

ARTÍCULO ORIGINAL

Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de *Halomonas nitroreducens* en la industria farmacéutica**Pharmaceutical applications of the exopolysaccharides produced by *Halomonas nitroreducens* strain HK30**Amjres H^{1,2*}, Béjar V¹, Quesada E¹, Abrini J² y Llamas I¹¹Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja s/n. 18071. Granada.²Equipo de Biotecnología y Microbiología Aplicada. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias.

Universidad Abdelmalek Essâadi BP2121. 93002. Tetuán. Marruecos.

amjresha@yahoo.fr

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Una de las líneas de investigación que desarrolla el Grupo Exopolisacáridos Microbianos (BIO 188) es el aislamiento y caracterización de nuevos microorganismos halófilos productores de EPSs con propiedades físicas y químicas competitivas con los ya existentes en la industria. De estos estudios destaca el polímero V2-7 (*Halomonas eurihalina* F2-7) que origina geles transparentes¹, el maurano (*H. maura* S-30) cuya viscosidad compite con la del xantano² y los EPSs producidos por *Salipiger mucescens*, *Halomonas. anticariensis*, *H. ventosae*, *Idiomarina fontislapidosi*, *I. ramblicola* y *Alteromonas hispanica* que emulsionan diferentes compuestos orgánicos y pueden actuar como biodetoxicadores^{3,4}. Además, estos polímeros tienen sulfatos en su composición que es una característica inusual e interesante para su aplicación en Medicina y el producido por *S. mucescens* contiene un carbohidrato llamado fucosa, con interesantes aplicaciones en cosmética y que resulta caro de obtener por síntesis química⁵. El grupo de investigación tiene colaboraciones con empresas del sector alimentario, farmacéutico y cosmético para aplicar las propiedades funcionales de sus polisacáridos en estas áreas.

OBJETIVO

La búsqueda y selección de bacterias productoras de exopolisacáridos de ambientes hipersalinos situados en Marruecos con propiedades interesantes para la industria.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas fueron aisladas de ambientes hipersalinos situados en Marruecos (suelos y aguas hipersalinos, alimentos en salazón y las raíces de las plantas marinas). Para producir los EPSs las bacterias se cultivaron en medio MY 7,5 % p/v de sales y se incubaron a 32°C en agitación (100 rpm) durante 5 días.

Producción de exopolisacáridos. Los exopolisacáridos se extrajeron de acuerdo con la metodología descrita por Quesada y col.⁶

Caracterización química y determinación de la masa molecular. El contenido en carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos, restos acetilos, iones sulfato y fosfato, así como la composición en monosacáridos y la masa molecular de los EPSs purificados se analizó siguiendo la metodología previamente descrita en nuestros trabajos⁴.

Caracterización física. El estudio de las características reológicas y actividad emulgente se realizó siguiendo la metodología descrita por Mata y col.³.

Estudio de la participación de los EPS en la formación de biofilms. Se hizo mediante tinción con cristal violeta en placas microtiter tras 40 horas de incubación en medios MY y MM al 7,5% (p/v) de NaCl⁷.

Determinación de la actividad floculante. Se prepararon soluciones de caolín y se mezclaron con

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3:255-266.

diferentes concentraciones de EPS^{8,9}.

CONCLUSIÓN /DISCUSIÓN

A partir de una colección de 120 cepas se han seleccionado las 26 mejores productoras de EPSs, que han sido identificadas taxonómicamente. Tras un primer análisis de la productividad y características físicas y químicas de los EPSs, se ha elegido el polímero producido por la cepa HK30 para llevar a cabo un estudio más completo. La cepa HK30, por su mayor rendimiento en la producción de un polímero con actividad viscosizante y emulgente, se considera un excelente candidato de interés biotecnológico con aplicaciones en la industria farmacéutica.

PALABRAS CLAVE: Exopolisacárido (EPS), *Halomonas*, biotecnología.

