

El pH del cultivo es uno de los factores más importantes, influyendo directamente en la tasa de crecimiento celular, así como en la producción de EPS.

Como en el caso del xantano, la elevada viscosidad del medio con frecuencia puede ser un problema crítico en la producción, la solución para evitar este inconveniente es trabajar con pH ligeramente ácidos, ya que el curdlano es insoluble en estas condiciones.

En otros estudios, generalmente la producción de curdlano se divide en dos fases; la fase de crecimiento celular y la producción de curdlano.

Lee, J.-H. y col. (2001) estudió un pH óptimo para la producción discontinua de curdlano en fermentador, con *Agrobacterium*. El crecimiento celular fue óptimo a un pH de 7.0, mientras que la producción de EPS fue máxima a un pH de 5.5. Esta variación en el cambio del pH ofrece una buena estrategia para la optimización en la producción, teniendo en cuenta que la variación de pH se realiza cuando existe un agotamiento de la fuente nitrogenada del medio. Estos autores obtuvieron rendimientos importantes en la producción de curdlano obtenidos en fermentadores en discontinuo a pH constante.

Trabajos anteriores, describen la maltosa y la sacarosa como fuentes eficientes de carbono para la producción de goma curdlano. Obteniéndose máximas producciones de curdlano en el caso de la sacarosa. Por otro lado, se han empleado fuentes de carbono baratas como las melazas de caña de azúcar, con unos rendimientos elevados. Lee y col, afirman que la maltosa y sucrosa son fuentes carbonadas eficientes para la producción de este EPS. (Lee, I.Y et al., 1997).

En nuestro caso, el principal objetivo fue demostrar que el lactosuero tratado era un medio apto para la producción de curdlano y de succinoglicano. Con tal fin, y para simplificar el proceso decidimos trabajar a un pH de compromiso, aproximadamente de 6,5 -6,3 (valores de pH del lactosuero sin modificar).

Dicho proceso de fermentación fue llevado a cabo en matraces de 250 ml de capacidad, con un volumen de trabajo de 100ml. Partiendo de un volumen de inóculo de 10 ml obtenido a partir de un slant de un cultivo joven de *Agrobacterium radiobacter*, incubándolo a 30°C durante 36 horas. Posteriormente los matraces fueron inoculados (10% de inóculo), e incubados en agitador orbital a 30°C durante 96 horas.

Es sabido, que en algunas ocasiones el proceso de fermentación revierte parcialmente a la producción de succinoglicano, por los microorganismos productores. (Railton, K y col., 2004).

En principio ésto no supone ningún problema, ya que el succinoglicano es un importante metabolito empleado enormemente en la industria. Uno de sus principales usos es en la recuperación de hidrocarburos de yacimientos subterráneos, caracterizado porque consiste en combinar: una cantidad formadora de gel de un biopolímero del tipo de succinoglicano

Además, este desvío de la producción de succinoglicano en detrimento de la de curdlan puede minimizarse mediante la regulación de las condiciones de fermentación.

En un principio, el crecimiento y la producción de EPS se llevó a cabo sin regular el pH(figura 47). Según la bibliografía consultada, si no existe regulación del pH, se obtienen niveles más bajo de crecimiento celular, y decrece la fase estacionaria, existiendo una fase más marcada de muerte comparada con un proceso de fermentación con el pH regulado.

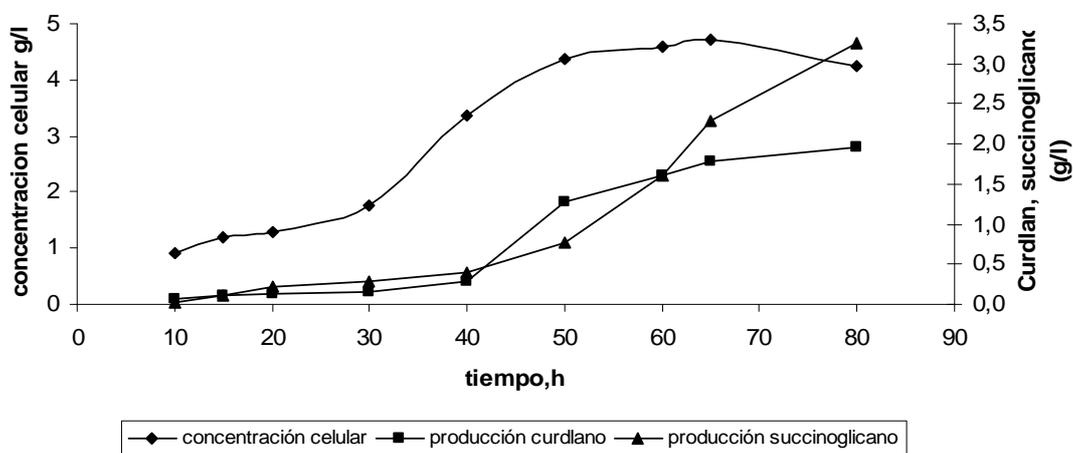


Figura 47. Curvas de crecimiento de *Agrobacterium radiobacter* en lactosuero tratado al 5% de lactosa, y su producción de EPS (goma curdlan y succinoglicano) sin control de pH.

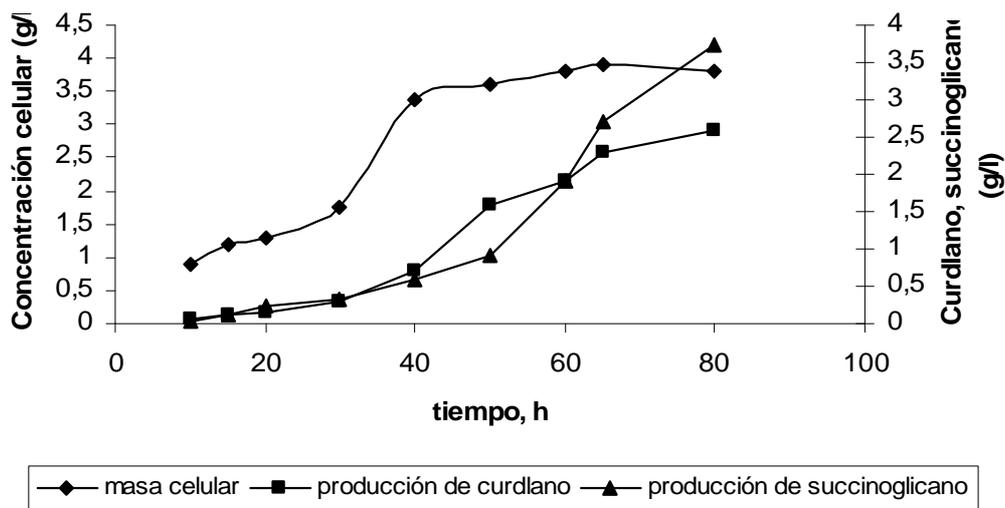


Figura 48. Curvas de crecimiento de *Agrobacterium radiobacter* en lactosuero tratado al 5% de lactosa, y su producción de EPS (goma curdlano y succinoglicano) con control de pH ($6 \pm 0,3$).

Las células se encuentran en fase de retardo o fase lag hasta aproximadamente 20 horas de fermentación, la fase log comprende entre las 20 y 50 horas de fermentación, para finalmente entrar lentamente en una fase de muerte celular, transcurridas 65 horas (figura 48).

En este caso el pH fue controlado cada 6 horas empleando 0,1 N de NaOH. El efecto del crecimiento celular y en la producción se ilustra en la figura 48.

Transcurridas 80 horas de fermentación sin control de pH, el rendimiento fue de 1,96 g/l de goma curdlano y de 3,3 g/l de succinoglicano, En contraposición los rendimientos cuando la fermentación se realizó con pH controlado se registraron mayores producciones, 2,60 y 3,75 g/l respectivamente.

Situación actual y perspectivas de uso del curdlano.

El potencial de uso del curdlano es múltiple, sobre todo en sistemas alimentarios, debido a que no altera el sabor y carece de efectos tóxicos, además de producir geles termorreversibles y resistentes a temperaturas de congelación y refrigeración.

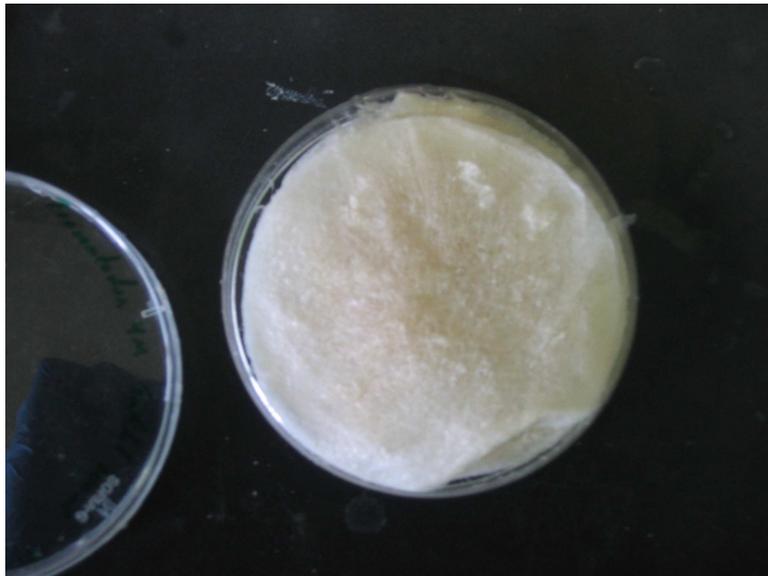


Figura 49. Curdlano liofilizado obtenido a partir de lactosuero tratado.

El uso de curdlano (figura 49) fue aprobado por la FDA en diciembre de 1996 como un auxiliar, coadyudante, estabilizador, espesante o texturizante alimentario. Existen multitud de estudios donde se demuestra su seguridad para el uso alimentario. (Spicer y col., 1997)

Los únicos efectos a altas concentraciones en nuestra dieta es una reducción de peso corporal, por lo que actualmente se formulan alimentos dietéticos con goma curdlan, descrita como una fibra dietética inerte nutricionalmente. (Pszczola, 1997). Por otro lado, uno de los potenciales usos del curdlano es la industria farmacéutica, recientes estudios emplearon el O-palmitoilcurdlano sulfatado (OPCurS)- con el fin de recubrir y proteger liposomas para su uso oral, con el fin de resistir la barrera gastrointestinal y actuar como portador de fármacos. (Chang-Moon Lee at al., 2005).

Los derivados del curdlano sulfatados modificados mediante reacción con glicidol, desarrollan una excelente actividad antiviral con una toxicidad extremadamente baja, otra de sus aplicaciones en el mundo farmacéutico es la posibilidad de ser un tratamiento auxiliar frente a la malaria. (Mikio y col., 1995), (Evans y col., 1998).

3. Crecimiento y producción de los microorganismos en condiciones de estrés hídrica.

3.1. Efecto del potencial matricial y de soluto en el crecimiento de *Aureobasidium pullulans*.

Los datos obtenidos se presentan en la tabla 22 y en las gráficas 50, 51, como los índices de crecimiento de los hongos en presencia de distintos medios de cultivo (ME "extracto de malta", lactosuero tratado y lactosuero sin tratar) a distintos valores de potencial de soluto (-0,7, -2,8 Mpa) y de potencial matricial (-0,7, -1,4 Mpa), los valores se resumen en la siguiente tabla 22.

Tabla 22. Media de los índices de crecimiento (mm día⁻¹) con sus desviaciones estándar de *A.pullulans* en ME (malt extract), lactosuero tratado con galactosidasa y lactosuero sin tratar, bajo la influencia de distintos potenciales osmóticos y matriciales.

| | <i>Aureobasidium pullulans</i> | | <i>Aureobasidium pullulans</i> | |
|-----------------------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| | <i>Potencial de soluto</i> | | <i>Potencial matricial</i> | |
| Ψ (MPa) | -0.7 | -2.8 | -0.7 | -1.4 |
| ME | 2.8±0.21 | 1.8± 0.34 | 2.5±0.11 | 1.4±0.37 |
| LACTOSUERO | 2,6±0.11 | 1.8±0.14 | 2.2±0.11 | 1,7 ±0.15 |
| LACTOSUERO SIN TRATAR | 0,4±0.08 | 0,2±0.07 | 0,3±0.07 | 0,1 ±0.1 |

Las tasas de crecimiento son mayores en todos y cada uno de los tratamientos en los que el hongo (*Aureobasidium pullulans*), se encuentra en un medio con un potencial de soluto de -0.7 MPa. Como se aprecia en la figura 50, la modificación del potencial de soluto por la adición de glicerol al medio, no provoca un aumento importante en la tasa de crecimiento.

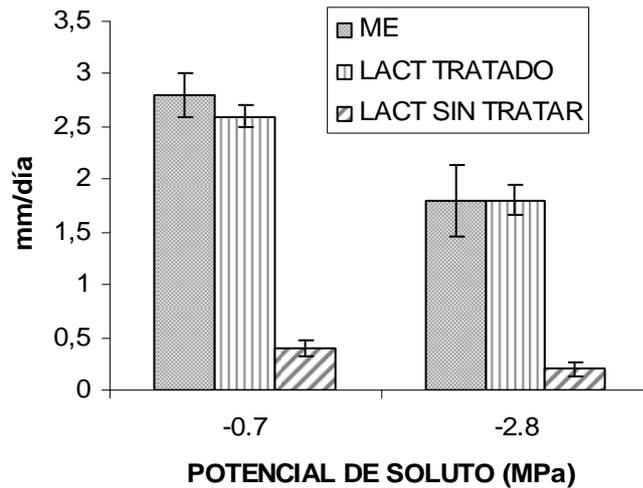


Figura 50. Tasas de crecimiento de *A. pullulans* a distintos valores de potencial de soluto.

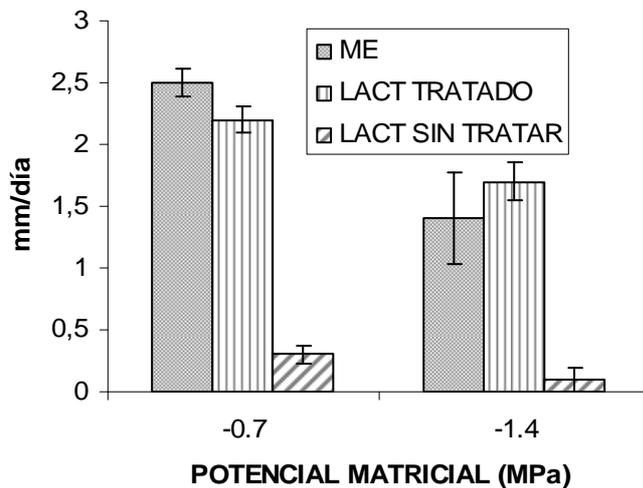


Figura 51. Tasas de crecimiento de *Aureobasidium pullulans* a distintos valores de potencial de soluto.

Al adicionar polietilenglicol (PEG 8000) se modifica el potencial matricial del medio. Los resultados de la tabla 22, indican que existe un menor crecimiento fúngico en medios donde se han modificado el potencial matricial que en medios donde se ha modificado el osmótico.

Según los valores obtenidos, existe una mayor sensibilidad a variaciones del potencial matricial que frente a variaciones del potencial de soluto.

No obstante cabe mencionar que el potencial osmótico se ha identificado como un parámetro importante en la ecología y el crecimiento de los hongos filamentosos patógenos, como puede ser el caso de *Aureobasidium pullulans* (Davis y col., 2001), ver figura 51.

La disminución del potencial osmótico reduce el crecimiento, al incrementar la tasa de respiración y existe un aporte extra de energía para el mantenimiento de la turgencia de las células hifales (figura 52).

Otro efecto importante del estrés osmótico es la acumulación de endógena de osmolitos tales como azúcares y polioles (Railton y col., 2004).



Figura 52. Hifas de *A.pullulans*.

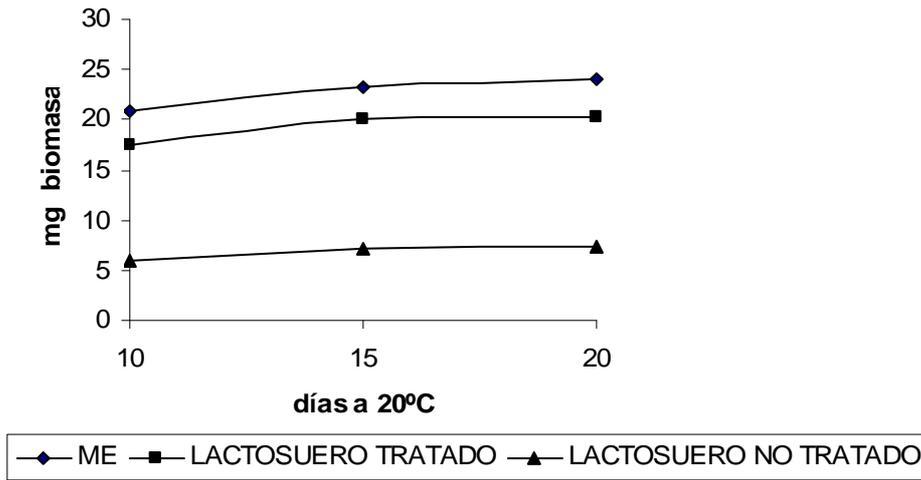


Figura 53. Seguimiento de la masa fúngica potencial de soluto de -0,7 MPa.

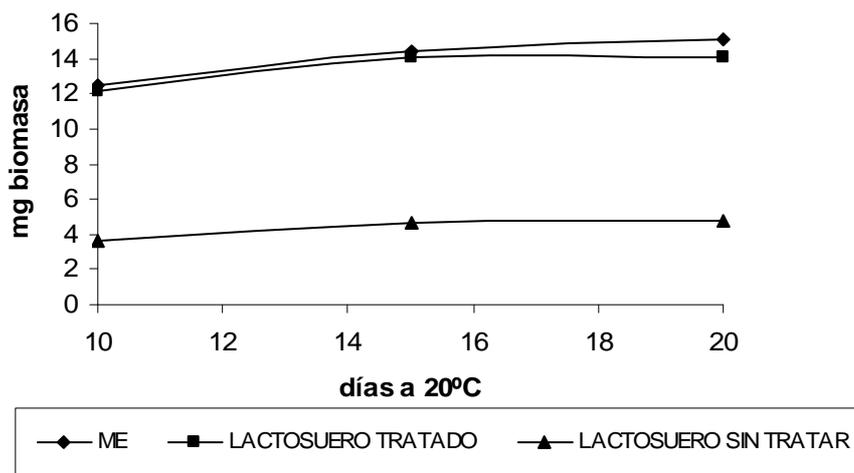


Figura 54. Seguimiento de la masa fúngica potencial de soluto de -2,8 MPa.

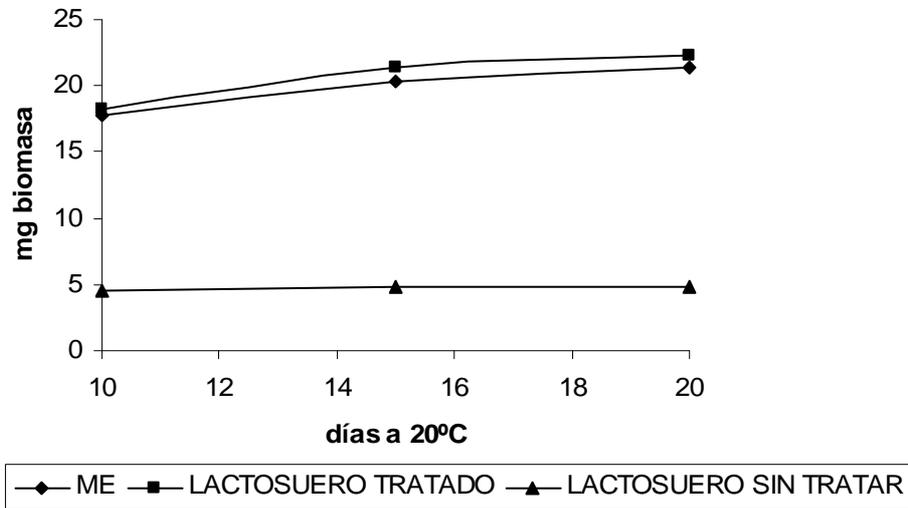


Figura 55. Seguimiento de la masa fúngica potencial matricial -0,7 MPa.

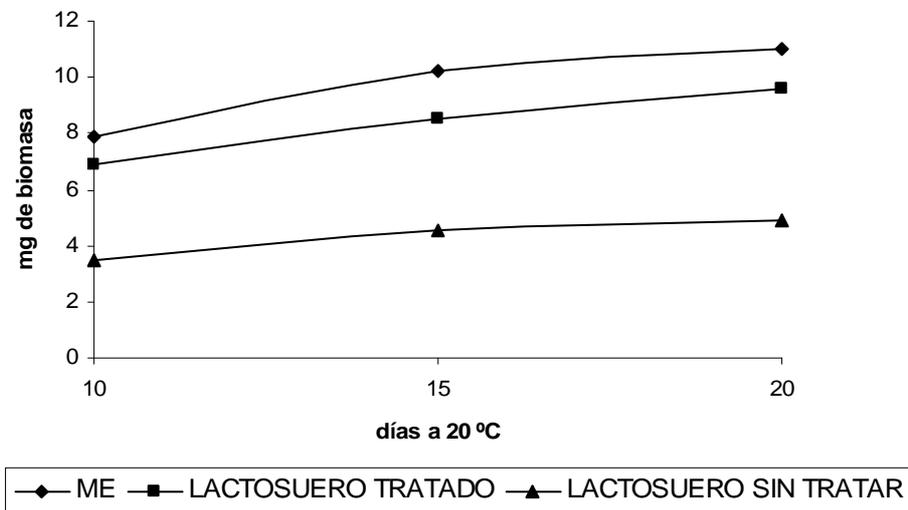


Figura 56. Seguimiento de la masa fúngica potencial matricial -1,4 MPa.

3.2. Efecto en la producción de xantano, curdlano y succinoglicano bajo condiciones de estrés hídrico.

Se adicionó al medio diferentes concentraciones de L-prolina (Sigma 99%), ajustando los valores de A_w a 0.98, 0.96 y 0.94 tanto en medio YM como en lactosuero, investigando la influencia en el crecimiento y la producción de EPS bajo distintas condiciones de estrés hídrico.

Tabla 23. Datos de producción de EPS y PSC de los diferentes medios de cultivo con lactosuero tratado a diferentes valores de A_w .

| | 0,98 | 0,96 | 0,94 |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Xantana | | | |
| biomasa | 3,5 | 2,4 | 0,5 |
| EPS | 1,2 | 0,7 | 0,1 |
| Curdlano | | | |
| biomasa | 2,7 | 1,3 | 0,6 |
| EPS | 1,96 | 1 | - |
| Succinoglicano | | | |
| biomasa | 2,7 | 1,3 | |
| EPS | 3,3 | 1,4 | 0,2 |

Como se observa en la tabla 23, al modificar las condiciones de actividad de agua y crecer en condiciones de estrés hídrico, se obtuvieron valores de crecimiento y producción bastante inferiores. Por tanto, se decidió trabajar sin alterar los valores de A_w iniciales de los medios de cultivos.

Parte III

ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANO

El escalado es una tarea indispensable en toda actividad industrial, es decir, ninguna planta de producción puede ser construida sin cálculos, estudios previos y demostraciones en condiciones diferentes a la escala comercial. Así, sobra recalcar la importancia de un buen proceso de escalado, especialmente en la industria química y bioquímica. La dificultad en el escalado de procesos reside en el cambio en el régimen de operación en la nueva escala por intentar mantener el punto de operación.