ABSTRACT

The Microbial Exopolysaccharide Research Group (BIO 188) has been carrying out a wide search aimed at isolating and characterizing exopolysaccharides produced by halophilic microorganisms with different physical and chemical properties of interest to industry. As a result of these studies, we selected and characterized the polymer V2-7 (*Halomonas eurihalina* F2-7) that has emulsifying activity and jellifying properties at acid pH¹; the mauran, which has a viscosifying activity similar to that of xanthan gum² and the EPSs produced by *Salipiger mucosus*, *Halomonas anticariensis*, *H. ventosae*, *Idiomarina fontislapidosi*, *I. ramblicola* and *Alteromonas hispanica* that emulsify different organic compounds^{3,4}. In addition, all of these polymers have sulphate groups in their composition, an unusual and interesting feature for their application in medicine. Moreover, the fucose-rich EPS of *Salipiger mucosus* has applications in the fields of medicine and cosmetics. The chemical or enzymatic hydrolysis of fucose-rich polysaccharides offers a new efficient way to process fucose⁵. The Research Group BIO 188 has established collaborations with several companies related to the food, pharmaceutical and cosmetics industries in order to test the functional properties of our halophilic exopolysaccharides in these areas.

AIM

Searching and selection of exopolysaccharide-producing bacteria from hypersaline environments located in Morocco with interesting properties to industry.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The strains were isolated from hypersaline environments in Morocco. Bacteria were cultured in MY with 7.5% (w/v) of salts and incubated at 32 °C with shaking (100 rpm) for 5 days.

Production of exopolysaccharides. The exopolysaccharides were isolated according to the methodology described by Quesada *et al.*⁶

Chemical characterization and molecular weight determination. The content of carbohydrates, proteins, uronic acids, acetyl residues, sulphates, phosphates, monosaccharide composition, and molecular weight of purified EPSs were analyzed following the methodology previously described [4].

Physical characterization. The study of the rheological properties and emulsifying activity was carried out following the methodology described by Mata *et al.*³

Production of biofilms. The production of biofilms were tested by crystal violet staining in microtiter plates after 40 hours incubation in the media MM and MY 7.5% (w/v)⁷.

Determination of flocculating activity. Kaolin solutions were prepared and mixed with different concentrations of EPS^{8,9}.

KEYWORDS: Exopolysaccharides (EPSs), biotechnological interest.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos son hábitats extremos que se caracterizan por una elevada concentración salina, fundamentalmente NaCl, entre otros factores inusuales. Los seres vivos que habitan los ambientes salinos suelen ser halófilos y entre ellos destacan los microorganismos (algas, hongos, protozoos microscópicos, arqueas y bacterias).

Las bacterias halófilas, al igual que otros microorganismos extremófilos, han sido consideradas como un grupo de organismos con un enorme potencial biotecnológico.^{1,2,3,4}

Hay que destacar además que presentan un marcado carácter eurihalino, fácil cultivo y manipulación en el laboratorio y la falta de patogenicidad.

Numerosas bacterias producen componentes extracelulares llamados exopolisacáridos, polisacáridos extracelulares o EPS. Estos términos son utilizados para describir aquellos polisacáridos localizados en el exterior de la superficie de las células microbianas.⁵ Su composición química y estructura puede ser muy variada por lo que son moléculas versátiles con aplicaciones muy diversas en distintos campos biotecnológicos. Además, confieren una serie de ventajas a los microorganismos que los producen tales como la adherencia a superficies y con ello la formación de biofilms, y la protección frente a agentes nocivos del medioambiente.⁶

Una de las líneas de investigación que desarrolla el Grupo Exopolisacáridos Microbianos (BIO 188) es el aislamiento y caracterización de nuevos microorganismos halófilos productores de EPSs con propiedades físicas y químicas competitivas con los ya existentes en el mercado. Hasta la fecha se han descrito exopolisacáridos sintetizados por bacterias halófilas pertenecientes a la clase γ -*Proteobacteria*, entre los que destaca el polímero V2-7 (*Halomonas eurihalina* F2-7) que origina geles transparentes,^{7,8,9,10} el maurano (*H. maura* S-30) cuya viscosidad compite con la del xantano¹¹ y los EPSs producidos por *H. anticariensis* y *H. ventosae*¹² e *Idiomarina fontislapidosi*, *I. ramblicola* y *Alteromonas hispanica*¹³ que emulsionan diferentes compuestos orgánicos y pueden actuar como biodetoxicadores. Recientemente, se ha caracterizado un polímero producido por la cepa *Salipiger mucosus* A3^T incluida en la clase α -*Proteobacteria* que contiene en su composición un carbohidrato llamado fucosa con interesantes aplicaciones en cosmética y que resulta caro de obtener por síntesis química.¹⁴ Además, todos estos polímeros tienen sulfatos en su composición que es una característica inusual e interesante para su aplicación en Medicina destacando la especie *H. stenophila*¹⁵ que produce un EPS con propiedades antitumorales.¹⁶ Gracias a todas estas características físicas y químicas, el grupo de investigación actualmente tiene colaboraciones con empresas del sector alimentario, farmacéutico y cosmético para aplicar las propiedades funcionales de sus polisacáridos en estas áreas.