El escalado es el diseño y construcción de una unidad o conjunto de unidades de procesamiento a gran escala, tomando como base los cálculos y experimentos a pequeña escala.

Sin embargo, esto no debe llevar a que el problema de escalado, dada una capacidad de producción requerida, se soluciona aumentando el número de dispositivos idénticos de pequeña escala.

Existen muchas causas de los problemas de escalado: imprecisión en el modelo, los tiempos de respuesta del proceso cambian, ciertos fenómenos superficiales no se consideran, hay insuficiente conocimiento de los detalles de las cinéticas (formación de subproductos), hay poca especificación del flujo de fluidos y de los cambios en las materias primas. Todo esto se puede detectar cuando la interacción de los fenómenos de transferencia de masa, energía y cantidad de movimiento se altera con el cambio de escala.

Considerando los diversos cambios revelados con el cambio de escala, es pertinente resaltar que cada vez que se modifica la escala del proceso, en este adquieren importancia fenómenos que en la escala inicial no se veían afectados. Por ejemplo, en la escala de laboratorio los fenómenos relevantes son las reacciones bioquímicas, mientras que la transferencia de masa y de calor no presentan inconveniente. Al aumentar la escala, la hidrodinámica (y por ende la transferencia de masa y calor) del proceso van adquiriendo mayor relevancia y se constituyen en el fenómeno físico dominante del proceso.

1. Producción en biofermentador de 2 litros.

1.1. Optimización de la producción de los exopolisacáridos

Importancia de inóculo en biofermentador.

Al igual que en los estudios realizados en matraces es de vital importancia para conseguir buenos rendimientos en el proceso de fermentación, el porcentaje de inóculo a añadir. Las pruebas iniciales en matraces indicaban mayores rendimientos cuando se incorporaba un 10 % de inóculo al cultivo. Posteriormente, se ha corroborado que los ensayos en biofermentador de 2 litros en medio lactosuero tratado, se obtuvieron los mismos resultados que en los realizados en matraz.

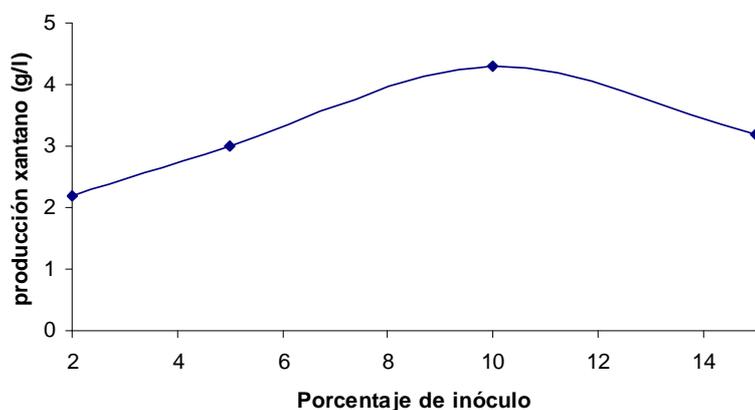


Figura 57. Producción de xantano (g/l) en un fermentador de 2 l de volumen según porcentaje de inóculo.

Si en el fermentador de producción se inicia con un porcentaje de inóculo bajo (menor del 10%), el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación del producto puede ser insatisfactoria. La concentración óptima del inóculo para el fermentador de producción determina el número de etapas del precultivo de fermentación que son necesarias. Se concluyó, determinándose la concentración de inóculo más efectiva fue del 10 % del volumen del total del medio tanto en matraz como en fermentador, figura 57.

Para la variable del pH, únicamente Thonart y col., (1985) proponen realizar la preparación del inóculo a un valor de 5, el resto de los autores comienzan la fermentación partiendo de un inóculo crecido a pH cercano al neutro y con el medio de producción ajustado también a un valor cercano a 7, como ha sido en nuestro caso.

La diferencia entre unos trabajos y otros radica en controlar o no esta variable durante la fermentación, e incluso se estudia la mejor base a emplear para realizar el citado control. Hay autores que señalan, de forma especial, el beneficio del control del pH durante la fermentación (Moraine y Rogovin. 1971), mientras que otros autores únicamente trabajan empleando el citado control, pero sin comentar si esta variable ha sido o no estudiada (Cadmus y col., 1978; Souw y Demain, 1980; Patton y Dugar, 1981; Pinches y Pallent, 1986; Tait y col., 1998; Robinson y Wang, 1988; Pons y col., 1990; Lee y col., 1997; Peters y col., 1993; Schweickart y Quinlan, 1989; Shu y Yang, 1990 y 1991). Moraine y Rogovin (1971) señalan la mejoría que supone el empleo de hidróxido amónico como álcali para realizar el control del pH.

Temperatura de incubación y agitación de los cultivos

Para continuar la selección de las condiciones óptimas de producción de los EPS en biofermentador de 2 litros de volumen total, fijamos la temperatura de incubación y la agitación de los cultivos en primer lugar en matraces (ver apartado 2.4 de resultados estudio en matraces) y posteriormente en fermentador.

Si bien, la temperatura óptima para la producción es de 28° C, se ha experimentado a diferentes temperaturas 25, 30 y 33 ° C, para tratar de describir la influencia de esta variable en fermentador.

La velocidad de agitación afecta extensamente a los caldos de fermentación de la goma xantana, siendo esta una variable fundamental a controlar en el proceso, para la obtención de un biopolímero de calidad y con rendimientos óptimos.

La producción del polisacárido y el crecimiento celular son prácticamente nulos en ausencia de agitación, incluso con una aireación comprendida entre 0.3-1 vvm, y transcurridas 72 horas. Esto se explica porque las burbujas de aire, por sí mismas, y en el tipo de fermentador utilizado, apenas contribuyen a romper la barrera mucilaginosa formada por el polisacárido que rodea a las células. La difusión del oxígeno del aire y de los nutrientes está restringida y se observa que el azúcar no es consumido. Una vez establecida la agitación a una velocidad de 400rpm los tres parámetros registrados cambian rápidamente con el tiempo de forma dependiente uno de otro.

Tabla 24. Efecto de la temperatura de incubación y agitación sobre la producción de EPS y la biomasa celular en fermentador 1,5 litros a 200,400 y 600 rpm al cabo de 72 horas.

| FERMENTADOR velocidad de agitación 200 rpm | | | | | | | | | |
|--|-------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| MEDIO | 25 °C | | | 30°C | | | 33°C | | |
| | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO |
| YM | 0,3 | 0,34 | 0,88 | 0,35 | 0,33 | 1,06 | 0,32 | 0,30 | 1,06 |
| LACT. | 0,15 | 0,30 | 0,5 | 0,25 | 0,30 | 0,83 | 0,20 | 0,20 | 1,00 |

| FERMENTADOR velocidad de agitación 400 rpm | | | | | | | | | |
|--|-------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| MEDIO | 25 °C | | | 30°C | | | 33°C | | |
| | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO |
| YM | 0,6 | 0,77 | 0,78 | 0,7 | 0,65 | 1,07 | 0,65 | 0,58 | 1,12 |
| LACT. | 0,35 | 0,63 | 0,55 | 0,43 | 0,54 | 0,79 | 0,40 | 0,45 | 0,89 |

| FERMENTADOR velocidad de agitación 600 rpm | | | | | | | | | |
|--|-------|---------|-------------|------|---------|-------------|------|---------|-------------|
| MEDIO | 25 °C | | | 30°C | | | 33°C | | |
| | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO | EPS | BIOMASA | RENDIMIENTO |
| YM | 0,4 | 0,49 | 0,82 | 0,5 | 0,58 | 0,86 | 0,55 | 0,55 | 1,00 |
| LACT. | 0,39 | 0,55 | 0,71 | 0,40 | 0,52 | 0,76 | 0,36 | 0,40 | 0,90 |

Como observamos, en la tabla 24, la velocidad de agitación es un parámetro fundamental tanto escala de matraces como de fermentador de 1,5 litros con un volumen de trabajo de 1 litro.

Es de considerar que no existe un factor limitante respecto al suministro de O₂, como es el caso del trabajo en fermentadores donde la variable aireación es un factor limitante a los volúmenes de trabajo.

Cuando los valores de agitación son altos 600 rpm o más, aunque la saturación de oxígeno se encuentra prácticamente al 100 %, existe daño celular, consecuentemente la tasa de crecimiento de la biomasa, es muy baja y la producción de goma xantana. Recientemente se ha observado que, como respuesta al estrés hidrodinámico, al interior de la célula se establece una respuesta asociada a los mecanismos de defensa ya conocidos hacia el estrés oxidativo. Esta correlación entre las respuestas ante ambas condiciones de estrés ha sido reportado tanto para bacterias (Sahoo y col. 2003; Sahoo y col. 2004) como para células vegetales (Kieran y col. 2000; Shi y col. 2003; Han y Yuan 2004; Wu y Ge 2004). El porcentaje crítico de saturación de oxígeno se encuentra comprendido entre el 6 y el 10 %.

Como se cita en bibliografías anteriores, la producción de EPS es máxima a temperaturas comprendidas entre 30-33°C, por otro lado la temperatura óptima para el

crecimiento celular se sitúa entorno a 28°C, no obstante la temperatura ideal de producción del EPS depende del medio empleado (Shu y Yang., 1990).

Efecto de la concentración de lactosuero en cultivo líquido. Resultados de la producción de EPS en biofermentador de 2 litros a diferentes concentraciones de lactosuero tratado

Tras tres días de fermentación a diferentes concentraciones de lactosuero, observamos que la mayor concentración de EPS obtenido, se consiguieron a concentraciones de lactosuero comprendidas entre el 5 y 6 %, alcanzándose producciones de 4,47 g l⁻¹ al 6% de lactosuero, figura 58.

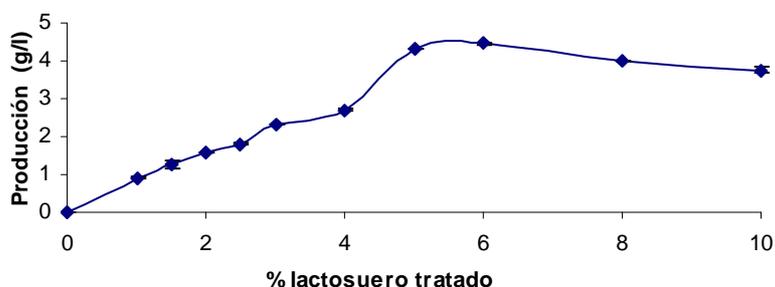


Figura 58. . Efecto de la concentración de lactosuero tratado en la producción de EPS al cabo de 72 horas.

La mayor producción de EPS se desarrolla cuando se adiciona un 6% de lactosuero tratado como medio de cultivo.

Se observa que la concentración de azúcares presentes en el medio de fermentación disminuye durante la fermentación siendo inversamente proporcional a la producción de EPS.

Tabla 25. Efecto de las diferentes concentraciones de lactosuero sobre la producción, por *Xanthomonas campestris*, y su contenido en proteínas y cenizas, en la fracción de polisacárido precipitado con alcohol.

| LACTOSUERO % lactosa | XANTANO(g/l) | PROTEINA % (P/P) | CENIZAS % (P/P) |
|-------------------------|--------------|------------------|-----------------|
| 4 | 2,91 | 1,8 | 25 |
| 5 | 4,31 | 2 | 20 |
| 6 | 4,47 | 2,5 | 28 |

En la tabla 25, puede observarse que la concentración al 5% de lactosuero logra una considerable producción de xantano con la menor producción de cenizas, en comparación con el resto de porcentajes de lactosuero empleadas.

El precipitado obtenido a dicha concentración presentó una textura más gomosa y fácilmente soluble en agua con un mayor incremento en viscosidad. Se seleccionó así, esa concentración de lactosuero para futuras experiencias.

Efecto del pH en la producción de goma xantana.

El control del pH al emplearse como medio lactosuero en la producción de goma xantana por *Xanthomonas campestris*, desempeña un importante papel. Los resultados mostraron que cuando la fermentación se desarrolla sin control del pH, se obtienen rendimientos significativamente menores en la producción con respecto al proceso de fermentación bajo condiciones de pH 7 ± 0.5 , mantenidas mediante adición de NaOH.

La producción de xantano se realiza tanto durante la fase exponencial como en la logarítmica, siendo mayor en la primera. Importante: el pH en el cultivo sufre un ligero incremento al final de la fase exponencial y principio de la estacionaria, coincidiendo con el aumento en el contenido de grupos acilo y en la viscosidad del medio (Tait y col., 1998).

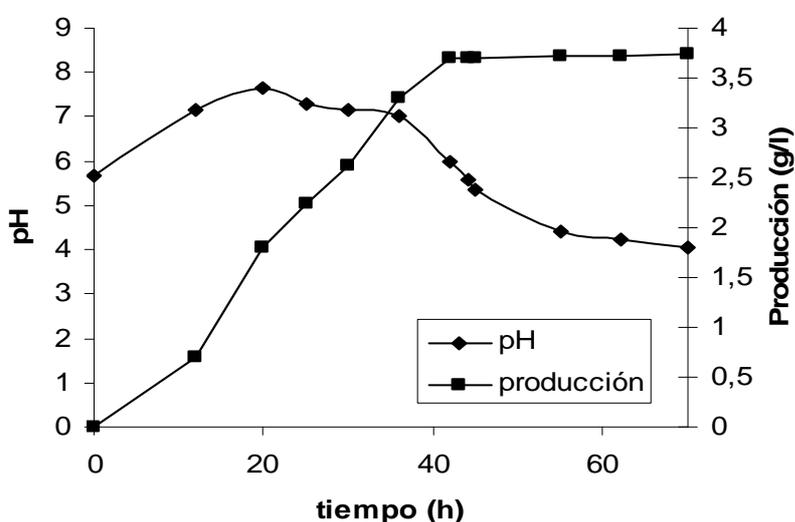


Figura 59. Producción en condiciones de fermentación estandar sin control del pH en medio lactosuero al 5% por *Xanthomonas campestris*.

En condiciones incontroladas del pH, figura 59, se observa que el incremento de la producción de xantano ocurre linealmente hasta 42 horas, donde alcanza 3,70 g/l y prácticamente se detiene a partir de este tiempo, disminuye al alcanzar un pH

próximo a 5, debido a los grupos ácidos presentes en la goma xantana. Bajo estas condiciones de fermentación se alcanza una producción máxima de $3,75 \text{ g L}^{-1}$, transcurridas 70 horas, empleando como medio de cultivo lactosuero al 5 % (p/V). En comparación al valor de producción bajo condiciones de pH controladas ($\text{pH } 7 \pm 0,5$) de $4,31 \text{ g L}^{-1}$.

En la literatura, sin embargo, existe también un gran número de trabajos en los que se realiza la fermentación sin llevar a cabo el control del pH (Rogovin y col., 1961 y 1965; Souw y Demain, 1980; De Vuyst y col., 1987; Funahashi y col., 1987). Santos (1993) y García-Ochoa y col. (1997) proponen realizar la producción sin control de pH pues no resulta beneficioso para la producción.

Generalmente, en los medios de producción se suele incorporar ácido cítrico, ya que se ha comprobado el efecto beneficioso en la producción de ciertos ácidos orgánicos añadidos en pequeñas cantidades en el medio (Souw y Demain, 1980; Trilsbach y col., 1984). No obstante, en este trabajo no realizamos la adición de ningún ácido orgánico, debido que el objetivo era calcular los rendimientos de producción sin la adición de ninguna sustancia externa al lactosuero o sus permeatos.

El pH del cultivo debe mantenerse por encima de 5 con un óptimo entre 6- 7,5, empleándose la adición de un tampón en el medio de cultivo, como NH_4OH ó NaOH favoreciendo la cantidad de biomasa y reduciéndose el tiempo de fermentación, alcanzándose así mayores rendimientos de producción de EPS posibles.

Por otra parte, la concentración de biomasa incrementa durante todo el periodo de fermentación hasta concentraciones de $5,45 \text{ g l}^{-1}$. La máxima concentración de xantano se localiza tras 70 horas de fermentación y posteriormente decrece es los últimos estadios del proceso. Esto es debido a las reacciones de hidrólisis del xantano por la acción varias enzimas como xantanasa (Sutherland, 1988).

1.2. Fenómenos de degradación del EPS

El fenómeno de degradación, tras un prolongado tiempo de incubación, es bastante frecuente en muchos exopolisacáridos microbianos, entre ellos el gelano (Kennedy y Sutherland, 1994) o esfingano (Hashimoto y Murata, 1998). Este efecto es importante ya que pueden verse alteradas algunas propiedades de los biopolímeros;

de hecho, parece existir relación entre la actividad de determinadas enzimas y la disminución de la viscosidad de las soluciones de EPS; estas enzimas producen una escisión a nivel de los enlaces glicosídicos de la cadena polisacáridica y originan polímeros de menor masa molecular, que dan soluciones de menor viscosidad, tal y como se ha demostrado en un estudio llevado a cabo con *Lactobacillus rhamnosus* (Pham y col., 2000).

La degradación de los exopolisacáridos microbianos es un proceso complejo y del que se desconocen muchos aspectos. Generalmente envuelve la acción de diferentes enzimas cuyo estudio se está abordando cada vez con más frecuencia dada la necesidad de tratar de controlar y reducir al máximo su efecto negativo sobre los EPS microbianos (Sutherland, 1999).

Actualmente se ha demostrado la presencia de glicohidrolasas en los extractos celulares y fracciones extracelulares de algunos microorganismos. En un estudio realizado con *Lactobacillus rhamnosus* se ha puesto de manifiesto la existencia de α -glucosidasa (fundamentalmente a nivel intracelular) y α -glucuronidasa (mayoritariamente en la fracción externa) y asociadas a ellas otras enzimas como α -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa y β -D-galactosidasa (Pham y col., 2000). La actividad de dichas enzimas se acentúa en cultivos de mayor edad debido a que en ellos se produce lisis celular y se provoca la liberación de gran número de enzimas. Además, se ha descrito que factores como la temperatura, el pH o la composición del medio pueden influir en el proceso de degradación del EPS (De Vuyst y col., 1998).

La pululanasa es la enzima que hidroliza el pululano, poli α 1 \rightarrow 6 maltotriosa. Rompe el enlace α 1 \rightarrow 6 de la amilopectina y son producidos por cepas de *Aerobacteraerogenes* (*Klebsiella aerogenes*) y *Bacillus cereus* var. *Mycoides*.

En el caso de la goma xantana, son raros los microorganismos que la degradan, aunque en su empleo en la recuperación de petróleo puede verse afectada por la degradación microbiana por actividades enzimáticas (Bragg y col., 1983). Cadmus y col. Identificaron *Bacillus* salino tolerante capaz de degradar la goma xantana. La actividad de la xantanasa es una mezcla de enzimas que atacan a las uniones de las cadenas laterales pero no al esqueleto glicosídico de la xantana como ocurre en la mayoría de las liasas (Cadmus y col., 1982). Sutherland, aisló un sistema de glucanohidrolasa de *Bacillus* cepa R, capaz de hidrolizar los enlaces β 1-3, β 1-4 unidos a D glucanos mediante las cadenas laterales u otros sustituyentes (Sutherland,

1982). La acción de estas enzimas donde su pH óptimo de actuación se sitúa entre 7,5-11 valores de pH alcalinos.

Estudios recientes, demuestran que los productos derivados de la degradación del xantano poseen un efecto antibacteriano frente a la patogenicidad de *X. campestris* pv. *Campestris*. Estos derivados (xanho-oligosacáridos) pueden inhibir el crecimiento de *X. campestris* pv. *Campestris*, evitando en los cultivos de crucíferas el black rot, pudiendo ser una alternativa a los tratamientos con pesticidas tradicionales (Williams, 1980), (Wul y col., 2002).

1.3. Cambios dinámicos en concentración celular, producción de goma xantana y carbohidrato consumido durante la fermentación del medio lactosuero tratado por *Xanthomonas campestris*.

La materia prima que contiene los carbohidratos no convencionales tuvo como origen el lactosuero previamente tratado con β galactosidasa. La composición de este medio se detalla a continuación:

| Medio lactosuero proláctea | |
|----------------------------|---------|
| Humedad | 5% |
| Proteína bruta | 12% |
| Cenizas | 11% |
| Lactosa | 5% |
| Cloruros-NaCl | 4.9 % |
| Concentración de proteína | 0.9- 1% |

Con el fin de optimizar la producción de goma xantana por *X. campestris* en fermentadores de 1 litro de medio como fuente de carbono proveniente del lactosuero, se estudió el efecto de la variación de distintos parámetros. En la figura 60, se observa que lactosuero al 5% de lactosa es la concentración óptima de azúcares totales en el medio lactosuero que favorece el mayor rendimiento y producción de goma xantana y permite obtener el caldo con una mayor viscosidad. Concentraciones superiores al 6% son inhibitorias para la producción de goma xantana. Probablemente ello se deba a que se incrementa el poder reductor del medio.

Por otro lado, el comportamiento que presenta en general el microorganismo frente a la concentración de azúcares presentes en el medio de cultivo es similar al de

otros muchos microorganismos, que crecen mejor cuando la concentración de azúcar no es demasiado alta. En estudios anteriores llevados a cabo con la goma xantana, se evaluó el efecto del porcentaje de glucosa sobre la producción de biopolímero, y se puso de manifiesto que el aporte óptimo de dicha fuente de carbono para la producción de goma xantana está entre el 1 y 5% (p/v), de modo que mayores porcentajes de este componente resultan inhibitorios y no se produce un aumento en la producción de EPS posiblemente debido a una represión catabólica (Leela y Sharma, 2000). De hecho, *Xanthomonas campestris* metaboliza los azúcares mediante una ruta metabólica central en la que, una vez que ingresa la glucosa, se produce primeramente una fosforilación para dar glucosa-6- fosfato que puede incorporarse o bien al metabolismo central en el que es catabolizada hasta piruvato y gliceraldehído 3-fosfato, o bien ser incorporada y utilizada para la producción de polímero. En condiciones de exceso de glucosa en el medio, se induce la activación de una ruta metabólica alternativa consistente en la oxidación directa de la glucosa a gluconato. Bajo estas condiciones es de esperar una disminución de los niveles y con ello menor disponibilidad de glucosa-6-fosfato, necesaria para la producción de EPS, de ahí que el rendimiento en la producción de goma xantana sea menor. A causa de este fenómeno, los procesos de optimización de producción de goma xantana han de incluir estrategias que eviten una acumulación excesiva de glucosa en el medio (Lettisse y col., 2001).

Otra explicación para el comportamiento de la gran mayoría de las bacterias frente a elevados porcentajes de glucosa, podría ser el que a que a elevadas concentraciones de la fuente de carbono, la bacteria sufra una plasmolisis que provoque que la captación de nutrientes no sea lo suficientemente efectiva. Este fenómeno podría evitarse, y con ello hacer que la bacteria tolere mayores cantidades de azúcar, incorporando de forma gradual concentraciones crecientes de la misma al medio en el que crece el microorganismo cada cierto intervalo de tiempo (Sutherland, comunicación personal). Además hay que sumar el hecho de que un incremento de la concentración de azúcar puede traducirse en una utilización ineficaz de la misma al aumentar la síntesis de otros metabolitos en detrimento de la producción de exopolisacárido (Farres y col., 1997).