OBJETIVO

La búsqueda y selección de bacterias productoras de exopolisacáridos de ambientes hipersalinos situados en Marruecos con propiedades interesantes para la industria.

METODOLOGÍA

Procedencia de las muestras: Los ambientes hipersalinos analizados fueron suelos y aguas hipersalinos, alimentos en salazón y las raíces de las plantas situados en el norte de Marruecos (Chefchaouen, Tetuán y Tánger).

Procesamiento de las muestras: 1g de cada una de las muestras se resuspendió en 9 ml de solución de sales marinas preparada al 3 % (p/v)¹⁷ y se realizaron diluciones seriadas. Seguidamente se sembraron en placas de medio complejo MY¹⁸ adicionado de una solución de sales marinas¹⁷ hasta obtener un rango creciente de concentraciones salinas del 0,5 al 30% (p/v) de sales. Las placas se incubaron a 32°C durante 5 días.

Condiciones de cultivo. Las bacterias se cultivaron en medio MY al 7,5% (p/v) de sales y se incubaron a 32°C en agitación (100 r.p.m.).

Producción de exopolisacáridos. Los exopolisacáridos sintetizados por las bacterias objeto de estudio se extrajeron tras 5 días de incubación a 32°C y en agitación (100 r.p.m.).¹⁹

Caracterización química. El contenido en carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilos de los EPSs purificados se analizó siguiendo la metodología previamente descrita en nuestros trabajos.^{20,21,22,23}

Caracterización física. El estudio de las características reológicas se realizó utilizando un reómetro Bohlin CSR 10 y las características emulgentes siguiendo la metodología de Cooper y Goldenberg.²⁴

Identificación taxonómica. La identificación taxonómica de las cepas estudiadas en este trabajo se realizó tal y como se describe en trabajos previos. El gen ribosomal completo (ARNr 16S) se amplificó a partir del ADN total mediante PCR utilizando primers universales y posteriormente se secuenció en los servicios de secuenciación del Instituto López-Neyra, CSIC, Granada. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en las bases de datos EMBL y GenBank mediante el programa BLAST, disponible en el servidor de internet del NCBI (National Center for Biotechnology Information). También se calculó el porcentaje de identidad entre cepas utilizando el servidor EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>).²⁵ El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA, version 4²⁶ tras el alineamiento múltiple de los datos realizado previamente con los programas CLUSTALW²⁷ y PHYLIP version 3.69.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras procedentes de los diferentes ambientes hipersalinos analizados se procesaron mediante técnicas de microbiología clásica y se seleccionaron un total de 120 cepas al azar en función de su diferente morfología colonial. De éstas se eligieron 26 por

presentar un aspecto colonial mucoso, indicativo de la capacidad de producir exopolisacárido. Las bacterias seleccionadas se identificaron taxonómicamente. Por otra parte se determinó la productividad de los polímeros para posteriormente realizarles un análisis de las características físicas y químicas.

Identificación taxonómica

El análisis filogenético basado en la secuenciación del gen ribosomal ARNr 16S (1500 pb) de las 26 cepas estudiadas indicó que la mayoría eran bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Halomonas* (HK12, HK16, HK20, HK24, HK27, HK28, HK30, HK31, HK45), *Pseudoalteromonas* (HK33, HK41), *Cobetia* (HK1, HK5, HK9, HK13), *Pantoea* (HK2, HK3, HK6, HK7, HK8, HK10, HK11, HK14, HK15) y *Enterobacter* (HK4), mientras que sólo la cepa HK44 era una bacteria Gram positiva incluida en el género *Bacillus*.