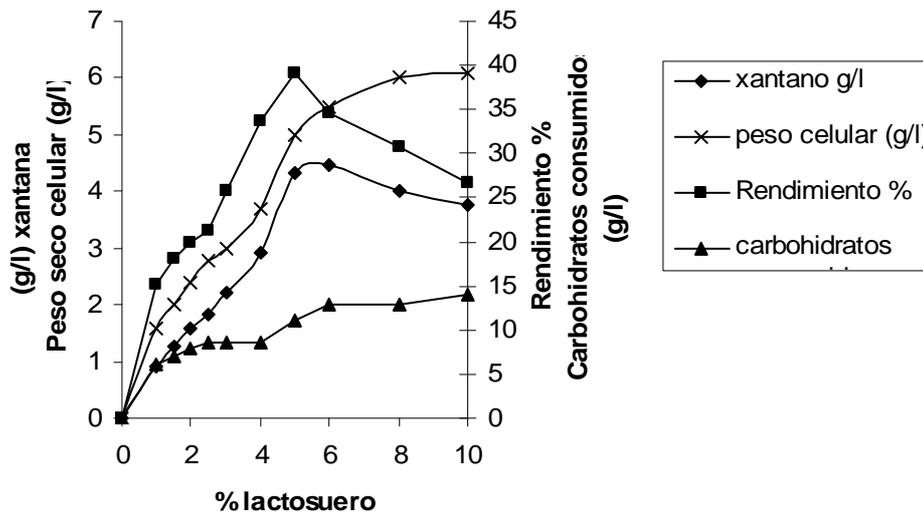


Figura 60. En la figura se representa el efecto de la concentración de lactosuero sobre la biomasa y la producción de goma xantana, la variabilidad de los resultados de producción es muy significativa según concentración del lactosuero existente en el medio.

Cada valor es un promedio de tres experiencias diferentes. El rendimiento se calculó dividiendo la cantidad de goma xantana obtenida entre la cantidad de azúcar consumido.

Es importante señalar, que como se muestra en la figura 60, se alcanza una producción ligeramente superior a la concentración del 6% con una producción de 4,47 g/l en comparación al 5% con una producción de 4,31g/l. No obstante con esta última concentración se alcanzan rendimientos de 39,2 % al 5% de lactosuero, superiores al emplearse lactosuero al 6% con un rendimiento del 34,6%.

Además de obtenerse rendimientos superiores al emplearse lactosuero al 5%, la viscosidad del cultivo es mayor en comparación con cualquier otra concentración de lactosuero. No obstante, es interesante observar que los medios que poseen una relación C/N relativamente baja (suero de leche, harina de soja, torta de maíz y cutícula de arroz) favorecen el crecimiento de *Xanthomonas campestris* pero no incrementan la viscosidad del cultivo.

La productividad específica del EPS, es un parámetro de gran utilidad para comparar la eficacia de la producción de EPS a distintas concentraciones de EPS, relacionando la cantidad de EPS producido por peso de biomasa.

En general, la producción del EPS se incrementa con una alta relación carbono/nitrógeno, mientras que la relación inversa favorece el crecimiento, no obstante una concentración de azúcares excesiva poseen un efecto de inhibición tanto en el crecimiento como en la producción (Souw y Demain, 1979).

1.4. Condiciones generales de producción en fermentador de 1,5 litros de volumen.

Fermentador de 1,5 litros de capacidad

Se utilizó un fermentador LKB de 1,5 litros con un volumen de trabajo de 1 litro. La composición del medio descrita anteriormente, en la cual no se añadió ningún suplemento, el proceso se realizó a 30°C y pH 7.5. El cultivo se agitó a una velocidad constante de 400 rpm durante 72 horas y se suministró aire a un flujo de 0.3 a 1 vvm. Cuando fue necesario se agregó antiespumante (Wacker silicone). Las determinaciones se hicieron como se indica en Materiales y Métodos. apartado 5.2 temperatura, agitación, aireación, y volumen de los inóculos; en cada caso serán precisadas las condiciones experimentales.

Tabla 26. Condiciones generales de producción del fermentador de 1,5 litros.

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| T ^a del proceso | 30 ±1°C |
| Aireación | 1.5 l min ⁻¹ |
| volumen | 1 l de medio lactosuero al 5% |
| Agitación | 400 rpm |
| Duración proceso de fermentación | 72 horas |
| Control del pH | Control del pH a 7,5 |
| Viscosidad del caldo de cultivo | 150cps |

2. Producción en biofermentador de 20 litros.

2.1. Estudio fermentador 20 litros volumen medio

Actualmente, en la producción de la goma xantana se emplea fermentadores de tanque agitado, como el empleado en este estudio, realizándose de forma discontinua. Aunque en el pasado, hubo numerosas experiencias de fermentaciones en continuo, se siguen utilizando en discontinuo, con el fin de evitar contaminaciones por microorganismos indeseables y la degeneración de las cepas.

En los últimos años se están realizando producciones en fermentadores diferentes al tanque agitado, como columnas de burbujeo y airlifts, según sus autores (Pons et al., 1990) estos sistemas presentan innumerables ventajas como un menor stress hidrodinámico, mayor velocidad de transferencia de materia calor, mayores condiciones de mezcla y menores limitaciones en cambio de escala.

En principio al ser *Xanthomonas campestris* una bacteria estrictamente aerobia, la transferencia de oxígeno durante la fermentación, es una variable de suma importancia. Según el tipo de reactor empleado dicha variable puede verse afectada en gran medida, siendo el reactor empleado en este estudio tanto para volúmenes de 1l como de 15 litros a escala piloto, reactores de tanque agitado, donde las condiciones de operación más influyentes son el caudal de aire/ agitación.

La velocidad de agitación se mantuvo constante durante todo el proceso, siendo una velocidad de agitación lo suficientemente alta, como para permitir la transferencia de oxígeno a las células, incluso en estadios avanzados de la fermentación donde la viscosidad del cultivo aumenta dificultando así la difusión de oxígeno en el medio. Ya que en esta fase los microorganismos se encuentran cubiertos por una capa de EPS, que evitan su rotura por efecto de la agitación, la velocidad de agitación es un parámetro esencial para alcanzar los niveles adecuados de concentración de oxígeno disuelto. Si la velocidad de agitación es inicialmente muy alta, las bacterias sufren daños celulares, pero si no existe suficiente agitación cuando aumenta la viscosidad, no se consigue una eficiente velocidad de transporte de oxígeno, y su concentración disminuye hasta cero, lo cual afecta de forma negativa al microorganismo, que es aerobio estricto, y en consecuencia a la producción del polisacárido, por ello se adoptó una velocidad de agitación fija de compromiso,

Debido a que *Xanthomonas campestris* es una bacteria aerobia estricta, el oxígeno disuelto en el medio puede ser un nutriente limitante del crecimiento del microorganismo. No obstante, en este caso, el oxígeno disuelto no actúa de limitante del crecimiento ya que los experimentos han sido realizados una agitación suficiente para compensar la bajada de concentración de oxígeno por el consumo de las células en el crecimiento y además por el aumento de la viscosidad en el medio, como consecuencia de la producción de goma xantana. La concentración de oxígeno no desciende hasta cero si no que permanece alrededor del 10% del valor de saturación.

Para efectuar cambios de escala en las fermentaciones aerobias, uno de los criterios más ampliamente utilizados es la de mantener valores similares de la concentración de oxígeno disuelto o su velocidad de transferencia, siendo el parámetro de transferencia volumétrico $k_l a_w$.

La transferencia de oxígeno en un fermentador de tanque agitado está en función de múltiples variables; propiedades físicas del líquido (viscosidad, tensión superficial), geometría del tanque y del agitador, tipo de difusor empleado, condiciones de operación etc.

En nuestro caso con las diluciones de goma xantana para biorreactores de 15 y 2 litros, cuando la reología se describe mediante el modelo de Ostwald-de Waele.

2.2. Resultados producción en fermentador de 20 litros.

Mediante el presente trabajo queda demostrado que es posible desarrollar medios de cultivo baratos basados en desechos agroindustriales (lactosuero), donde la bacteria puede sintetizar el polisacárido. El lactosuero tratado, puede ser útil en las formulaciones de medios para la producción de goma xantana a nivel industrial.

Los parámetros empleados en el fermentador de 20 litros aplicaron con un volumen útil de 15 litros, posteriormente del escalado inicialmente realizado en fermentadores de 1,5 litros;

Debemos tener en cuenta que se pueden tener sistemas donde los microorganismos crecen con múltiples sustratos, pero en el caso que todos son limitantes. Ej, C, N₂, O₂, luego la cantidad de cada uno de ellos afecta la cinética de crecimiento.

Por ello la transferencia de oxígeno es un factor fundamental para el escalado, el comportamiento de las fermentaciones está fuertemente influenciado por una serie de operaciones de transferencia.

Es posible que una determinada fermentación, en especial las aeróbicas, esté limitada en sus posibilidades de mejorar su rendimiento y productividad, no por razones propias de las características de las células sino que por problemas en el diseño que permita satisfacer la alta demanda de transferencia de masa, y en especial de oxígeno.

La agitación es una operación muy importante tanto del punto de vista técnico como económica. La agitación es importante para: un mezclado homogéneo, una buena transferencia de masa y de calor, permite disminuir el espesor de la película líquida estática. Por ello la agitación se mantuvo constante a una velocidad de 400 rpm, velocidad de compromiso entre conseguir una óptima transferencia de masa y de calor, además de evitar daños celulares.

Otro de los parámetros a resolver fue la velocidad de flujo de aire, como ya se ha mencionado anteriormente se trata de un parámetro de vital importancia, optando por una tasa específica de aireación de 1 vvm (volúmenes de aire por volumen de líquido por minuto). Parámetro de vital importancia en el escalado, debido a que al tratarse de un cultivo aerobio de células requiere el suministro de oxígeno a una determinada velocidad para asegurar la plena satisfacción de sus requerimientos metabólicos.

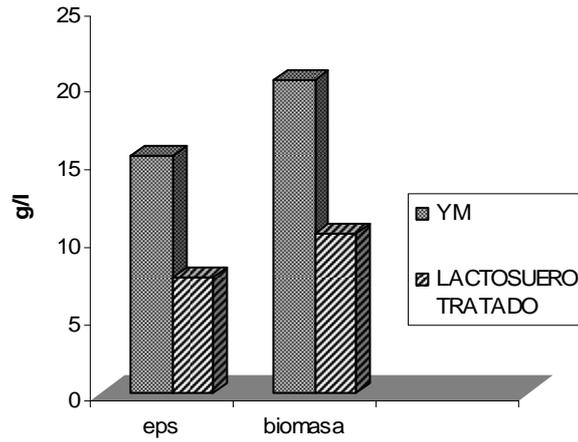


Figura 61. Producción de EPS y biomasa en fermentador de 20 litros.

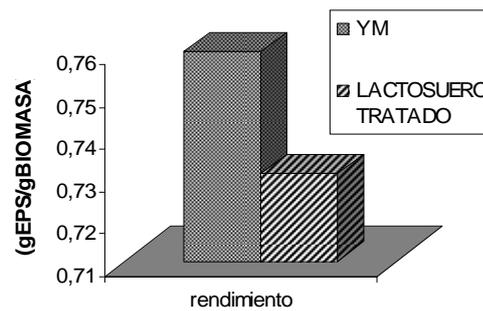


Figura 62. Comparativa del rendimiento en la producción de goma xantana en fermentador de 20 litros entre medio YM y lactosuero tratado con β -galactosidasa.

Los rendimientos obtenidos a escala del fermentador de 20 litros son considerables, se consiguieron unas tasas de producción de 15,43 g/l en medio YM y de 7,54 g/l en medio lactosuero tratado con biolactasa, transcurridas 96 horas de fermentación, figura 61. Por otro lado, cabe destacar los altos rendimientos obtenidos, en ambos casos, con valores de 0,76 y 0,73 respectivamente, ver figura 62.

3. Procesos postfermentación y método de recuperación del alcohol isopropílico (IPA)

3.1. Recuperación del disolvente por destilación.

En la mayoría de las aplicaciones industriales, los disolventes tienen una función transitoria, pues facilitan un proceso o tarea, para luego salir del sistema, lógicamente contaminados con otras sustancias químicas.

El uso habitual de grandes cantidades de disolventes orgánicos en todo el mundo así como el precio de mercado de estos disolventes y las regulaciones en materia de seguridad y protección del medio ambiente, plantea a la industria la necesidad de eliminar emisiones químicas de acuerdo con la reglamentación vigente y reducir costes de gestión de residuos resultantes de la manipulación de dichos disolventes. La solución convencional de la industria consiste en emplear tecnologías de tratamiento a final de línea, cada vez más sofisticadas, para el reciclado, recuperación y reutilización de los disolventes. En respuesta al endurecimiento de la legislación, que refleja la creciente concienciación mundial en materia de medio ambiente, la industria en general ha comenzado a reconsiderar sus procesos. Recientemente, la política de prevención de la contaminación, reflejada en España en la ley 16/2002 de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, que transpone la directiva 96/61 de la Unión Europea, da un paso más buscando los mejores materiales, procesos y técnicas disponibles para reducir o eliminar la generación de contaminantes o residuos en origen. Por un lado, se concede mayor importancia al diseño y selección de los disolventes más adecuados para una operación, sustituyendo los disolventes cuyo uso ha sido regulado y restringido por las normas sanitarias, ambientales y de seguridad actuales. Por otro lado, cuando un disolvente forma parte de una reacción de proceso, es mucho más difícil de sustituir, ya que influye en la naturaleza del producto de la reacción. En tal caso, el disolvente ha de ser separado de la corriente de producto y, aunque puede ser necesario el almacenamiento intermedio antes de su recirculación a la siguiente carga al reactor, esto es preferible a disponer del disolvente como residuo tóxico.

Una de las formas de contaminación más habituales en la industria química es la contaminación de los disolventes con cantidades más o menos pequeñas de agua al final del proceso de fabricación.

Esto hace fundamental una etapa de deshidratación de las corrientes orgánicas en procesos industriales, para lo cual es necesario determinar la mejor tecnología disponible que cumpla los valores límite de emisión autorizada, desde el punto de vista tecnológico y ambiental. De los métodos tradicionalmente disponibles para la separación de agua, la adsorción y la destilación son las tecnologías más empleadas. La adsorción se utiliza, sin embargo, para secar compuestos orgánicos en los que la cantidad inicial de agua es muy pequeña, esto es, del orden de partes por millón (Rivero Martínez, 2002).

Las disoluciones acuosas de disolventes orgánicos se separan habitualmente mediante destilación simple, aprovechando las diferencias de composición entre la fase líquida y la fase vapor originadas por la vaporización parcial de la alimentación líquida o la condensación parcial de la mezcla en fase vapor. El vapor se enriquece en los componentes más volátiles, mientras que la fase líquida se empobrece en esos mismos componentes.

El disolvente empleado en este caso alcohol isopropílico, puede ser y debe ser recuperado mediante destilación. En principio, la principal desventaja del empleo de solventes orgánicos se debe al coste relativo de la fase de destilación del alcohol isopropílico, debido a los grandes volúmenes de agua que implica el proceso de recuperación del EPS (Swift, 1983). Además, de la existencia de precipitados de proteínas, sales y/o pigmentos reduciendo así la pureza y cambios de coloración del producto.

Para la recuperación del alcohol isopropílico a partir de los caldos de cultivo diluidos, se empleó una destilación al vacío fraccionada rotacional mediante un aparato Bohlin con baño termostático, a partir de un matraz de un volumen de 1 litro y una capacidad de 400 ml, a una temperatura de 40°C durante 20 minutos se consiguió destilar un 80% del alcohol isopropílico total empleado.

La recuperación de isopropanol es otra de las operaciones de deshidratación representativas en la purificación de disolventes orgánicos. En 1992 se recuperaban más de 550.000 toneladas de este alcohol en Europa (Sullivan, 1997). El 2-propanol o isopropanol (IPA) es uno de los alcoholes más importantes, ya que sirve como reactivo en la síntesis de varios compuestos orgánicos, tales como la acetona y el peróxido de hidrógeno. También se utiliza como desinfectante en aplicaciones médicas, en la hidrogenación de azúcar y gelatina en la industria alimentaria, y como disolvente de

limpieza en la industria de circuitos electrónicos, además de la extracción y precipitación de muchos exopolisacáridos.

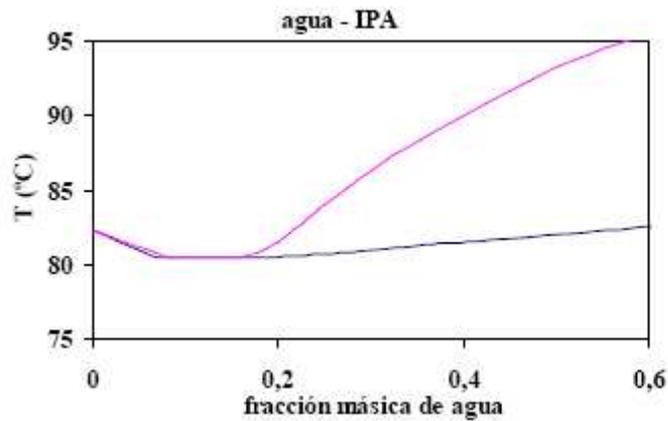


Figura 63. Curvas de equilibrio líquido-vapor a presión atmosférica (Perry y Green, 1997).

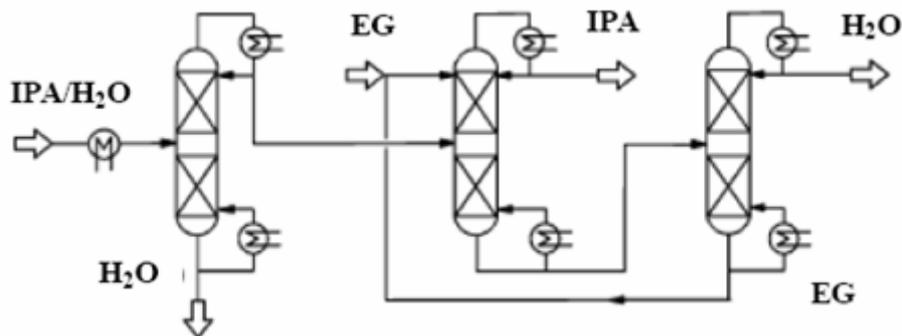


Figura 64. Diagrama de flujo de la destilación extractiva para la separación de agua e isopropanol (Sommer y Melin, 2004).

La deshidratación de isopropanol se lleva a cabo mediante destilación extractiva con etilenglicol como agente de arrastre. La Figura 64, representa un proceso típico de destilación extractiva para separar el azeótropo agua/isopropanol, en el cual la alimentación se concentra hasta casi la composición azeotrópica en la primera columna. El destilado tiene una composición ligeramente inferior a la composición azeotrópica y del fondo de la columna se retira el agua, que es el componente menos volátil. En la segunda columna es donde tiene lugar la separación del azeótropo. Para ello, se añade el disolvente auxiliar, etilenglicol (EG), por cabeza de columna, para extraer el agua. El destilado de esta segunda columna es el producto alcohol isopropílico deshidratado. El producto de cola es una mezcla de agua y etilenglicol, que se separa en la tercera columna para recircular el EG a la segunda columna, obteniendo por cabeza agua casi pura que se junta con la producida en la primera columna para verterlo al curso receptor. Generalmente, es necesario añadir

pequeñas cantidades de EG nuevo al reciclado, para reponer lo que se ha perdido en el proceso.

Información adicional sobre los equipos y ecuaciones de diseño de las operaciones convencionales de separación de mezclas acuosas de disolventes orgánicos puede encontrarse en la bibliografía (Perry y Green, 1997; McCabe y col., 1993).

La destilación es, por tanto, una técnica de separación conocida y fiable. Sin embargo, su consumo energético es muy elevado, generando altos costes de operación, y altos o moderados costes de inversión, sobre todo cuando se trata de separaciones difíciles, en las que es necesario utilizar columnas con un elevado número de platos (como en el caso agua-acetona), o bien combinar varias columnas (como en los casos agua-THF y agua-IPA) y utilizar un arrastrador que genera impurezas no deseadas en el producto además de corrientes secundarias. Esta situación proporciona motivos suficientes para el desarrollo de nuevos procesos de separación más eficaces, como pueden ser las separaciones con membranas.

3.2. Métodos alternativos de membranas

Durante las últimas décadas, las separaciones con membranas están encontrando un grado de aplicación a gran escala, debido a su sencillo diseño, consumo eficaz de la energía y menor costo de operación que los procesos convencionales, operación en modo continuo, sin necesidad de regeneración de adsorbentes; lo cual favorece la flexibilidad del diseño, construcción modular, lo cual si bien no significa economía de escala, sí facilita su aplicación tanto en unidades pequeñas como grandes, así como su integración con otras técnicas de separación formando procesos híbridos económicamente atractivos en muchas aplicaciones industriales. Todo esto hace ocupar a las operaciones con membranas un lugar preferente en el listado de mejores técnicas disponibles recogidas en la ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación. Por este motivo, se dedica mucha atención al desarrollo de la ciencia y tecnología de membranas, tanto en lo relativo a su funcionamiento, diseño de módulos y procesos, como al desarrollo de nuevos materiales y al análisis de los mecanismos de transporte de materia.

La pervaporación (PV) es una tecnología de membranas utilizada para separar mezclas líquidas. El término "pervaporación" (PV) es una contracción de los términos permeación y evaporación, ya que se trata de un proceso de separación en el cual una mezcla líquida se pone en contacto con una membrana selectiva y uno de los

componentes de la mezcla se transporta mediante permeación preferencial a través de la membrana, saliendo en fase vapor del otro lado de la membrana, como se muestra en la figura 65.



Figura 65. Diagrama del mecanismo de pervaporación a través de una membrana.

La aplicación de la pervaporación en la deshidratación de alcoholes, principalmente etanol e isopropanol, tiene una amplia implantación, con más de 150 instalaciones industriales en todo el mundo (Brüschke, 2001).

Se utilizan membranas hidrófilas, a través de las cuáles se produce la permeación preferencial del agua, para la deshidratación de disolventes orgánicos, sobre todo mezclas azeotrópicas. Estas membranas separan el agua con flujos y selectividades variables en función de la estructura química de su capa activa así como de su morfología. La mayoría de las membranas hidrófilas disponibles en el mercado están hechas de alcohol polivinílico (PVA), más o menos entrecruzado mediante agentes especiales o temperatura para proporcionar la resistencia química necesaria en medios ácidos o solvatados. Se observa que en los últimos años se ha producido un notable aumento de los trabajos en los que se emplean membranas cerámicas hidrófilas, en especial aquéllas cuya capa activa está hecha de sílice o de zeolita NaA.

Por tanto podemos concluir que la tecnología de pervaporación con membranas cerámicas microporosas, para evitar las desventajas de las membranas poliméricas convencionales, tales como la inestabilidad térmica y química, puede ser empleadas con éxito para la recuperación del solvente alcohol isopropílico empleado en el proceso de extracción de la goma xantana.

Parte IV
Composición química de los
Exopolisacáridos

1. Composición química de los exopolisacáridos.

Los polímeros estudiados son heteropolisacáridos con un carácter aniónico, constituidos fundamentalmente por carbohidratos, aunque con diversos sustituyentes orgánicos en su composición, como restos acetilo, restos piruvato, hexosaminas y proteínas. Excepto algunos de los EPS estudiados, como el curdlano, que además de ser un homopolisacárido, no iónico, posee una importante fracción inorgánica dada fundamentalmente por los grupos sulfato, poco frecuentes entre los EPS microbianos, y que podrían conferir a los polímeros que los poseen importantes propiedades biológicas. Aoki y col, han demostrado in vitro la efectividad del curdlano sulfatado para el tratamiento del VIH-1 (Aoki y col., 1991), otros estudios demuestran que estimula la respuesta inmune frente a infecciones (Ashida, y col., 1997; Fujiki, 1997).