Productividad y composición química

Los mejores resultados en cuanto a la productividad en la mayoría de las cepas estudiadas por nuestro grupo se ha alcanzado utilizando el medio MY tras 5 días de incubación en agitación. Los estudios realizados hasta el momento para otros EPSs producidos por bacterias halófilas indican que los EPSs comienzan a sintetizarse en la fase exponencial de crecimiento, aumentando su producción conforme aumenta el número de células y cesando cuando el sustrato carbonado se consume.^{7,11,12,13,14,15} Hay autores que proponen que el descenso posterior en la cantidad de EPS en el cultivo es debido a la degradación enzimática.²⁸

El estudio de la productividad de los exopolisacáridos en las condiciones mencionadas anteriormente indicó que la mayoría de las bacterias producían menos de 1 g de polímero por litro de medio de cultivo excepto la cepa HK30 que produjo 1,23 g/l.

La Tabla 1 muestra los porcentajes de carbohidratos totales, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilo que componen los EPSs analizados.

En general los polímeros analizados están compuestos mayoritariamente por carbohidratos y otros compuestos orgánicos como grupos acetilo o proteínas, como sucede en otros EPSs procedentes de bacterias halófilas^{11,12,13,14,15,29} y de otros microorganismos. Sin embargo, el contenido total de carbohidratos de los EPSs bacterianos descritos es variable. En la bibliografía se puede también comprobar que este contenido puede oscilar entre un 20%, como es el caso del EPS de *Pseudomonas fluorescens*³⁰ y 99% en el polímero de *Lactobacillus brevis*.³¹

El contenido en proteínas suele ser mucho menor que el de carbohidratos en los exopolisacáridos descritos y puede deberse a impurezas procedentes del medio de cultivo e incluso a restos celulares que se arrastran durante el proceso de extracción. En algunos casos, como ocurre en *Acinetobacter calcoaceticus* cepa BD4³² o *Halomonas ventosae* cepa Al-

12¹,¹² las proteínas están tan íntimamente unidas al polímero que no se pueden eliminar con facilidad y juegan un papel crucial en la alta actividad emulgente del mismo. Muchos de los polímeros producidos por las cepas estudiadas en este trabajo carecen de proteínas o presentan un contenido bajo. Únicamente los polímeros de las cepas HK12, HK30, HK31, HK44 y HK45 tienen un porcentaje de proteínas similar o mayor al contenido en carbohidratos totales. Esto también sucede en algunas bacterias como *Sinorhizobium meliloti*, *R. japonicum*,³³ y *Rhodococcus erythropolis* ST-2 cuando crece en medios con petróleo como única fuente de carbono y energía.³⁴

Tabla 1. Contenido en carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilo de los exopolisacáridos*