En la tabla 27, se recogen los resultados de los análisis elementales llevados a cabo en las diferentes muestras de EPS, concretamente de las diferentes gomas xantana obtenidas a partir de distintos medios de cultivo. Los resultados indican que apenas existen diferencias significativas entre los contenidos de los elementos C, N, H de los EPS obtenidos a partir de los diferentes medios procedente del lactosuero, medio YM, y su homólogo comercial.

Los resultados se expresan como porcentaje total del peso seco del polímero. Los datos son la media de tres determinaciones.

Tabla 27. Resultados de los análisis elementales del xantano obtenido de diferentes medios (lactosuero, YM) comparados con su homólogo comercial.

| EPS | N (% peso) | C (% peso) | H (% peso) | Ácido % pirúvico | Carbohidratos | Proteínas | Acetilo | Cenizas % |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|-----------|---------|--------------|
| Xantano YM | 1,40 | 53,50 | 7,02 | 3,2 | 65 | 1,2 | 2,4 | 8,2 |
| Xantano Lactosuero | 1,54 | 51,56 | 6,80 | 2,6 | 63 | 1,4 | 1,9 | 9,4 |
| Xantano Comercial | 1,63 | 56,78 | 7,32 | 5,1 | 68 | 1,2 | 2,7 | 10,7 |

Los EPS están compuestos mayormente por unidades polisacáridicas unidas mediante distintos tipos de enlaces, formando secuencias repetitivas. A dichos azúcares se les unen sustituyentes orgánicos e inorgánicos determinando parte de sus características y propiedades.

Para determinar los azúcares y analizarlos cuantitativamente es necesaria la hidrólisis ácida y previa del polisacárido en condiciones suficientemente suaves para no causar degradación. En la práctica, sin embargo, puede ocurrir la destrucción de algunos monosacáridos o la hidrólisis incompleta por la presencia de aniones resistentes. Por tal motivo es conveniente utilizar diferentes condiciones de hidrólisis para analizar los distintos componentes de un polisacárido.

Los valores de carbohidratos totales del EPS se sitúan entre 68 % del xantano comercial y el 63 % del xantano procedente del medio lactosuero, los valores de los carbohidratos son en general menores debido a la estructura compleja del polisacárido, resistente a los reactivos empleados en la determinación, detectándose una cantidad menor de monosacáridos del existente en la realidad.

Los valores de proteínas oscilaron entre 1,2% tanto del EPS procedente del formato comercial como el procedente del medio YM, y del 1,4% del medio lactosuero purificados. Generalmente las proteínas presentes en el polímero son impurezas procedentes del medio de cultivo o de restos citoplasmáticos que fácilmente son arrastradas durante la extracción del exopolisacárido y que pueden ser eliminados, en gran medida, mediante la etapa de ultrapurificación de los EPS por ultracentrifugación y diálisis.

Por tanto, en principio tenemos que pensar que el contenido en proteínas detectado en los exopolisacáridos purificados representa en su mayor parte proteínas que forman parte del exopolisacárido, que están unidas al mismo, consideradas como un contaminante, no obstante, habría que realizar estudios estructurales más profundos para asegurar dicha afirmación. El contenido proteico de los exopolisacáridos puede desempeñar un papel fundamental en la actividad emulgente de los polímeros, como ha sido descrito para otros exopolisacáridos (Navon-Venezia y col., 1995; 1998; Shepherd y col., 1995; Béjar et al., 1998; Bouchotroch y col., 2000; Desai y col., 1997).

Los grupos acetilo forman parte de todos los EPS estudiados, los valores oscilan entre 2,7 del xantano comercial y 1,9 del xantano procedente de lactosuero. La presencia de grupos acetilo confiere carácter hidrófobo a los exopolisacáridos que los contienen, lo que puede contribuir a su potencial actividad emulgente, como Ashtaputre y Shah (1995) han descrito para un polímero sintetizado por

Sphingomonas paucimobilis. Además, el efecto de los grupos acetilo sobre las propiedades físicas de los exopolisacáridos está bien documentado. Así, además de afectar a las propiedades gelificantes de determinados polímeros como alginatos o gelano (Skjak-Braek y col., 1988; Chandrasekaran y Thailambal, 1990), también afectan a la unión de iones metálicos con polímeros como los alginatos bacterianos (Geddie, 1992). El contenido en piruvato es independiente de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, se obtiene un mayor grado de acetilación cuando la producción se realiza con una agitación elevada, por otro lado la limitación de oxígeno disuelto da lugar a polisacáridos de menor peso molecular.

La presencia de ácido urónico y pirúvico producen un polisacárido de tipo aniónico (Sandford y Baird, 1983). El xantano comercial presenta mayores ventajas en cuanto aplicación, al poseer mayor carga de ácidos urónico y pirúvico, esto significa que el porcentaje en ácidos urónicos de un EPS es importante y deseable ya que estos restos confieren carga negativa al polisacárido (Sutherland, 1990), confiriéndole carácter aniónico con capacidad para captar cationes pudiéndose utilizar en la biorremediación de lugares contaminados con metales pesados o aguas residuales. (Geddie y Sutherland, 1993; de Philippis y Vicenzini 1998; Sutherland, 1994).

Por otro lado la presencia de ácidos urónicos confiere al EPS una mayor resistencia a la degradación por hidrólisis ácida H_2SO_4 y se impide en ocasiones que la determinación de carbohidratos se lleve a cabo de forma correcta (Pfiffner y col., 1983), como anteriormente ya se ha mencionado.

Los polisacáridos presentaron un porcentaje en restos piruvato (entre 2,6% del EPS procedente del lactosuero tratado y 5,1% p/p del EPS comercial), constituyentes que también contribuyen a la carga neta negativa de las moléculas de polisacárido. La presencia de estos grupos es determinante de las propiedades reológicas de la goma xantana. Concretamente, parece ser que un elevado grado de piruvatación origina soluciones de mayor viscosidad y de mayor termoestabilidad (Capron y col., 1998). No obstante, también se ha descrito que los grupos piruvato inestabilizan el estado ordenado de las cadenas de goma xantana, debido a las repulsiones electrostáticas existentes entre ellos (Gamini y col., 1991).

En multitud de EPS se ha observado una relación entre la composición química y la viscosidad, demostrándose un aumento de los grupos O-acetilo favorece la viscosidad del xantano (Sutherland, 1994).

Una goma xantana con un contenido alto en acetato y especialmente en piruvato, implican mayores aumentos en la viscosidad de soluciones acuosas al favorecer las asociaciones intermoleculares (Tako y Nakamura, 1984). Demostrándose que las concentraciones de acetato y piruvato encontradas en la goma xantana comercial, son mayores, presentando diferencias de viscosidades en soluciones acuosas con goma xantana obtenida a partir de lactosuero tratado.

Monosacáridos constituyentes de los EPS

Tabla 28. Composición química del xantano comercial y del xantano procedente del lactosuero tratado.

| EPS | MANOSA | GLUCOSA | Ác.GLUCURÓNICO |
|--------------------|--------|---------|----------------|
| x. comercial | 28,00 | 41,45 | 20,90 |
| x.lactosuero trat. | 29,40 | 40,00 | 9,02 |

Tabla 29. Composición química del succinoglicano comercial y del succinoglicano procedente del lactosuero tratado.

| EPS | GLUCOSA | GALACTOSA | Ac.PIRÚVICO | Ac. succínico | Ac. acético |
|-----------------------------|---------|-----------|-------------|------------------|----------------|
| succinoglicano comercial | 80 | 10 | 5,9 | 0,4 | 0,5 |
| Succinoglicano comercial | 78 | 8 | 4,2 | 0,4 | 0,3 |

Los porcentajes coinciden con el succinoglicano producido por la *A. radiobacter*, cepa 10C3 produce un EPS con un contenido del 77% de glucosa, 6.7 % galactosa, 1,9 % manosa y 10,6% ácido succínico al crecer en medios de cultivo que contenía 0,1 % de YE (Harada, 1965).

El peso molecular y la cantidad de ácido pirúvico y grupos acilo del xantano dependen de la cepa empleada (Cadmus y col., 1978; Kennedy y Bradshaw, 1984), de la composición del medio y de las condiciones o parámetros de fermentación (Cadmus y col., 1978; Souw y Demain, 1979; Trilsbach y col., 1984; Peters y col., 1993).

La glucosa fue el monómero presente más abundantes en los EPS, el ácido glucurónico es frecuente entre los exopolisacáridos microbianos, mientras que el ácido galacturónico se detecta en muchas menos ocasiones (Sutherland, 1994).

Las condiciones de fermentación no afectan al tipo de azúcares de los exopolisacáridos microbianos, aunque influyen de forma importante en su conformación final, masa molecular, grado de sustitución y proporción de los distintos monosacáridos constituyentes (Orgambide y col., 1991; Sutherland, 1994).

Parte V

Estudio de las propiedades reológicas y análisis en sistemas alimentarios de los exopolisacáridos obtenidos

1. Propiedades reológicas de los EPS.

La reología proporciona información de enorme valor previa a la comercialización de un determinado producto, dependiendo de su relación entre sus estructuras y sus atributos físicos, el comportamiento en una determinada aplicación industrial así como su textura una vez integrado en el producto final.

El estudio realizado en la presente Tesis doctoral se ha planteado, en primer lugar determinando las viscosidades de los EPS en solución acuosa, y posteriormente profundizando en las propiedades reológicas del EPS obtenido a partir del lactosuero en comparación con su homólogo comercial.

Hemos estudiado, el efecto de diversos factores sobre la viscosidad de los EPS en solución determinando los parámetros que conforman el poder viscosizante de nuestros EPS. También ha sido objeto de estudio el comportamiento reológico de las soluciones de los EPS, en cuanto a las variaciones que se producen en la viscosidad en función del gradiente de deformación (pseudoplasticidad) y el tiempo (tixotropía), realizándose un estudio de las propiedades viscoelásticas de los EPS. Por último, estudiamos el efecto sinérgico de los EPS con otros estabilizantes y gelificantes, como los carragenatos, ampliamente utilizados en la industria alimentaria.

1.1. Comparación de las propiedades reológicas y otros parámetros entre los xantanos obtenidos a partir de diferentes medios, con su homólogo comercial.

Las propiedades y características exigidas al xantano, que deben cumplir las especificaciones comerciales son las siguientes:

Contenido en cenizas y humedad.

Contenido en nitrógeno, acetato y piruvato.

Viscosidad (como indicación del peso molecular) y comportamiento reológico.

La viscosidad es una propiedad de los fluidos de gran importancia en múltiples procesos industriales, además de ser una variable de gran influencia en las mediciones de flujo de fluidos, el valor de viscosidad se usa como punto de referencia en la formulación de nuevos productos, facilitando la reproducción de la consistencia de un lote a otro en lo que respecta a la fabricación a nivel industrial.

La viscosidad se considera como el atributo industrial de mayor importancia al tratarse de EPS, por lo que se compararon las propiedades del xantano comercial con los obtenidos a partir de diferentes medios.

Los parámetros más importantes del xantano obtenidos a partir de diferentes medios de cultivo con su homólogo comercial se reflejan en la tabla 30, presentando unas características y propiedades muy similares.

Tabla 30. Comparativa de los parámetros de los distintos EPS obtenidos a partir de medio lactosuero y medio YM con su homólogo xantano comercial.

| | Estado físico | pH | Viscosidad (cp) 1% solución acuosa | Humedad % |
|---------------------------|----------------------|-----------|--|------------------|
| Xantano comercial | Polvo, color crema. | 7 | 865 | 13,1 |
| Xantano lactosuero | Polvo, color blanco. | 6,3 | 650 | 22,2 |
| Xantano YM | Polvo, color crema. | 6,5 | 780 | 22,8 |

1.2. Pseudoplasticidad y características físicas: color de los distintos EPS liofilizados obtenidos a partir de lactosuero

Todas la muestras analizadas de las soluciones acuosas al 1% (p/V) mostraron un alto grado de pseudoplasticidad típico de las soluciones de xantano comercial, figura 66. Como veremos esta es una característica de vital importancia para que los EPS puedan ser empleados en la mayoría de los sistemas alimentarios.

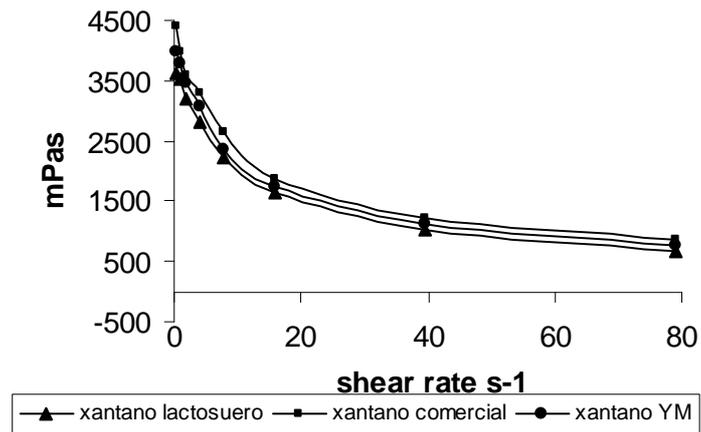


Figura 66. Pseudoplasticidad de los diferentes xantanos evaluados.

La pseudoplasticidad determina que muchos EPS de origen bacteriano puedan aplicarse en sistemas alimentarios por contribuir a una mejor textura y propiedades organolépticas (Lapasin y Pricl, 1995).

Esta propiedad es fundamental para los EPS empleados en productos lácteos y otros sistemas alimentarios, ya que el producto en condiciones de reposo ha de mantener una consistencia que impida la precipitación de partículas y una vez es ingerido por el consumidor se requiere una disminución de la viscosidad presentando una textura cremosa en paladar.

Otra característica presente en estas soluciones de EPS es su naturaleza tixotrópica, es decir la recuperación inmediata de su viscosidad tras el cese de la fuerza de cizalla. Es decir, la recuperación de su estado inicial tras la deformación sufrida, reflejo de un comportamiento elástico (sólido) y viscoso (fluido), lo que determina un cierto carácter viscoelástico de las soluciones de los EPS obtenidos a partir de diferentes medios,

Generalmente el aumento de la viscosidad de una solución está relacionada con la concentración del polímero disuelto. El xantano, presenta una ventaja respecto a otros polímeros ya que las dispersiones acuosas de este polímero presentan altas viscosidades a bajas concentraciones.

Un parámetro a tener en cuenta en los sistemas alimentarios es el color; el xantano obtenido a partir del lactosuero, (ver figuras 67 y 68) presenta la particularidad de no transferir ningún tipo de color, siendo transparente en soluciones acuosas incluso a concentraciones de hasta el 4%(p/V). Característica muy importante al tratar de introducir el producto en sistema alimentarios neutros, sin aporte alguno de color, olor y sabor.



Figura 67.

Fotografía: Xantano obtenido a partir de medio lactosuero.



Figura 68.

Fotografía: Xantano obtenido a partir de YM.

No obstante existen ligeras diferencias de color del EPS obtenido a partir del medio lactosuero y medio YM. Obteniéndose una coloración mas blanquecina en el EPS procedente del medio lactosuero.



Figura 69. Aspecto del curdlano liofilizado.

1.3. Estabilidad frente a la temperatura

El comportamiento del EPS en función de este parámetro es vital para su empleo posterior en diferentes aplicaciones industriales que requieran cambios de temperatura.

Las soluciones acuosas de los EPS son especialmente estables a rangos de temperatura muy amplios, como muestra la figura 70, ambos EPS tanto comercial como obtenido a partir de lactosuero muestran una gran estabilidad de la viscosidad a temperatura ambiente hasta los 60° C, donde empieza a descender ligeramente el valor de la viscosidad.

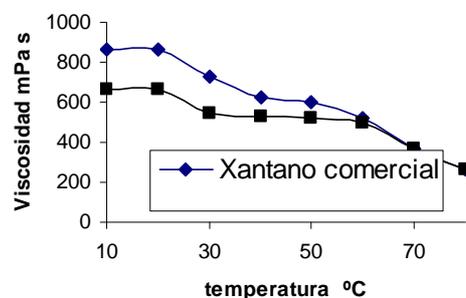


Figura 70. Estabilidad reológica de los diferentes xantanos evaluados frente a la temperatura.

Esta disminución se explica, por una transición desde los estados ordenados que normalmente caracterizan la estructura polisacáridica, a estados más desordenados a medida que la temperatura de la preparación se incrementa. Los polímeros microbianos se ven afectados por la temperatura de diferente forma, aunque generalmente un aumento en la temperatura conlleva una disminución en la viscosidad de las soluciones. En el caso del xantano en solución, debido a su rigidez molecular, permanece prácticamente inalterado tras elevar la temperatura, característica de gran utilidad por ser estable en multitud de procesos industriales que precisan de calentamiento (Sutherland, 1990).

La conformación adquirida por el xantano depende de la temperatura de la solución, adquiriendo una conformación ordenada (doble hélice a temperaturas comprendidas entre 25-40°C) o una conformación desordenada (de ovillos, a temperaturas de disolución elevadas 60-80°C).

1.4. Estudio del efecto de ciclos de congelación - descongelaciones sucesivas.

En lo referente a los procesos de congelación – descongelación, se determinó que tanto las soluciones de los EPS tanto del xantano comercial como el obtenido a partir de medio lactosuero, poseen una excelente estabilidad frente a ciclos de congelación descongelación.

La congelación no afecta a las propiedades reológicas de los EPS lo que lo hace potencialmente útil para aplicaciones en productos congelados, manteniéndolos estables durante sucesivos ciclos de congelación descongelación. Estabiliza la textura, evitando la sinéresis o pérdida de agua, aumentando así la vida útil del producto al evitar además la formación de hielo (Vafiadis, 1999).

Otros usos, podrían ser aumentar la viscosidad de salsas o postres lácteos a base de frutas, incluso en la recuperación del petróleo, debido a su estabilidad frente a la temperatura y a la fuerza iónica, y a su capacidad de retención del agua.

1.5. Estudio de la conservación a 4°C en diferentes soluciones de xantano.

Realizamos un seguimiento a temperaturas de refrigeración de los parámetros físicos de diferentes soluciones al 1% (p/v) de xantano comercial, xantano procedente de lactosuero sin pasteurizar y xantano procedente de lactosuero pasteurizado.

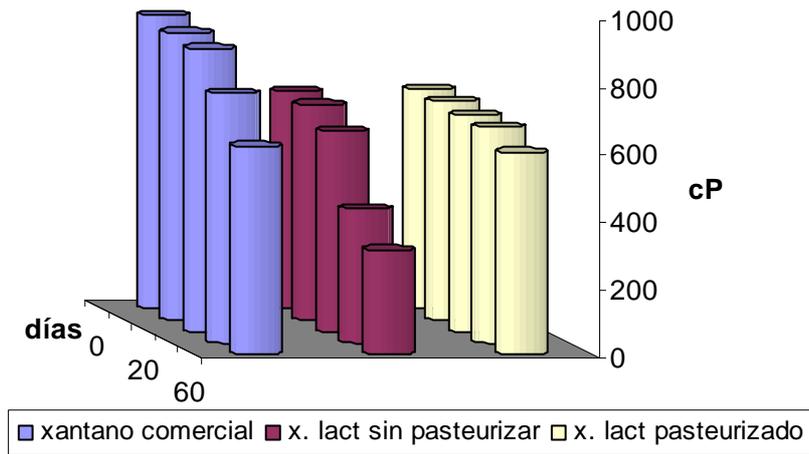


Figura 71. Conservación de las soluciones de xantano a 4°C.

El objetivo del estudio fue evaluar la vida útil de las diferentes soluciones de EPS, determinando la importancia del proceso de pasteurización que recibe el xantano durante su procesamiento.

Como se observa en la figura 71, tanto las soluciones del xantano comercial donde además del proceso de pasteurización se le aplica un proceso de molienda como el xantano procedente del lactosuero al que se le aplica un proceso de pasteurización, mantienen prácticamente los valores de viscosidad invariables hasta prácticamente 40 días a 4°C.

Por el contrario, el xantano procedente del lactosuero sin pasteurizar, los valores de viscosidad descienden notablemente situándose a los 2 meses a la mitad de los valores iniciales de viscosidad.

Podemos afirmar, que el tratamiento de pasteurización es esencial para preservar las características de las soluciones de los EPS, ya que están expuestos a los ataques de otros microorganismos y enzimas provocando su degradación, incluso a temperaturas de refrigeración.

Estas enzimas denominadas liasas, son producidas por múltiples microorganismos, *Bacillus liasas* descritas por Sutherland, I.W. (1987) actúan fragmentando las cadenas de los EPS por un mecanismo de β eliminación, actúan a pH alcalinos en torno a 7,5 -11 (Cadmus y col., 1982).

1.6. Resistencia a la esterilización en autoclave de vapor.

Se sometieron los EPS obtenidos a partir de lactosuero, medio YM y xantano comercial a una esterilización en autoclave durante 20 minutos a 112°C.

Siendo el poder viscosizante de los EPS ensayados bastante resistentes a los procesos térmicos, característica de vital importancia en los procesos industriales llevados a cabo en multitud de alimentos, los cuales son sometidos a procesos de termización, pasteurización o esterilización.

1.7. Estabilidad frente al pH

La modificación del pH produce una variación de la fuerza iónica de las soluciones de los EPS, que origina cambios de viscosidad.

En el caso de EPS de naturaleza aniónica, como nuestros EPS, la concentración del polímero es fundamental en el efecto del pH sobre el efecto viscosizante de las soluciones de EPS. Estudios anteriores, ponen de manifiesto, que para concentraciones inferiores al 0,2 % (p/v) se produce un cierto incremento de la viscosidad al aumentar el pH, mientras que para soluciones más concentradas mayores del 0,4 % (p/v) las concentraciones con pH ácido son más viscosas. (Clark, 1992; Pastor y col., 1994). La explicación radica en lo que ocurre en la fuerza iónica y en las interacciones en las fuerzas de atracción y repulsión entre las cadenas.

No obstante, como hemos demostrado en los resultados expuestos en la tabla 31, los valores de viscosidad son independientes en un amplio intervalo de pH comprendido entre valores de pH (2-12).

El carácter compacto de las dobles hélices, protegida por el repliegue de las cadenas laterales impide la penetración del ácido y del álcali, evitando su degradación por hidrólisis (Sutherland, 1998,1999).

Por las propiedades anteriores expuestas los EPS pueden emplearse tanto en sistemas alcalinos como ácidos, ampliamente distribuidos en alimentación.

Tabla 31. Estabilidad de los EPS en solución acuosa al 1% (p/v) frente a amplios valores de pH.

| pH | 2 | 6 | 8 | 10 | 12 |
|---|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Viscosidad mPa s (Xantano lactosuero 1%) | 650 | 650 | 650 | 650 | 650 |
| Viscosidad mPa s (Xantano comercial 1%) | 865 | 865 | 865 | 865 | 865 |

La estabilidad de la viscosidad frente al pH es una característica muy importante a nivel industrial, tal es el caso de nuestro xantano que presenta una gran estabilidad frente a un amplio rango de pH. La viscosidad permanece constante entre valores de pH comprendidos de 2-12. Cuando se encuentran en valores superiores o inferiores de este rango los valores de la viscosidad empiezan a disminuir.

Por tanto, las variaciones en la viscosidad provocadas por cambios del pH pueden estar relacionadas con cambios en la conformación molecular de las cadenas polisacáridicas afectadas por una alteración de la carga eléctrica neta de la molécula de polisacárido.

1.8. Estudio de la presencia de sales en la solución de EPS.

Generalmente un factor como la concentración de sales en solución afecta a las viscosidades de las soluciones de los EPS. Por esta razón, estudiamos el efecto de la presencia de electrolitos sobre las soluciones de nuestros EPS.

Las soluciones de polielectrolitos exhiben comportamientos particulares. Cuando se determina la viscosidad reducida de un polielectrolito en agua desionizada su valor aumenta abruptamente al disminuir la concentración del polielectrolito. Este efecto se hace más débil con la adición de sales. Sobre una concentración dada de sales, los polielectrolitos se comportan de manera similar a los no-polielectrolitos. El incremento en viscosidad se observa solo a bajas concentraciones de polielectrolito; a altas concentraciones el comportamiento es similar al observado para soluciones de no-polielectrolitos.

Este comportamiento de los polielectrolitos (figura 72) se ha explicado tradicionalmente en términos de la extensión de cadena de los polielectrolitos. Al disminuir la concentración del polielectrolito, aumenta el grado de ionización. Los contraiones de las polisales forman una atmósfera iónica alrededor de la macromolécula. En soluciones diluidas, la atmósfera iónica es más grande que el diámetro del ovillo molecular y los grupos cargados se repelen unos a otros, incrementando la rigidez de la cadena y expandiendo el ovillo del polímero con un consecuente aumento en la viscosidad. La adición de sales de bajo peso molecular apantalla las cargas suprimiendo el efecto polielectrolito.

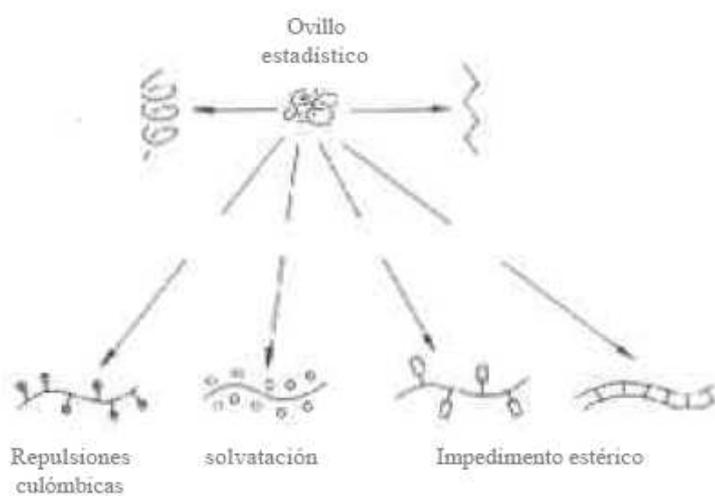


Figura 72. Principios estructurales para polímeros en solución acuosa, los cuales llevan a la expansión del ovillo y por lo tanto a un incremento en viscosidad.

Con el aumento de la concentración salina, muchos polímeros solubles en agua muestran una fuerte disminución en la viscosidad. El efecto de iones divalentes es aun más pronunciado que el de iones monovalentes; la presencia de cationes divalentes en pequeñas cantidades puede ocasionar, incluso, el fenómeno de floculación del polímero. Este efecto salino es de importancia en polímero con grupos ionizables como es el caso de nuestros EPS, xantano procedente de lactosuero.

En las figuras 73 y 74, se muestran las relaciones entre el pH y la viscosidad de los polímeros en función de la presencia o ausencia de sales. La concentración de CaCl_2 añadida fue de 1 mg/ml.

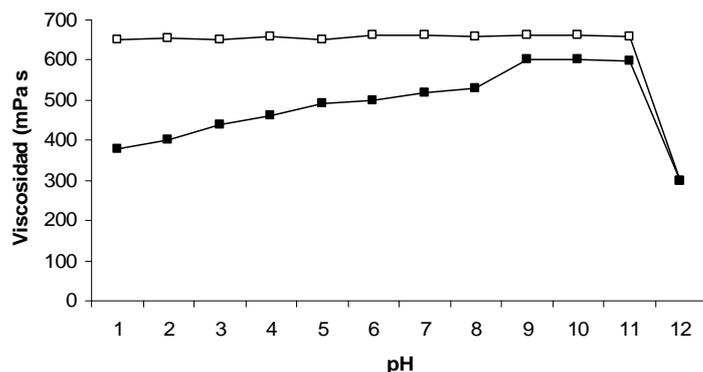


Figura 73. Relación entre el pH y la viscosidad de la goma xantana procedente de lactosuero. □ goma xantana al 1% en solución acuosa en ausencia de CaCl₂ ■ goma xantana al 1% en solución acuosa con CaCl₂ a una concentración de 1mg/ml.

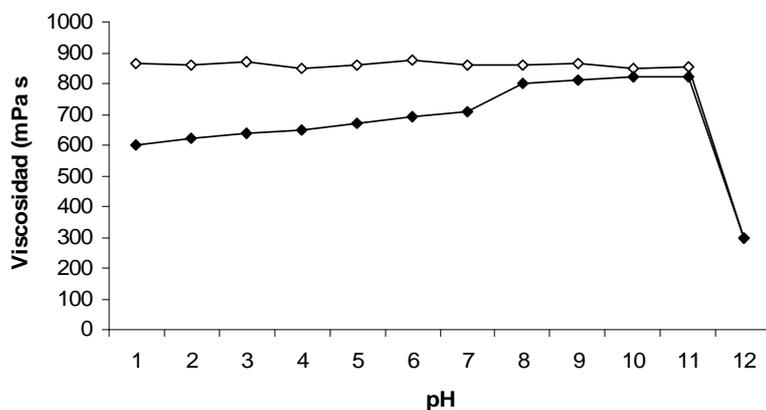


Figura 74. Relación entre el pH y la viscosidad de la goma xantana comercial. □ goma xantana al 1% en solución acuosa en ausencia de CaCl₂ ■ goma xantana al 1% en solución acuosa con CaCl₂ a una concentración de 1mg/ml.

La viscosidad se incrementa gradualmente en ambos polisacáridos tanto el procedente del lactosuero como de su homólogo comercial, al aumentar el pH desde valores de 2 hasta pH de 12, donde a valores superiores los polisacáridos se hidrolizan. En ambos casos, la adición de CaCl₂ provoca un descenso de la viscosidad.

La compatibilidad con altas concentraciones de sal es una propiedad a tener en cuenta para el uso final de los EPS microbianos (Antón y col., 1988). El hecho que la adición de sales afecte a la viscosidad del polímero sugiere la presencia de grupos cargados en el EPS. Un exceso de sales provoca repulsiones electroestáticas entre

las cargas, traducándose en una disminución de la rigidez de las cadenas poliméricas y consecuentemente una disminución en la viscosidad (Vincent y col., 1994).

Las propiedades reológicas del xantano son extremadamente dependientes de la concentración de polímero y presencia de sales, estudiamos como se veían afectados los parámetros viscoelásticos de este biopolímero en solución con la adición de sales. En presencia de NaCl 0,1M, y al igual que ocurre al incrementar la concentración de polisacárido, la frecuencia en la que los módulos elástico y viscoso se igualan ($G' = G''$), se hace menor. Ello se debe a que los cambios estructurales que determinan la transición de un estado ordenado a desordenado son dependientes del contenido en sal de la solución, de forma que la adición de electrolitos induce a asociaciones intermoleculares que reducen las repulsiones electrostáticas típicas de polímeros con carga neta y con ello se consigue que las moléculas estén más ordenadas y que el estado sea más estable. Efecto descrito para el xantano (Pelletier y col., 2001), polímero de naturaleza ácida.

Por otra parte, la presencia de determinados grupos tiende a estabilizar la forma ordenada del xantano, como los grupos acetilo (Gamini y Mandel, 1994).

Esta forma ordenada responsable de una estructura de mayor solidez se mantiene estable a temperaturas entre 25 -70°C, a partir de la cual parece ser que comienza a producirse una desorganización molecular. Este último hecho determinaría que la viscosidad de las soluciones no se modifique a temperaturas entre 25 - 55°C como vimos en apartados anteriores, produciéndose una disminución a temperaturas de 70°C y superiores. Sin duda alguna, la capacidad viscosizante de este exopolisacárido está relacionada con la estructura molecular de sus cadenas polisacáridicas.

2. Estudios reológicos de los EPS en sistemas alimentarios.

2.1. Estudios de viscosidad en sistemas alimentarios.

Los estudios de viscosidad realizados en sistemas alimentarios, figura 75, como la leche desnatada y leche entera nos muestran un efecto positivo en la viscosidad de la suspensión del EPS al 1 % (p/V) en leche entera.

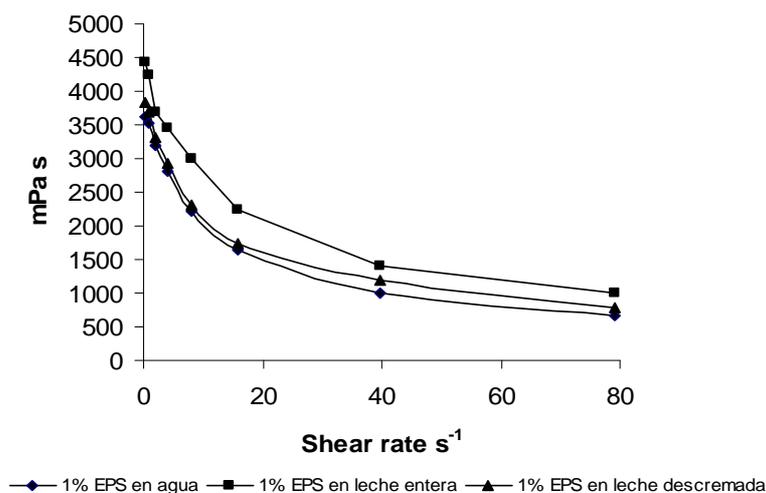


Figura 75. Viscosidad del xantano en diferentes sistemas alimentarios.

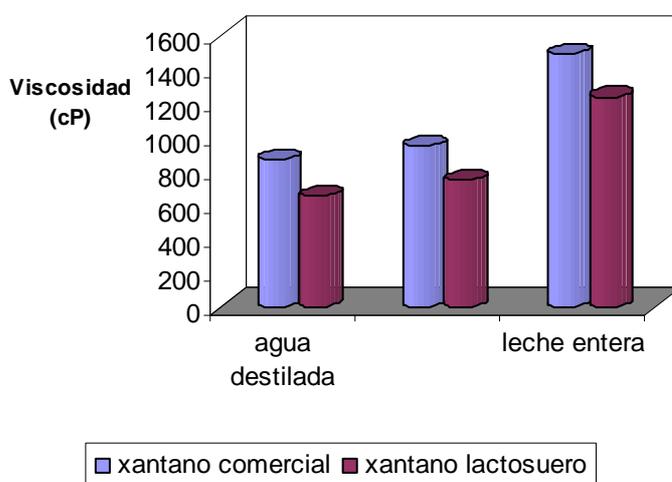


Figura 76. Viscosidad de las dispersiones del EPS de xantano lactosero y su homólogo comercialal 1% (p/V) en agua destilada, leche desnatada y leche entera. (Medidas de viscosidad realizadas en un Brookfield LVTDV-II usando un husillo SC4-18 y el adaptador para pequeñas muestras 13R; a una velocidad de cizalla de 39.6 s^{-1} y temperatura de 25°C).

En cuanto a su solubilidad en diferentes disolventes, en matrices alimentarias, como es el caso de la leche entera y leche descremada, figura 76, se observó que presentaban una gran estabilidad, fácil dispersión de la goma xantana obtenida a

partir de medio lactosuero comparada con su homólogo comercial. Durante su estudio se observó que es un emulgente y un estabilizante perfectamente válido para uso alimentario.

En las soluciones preparadas con leche desnatada y entera, las propiedades estabilizantes se ven acentuadas por la interacción con la caseína de la leche

Las soluciones lácteas de los polímeros estudiados poseen un comportamiento pseudoplástico hecho patente en los reogramas realizados. Acentuándose en las soluciones más concentradas, haciéndose menor a medida que la concentración del polímero disminuye, siendo de vital importancia la determinación del contenido de sólidos de la leche para controlar el comportamiento reológico y propiedades de flujo (Chang y Hartel, 1997).

2.2. Actividad emulgente

En multitud de EPS se ha observado una relación entre la composición química y la viscosidad, demostrándose un aumento de los grupos O-acetilo favorece la viscosidad del xantano (Sutherland, 1994).

Estos EPS poseen capacidad de estabilizar emulgentes, ejerciendo su efecto mediante cuatro mecanismos fundamentales:

- Formación de una barrera electroestática (estabilización electroestática).
- Estabilización termodinámica (reducción de la tensión superficial).
- Creación de una barrera estérica (estabilización estérica).
- Modificación de las propiedades reológicas.

En la tabla 32 se recoge la actividad emulgente de los exopolisacáridos, en comparación con surfactantes químicos utilizados como control (Tritón X-100, Tween 20, Polisorbato 60), a una concentración del 0,5% (p/v), sobre las distintas fases oleosas alimentarias ensayadas (aceite de oliva, aceite de girasol).

Los resultados son la media de tres determinaciones e indican el porcentaje emulsionado de la mezcla agua-fase oleosa. Las medidas fueron realizadas tras dejar

la emulsión en reposo durante 1 hora y 24 horas a temperatura ambiente, con el objetivo de evaluar la estabilidad de las mismas con el paso del tiempo.

Tabla 32. Actividad emulgente.

| EMULGENTE | tiempo | FASE | OLEOSA |
|---------------------|-----------------|---------------|----------------|
| | | Aceite | Aceite |
| | | oliva | girasol |
| Tritón X-100 | 1 hora | 70,1* | 69,25 |
| | 24 horas | 61,85 | 67,1 |
| Tween 20 | 1 hora | 61,75 | 62,8 |
| | 24 horas | 60,7 | 62,5 |
| Polisorbato | 1 hora | 62,55 | 64,7 |
| 60 | 24 horas | 61,5 | 62,8 |
| Xantano | 1 hora | 100 | 92,45 |
| comercial | 24 horas | 100 | 88,95 |
| Xantano | 1 hora | 95 | 85,5 |
| lactosuero | 24 horas | 95 | 82,4 |

La emulsión de aceite de oliva y el aceite de girasol por los biopolímeros es un hecho de interés a nivel alimentario. La emulsión aceite/agua es muy común en la industria alimentaria, en concreto en la elaboración de salsas y aliños, así como en otros muchos productos. El porcentaje de mezcla emulsionada por el EPS obtenido a partir de lactosuero con ambos aceites es como mínimo comparable, y en muchos casos superior, al obtenido con cualquiera de los emulgentes químicos empleados como control en este estudio. Hemos de tener en cuenta que de los surfactantes utilizados únicamente se encuentran aceptados como aditivos alimentarios además del xantano, el Tween 20 y Polisorbato 60, presentando estos dos últimos un menor poder emulgente que muchos de nuestros EPS.

Por lo que podemos afirmar que la actividad emulgente de la goma xantana obtenida a partir de lactosuero es comparable a la goma xantana comercial. No obstante debido al mayor porcentaje de humedad que presenta nuestra goma xantana, presenta valores algo inferiores en cuanto a su capacidad emulgente.

El interés del estudio de estos EPS se debe a sus extraordinarias propiedades tanto físicas como químicas, que permiten el empleo de estos polímeros

en multitud de aplicaciones industriales. Los polisacáridos microbianos compiten con otros de origen sintético en aplicaciones industriales, prevaleciendo una tendencia al uso de polímeros de origen microbiano principalmente debido a su biodegradabilidad y a su ausencia de toxicidad (Sutherland, 1990). Las industrias donde el empleo de EPS de origen microbiano se está incrementando son: extracción de petróleo, producción de enzimas, textil, imprenta, geles e industrias de biosurfactantes (Sutherland, 1990).

2.3. Importancia del envase con el que se comercializan los EPS. Porcentaje de humedad del producto.

La mayoría de los productos naturales contienen humedad. El contenido de agua por sí mismo es raramente interesante. Por el contrario, determina si el producto que se pretende comercializar y producir tiene propiedades estándares tales como:

- aptitud para almacenamiento,
- aglomeración en el caso de tratarse de un polvo,
- estabilidad microbiológica,
- propiedades de flujo, viscosidad,
- peso en seco,
- concentración o pureza,
- grado comercial (cumplimiento de los acuerdos de calidad),
- valor nutricional del producto,
- conformidad legal (regulaciones normativas en cuanto a alimentación).

El contenido de humedad influye en las propiedades físicas de una sustancia: en el peso, la densidad, la viscosidad, el índice de refracción, la conductividad eléctrica y en muchas otras propiedades, por todas estas razones es fundamental conocer este dato en los EPS de interés comercial obtenidos.

Los resultados muestran el porcentaje de humedad de diferentes EPS de interés industrial. Como se observa en la tabla 33, tanto la goma xantana obtenida a partir del medio YM como la goma xantana obtenida a partir de lactosuero tratado, presentan unos valores muy superiores con respecto a su homóloga comercial, situándose generalmente los porcentajes de humedad final en xantano comercial entorno al 10%.

Tabla 33. Los valores de humedad corresponden a muestras almacenadas durante 3 meses a temperatura ambiente en placas petri selladas.

| EPS | % HUMEDAD |
|--|------------------|
| G.xantana obtenida a partir medio YM | 22,8 ± 0,3 |
| G.xantana obtenida a partir medio lactosuero | 22,2 ± 0,4 |
| G.xantana comercial | 13,1 ± 0,2 |
| Curdano obtenido a partir de lactosuero | 9,1 ± 0,3 |

A diferencia del xantano obtenido en nuestro laboratorio, el xantano comercial se somete a un proceso de molienda, disminuyendo la humedad que puede captar el producto debido a la formación de granos de unas pocas μ ., reduciendo así la superficie total expuesta a la captación de humedad, además para el control de la dispersabilidad y facilitar una rápida disolución. Debe extremarse la precaución al molerse evitando una excesiva producción de calor que podría degradar o decolorar el producto (Smith y Pace, 1982).

Por otro lado es muy importante el envase con el que se va a comercializar el producto, ya que cumple numerosas funciones; protege el producto de la humedad ambiental, al ser un producto higroscópico sujeto a la degradación hidrolítica, además de otras importantes funciones como: merchandising, facilitar el consumo, informar, comodidad de transporte, valor de post venta...etc.

En la producción comercial el producto seco se muele y se empaqueta en recipientes con baja permeabilidad al agua.

En un futuro próximo, se realizaran ensayos con diferentes formatos de envases existentes en el mercado con el fin de comparar la protección, aspecto comercial, facilidad en el transporte y almacenamiento, estabilidad, entre otros aspectos.

2.4. Formación de geles. Estudio del sinergismo con κ -carragenatos en sistemas alimentarios.

La capacidad de formar geles de muchos EPS de origen bacteriano es una propiedad muy atractiva desde el punto de vista industrial. Los geles constan de dos componentes, el disolvente, mayoritario, es un líquido y está atrapado en una pequeña

cantidad de un segundo compuesto, que forma una red tridimensional en el seno del disolvente, esta red impide que el disolvente fluya. Por lo que un gel se comporta como un sólido blando, fácil de deformar, elástico o plástico.

Los geles de los biopolímeros fueron los primeros en ser conocidos, estas moléculas deben sus propiedades gelificantes a sus posibilidades de asociación. La gelificación puede ser una propiedad inherente al EPS o puede requerir la presencia de cationes mono o multivalentes. En otros casos, la gelificación se logra con el efecto sinérgico con otro EPS, como es el caso del xantano.

Las características de un gel vienen determinadas por el tipo de uniones que se establecen en las cadenas poliméricas.

Ross- Murphy y Shatwell 1993, clasificaron los geles formados por los EPS en tres categorías fundamentales:

1) Geles en las que las uniones se establecen con uniones covalentes. El establecimiento de enlaces covalentes entre los polímeros en solución engendra cadenas flexibles ligadas por sus extremos a otras tres o cuatro, creando una red extendida sobre toda la disolución. Estos geles son reversibles, pueden deformarse bajo la acción de una fuerza exterior débil, recuperando su forma inicial al detenerse dicha fuerza.

2) Geles con uniones fáciles de disgregar. Pueden disgregarse bajo la acción de una fuerza exterior débil, perdiendo la estructura inicial al cesar la fuerza.

3) Geles que originan unidades compactas. La agregación de las partículas o de las moléculas es irreversible, solamente una variación de temperatura de unos grados, para que el gel empiece a fundir.

Las pruebas de sinergismo con los carragenatos, polímeros utilizados ampliamente en la industria alimentaria, dan información de interés en lo que respecta a las propiedades del gel obtenido. El xantano por sí solo es incapaz de formar geles, aunque en altas concentraciones puede formar geles débiles no obstante presenta excelentes sinergia con los κ - carragenatos empleados ampliamente en multitud de sistemas alimentarios.

El objetivo de estos estudios fue determinar la capacidad y el sinergismo de las gomas obtenidas a partir del medio lactosuero junto con los κ - carragenatos (figura 77). Los ensayos realizados fueron los siguientes:

κ - carragenatos + xantano procedente de lactosuero + agua

κ - carragenatos + xantano procedente de lactosuero + leche entera

κ - carragenatos + curdlano + agua

Se procedió a determinar y analizar los siguientes parámetros:

- Fuerza de gel.
- Elasticidad.
- Sinéresis.
- Brillo.
- Dureza.
- Color.
- Fragilidad.



Figura 77. Sinergismo de los κ -carragenatos con la goma xantana en agua y en leche entera.

En las siguientes fotografías (figura 78), se aprecian las diferentes texturas y consistencias de los geles. Obtuvimos que los geles formados con carragenato y curdlano, presentaban mayor resistencia a las fuerzas de tracción y compresión, es decir presentaban mayores fuerzas de gel, así como mayor facilidad al corte sin fragmentarse. La estructura primaria de los exopolisacáridos microbianos tienen gran influencia sobre su capacidad para formar geles, por ejemplo el curdlano forma geles mientras que el escleroglucano muy similar a el estructuralmente, pero difiere únicamente en la presencia de sustituyentes glucosilo, no presenta esta capacidad (Sutherland, 1990), las modificaciones en cuanto a la composición química de los polímeros también conducen por tanto a variaciones en su poder de gelificación.



Figura 78. Fotografías de los geles; K carragenato 0,5% + xantana lactosuero 1.5% en agua, K carragenato 0,5% +xantana lactosuero 1.5% en leche entera, K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en agua, K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en leche entera.

Tabla 34. Propiedades físico químicas de las mezclas de los EPS obtenidos a partir de medio lactosuero con carragenatos al 1.5% en diferentes matrices acuosas y lácteas.
+: valor bajo; ++: valor medio; +++: valor alto

| | Solubilidad | pH | Gelificación | Dureza | Color |
|---|-------------|-----|--------------|--------|-------------|
| K carragenato 0,5% + Xantana lactosuero 1.5% en agua | +++ | 6,8 | +++ | ++ | Anaranjado |
| K carragenato 0,5% + Xantana lactosuero 1.5% en leche entera | ++ | 6,9 | ++ | + | Blanquecino |
| K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en agua | +++ | 7,1 | +++ | ++ | Pardo |
| K carragenato 0,5% + Curdlano lactosuero 1.5% en leche entera | ++ | 7,3 | +++ | +++ | Blanquecino |

Todas las muestras ensayadas, mostraron una gran solubilidad en caliente, además con las distintas combinaciones de EPS evaluadas se lograban geles menos rígidos y quebradizos al compararlos con los geles formados solo por los K carragenatos, ver tabla 34.