| Cepa | % (p/p) proteínas | % (p/p) carbohidratos | % (p/p) ácidos urónicos | % (p/p) restos acetilo |
|------|-------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| HK1 | 0,00 | 58,7 ± 0,2 | 10,5 ± 0,6 | 0,00 |
| HK2 | 0,00 | 57,7 ± 0,9 | 10,9 ± 0,8 | 2,3 ± 0,2 |
| HK3 | 0,00 | 50,1 ± 1,0 | 9,5 ± 0,3 | 3,2 ± 0,2 |
| HK4 | 13,8 ± 0,4 | 38,1 ± 1,8 | 9,0 ± 0,8 | 7,7 ± 0,3 |
| HK5 | 0,00 | 43,8 ± 0,6 | 8,4 ± 0,9 | 3,2 ± 0,2 |
| HK6 | 0,00 | 59,2 ± 0,5 | 8,8 ± 0,4 | 7,9 ± 0,2 |
| HK7 | 0,00 | 59,1 ± 0,3 | 13,9 ± 0,7 | 3,5 ± 0,0 |
| HK8 | 0,00 | 49,8 ± 1,9 | 12,0 ± 0,4 | 5,2 ± 0,0 |
| HK9 | 0,00 | 72,1 ± 0,8 | 11,8 ± 1,1 | 0,00 |
| HK10 | 0,00 | 54,4 ± 0,2 | 10,9 ± 0,9 | 9,0 ± 0,1 |
| HK11 | 0,00 | 59,7 ± 1,0 | 13,7 ± 0,6 | 5,3 ± 0,1 |
| HK12 | 36,4 ± 0,2 | 29,5 ± 0,8 | 11,4 ± 0,1 | 0,00 |
| HK13 | 0,00 | 84,1 ± 1,3 | 11,9 ± 0,4 | 8,3 ± 0,2 |
| HK14 | 0,00 | 66,8 ± 0,9 | 7,3 ± 0,7 | 3,0 ± 0,1 |
| HK15 | 0,00 | 50,8 ± 0,2 | 12,1 ± 1,2 | 0,00 |
| HK16 | 4,45 ± 0,09 | 44,4 ± 0,8 | 9,8 ± 0,1 | 2,35 ± 0,1 |
| HK20 | 3,52 ± 0,11 | 32,7 ± 0,2 | 10,1 ± 0,2 | 1,54 ± 0,1 |
| HK24 | 11,47 ± 0,10 | 38,2 ± 0,6 | 11,1 ± 0,13 | 2,20 ± 0,1 |
| HK27 | 5,94 ± 0,17 | 37,1 ± 0,1 | 11,8 ± 0,5 | 1,27 ± 0,2 |
| HK28 | 5,40 ± 0,08 | 27,5 ± 0,6 | 3,7 ± 0,2 | 2,62 ± 0,1 |
| HK30 | 63,50 ± 0,57 | 34,1 ± 0,1 | 0,1 ± 0,2 | 2,35 ± 0,1 |
| HK31 | 56,80 ± 0,41 | 39,3 ± 0,1 | 9,4 ± 0,3 | 1,69 ± 0,1 |
| HK33 | 4,23 ± 0,01 | 33,6 ± 0,3 | 12,3 ± 0,2 | 1,90 ± 0,1 |
| HK41 | 5,06 ± 0,03 | 41,1 ± 0,1 | 10,1 ± 0,4 | 1,64 ± 0,2 |
| HK44 | 41,03 ± 0,06 | 46,3 ± 0,1 | 11,7 ± 0,1 | 3,23 ± 0,1 |
| HK45 | 58,89 ± 0,10 | 39,4 ± 0,5 | 12,3 ± 0,5 | 1,93 ± 0,2 |

*Los resultados son la media de tres determinaciones.

Los ácidos urónicos son los principales responsables del carácter aniónico de los

exopolisacáridos junto con los restos sulfato. La mayoría de los polímeros analizados presentan un alto contenido en ácidos urónicos en comparación con los polímeros de otras bacterias aisladas de medios hipersalinos y destaca la cepa HK7 que tiene un 13,96 % (p/p). Desde un punto de vista fisiológico, los ácidos urónicos juegan un papel importante ya que permiten la unión de la célula a superficies y la adsorción de diferentes compuestos. Debido a estas propiedades, algunos de los biopolímeros con alto contenido en ácidos urónicos son utilizados para la unión de metales pesados y otros compuestos tóxicos, así como en procesos de biodetoxicación y tratamiento de aguas residuales.^{35,36}

Por último, el contenido en restos acetilo de los exopolisacáridos microbianos analizados es muy variable y oscila entre 0,14 % (p/p) en la cepa HK30 y 13,77 % (p/p) en la cepa HK11 al igual que ocurre en otros polímeros bacterianos.⁷

Actividad emulgente

Una de las propiedades funcionales más importantes de los polímeros microbianos es su capacidad de estabilizar emulsiones. Esta actividad tiene interés en alimentación y en la industria farmacéutica, ya que estos polímeros pueden ser empleados como aditivos, y en su caso como excipientes.

En la Tabla 2 se representa el porcentaje de emulsión que originan las preparaciones acuosas al 0,5% (p/v) de los polímeros con mayor actividad emulgente y de los controles (xantano y Triton X-100) con diferentes preparaciones oleosas. En general, los EPSs presentaron menor actividad emulgente que los controles. Sin embargo, los polímeros producidos por las cepas HK10 y HK30, y sobre todo el de la bacteria HK15, tienen una mayor actividad emulgente que el Triton X-100 sobre algunos compuestos.