Estas pruebas previas a la aplicación industrial, son de vital interés, ya que su campo de aplicación es enorme: industria láctea, cárnica, ambientadores en gel, postres en polvo...

La medición objetiva de la textura no sólo determina la resistencia del producto a la fuerza aplicada sino que ayuda a caracterizar la firmeza, suavidad, succulencia, resistencia a la masticación, fibrosidad, etc., de los productos comestibles.

Para la medición objetiva de la textura, se han ideado un número considerable de aparatos mecánicos, tales como, el texturómetro instron. La textura es un factor muy importante en la selección y preferencia de los alimentos, y además es reconocida como uno de los mayores atributos de calidad.

Las propiedades relacionadas con la sensación que se percibe al iniciarse la masticación del alimento son de tipo mecánica, entre estas: la dureza, la viscosidad y la fragilidad (Costell, 1994). Además, la evaluación textural está basada en la interpretación de las relaciones de fuerza-deformación, cuya relación puede ser definida experimentalmente a través de una prueba de compresión unidireccional (Calzada y Peleg, 1978).

La dureza es la fuerza máxima obtenida durante el primer ciclo de compresión. Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un producto entre los molares o entre la lengua y el paladar. Es la resistencia a la penetración, donde varios procedimientos son utilizados para medir la dureza, y estos dependen del material con que esté hecha la sustancia, su espesor y la carga aplicada.

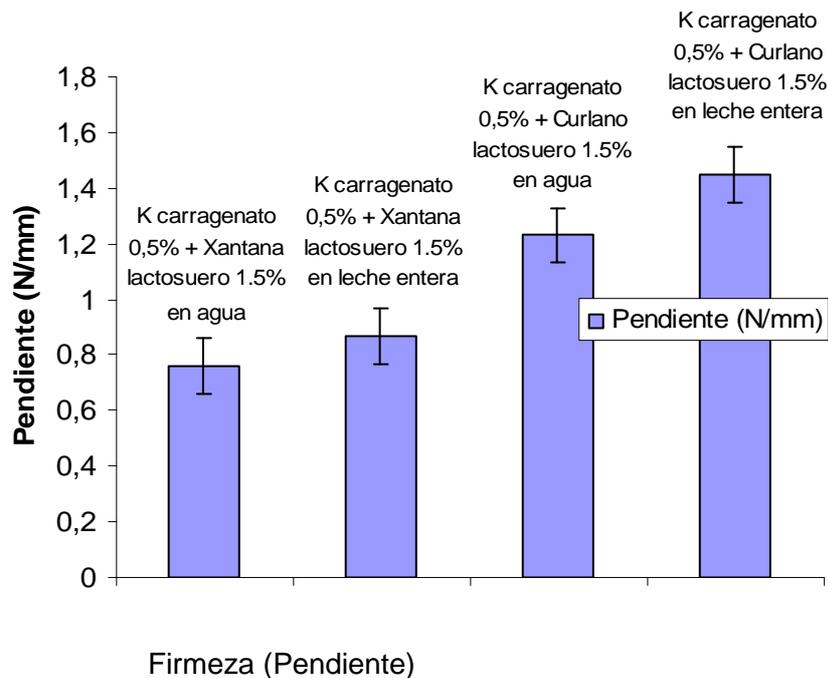


Figura 79. Firmeza de gel de las diferentes combinaciones entre K-carragenato y goma xantana y curdlano.

Los carragenatos ofrecen una mayor sinergia al combinarse con el curdlano, formando en ambas matrices tanto acuosa como en leche entera, geles de mayor resistencia, dotados de una mayor firmeza y elasticidad, figura 79. Esto es debido porque el curdlano insoluble en agua, forma un gel con propiedades elásticas al calentar la solución acuosa de polisacáridos. Al calentarse a temperaturas mayores de 80°C se forma un gel termo irreversible (hight-set-gel). El curdlano, forma un gel firme a 54 ° C, la fuerza del gel depende de la temperatura es prácticamente constante entre los 60 - 80 ° C, y llega a incrementarse hasta 80 - 100 ° C, (Harada y Amemura, 1981). Cuando el calentamiento supera los 120 ° C, la estructura del polímero pasa de una simple hélice a una triple (Sutherland, 1983), el incremento de la temperatura provoca un cambio conformacional que hace mayor la fuerza de estos geles. A diferencia del xantano que por sí solo es incapaz de formar geles firmes, incluso a altas concentraciones. Es de destacar el inusual comportamiento del curdlano, cuya viscosidad aumenta con la temperatura hasta el grado de formar geles débiles a 60-65 °C y geles de mayor firmeza a 75-80°C.

El succinoglicano obtenido, a partir de 60°C sufre una drástica disminución en su viscosidad, este fenómeno está relacionado con una transición conformacional del polímero (Stredansky y col., 1999).

En este sentido, el xantano se caracteriza por una gran termoestabilidad, pudiendo permanecer inalterado hasta temperaturas alrededor de los 90°C. No obstante, sus propiedades reológicas se afectan si se supera la temperatura de transición conformacional de la molécula, que es dependiente de la concentración de polímero y de sales presentes en la solución (Oviatt y Brant, 1993; 1994).

Puesto que tanto los carregenatos y el xantano, son gomas que tienen funciones estabilizantes en muchos alimentos, es importante hacer notar que en el sentido más amplio del término, un estabilizante alimenticio es cualquier material que al ser adicionado a un alimento aumenta su tiempo de almacenamiento; aunque existe una definición menos amplia que define un estabilizante como un material que reduce la tasa en la cual suceden algunos cambios dentro de un producto alimenticio durante su almacenamiento, transporte y manipulación; esto es, los estabilizantes retardan o evitan cualquiera de los siguientes procesos (Walker, 1984):

- Cristalización, usualmente del agua o del azúcar.
- Sedimentación gravitacional de partículas en suspensión.
- Encuentro entre partículas, gotitas o burbujas en un medio fluido.
- Floculación, coagulación o coalescencia de fracciones dispersas.
- Disgregación de agregados.
- Descremado.
- Pérdida de pequeñas moléculas o iones debido a cambios en el potencial químico del ión o molécula disuelta, o debido a la formación de una película impermeable.
- Sinéresis en geles. Aunque la sinéresis usualmente sucede como resultado de la presencia de gomas, en algunos casos donde una goma es adicionada para formar un gel (esto es una función no estabilizante), una u otra goma pueden ser adicionadas para prevenir la sinéresis, convirtiéndose, por tanto, en un estabilizante.

El mecanismo de gelificación, varía de modo que en algunos sistemas se establecen uniones mediante puentes de hidrógeno mientras que en otros existen uniones covalentes a través de cationes multivalentes. Algunos de los polímeros requieren la presencia de iones para la formación de geles, por ejemplo algunos alginatos mientras que el curdlano no necesita la colaboración de iones (Sutherland,

1990). El principal mecanismo de formación de geles por el alginato consiste en una unión selectiva de cationes divalentes, provocando cambios a nivel de la estructura química del polímero cuando este se pone en contacto con cationes de Ca^{2+} . Los cationes más adecuados para los procesos de gelificación de la mayor parte de los EPS es que elementos de transición tales como Zn, Cu y Pb dan lugar a geles de mayor fuerza y consistencia.

3. Aplicaciones de los EPS producidos a partir de lactosuero. Capacidad filmógena, micronización, extensibilidad, grado de hidratación.

Existe un incremento en el empleo de polisacáridos microbianos en el campo de la agricultura y horticultura, donde se emplean recubriendo las semillas, cortes y heridas de los árboles, polímeros empleados para este objetivo son el curdlan y los alginatos (Sutherland, 1990), además de aplicarse en baños glaseantes para productos congelados. Es importante señalar la propiedad de los polisacáridos de formar finas películas empleadas en la industria alimentaria para realizar recubrimientos protectores comestibles en sectores tanto de lácteos, cárnicos como hortofrutícola. La utilización de recubrimientos comestibles en frutos puede tener entre otros objetivos la modificación de la composición interna de los frutos, ralentizando el proceso de maduración de los mismos, mediante la alteración de la permeabilidad, por bloqueo de una mayor o menor proporción de los poros de la superficie del producto, reducción de la pérdida de agua por transpiración (Amarante y Banks, 2001) y mejora del aspecto superficial del producto. La cobertura de los poros con un recubrimiento reduce la permeancia del agua, sin embargo hay una extensiva difusión del agua a través de la cutícula. Mientras que los recubrimientos basados en lípidos y resinas confieren principalmente hidrofobicidad, reduciendo pérdida de agua, y brillo; los polisacáridos presentan permeabilidad selectiva al O_2 y CO_2 dando lugar a una modificación interna de la composición de la atmósfera, siendo poco efectivo como film barrera frente al agua (Wong y col., 1992).

La capacidad filmógena es una característica muy importante a la hora de formular productos para diferentes sectores alimentarios como puede ser entre otros el sector lácteo. En este caso, se desarrollan una serie productos con base en gomas alimentarias, que soportan componentes antifúngicos destinados al tratamiento de la superficie externa de los quesos durante su periodo de maduración, evitando así la aparición de mohos y levaduras en superficie. Estos componentes antifúngicos con efecto sinergista constan de sorbato cálcico o sórbico (E-203, E-202), preferiblemente se incorpora el primero evitando así fenómenos de migración al interior de la masa del alimento, además se emplea también el E-235, la pimaricina, único antibiótico aprobado para su uso en la industria alimentaria en el tratamiento externo de superficie de alimentos como quesos y embutidos.

Con este objetivo, estudiamos una serie de propiedades de la goma xantana obtenida a partir de lactosuero y lo comparamos con el xantano comercial, además de evaluar las propiedades del curdlano y pululano obtenidos también a partir de lactosuero. Teniendo en cuenta que las características principales a evaluar, en la formación de un film alimentario son: capacidad filmógena es decir facilidad con la que se adhiere a la superficie de un alimento, micronización que los componentes que soporta la matriz estén dispersos por igual por todo el film, extensibilidad que la película que se forma sea flexible evitando que sea quebradiza, grado de hidratación es de vital importancia para el mantenimiento íntegro del film, ya que los alimentos contienen mayor o menor grado de humedad por lo que estas películas han de ser resistentes en cierta medida a la rehidratación.

El grado de hidratación obtenido en las películas de los diferentes EPS fue muy similar, con un tiempo de rehidratación de la película aproximadamente de minuto y medio en todos los casos, tabla 35.

El tamaño de partícula del producto, posee un considerable efecto sobre la dispersabilidad y velocidad de hidratación.

Tabla 35. Evaluación de las propiedades de la película de 300 µm formada mediante el extensiómetro.

| EPS | Capacidad filmógena | Micronización | Extensibilidad | Grado de hidratación |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Xantano comercial | ++++ | ++ | ++++ | ++ |
| Xantano YM | +++ | ++ | ++++ | ++ |
| Xantano lactosuero | +++ | ++ | ++++ | ++ |
| Curdlano lactosuero | + | | + | ++ |
| Pululano lactosuero | ++++ | ++ | + | ++ |

La película formada por el curdlano, carecía de las mismas propiedades y de la capacidad filmógena que el resto de los EPS ensayados, tanto el xantano como el pululano obtenido del lactosuero mostraron unas buenas propiedades filmógenas

(figura 80 y 81); presentando un elevado potencial de uso y aplicabilidad en diferentes sectores alimentarios.

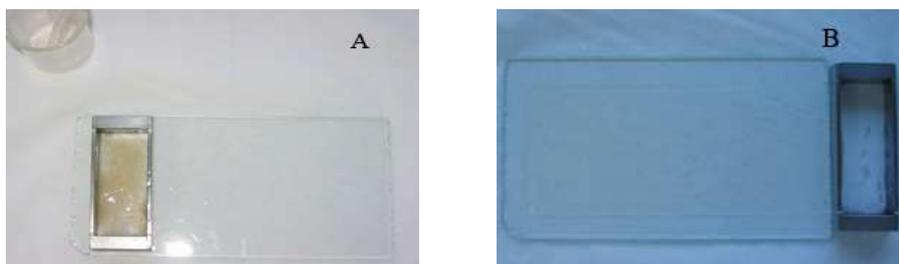


Figura 80. A, b) Fotografía Formación de una película de 300 µm mediante un extensómetro de goma xantana al 2% obtenida a partir de lactosuero tratado. Observándose una buena capacidad filmógena.



Figura 81. Fotografía: Deficiente película formada a partir de curdlano al 2%

Las conclusiones que se derivan a partir de este estudio son las siguientes:

La goma xantana obtenida a partir de lactosuero, posee idénticas propiedades a su homóloga comercial en cuanto a su capacidad para estabilizar en solución los productos antifúngicos, evitando así la precipitación. Además, de favorecer la micronización, dispersión y estabilización de dichos componentes antifúngicos en la matriz acuosa, posibilitando la formación de una buena capacidad filmógena que le permite adherirse a la superficie del alimento, confiriéndole un óptimo grado de protección frente a mohos y levaduras.

La goma xantana y el pululano producida a partir del lactosuero debido a sus buenas propiedades filmógenas podrían incorporarse en las coberturas comestibles para reducir los efectos perjudiciales que inflige el procesado mínimo en los tejidos vegetales de frutas frescas cortadas o en los tratamientos postcosecha a base de recubrimientos naturales. Así, la barrera artificial semipermeable que constituye una cobertura polimérica, contribuye a la extensión de la vida útil del producto al reducir la migración de humedad y de solutos (Deshpande y col., 1992; Singh y Kennedy, 2008) el intercambio de gases, la respiración, y otras reacciones oxidativas, disminuyendo así los desórdenes fisiológicos. Además, las coberturas pueden servir como soporte

de algunos aditivos, tales como antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes y nutrientes (Li y Barth, 1998; Pena y Torres, 1991; Pranoto y col., 2005; Wong y col., 1996)., evitando en gran medida la sedimentación gravitacional de partículas en suspensión.

Es importante señalar, que el empleo de recubrimientos comestibles y recubrimientos empleados como carriers de sustancias bioactivas conforma una aplicación muy prometedora de los embalajes alimentarios activos e inteligentes (Cuq y col., 1995; Han, 2000,2001). Las biopelículas comestibles y recubrimientos están producidos a partir de biopolímeros y aditivos de grado alimentario, las biopelículas que están formados por biopolímeros pueden ser proteínas, polisacáridos (carbohidratos y gomas) o lípidos (Gennadios y col., 1997). Los plastificantes (glicerol, PEG, sorbitol) y otra serie de aditivos son combinados con la biopelícula formado por biopolímeros para modificar las propiedades físicas o funcionales.

Mediante el empleo de recubrimientos comestibles y envases inteligentes se pretende mantener la calidad incrementando la vida útil y mejorando notablemente la seguridad del producto (Han, 2002, 2003). Existe, un incremento de la demanda de alimentos mínimamente procesados y frescos, existiendo por tanto una necesidad de aumentar la vida útil y seguridad de este tipo de productos (Baldwin y col., 1995, 1997;). Además, el uso de materiales biodegradables en embalajes alimentarios es un negocio muy atractivo ya que se podrá reducir una gran cantidad del material sintético empleado actualmente y ofrecer una alternativa ecológica respetando el medio ambiente. (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Amarante y Banks, 2001).

Los nuevos progresos científicos han permitido crear embalajes «activos» e «inteligentes» que prolongan la vida de un alimento o que reaccionan cuando éste se ha deteriorado (por ejemplo, con un embalaje que cambia de color). Estos nuevos materiales han sido incluidos en la legislación que regula todos los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.(Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE).

CONCLUSIONES

1. Se han conseguido obtener exopolisacáridos de interés industrial, tales como, xantano, curdlano, succinoglicano y pululano, a partir de lactosuero tratado previamente con β -galactosidasa, producidos por diferentes microorganismos *Xanthomonas campestris* NRRL 1459, *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067 y *Aurobasidium pullulans* ATTC 9348.

2. En el proceso de optimización y escalado en fermentadores de 1,5 y 20 litros, centrado en la producción de xantano a partir de lactosuero tratado, se han logrado producciones de EPS comparables a los obtenidos en medios definidos, lográndose una alternativa viable y económica para el aprovechamiento de un subproducto agroalimentario.

3. La determinación de las propiedades reológicas de los EPS en solución acuosa, determinan que el xantano obtenido a partir del lactosuero tratado presenta un menor poder viscosizante en comparación con su homólogo comercial, no obstante los EPS obtenidos presentan óptimas propiedades pseudoplásticas, lo que determina que puedan aplicarse en sistemas alimentarios por sus buenas propiedades emulgentes y por contribuir a una mejor textura y propiedades organolépticas. Los carragenatos ofrecen una mayor sinergia al combinarse con el curdlano formado a partir de lactosuero, tanto en matriz acuosa como en leche entera, conformando geles de mayor resistencia, dotados de una mayor firmeza y elasticidad. Las películas formadas por el curdlano, carecía de las mismas propiedades y de la capacidad filmógena que el resto de los EPS ensayados, tanto el xantano como el pululano obtenido del lactosuero mostraron unas buenas propiedades filmógenas

CONCLUSIONS

1. This study reports a process for the production of industrial exopolysaccharide : (xanthan, curdlan, succinoglucano, pullulans) using whey or whey permeate previously treated with β -galactosidase from *Saccharomyces lactis* or *Kluyveromices lactis* use to increase polysaccharide production as the fermentation substrate from *Xanthomonas campestris* NRRL 1459, *Agrobacterium radiobacter* CECT 4067 y *Aurobasidium pullulans* ATTC 9348.
2. The amounts of xanthan obtained from whey and whey permeate are comparable to sucrose-based medium in the scale up in 1,5 and 20 liters fermentors focus on xanthan production from whey permeate treated with β -galactosidase. In this study, whey or whey permeate, a by-product of the dairy industry, pretreated with β -galactosidase from *Saccharomyces lactis* or *Kluyveromices lactis* were compared to synthetic medium for polysaccharide and xanthan production by *Xanthomonas campestris*.
3. The rheology of aqueous solutions of xanthan whey is remarkably stable over a broad temperature range, all samples of aqueous solutions exhibit a high degree of pseudoplasticity behaviour, typical of xanthan. Indeed, the aqueous solutions are remarkably stable over a broad temperature range and pH. The viscosity was considered to be most important industrial attribute, the viscosity is lower comparing the properties of comercial xanthan with the obtained from whey and YM. Carragenates gels in combination with curdlan show better structural and organoleptiques properties in both matrix: water and milk blends.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril J. R., Stull, J. W.**. 1989. Lactose hydrolysis in acid whey with subsequent glucose isomeration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **48**: 511-514.
- Aguilera, M., Quesada, M.T., Guerra del Águila, V., Morillo, J.A., Rivadeneyra, M.A., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M.** 2008. Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technology*. **99**. 5640-5644.
- Albrecht, W. J., Rogovin, P., Griffin, E. L.** 1962. Recovery of microbial polysaccharide B-1459 with quaternary ammonium compound. *Nature* **194**:1279-1283.
- Amanullah, A., Serrano-Carreón, L., Castro, B., Galindo, E., Nienow, A.W.** 1998b. The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. **57**: 95-108.
- Amanullah, A., Tuttiett, B., Nienow, A.W.** 1998a. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 198-210.
- Amarante, C., Banks, N. H.** 2001. Post harvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. *Horticultural Reviews*. **26**,161-238.
- Amemura, A., Harada, T.** 1983. Structural studies on extracellular acidic polysaccharides secreted by three non-nodulating *Rhizobia*. *Carbohydrate Research*. **112**:85-93.
- Antón, J., Meseguer, I., Rodríguez.Valera, F.**1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*.**54**:2381-2386.
- Aoki, T., Kaneko, Y. Stefanski, M.S., Nguyen, T., Ting, R.C.Y.** 1991 Curdlan sulfate and HIV-1: In vitro inhibitory effects of curdlan sulfate on HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*. **7**: 409.
- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallón, 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.
- Aronson M.** 1952. Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem.***39**: 370.
- Ashida, T., Kajikawa, M., Okimasu, E., Asai, T., and Amemura, A.** 1997. Augmentative effect of curdlan (b(1,3)-glucan) on host defense and superoxide anion production in leukocytes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. (Abstr.) *Japanese Society of Scientific Fisheries*. Sept.:59.

- Ashtaputre, A.A., Shah, A.K.** 1995. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World journal of microbiology and biotechnology*. **11**: 219-222.
- Atkins, E.** 1990. Structure of microbial polysaccharides using X-ray diffraction. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, (Ed. E.A. Dawes), pp. 371-386. Netherlands: Kluwer Academic.
- Audet, J., Lounes, M., Thibault, J.** 1996. Pullulan fermentation in a reciprocating plate bioreactor. *Bioprocess Engineering*. **15**: 209-214.
- Axelsson, A., Zacchi, G.** 1990. Economic evaluation of the hydrolysis of lactose using immobilized β -galactosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **24/25**: 679-693.
- Axelsson, L.** 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *Lactic acid bacteria*, (2nded), pp 1-72. Salminen S. y A. von Wright (eds) Ed. Marcel Dekker, New York.
- Azuaje, R.A., Sánchez, J.A.** 1999. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a non-conventional culture medium. *Acta Cient. Venez.* **50**: 201-209.
- Bachhawat, N., Gorda, L.R., Bhat, S.G.** 1996. Single step method of preparation of detergent-permeabilized *Kluyveromyces fragilis* for lactose hydrolysis. *Process Biochemistry*. **31**: 21-25.
- Baldwin, E. A., Nispero-Carriedo, M. O., Baker, R. A.** 1995. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *Horticultural science*. **30**:35-38.
- Baldwin, E. A., Nispero-Carriedo, M. O., Hagenmaier, R. D., Baker, R. A.** 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.* **51**: 56-64.
- Bales, S.A., Castillo, F.J.** 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Applied and Environmental Microbiology*. **37**: 1201-1205.
- Barbosa, M.F.S., Silva, D.O., Pinheiro, A.J.R., Guiniarayas, W.V., Borges, A. C.** 1985. Production of Beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown in cheese whey. *Journal of Dairy Science*. **68**:1618-1623.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., Ielpi, L.** 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 145-52.
- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C y Quesada, E.** 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains included in species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.* **61**: 135-141.
- Berg, D.J.C., Robjin, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebøer, A.M. and Verrips, C.T.** 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0/1 and characterization of the polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0/1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**. 2840- 2844.

- Bernal V., Pavel, J.** 1985. Lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -D-galactosidase in skim milk, whey, permeate and model system. Canadian institute of food science and technology journal. **18**: 97-99.
- Boger, D., Tiu,C.** 1974. Rheological properties of food products and their use in the desing of flow Systems. Food Technology In Australia **26**: 2325-335.
- Bonet, R., Simon-Pujol, M.D., Congregado, F.** 1993. Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface proprieties of *Aermonas salmonicida*. Applied and Environmental Microbiology. **59**:2437-2441.
- Borwankar, R.P., Frye, L.A., Blayrock, A.E., Sasevich, F.J.** 1992. Rheological characterization of melting and tablesreads. Journal of Food Engineering. **16**. 55-74.
- 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. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **24**: 374-378.
- Bouniot, A.** 1976. U. S. Patent. 3988313.
- Bourne, M.C.** 1992. Calibration of rheological techniques used for foods. Journal of Food Engineering. **16**:151-163
- Bradbury, J.** 1984. *Xanthomonas*. Dowson. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology..N.R. Krieg and J.G. Holt. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins. **1**: 199-210.
- Bragg, J.R., Marcua S.D., Gale W.W., Gall L.S., Wernau W.C., Beck D., Goldman I.M., Laskin A.I., Naslund L.A.**1983. Control of xanthan-degrading organisms in the Loudon Pilot: Approach, Methology, Results. Society of Petroleum Petroleum Engineering. Paper SPE 11989, presented at the 58th annual technical conference, San Francisco, CA, October 5-8.
- Bramucci, M.G., Nagarajan, V.** 2000. Industrial wastewater bioreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. Trends Biotechnol. **18**:501-505.
- Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., Zehnder, A.J.B.** 1990. Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti*. Journal of General and Applied Microbiology. **136**: 2511-2579.
- Brüschke HEA** .2001. State-of-Art of Pervaporation Processes in the Chemical Industry, in: Membrane Technology. S.P. Nunes, K.V. Peinemann (Eds.) Wiley-VCH, Weinheim.
- Cadmus M.C., Lagoda, S.P.; Burton, K.A., Pittsley, J.F., Knutson, C.A., Jeanes A.** 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRLB 1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain". Canadian Journal of Microbiology. **22**, 942-948.

- Cadmus, M.C., Knutson, C.A., Lagoda, A.A., Pittsley, J.E., Burton, K.A.** 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*. **20**:1003-1018.
- Cadmus, M.C., Jackson, L.K., Burton, K.A., Plattner, R.D., Slodki, M.E.** 1982. Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **44**: 5–11.
- Calzada, J., Peleg, M.** 1978. Mechanical interpretation of compressive stress-strain relationships of solid foods. *Journal of Food Science*. **43**: 1087-1092.
- Capron, I., Brigand, G., Muller, G.** 1998. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*. **23**: 215-225.
- Caredu, P.** 1977. Applicazioni del latte di idrolizzato in pediatria. *Latte*, **2**, 523-527.
- Carminatti, C. A., Cunha Petrus, J. C., Marques Porto, L.** 2003. Hidrólise enzimática da lactose em reator à membrana. *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil.
- Casas, J.A., Mohedano, A.F., García-Ochoa, F.** 2000. Viscosity of guar gum and xanthan/guar gum mixture solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1722-1727.
- Casas, J.A., Santos, V.E., García –Ochoa, F.** 2000. Xanthan gum production under several operational conditions :molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*. **26**: 282-291.
- Castillo, F. J., Moreno, B.** 1983. Properties of lactase produced by *Candida pseudotropicalis*. *Journal Dairy Science*. **66**:1616-1621.
- Castillo, F.J.** 1990. Lactose metabolism by yeasts. En *Yeast: biotechnology and and biocatalyst*. Dekker, New York. **5**: 297–320.
- Catley, B.J.** 1973. The rate of elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan during growth of *Pullularia pullulans*. *Journal of General Microbiology*, No. **78**, 33-38.
- Cavaille D., Combas, D.** 1995. Characterization of β galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Applied Biochemistry*. **22**: 55-64.
- Champluvier B., Kamp, B., Rouxhet, P.G.** 1998. Preparation and properties of β galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. *Enzyme and Microbiology Technology*. **10**: 611-617.
- Chandrasekaran, R., Thailambal, V.G.** 1990. The influence of calcium ions, acetate and L-glycerate groups on the gellan double helix. *Carbohydrate polymers*. **12**: 431-442.
- Chang, Y.H., R.W, Hartel.** 1997. Flor properties of freeze- concentrated skim milk. *Journal of Food Engineering*. **31**: 375-386.

- Chang-Moon, Lee., Hyun- Chulm Lee., Ki-Young, Lee.** 2005. O-Palmitoylcurdlan Sulfate (OPCurS)-Coated Liposomes for Oral Drug Delivery Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering, **100**: 255–259,
- Chaplin, M.F.** 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. **123** : 336-341.
- Charles, M., Radjai, M.K.** 1977. Xanthan gum from acid whey. In *Extracellular Microbial Polysaccharides*. eds Sandford P.A. and Laskin A.. Washington. D.C.: American Chemical Society. 27–39
- Cheeseman, I.M., Brown Junior,M.** 1995. *Microscopy of curdlan structure*. <www.botany.utexas.edu.>. Austin,
- Clark, R.C.** 1992. Extensional viscosity of some food hydrocolloids. En: *Gums and stabilisers for the food industry 6*. Phillips G.O., Wedlock, D.J. y Williams, P.A. (Eds), pp.73-85. IRL Press, Oxford.
- concentration by pH control". *Biotechnology and Bioengineering*. 13, 381-391.
- Costell, E.** 1994. Evaluación sensorial de la textura de los alimentos. Valencia, España: Rubes Editorial. p. 2-3.
- Costerton, J.W.** 1995. Overview of microbial biofilm. *Industrial Microbial*. **15**:137-140.
- Costerton., J.W., Cheng, K.J., Geesey,G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T,J.** 1987. Bacterial biofilm in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. **41**: 435-464.
- Costerton., J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J.**1981.The bacterial glycocalix in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. **35**: 299-324.
- Coton, G.** 1980. New uses for whey permeates. *Food Engineering*. **52**: 132.
- Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S.** 1995. Edible biobiofilmss and coatings as active layers. In:Active Food Packaging (M. Rooney, ed.), pp. 11 1-142. Blackie, Glasgow, UK.
- Dahlqvist, A.** 1984. β -galactosidase (lactase). En *Methods of enzymatic análisis*, H.U. Bergmeyer (ed.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.**4**: 227-230.
- Dallyn, H., Fox, A.** 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould GH, Corry EL, eds. *Microbial growth and survival in extreme environments*. London and New York: Academic Press. p 129–139.
- Davey, M.E., O´toole, G.O.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular gelimpoics. *Microbiology and Molecular Biology*. **64**: 847- 67.
- Davies, A.** 1964. Lactose utilization hydrolysis in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen.*
- Davis, D.J., Burlak, C., y Money, N.P.** 2000. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research* **104**: 800-804.

- de Philipps R., Vincenzini M.** 1998 Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible application. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**:151-175.
- De Vuyst, L., Van Loo, J., Vandamme, E.J.** 1987. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **39**:263-273.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B.** 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk médium and evidence for their growth- associated biosynthesis. *Journal Applied microbial*. **84** : 1059-68.
- Decleire M., De Cat, W., Van Huynh, N.**1987. Comparison of various permeabilization tratments on *Kluyveromyces* by determining *in situ* β -galactosidase activity. *Enzyme Microbial Technology*. **9**: 300-302.
- Desai, J.D., Banat, I.M.** 1997. Microbial production of surfactant amd their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**: 47-61.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., Lynch, J. M.**1992. Aureobasidium pullulans in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*. **14**: 514–527.
- Dickinson, E.** 2003. Hidrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. **17**: 25-39.
- Dickson R.C., Markin J.S** 1980. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol*. **142**: 777-785.
- Dische.**1962. Measurement of cell wall neutral sugars. In: R.L. Whistler and M.L. Wolfrom, Editors, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, pp. 475–481.
- Domsch, K. H.** 1980. Compenium of Soil Fungi, **1** Academic Press, New York.
- Dragone, G., Solange I., Mussatto., Oliveira. M., Teixeira, A.** 2008. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry* .**112**: 929-935.
- Drobot V.I., Kudrya, V.A.** 1981. Effect of the enzymic hydrolysis of milk whey lactose on bread quality. *Pishch. Prom-st.***4**: 33-35.
- Dubois, M. K., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers P. A.**1956. *SmithAnal. Chem.*Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
- Dziezak, J.D.** 1990. Gellam gum receives FDA approval. *Food Technology*. **44**: 24-29.
- Eanes., Pittsley, J., Senti, R.** 1961. Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J.Appl.Polimer Sci*. **5**: 519-526.
- Evans, S.G., Morrison, D., Kaneko.** The effect of curdlan sulfate on development *in vitro* of *Plasmodium falciparum*. 1998. *Trans R So Trop Med Hyg*, **92**: 87-89.

- F. García-Ochoa, Santos, V. E., Casas, J. A., Gómez, E. 2000.** Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biothecnology advances*. **18**: 549-579
- Farahat, S.M., Rabie, A.M., Abdel Baky, A.A., El- Neshaway, A.A., Mobasher, S.1985.** β -galactosidase in the acceleration of Ras cheese ripening. *Nahrung*, **29**: 247-254.
- Farres, J., Caminal, G., López-Santin, J. 1997.** Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48** : 522-7.
- Fenton, D.M. 1982.** Solvent treatment for β -galactosidase release from yeast cells. *Enzyme Microbiology Technology*. **4**: 229-232.
- Ferguson, J., Klemblowski, Z. 1991.** *Applied Fluid Rheology*. J. Ferguson (Ed). Elsevier Science Publishers. University Press, Cambridge.
- Flores M.V., Voget, C.E., Estola, R.J.J. 1994.** Premeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme and Microbiology Technology*.**16**: 340-346.
- Foda, M. I., López-Leiva, M. H. 2000.** Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochemistry*.**35**:581-587.
- Fujiki, K., Nakao, M., Kajikawa, M., Asai, T., Yano, T. 1997.** Enhancement of resistance to bacterial infection in carp *Cyprinus carpio* L., by oral administration of curdlan (b(1,3)-glucan). (Abstr.) Japanese Society of Scientific Fisheries. Sept.: 59.
- Funahashi, H., Yoshida, T., Taguchi, H. 1987.** Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*. **65**: 603-606.
- Funami, T., Funami, M., Tawada, T., Nakao, Y. 1999a.** Decreasing oil uptake of doughnuts during deep-fat frying using curdlan. *Journal of Food Science, Chicago*. **64**: 883-888.
- Funami, T., Funami, M., Yada, H., Nakao, Y. 1999b.** Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. *Food Hydrocolloids, Oxford*.**13**:317-324.
- Galarraga A., Rocandio, A.M. 1997.** Leches bajas en lactosa. Utilidad dietético-sanitaria e indicaciones. *Alimentaria*. **285**: 51-59.
- Gamini, A., Mandel, M. 1994.** Physicochemical properties of aqueous xanthan solutions: static light scattering. *Biopolymers*. **34**: 783-797.
- García, G., Quintero, R., López, M. 1998.** *Biotecnología Alimentaria*. 1ª Ed. Limusa, México 636 pp.
- García-Ochoa, F., Santos V. E., Fritsch, A. P. 1992.** Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments". *Enzyme and Microbial Technology*.**14**: 991-996.

- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcón, A.** 1995. Xanthan gum production. An unstructured kinetic model. *Enzyme and Microbial Technology*. **17**: 206-217.
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcón, A.** 1997. Xanthan gum production in a laboratory aerated stirred tank bioreactor. *Chemical and Biochemical Engineering*. **11**: 69-74.
- Gary, A., Charles, W., Melvin, J.** 2008. Whey utilization in furrow irrigation: Effects on aggregate stability and erosion. *Bioresource Technology*. **99**: 8458-8463.
- Geddie, J.** 1992. Cation binding by bacterial and algal polysaccharides. PhD Thesis, Edinburgh University.
- Geddie, J.L., Sutherland, I.W.** 1993. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *Journal of applied bacteriology*. **74**: 467- 472.
- Geddie, J.L., Sutherland, I.W.** 1994. The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnology and applied biochemistry*. **20**: 117-129.
- Geesey, G.G.** 1982. Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations. *ASM News*. **48**: 9-14.
- Gekas, v ., López-Leiva, M.** 1985. Hydrolysis of lactose: A literatura review. *Process Biochemistry*. **20**: 2-12.
- Gennadios, A., Hanna, M. Dragone, G., Solange I., Mussatto., Oliveira. M., Glicksman, M.** 1982. Functional properties of hydrocolloids. *Food hydrocolloids*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. **1**: 47-99.
- González Siso, M.I., Ramil, E., Cerdán, M.E., Freire-Picos, M.A.** 1996. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Etanol production and the Crabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology*. **18**: 585-591.
- Graber, M., Morin, A., Duchiron, F., Monsan, P.F.** 1998. Microbial polysaccharides containing 6-deoxysugars. *Enzyme and Microbial Technology*. **10**:198-205.
- Greenwood, J.A, Cornish,A., Jones, C. W.** 1990. Binding-protein-dependent lactose transport in *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Bacteriology*. **172**: 1703-1710
- Haddadin M.S., Al-muhirat, S.R., Batayneh, N., Robinson, R.K.** 1996. Production of acetic and propionic from laven whey by fermentation with propionibacteria. *Journal Soc. Dairy Technology*. **49**: 79-81.
- Han, JH.** 2003. Antimicrobial food packaging. In: Ahvenainen R, editor. Novel food packaging techniques. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing Ltd. p 50–70.
- Han, J. H.** 2001. Edible and biodegradable films/coatings carrying bioactive agents. Available from: www.den.davis.
- Han, J. H.** 2002. Protein-based edible biofilms and coatings carrying antimicrobial agents. agents. In: Gennadios, A. Ed. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 485–499.

- Han, R.B., Yuan, Y.J.** 2004. Oxidative burst in suspension culture of *Taxus cuspidata* induced by a laminar shear stress in shortterm. *Biotechnology Progress*. **20**: 507-513.
- Harada, T.** 1965. Succinoglucan 10C3: a new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **112**:65–69.
- Harada, T., Misaki, A.** 1968. Curdlan: A bacterial gel forming β -(1,3)-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **124**: 292–298.
- Harrigan, W.F., Mc Cance, M.E.** 1979. Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos y productos lácteos. Ed academia León. España.361-366.
- Hashimoto, W., Murata, K.** 1998. -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **62**: 1068-1074.
- Henley, S., Sadana, T.** 1986. Deactivation theory. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**: 1277-1285.
- Henning, D.R.** 1998. Fermented by-products. En *Applied dairy microbiology*, pp. 251-262. Marth E.H. y J.L. Steele (eds)., Ed. Marcell and Dekker, New York.
- Hestrin, S.**1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytic applications. *Journal Biology Chemistry*. **180**:249-261.
- Higgins, I.J., Best, D.J., Jones, J.** 1985. "Biotechnology: principles and applications". Blackwell Scientific Publications. Oxford, Londres.
- Horton, D., Walaszek, Z., Wernau, W. C.** 1985. Structural and biosynthetic studies on xanthan by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate research* . **141**: 340-346.
- Hussein, L., Elsayed, S., Foda, S.** 1989. Reduction of lactose in milk by purified lactase produced by *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Food Protection*. **52**: 30-34.
- Ielpi,L., Couso, R.O., Dankert, M.A.** 1982. Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide- P-P lipid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **102**: 1400-1408.
- Ielpi,L., Couso, R.O., Dankert, M.A.** 1983 Xanthan gum biosynthesis: acetylación occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. *Biochemistry Internacional*. **6**: 323-333.
- Ielpi,L., Couso, R.O., Dankert, M.A.**1981. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *FEBS Letter*. **130**: 253-256.
- Inkson, MB.** 1979. (Tate & Lyle) European Patent. 0028446.
- Itoh T., Suzuki, M., Adachi, S.**1982. Production and characterization of β -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agricultural Biology and Chemistry*. **46**: 899-904.
- Jeanes, A.** 1974. Extracellular microbial polysaccharides. *Food Technology*. **28**: 34-40.
- Jelen, P.** 1979. Industrial Whey Processing Technology: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **27**:658-661.

- Jiménez, L., Ferrer, J.L., García, I.** 1987. Modelos reológicos para líquidos alimentarios. Alimentación, equipos y tecnología. Enero- febrero. 295-299.
- Johnson, A.R.** 1971. Improved method of hexosamine determination. Analytical Biochemistry. **44**: 628-635.
- Joshi, M.S., Gowda, L.R., Katwa, L.C., Bhat, S.G.** 1989. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. Enzyme and Microbiology Technology. **11**:439-443.
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopouloukyriakides, M., Kyriakidis, D. A., Kang, K.S., Cottrell, I.W.** 1979. Polysaccharides. Microbial Technology. Peppler H.J y Perlman D. 2nd ed. Academic Press. London. **1**: 471-481
- Karasová-Lipovová, P., Strnad, H., Spiwok, V., Malá, S., Králová, B., Russell, N.J.** 2003. The cloning, purification and characterisation of a cold-active -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C22. Enzyme and Microbial Technology. **33**:836–844.
- Kelco, C.O.** 1972. Xanthan Gum/Keltrol/Kelzan/ a natural biopolysaccharide for scientific water control. Kelco, San Diego, California.
- Kennedy, J. F., Bradshaw, I.J.** 1984. Production, properties and applications of xanthan. Prog. Ind. Microbiol. **19**:319-371.
- Kennedy, J. F., Piones, P., Barker, S.A., Banks, G.T.** 1982. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. Enzyme Microbial Technology **4**, 3943.
- Kennedy, L., Sutherland, I.W.** 1994. Gellan lyases-novel polysaccharide lyase. Microbiology. **140**: 3007-3013.
- Kieran, P.M., Malone, D.M., MacLoughlin, P.F.** 2000. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. Advanced Biochemical Engineering Biotechnology. **67**: 139-177.
- Kierulf, C., Sutherland, I.W.** 1988. Thermal stability of xanthan preparations. Carbohydrate Polymers. **9**: 185-194.
- Kilara A., Patel, M.T.** 1992. Whey and lactose fermentation. Whey and lactose processing. Zadow J.G.(ed.). Ed. Elsevier Applied Science, London. 409-448.
- Kim, D., Robyt, J.F., Lee, So-Young., Lee Jin-Ha., Kim Young-Min Young-Min.** 2003. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. Carbohydrate Research. **338** :1183-1189.
- Kim, D., Robyt, J.F., Lee, S.Y., Lee, J.H., Kim, Y.M.** 2003. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. Carbohydrate Research. **338**: 1183-1189

- Kim, J.W., Rajagopal, S.N.** 2000. Isolation and characterization of β - galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica*. **45**, 29-34.
- Kim, M-K.; Lee, I-K.; Lee, J-H.; Kim, K-T.; Rhee, Y-H.;Park, Y-H.** 2000. Residual phosphate concentration under nitrogen-limited conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium* species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire. **25**:180-183.
- Ko, Y.T., Chipley, J.R.** 1983. Microbial production of lysine and threonine from whey permeate. *Applied Environmental Microbiology*. **45**: 610-615.
- Kokini, J. L.** 1985. Fluid and semi-solid texture y texture- taste interactions. *Food Technology*. **39**: 86-94.
- Koreeda, A., Harada, T., Ogawa, K., Sato, S. and Kasai, N.** 1974. Study of the ultrastructure of gel-forming (1,3)- β -D-glucan (curdlan-type polysaccharide) by electron microscopy. *Carbohydrate Research*. **33**: 396- 399.
- Kosminskii, G.I., Sorokina, G.S., Cheremnova, T.A., Dorokhov, V.V.** 1991. Optimal conditions for the hydrolysis of whey lactose to be used in brewing. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Teknol.*, **1-3**: 92-94.
- Kraigsley, A., Rommey, P.D., Finkel, Se.** 2002. Hydrodynamic influences of biofilm formation and growth. [Http://carambola.usc.edu/research.usc.edu./research/biophysics/biofilm4web.html](http://carambola.usc.edu/research.usc.edu./research/biophysics/biofilm4web.html).
- Kramer, A., Twigg, B.A.** 1970. Quality control for the foods industry Vol 1, AVI publishing Co., Westport Connecticut USA.
- Krochta., De Mulder-Johnston,** 1997. Edible and biodegradable polymer biofilms: challenge and opportunities, *Food Technology* **51** :61–74.
- Kulp, K.** 1975. Carbohydrases. Pages 92-97 in *Enzymes in food processing*. G. Reed, ed. Academia Press, New York, NY.
- Kun, N., Kyong, Mi Park, Eun, Ae Jo., Kwan, S.L.** 2006. Self-organized pullulan/deoxycholic acid nanogels: Physicochemical characterization and anti-cancer drug-releasing behaviour. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*. **11**:262-267
- Kwak H.S. y I.J. Jeon.** 1986. Effect of various conditions on the formation of oligosaccharide in milk treated with β -galactosidase. *Journal of Dairy Science.*, **69**: 2785-2790.
- Labuschagne, J.H., Nieuwoudt, J.A.** 1978. Shortening of Cheddar cheese manufacturing by (1) elimination of the cheddaring process and (2) the addition of β -galactosidase. *S. Afr. Journal of Dairy Technology*. **10**:77-81.
- Lapsin, R., Prici, S.** 1995. Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications. TJ Press Ltd, Padstow, Cornwall.

- Lawford, H.G, Rousseau, J.D.** 1989. Effect of oxygen on the rate of β -1-3- glucano microbial exopolysaccharide production. *Biotechnology Letters*. **11**: 125-130.
- Lawford, H.G, Rousseau, J.D.** 1992. Production of β -1-3- glucan exopolysaccharide in low shear systems. *Applied Biochemistry Biotechnology*. **34-35**: 597-612.
- Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, K. G., Kim, M. K., Park, C. S., and Park, Y. H.** 1997. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 255–259.
- Lee, J. H., Lee, I. Y.** 2001. *Biotechnology Letter*. **23**: 1131–1134.
- Lee, Y.A., Hildebrand, D.C., Schroth, M.N.** 1992. Use of quinate metabolism as a phenotypic property to identify members of *Xanthomonas campestris* DNA homology group 6. *Phytopatology* **82**: 972-973.
- Leela, J.K., Sharma, G.** 2000. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris* . *Bioprocess Engineering*. **23**: 687-689.
- Leigh, J.A., Coplin, D.L.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Reviews of Microbiology*. **46**, 307-346.
- Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G.m., Favre, N., Neeser, J.R.** 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi 39 and SFi12. *Applied and environmental microbiology*. **63**: 3512-3518.
- Lessie, T.G., Phibbs, P.V.** 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilisation in *Pseudomonas* . *Annual.Reviews Microbiology*. **38**: 359-387.
- Letisse, F., Chevallereau, P., Simon, J-L., Lindley, N.D.** 2001. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. *Applied Microbiology Biotechnology*. **55**: 417-422.
- Li, P., Barth, M.** 1998. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots, *Postharvest Biology and Technology* **14**: 51–60.
- Lin, S.D., Lee, C. C.** 2001. *Water and Wastewater Calculations Manual*. McGraw-Hill Professional Publishing.
- Lindberg, B.** 1990. Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **48**:279-318.
- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M.M., Peart, J., Brewin, N.J., Bonilla, I., Rivilla, R.** 1995. Ionic and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3701-3704.