Algunos de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas descritas por nuestro grupo de investigación presentan también una mayor actividad emulgente sobre hidrocarburos puros (tetradecano, octano, keroseno o xileno) que los surfactantes químicos comerciales. En algunos casos, como el del polímero producido por *Salipiger mucosus*, la actividad es aún mejor que la del xantano. Curiosamente este EPS tiene un contenido en proteínas del 1,6% (p/p) que parece tener un efecto importante en la actividad emulgente;^{14,15} este hecho ya había sido observado antes en *Halomonas ventosae* cepa Al-12^T cuyo EPS tiene un 2,07% (p/p) de proteínas.¹² En el caso de los tres EPSs estudiados en este trabajo, sólo el de la cepa HK30 tiene proteínas en su composición, por lo que posiblemente éstas ejerzan un efecto sobre la actividad emulgente. Por su parte, el polímero de la cepa HK10 no tiene proteínas pero sí un alto contenido en grupos acetilo que quizás contribuya a su capacidad, tal y como sugiere³⁷ Ashtaputre y col. (1995) que sucede en el caso del polisacárido de *Sphingomonas paucimobilis*.

Capacidad viscosizante

Las aplicaciones industriales de los exopolisacáridos dependen en gran medida del comportamiento reológico de sus preparaciones acuosas. La capacidad viscosizante de los EPSs los hace interesantes en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y otras áreas como la industria del petróleo.³⁸

Las figuras siguientes representan el comportamiento reológico de las preparaciones acuosas al 1% (p/v) de los EPSs producidos por distintas cepas estudiadas. Los polímeros se han dividido en tres grupos (Figuras 1, 2 y 3) de acuerdo a la viscosidad de sus preparaciones y al esfuerzo de la cizalla aplicado.

Tabla 2. Actividad emulgente de las preparaciones acuosas al 0,5% (p/v) de los materiales exopolisacáridos

| Actividad emulgente* (%) | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------|---------|--------------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| Fase oleosa | Tiempo (horas) | HK1 | HK5 | HK6 | HK8 | HK9 | HK10 | HK11 | HK12 | HK13 | HK15 | HK30 | Controles | |
| | | Xantano | Triton X-100 | | | | | | | | | | | |
| Miristato isopropilo | 1 | 82,9 | 89 | 85 | 83,3 | 92,7 | 55,5 | 85 | 89,7 | 92,2 | 100 | 80 | 100 | 100 |
| | 24 | 48,8 | 80 | 45 | 57,1 | 51,2 | 38,8 | 57,5 | 58,9 | 57,5 | 70 | 62,5 | 90,3 | 67 |
| Aceite de oliva | 1 | 51,3 | 95 | 85 | 70,7 | 85 | 65,8 | 15,4 | 52,4 | 87,5 | 100 | 99 | 100 | 62,5 |
| | 24 | 58,9 | 70 | 35 | 48,7 | 57,5 | 50 | 7,7 | 45,2 | 55 | 78,9 | 85 | 100 | 60 |
| Aceite de girasol | 1 | 77,1 | 80 | 84,2 | 55 | 77,5 | 62,5 | 46,8 | 57,1 | 47,3 | 74,3 | 85 | 100 | 84,1 |
| | 24 | 40 | 57,5 | 52,6 | 40 | 67,5 | 52,5 | 31,2 | 51,1 | 47,3 | 68,6 | 70 | 100 | 65 |
| Diesel | 1 | 97,4 | 75 | 80 | 76,7 | 90 | 94,7 | 41,1 | 87,5 | 85 | 100 | 80 | 100 | 84,4 |
| | 24 | 58,9 | 60 | 37,5 | 39,53 | 52,5 | 84,2 | 2,5 | 57,5 | 60 | 81,6 | 65 | 87,5 | 62,5 |
| Octano | 1 | 77,5 | 85 | 32,5 | 78 | 80 | 52,6 | 59,5 | 76,2 | 70 | 81,1 | 70 | 100 | 74,4 |
| | 24 | 55 | 57,5 | 7,5 | 43,9 | 37,5 | 31,6 | 38,3 | 52,4 | 52,5 | 64,8 | 56,7 | 93,3 | 60 |
| Tetradecano | 1 | 97,5 | 82,5 | 75 | 67,5 | 73,8 | 80,9 | 68,3 | 63,4 | 87,8 | 88,8 | 50 | 100 | 72,1 |
| | 24 | 52,5 | 57,5 | 22,5 | 47,5 | 47,6 | 64,3 | 53,6 | 58,9 | 58,5 | 69,4 | 41 | 90,3 | 62,5 |

*Los resultados son la media de tres determinaciones e indican el porcentaje emulsionado de la mezcla agua-fase oleosa.

Figura 1. Comportamiento reológico de las preparaciones acuosas al 1% (p/v) del polímero de la cepa HK30.

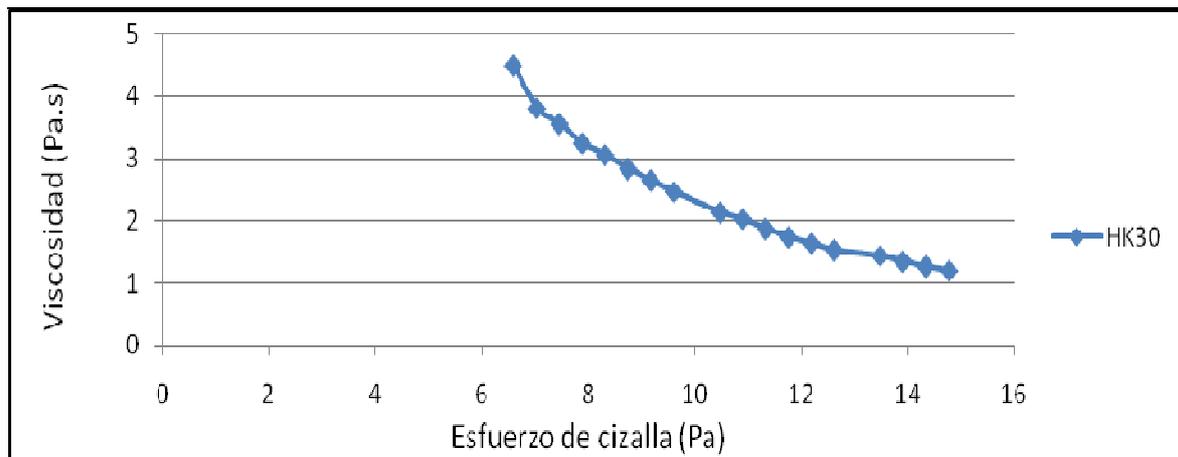


Figura 2. Comportamiento reológico de las preparaciones acuosas al 1% (p/v) del polímero de las cepas HK1, HK4, HK5, HK6, HK9, HK10, HK11, HK12, HK13, HK14 y HK15.