- Lloret, J., Wulff, B.B.H., Rubio, J.M., Downie, J.A., Bonilla, I., Rivilla, R.** 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 1024-1028.
- López, M.J., Vargas-García, M.C.** 2004. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. *Journal of Food Engineering* **63**:111-115
- López, M.J., Moreno, J., Ramos-Cormenzana, A.** 2001. The effect of olive mill wastewaters variability on xanthan production. *Journal of Applied Microbiology* , **90**, 829-835.
- López, M.J., Ramos-Cormenzana, A.** 1996. Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 263-270.
- López-Leiva M. H., M. Guzmán.** 1995. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*. **30**: 757-762.
- Mahoney R.R., Nickerson, T. A., Whitaker, J. R.**1974. Selection of strains, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Dairy Science*. **58**: 1620-1629.
- Mahoney, R.R., Whitaker, J.R.** 1978. Stability and enzymatic properties of β -Galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Food Biochemistry*. **1**:327-350.
- Marzocca, M.P., Harding, N.E., Petroni, E.A., Cleary, J.M., Ielpi, L.** 1991. Location and cloning of the ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. *Journal Bacteriology* **173**: 7519-7524.
- Matveeva, I.V., Polandova, R.D., Puchkova, L.I.**1983. Effectiveness of β -galactosidase in the preparation of bread from wheat flour. *Khlebopek. Konditer. Promst.*, **6**: 29-32.
- McCabe, W., Smith, J., Harriot, P.** 1993. *Unit Operations of Chemical Engineering*, 5^a meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **30**. 337-350.
- Mikio, K., Yoshiro, O., Hiroto, O.** Water soluble β -(1,3)-glucan derivative and antiviral agent containing the derivative. Japan patent, 07228601, 1995.
- Moon, C.J., Hwan, J., Kim, E.M., Cheong, S.J., Park, E.H., Kim, D.W., Seok, T.L., Sohn, M.H.** 2009. Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Decorated with Carboxymethyl Curdlan. *Macromolecular Research*. **17**: 133-136.
- Moon, C.J., Lee, J.H.** 2004. Use of curdlan and activated carbon composed adsorbents for heavy metal removal. *Process Biochemistry*. **40**: 1279-1283.
- Moraine, R.A., Rogovin, P.** 1971. "Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*. **13** : 381-391.
- Morillo, J.A, Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M.** 2006. Production of a metal binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Current Microbiology*. **53**:189–193.

- Morillo, J.A., Guerra del Aguila, V., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M.** 2007. Production and chemical characterization of the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae* grown on olive mill waste waters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **23**:1705–1710.
- Morris, V.J.** 1990. Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems. *Food Biotechnology*. **4** : 45-53.
- Mozaffar Z., Nakanishi, K., Matsuno, R.** 1985. Formation of oligosaccharides during hydrolysis of lactose in milk using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science*. **50**: 1602-1606.
- Mswaka, A.Y., Magan, N.** 1998. Wood degradation and cellulose and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forest of Zimbabwe. *Mycological Research*. **102**:1399-1404.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., Biro, S.** 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification*. **21**. 24-29.
- Nakata, M., Kawaguchi, T., Kodama, Y., Konno, A.** 1998. Characterization of curdlan in aqueous sodium hydroxide. *Polymer*. **39**:1475-1481.
- Nampoothiri, K. M., Singhania, R. R., Sabarinath, C., Pandey, A.** 2003. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, Kidlington. **38**:1513-1519.
- Navon-Venezia, S., Banin, E., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 1998. The bioemulsifier alasan: role of protein in maintaining structure and activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **49**: 382-384.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 1995. Alasan: a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied Environmental Microbiology*. **61**: 3240-3244.
- Nigam, P., Robinson, T., McMullan, G. y Marchant, R.** 2001. Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative *Biores. Technol.* **77**: 247-255.
- Odigboh, E.U., Mohsenin, N.N.** 1975. Effect of concentration and viscosity profiles of cassava starch pastes during the cooking/cooling process. *Journal of Texture Studies*, **5**: 441–457.
- Ogawa, K., Miyagi, M., Fukumoto, T., Watanabe, T.** 1973. Effect of 2-chloroethanol, dioxane, or water on the conformation of a gel-forming β -1,3-d-glucan in dmsO. *Chemistry Letters*. **2**:943-946.
- Okuyama, K.** 1980. Fiber diffraction studies os bacterial polysaccharides. *Fiber Diffraction Methods*. ACS Symposium Series, (Eds. A.D. French y K.H. Gardener) American Chemical Society. **141**: 411-427.

- Olano., Ramos, A., M., Martínez-Castro, L.** 1983. Enzymatic activities of Maxilact. *Food Chemistry*. **10**:57-67.
- Onishi N., Tanaka, T.** 1998. Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS 8119. *Letter Applied Microbiology*. **24**:136-139.
- Orgambide, G., Montrozier, H., Servin. P., Roussel, J., Trigalet-Demery, D., Trigalet, A.** 1991. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *Journal of Biology and Chemistry*. **266**:8312-21.
- Osbourne, A.E., Clarke, B.R., Stevens, B.J.H y Daniels, M.J.** 1990. Use of oligonucleotide probes to identify members of two-component regulatory systems in *Xanthomonas campestris pv campestris*. *Molecular Genetics and Genomics*. **222**, 145-151.
- Oviatt, H.W., Brant, D.A.** 1993. Thermal treatment of semi-dilute aqueous xanthan solutions yields weak gels with properties resembling. *International Journal of Biological Macromolecules*. **15**: 3-10.
- Oviatt, H.W., Brant, D.A.** 1994. Viscoelastic behaviour of thermally treated aqueous xanthan solutions in the semidilute concentration regime. *Macromolecules*. **27**: 2402-2408.
- Pace, G. W. y R. C. Righelato.** 1980. Production of extracellular microbial polisaccharides. *Advanced Biochemical Engineering*. **5**: 41-70.
- Papagianni, M., Psomas, S.K., Batsillas, L., Paras, S.V., Kyriakidis D.A., Liakopoulou-Kyriakides, M.** 2001. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*. **37**:173-80.
- Pastor, M.V., Costell, E., Izquierdo, L., Durán, L.** 1994. Effects of concentration, pH and salt content on flow characteristics of xanthan gum solutions. *Food Hydrocolloid*. **8**: 265-275.
- Patton, ST. y W. E. Flolman.** 1968. (Esso Prod. Res. Co.) US. Patent. 3383339.
- Pazur, J.H.** 1953. The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides *Science*, **117**: 335- 337.
- Peciulis J., Tikhomirova, A.S., Kulikova A.K.** 1979. Cultivation of bakers' yeast on molasses containing β - galactosidasa treated whey. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*. **15**: 353-359.
- Peciulis J., Kulikova, A.K., Tikhomirova, A.S.** 1982. Cultivation of feed yeasts on substrates with milk whey treated with β -galactosidase. *Gidriliz. Lesokhim. Prom-st*, **3**: 13-16.
- Peinemann). Weinheim : Wiley-VCH, 127-172.

- Pelletier, E., Viebke, C., Meadows, J., Williams, P. A.** 2001. A rheological Study of the Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. *Biopolymers* **59**: 339-346.
- Pena, D.C.R. , Torres, J.A.** 1991. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid biofilms: Water activity and pH effects, *Journal of Food Science* **56** : 497–499.
- performance of a bubble column and a stirred tank fermentor”. *Bioproc. Eng.* **5**, 107-114.
- Perry, R.H., Green, D.W.** 1997. *Perry’s Chemical Engineers’ Handbook*, 7^a ed.
- Peters H-U, Suh IS, Schumpe A, Deckwer WD.** 1993. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnology Letters*; **15**:565-6.
- Peters, H.-U., Herbst, H., Hesselink, P.G.M., L0nsdorf, H., Schumpe, A., Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.J., Cerning, J., Desmazeaud, M.** 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* grown in a chemically defined medium, *Applied and Environmental Microbiology*. **66** : 3427–3431.
- Pfiffner, S.M., Melnerney, M.J., Jenneman, G.E., Knapp, R.M.** 1983. Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. *Applied Environmental Microbiology*. **51**: 1224-1229.
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J.** 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied Environmental Microbiology*. **66** : 2302-2310.
- Pinches, A., Pallent, L. J.** 1986. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**: 1484-1496.
- Pivarnik L.F., Senecal, A.G., Rand, A.G.** 1995. Hydrolytic and transgalactosylyc activities of commercial β - galactosidasa (lactase) in food processing. *Advanced in Food and Nutrition Research*. **38**: 1-102.
- Polandova, R.D., Matveeva, I.V., Puchkova, L.I., Tikhomirova, A.S.** 1983. Effectiveness of using whey in the production of wheat bread. *Khlebopek. Konditer. Prom-st.*, **1**: 33-36.
- Pons, A., Dussap, C. G., Gros, J. B.** 1990. Xanthan batch fermentations: compared performances of a and a stirred tank fermentor. *Bioprocess and Biosystems engineering* **5**:107-114.

- Pranoto, Y., Salokhe, V., Rakshit, K.S.** 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil, *Food Research International* **38**: 267–272.
- Prenosil J.E., E. Stuker., J.R. Bourne.** 1987 a. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part J: State of Art. *Biotechnology and Bioengineering*. **30**: 1019-1025.
- Prenosil J.E., E. Stuker., J.R. Bourne.** 1987 b. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II: Experimental. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**: 1026-1031.
- Pszczola, D. E.** 1997. Curdlan differs from others gelling agents. *Food Technology*, Chicago. **51**.
- Railton, K., Farago, D., Mackenzie, C. R., Lawford, G. R., Pikk, J., and Lawford, H. G. Ramirez, M.L., Chulze, S.N., Magan, N.** 2004. Impact of osmotic and matrix water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia* **96**: 470-478.
- Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. and López, M.J.**1995. Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation* **35**: 249-268
- Rao, Y.M., Sureshkumar, G.K.** 2001. Improvement in bioreactor productivities using free radicals: HOCl-induced overproduction of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* and its mechanism. *Biotechnology and Bioengineering* **72** : 62-8.
- Rekha M.R., Sharma C.P.** 2007. Pullulan as a Promising Biomaterial for biomedical Applications: A Perspective. *Trends biomater. Artif. Organs*. **20**:116-121.
- Richmond, M.L., Gray, J.I., Stine, C.N.**1981. Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science.*, **64**: 1759-1771.
- Rivero Martínez, MJ** .2002. *Tesis doctoral*: "Diseño del proceso de purificación de estireno mediante adsorción en alúmina. Universidad de Cantabria
- Roberson, E.B., Chenu, C., Firestone,M.K.** 1993. Microstructural changes in bacterial exopolysaccharides during desiccation. *Soil Biology and Biochemistry*. **25**: 1299-1301.
- Robinson, D.K., Wang, D.I.C.** 1988. *Annals N. Y Acad. Sci.* **506**:229-241.
- Robyt, J.F.**1998. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Springer-Verlag, New York.
- Rogovin, P., Albrecht, W., Sohns, V.** 1965. "Production of industrial grade polysaccharide B-1459".*Biotech. Bioeng.* 7, 161-169.
- Rogovin, P., Anderson, R. F., Cadmus, MC.** 1961. "Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*". *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **3**, 51-63.
- Roland J.F., Alm, W.L.**1975. Wine fermentations using membrane processed hydrolyzed whey. *Biotechnology and Bioengineering*, **17**: 1443-1453.

- Roller, S., Dea, I.C.M.** 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Critical Reviews in Biotechnology*. **12**:261-277.
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., Benedito de Barber, C.** 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*.**15**: 75–81.
- Ross-Murphy, S.B. & Shatwell, K.P.** 1993. Biorheology, **30**:217.
- Rouwenhorst R.J., J.T. Pronk y J.P. van Dijken.** 1989. The discovery of β -galactosidasa TIBS. **14**:416-418.
- Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK.** 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnology Progress*. **19**: 1689-1696.
- Sahoo, S., Rao, K.K., Suresh, A.K., Suraishkumar, G.K.** 2004. Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. *Biotechnology and Bioengineering*. **87**: 81-89.
- Saito, H., Ohki, T., Sasaki, T.** 1997. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study of gel-forming (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans. Evidence of the presence of single-helical conformation in a resilient gel of a curdlan-type polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faecalis* var *myxogenes* IFO 13140, *Biochemistry* **16** : 908–914.
- Sánchez L. y F.J. Castillo.**1980. Producción, extracción y caracterización parcial de beta-D-galactosidasa de *Kluveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta. Cient. Venez.*, **31**: 154-159.
- Sanderson, G.R., Clarke, R.C.** 1983. Gellam gum. *Food Technology*. **37**:63-70.
- Sanford PA, Baird J.In: Aspinall GO, editor.**1983.The polisaccharides. Prague: Academia Press. pp. 470-3.
- Santos, VE.** 1993." Producción de xantano ". Tesis Doctoral. Universidad Complutense Madrid.
- Schütte H., Kula, M.R..** 1988. Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme and Microbiology Technology*. **10** :552-558.
- Schweickart, R. W., Quinlan, AV.** 1989. Kinetics of xanthan production when $\text{NH}_3\text{-N}$ limits biomass synthesis and glucose limits polysaccharide syntbesis". *Journal of Biomechanical and Engineering*. **111**:166-171.
- Serrano R., Gancedo J.M., Gancedo, C.** 1973. Assay of yeast enzymes in situ. A potential tool in regulation studies. *European Journal of Biochemistry*. **34**: 479- 482.
- Shama, F., Sherman, P.** 1973. Identification pf stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity. II. Oral methods. *J. Texture Stud.*, **4**, 111-118.
- Shatwell, K.P., Sutherland I.W., Ross-Murphy, S.B.** 1990. Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide. *International journal of Biogical Macromolecules*. **12**:71–78.

- Shepherd, R., Rockey, R., Sutherland, I.W., Rollers, S.** 1995. Novel bioemulsifiers from microorganism for use in food. *Journal of Biotechnology*. **40** : 207-217.
- Sherman, P.I.** 1970. *Industrial rheology*. Academic press. New York.
- Shi ZD, Yuan YJ, Wu JC, Shang GM.** 2003. Biological responses of suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* to shear stresses in the short term. *Appl Biochem Biotechnol*. **110**: 61-74.
- Shu, Ch-H., Yang, Sh-T.** 1990. " Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*. **35**:454-468.
- Shu, Ch-H., Yang, Sh-T.** 1991. "Kinetics and modelling of temperature effects on batch xanthan gum fermentations". *Biotech. Bioeng.* **37**, 567-574.
- Shukla, J.P.** 1975. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **5**: 325.
- Silman, R.W., P. Rogovin.** 1970." Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate". *Biotechnology and Bioengineering*. **14**, 23-31.
- Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F.** 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, **22**.
- Siso M.G.I., Freire, A., Ramil, E., Belmonte, E.R., Torres A.R., Cerdán, E.** 1994. Covalent immobilization of β - galactosidase on corn grits. A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Process Biochemistry*. **29**:7-12.
- Skjak-Braek, G., Zanetti, F., Paoletti, S.** 1988. Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydrate Research*. **185**: 131-138.
- Slodki. M.E., M.C Cadmus.** 1978. "Production of microbial polysaccharides".*Adv. Appl. Microbiol.* **23**: 19-49.
- Sloneker, J.H., Orentas, D.G.** 1962. Quantitative determination of pyruvic acid. *Nature*. **194**: 478.
- Smith, I. H.** 1983. (Kelco Co.) European Patent. 68706A.
- Smith, JH., Pace, GW.** 1982. Recovery of microbial polysaccharides. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology* **32**:119–129.
- Somkuti G.A., D.H. Steinberg.** 1994. Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of beta-galactosidase. *Enzyme and Microbiology Technology*.**16**: 573-576.
- Sommer. S, Melin, T.** 2004. Design and Optimization of Hybrid Separation Processes for the Dehydration of 2-Propanol and Other Organics. *Industrial Engineering chemistry Research*, **43**: 5248-5259.
- Sonawat, H.M., Agrawat, A., Dutta, S.M.** 1981. Production of the β - galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. *Folia Microbiol.* **26**: 370-376.
- Souw P, Demain AL.** 1980. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*. **58**:411-416.

- Spicer, E. J. F., Goldenthal, E. I., Ikeda, T.** 1999. A toxicological assessment of curdlan. *Food and Chemical Toxicology*, Kidlington. **37**: 455-479.
- Steuter, A. A., A. Mozafar, and J. R. Goodin.** 1981. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiol.* **67**:64-67.
- Stineman T.L., Edwards J.D., Grosskopf, J.C..** 1978. Bakers'yeast from acid whey. Patente.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.** 1989. *Microbiol Reviews.* **53**: 450-490.
- Stredansky, M., Conti, E., Bertocchi, C., Matulova, M., Zanetti, F.** 1998. Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens* . *J. Ferm. Bioeng.* **84** : 398-403.
- Stredansky, M., Conti, E., Bertocchi, C., Navarini, L., Matulova, M., Zanetti, F.** 1999. Fed-batch production and simple isolation of succinoglycan from *Agrobacterium tumefaciens* . *Biotechnol. Tech.* **13**: 7-10.
- Stredansky, M., Tomáška, M., Sturdík, E., Kremnický, L.** 1993. Optimization of β -galactosidase extraction from *kluveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbiology Technology.*, **15**:1063-1065.
- Sullivan, DA** .1997. Industrial Solvents. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical.*
- Sutherland, I. W.** 2001. Microbial polysaccharide from gramnegative bacteria. *International Dairy Journal*, Kidlington. **11**: 663-674.
- Sutherland, I.W.** 1980. Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. In *microbial adhesion to surfaces*, pp 329-338. Edited by R.C W. Berkeley, J.M. Lyrch J. Melling, P.R. Ruther B. Vincent London: ellis Horwood.
- Sutherland, I.W.** 1982. An enzyme system hydrolyzing the polysaccharides of *Xanthomonas* species. *J. Appl. Bacteriol.*
- Sutherland, I.W.** 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.* **23**: 79-100.
- Sutherland, I.W.** 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Int. Rev. Cytol.*Vol. **113**. Academic Press.
- Sutherland, I.W.** 1990. Biotechnology of microbial exopolysaccharides En: J. Baddiley, N.H. Carey, I.J. Higgins and W.G. Pitter (Eds). *Cambridge studies in Biotechnology.* **9**.
- Sutherland, I.W.** 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharide. *Biotechnol. Adv.* **12** : 393-448.
- Sutherland, I.W.** 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech.* **16** : 41-46.
- Sutherland, I.W.** 1999. Microbial polysaccharide products. *Biotechnology Genetic Engineering Reviews.* **16** : 217- 229.
- Sutherland, I.W.** 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* **147** : 3-9.

- Swift, C. J., Atkins, W. S.** 1983. Alcohol recovery by distillation. In Monograph: European Brewery Convention, pp. 185-202. Sydney: McGraw-Hill.
- Tait, M.I., Sutherland, I.W.** 1998. Synthesis and properties of a mutant type of xanthan. *Journal of Applied Bacteriology*. **66**: 457-460.
- Tako, M., Nakamura, S.** 1984. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous-media. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**: 2987–2993.
- Thakar, P.N., Vyas, S.H., Prajapati, P.S., Miyani, R.V., Upadhyay, K.G.** 1992. Lactose prehydrolysis of buffalo milk β - D- galactosidase in order to accelerate ripening of cheddar cheese. I. Ripening of cheddar cheese. *Cult. Dairy. Prod. J.*, **27**: 6-9.
- Thakar, P.N., Vyas, S.H., Prajapati, P.S., Upadhyay, K.G., Miyani, R.V.** 1988. Lactose prehydrolysis of buffalo milk β - D- galactosidase in order to accelerate ripening of cheddar cheese. I. Manufacture of Cheddar cheese. *Cult. Dairy. Prod. J.*, **23** : 20-21, 23-24.
- Thonart, Ph., Paquot, M., Hermans, L., Alaoui, H., d'Ippolito, P.** 1985. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and interfacial approach by zeta potential measurement". *Enzyme Microbiology and Technology*. **7** : 235-238.
- Trilsbach GF, Pielken P, Hamacher K, Sahm H.** 1984. Xanthan formation by *Xanthomonas campestris* under different culture conditions. 3rd European Congress of Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie, pp. 65-70.
- Trinder P.** 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*; **6**: 24-30.
- Umashankar, H., Annadurai, G., Chellapandian, M., Krishnan, M.R.V.** 1996a. Xanthan production. Effect of agitation. *Bioprocess Eng.* **15**: 35-37.
- Umashankar, H., Annadurai, G., Chellapandian, M., Krishnan, M.R.V.** 1996b. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Eng.* **14** : 307-309.
- Uses (H. J. Park, R. F. Testin, M. S. Chinnan and J. W. Park, eds), pp. 187-198.
- Vafiadis, D.** 1999. Anti-shock treatment (frozen dairy products formulation). *Dairy Field*. **182**: 85-88.
- Vanderslice R.W., Doherty, D.H., Capage, M.A., Betlach, M.R., Hassler, R.A., Henderson, N.M., Ryan-Graniero, J., Tecklenburg, M.** 1989. Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. *Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides*, (Eds. V. Crescenzi, I.C.M. Dea, S. Paoletti, S.S. Slilava y I.W Sutherland), pp. 145-156. New York, USA: Gordon y Breach.
- Verruga, María Isabel.** 2001. Mayor aprovechamiento y diversificación a partir de subproductos lácteos. ILE.271.

- Vidal-Bezerra, J. R. M.** 2000. Comportamento reológico da polpa de manga. Campinas . 159p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C., Prieur, D.** 1994. Production and Characterization of an Exopolysaccharide Excreted by a Deep-Sea Hydrothermal Vent Bacterium Isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Applied Environmental Microbiology*. **60**: 4134-4141.
- Walker, B., Phillips, G.O., Wedlock, D.J., Williams, P.A.** 1984. Gums and stabilisers in food formulations. (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry 2*, Elsevier Applied Science and Publishers, Barking, England .
- Wallenfels, K., Weil, R.**, 1972. β -Galactosidase. In: Boyer, P.D. (ED.), *The Enzymes*, Academic Press, New York. **7**:6
- Walling, E., Dols-Lafargue, Lonvaud-Funel, A.** 2005. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by *Lactobacillus pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food Microbiol.* **22** : 71-78.
- Weldman, A.D., Maddox, I.S.** 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Microbiol.* **21**: 269-274.
- Wendorff W.L., Amundson, C.H.** 1971. Characterization of beta-galactodidase from *Saccharomyces fragilis* . *Journal of Milk and Food Technology*. **34**:300-306.
- Wendorff, W.L., Amundson, C.H., Olson, N.F.** 1970. Nutrient requirements and growth conditions for production of lactose enzyme by *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* **33**: 451-455.
- William F., Mahadevan, A.** 1980. Degradation of aromatic compounds by *Xanthomonas* species. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **87**: 738–744..
- Williams, P.H.** 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Disease* **64**: 736–742.
- Wong, D.W., Gregorski, K.S., Hudson, J.S., Pavlath, A.E.** 1996. Calcium alginate biofilms: Thermal properties and permeability to sorbate and ascorbate, *Journal of Food Science* **61** : 337–341.
- Wu, J., Ge, X.** 2004. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng.* **85**: 714-721.
- Wul, E.G., Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L., and Hockenhull, J.** 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology.* **10** , pp. 317–325.

- Yang S.T., Silva, E.M..** 1995. Novel products and new technologies for use of familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*. **78**: 2541-2562.
- Young, R.J., Lovell, P.A.** 1991. *Introduction to Polymers*. Chapman & Hall, New York.
- Yukihiro, N.** 1997. Properties and food applications of curdlan. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, Paris, Jan./Feb.
- Yukihiro, N., Konno, A., Taguchi, T., Tawada, T., Kasai, H., Toda, J., Terasaki, M.** 1991. Curdlan: Properties and application to foods. *Journal of Food Science*, Chicago, **56**:769-772.
- Zadow, J.G.** 1992. Lactose hydrolysis. Whey and lactose processing. 361-408.
- Zárate S., López-Leiva, M. H..** 1990. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literatura review. *Journal of Food Protection*. **53**: 262-268.
- Zomer E., Z. Er-El., Rokem, J.S..** 1987. Production of intracellular enzymes by enzymatic tratment of yeast. *Enzime and Microbiology Technology*. **9**: 281-2.