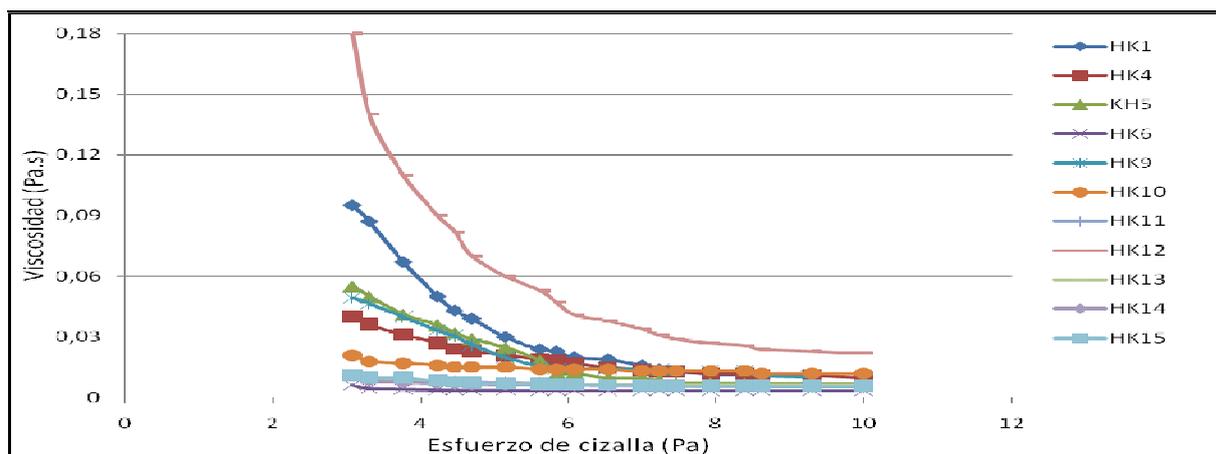
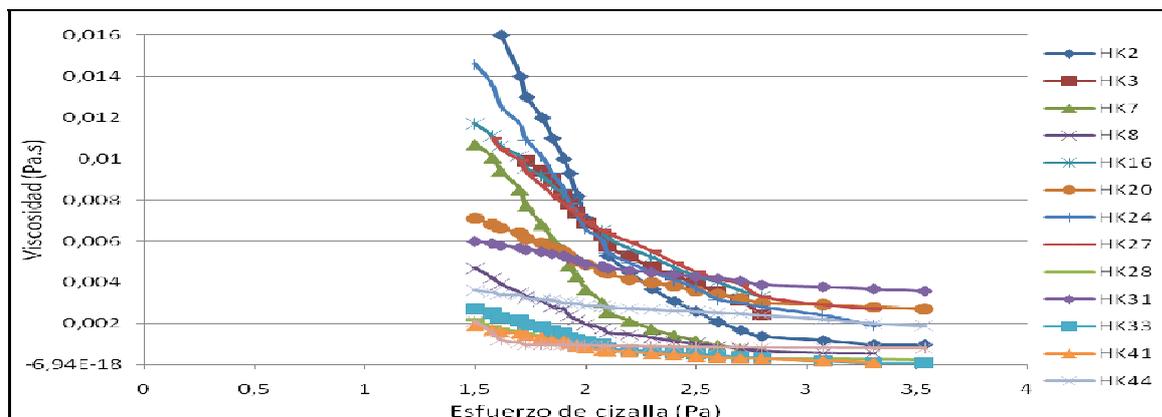


Figura 3. Comportamiento reológico de las preparaciones acuosas al 1% (p/v) del polímero de las cepas HK2, HK3, HK7, HK8, HK16, HK20, HK24, HK27, HK28, HK31, HK33, HK41 y HK44.



Como reflejan las tres figuras, el polímero producido por la cepa HK30 destacó entre el resto de los exopolisacáridos ensayados por presentar una mayor capacidad viscosizante, seguida del polímero de la cepa HK12. En todos los casos, y al igual que ocurre en otros muchos EPSs bacterianos, las soluciones acuosas mostraron un comportamiento pseudoplástico, es decir, se produjo una disminución de la viscosidad conforme aumenta el esfuerzo de cizalla.

CONCLUSIÓN

El estudio realizado sobre 120 cepas aisladas de diferentes ambientes hipersalinos nos ha permitido seleccionar la cepa HK30, perteneciente a la especie *Halomonas nitroreducens*, por ser la mejor productora de exopolisacárido. El polímero destaca entre el resto de los EPSs estudiados por sus altos valores de viscosidad y una actividad emulgente que es superior en algunos casos a la de los surfactantes comerciales, propiedades que le permiten ser un excelente candidato para la industria farmacéutica como viscosizante y estabilizador de emulsiones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por los Proyectos de Investigación CGL 2005-05947 y CGL2008-02399/BOS concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia y el proyecto P06-CVI-01850 de la Conserjería de Educación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía. Hakima Amjres disfruta de una beca predoctoral de la Fundación L'ORÉAL y UNESCO (Paris, France) y otra de Centro Nacional de Investigación Científica y Técnica de Marruecos (CNRST).

BIBLIOGRAFÍA

1. Mellado, E. y Ventosa, A. (2003). Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. En J. L. Barredo (ed.), *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*, pp. 233-256. Research Signpost: Kerala.
 2. Ventosa, A. (2004) (Ed.) *Halophilic Microorganisms*. Springer-Verlag: Heidelberg.
 3. Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environment. En: *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance*, N.A. Logam, H.M. Lappin-Scott & P.C.F. Oyston (eds). pp. 223-253. Cambridge University Press: Cambridge.
 4. Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C. y Márquez, M. C. (2008). Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. En: *Microbiology of Extreme Soils*. P. Dion & C.S. Nautiyal (eds.) pp. 87-115. New York: Springer.
 5. Sutherland, I. W. (1998). Bacterial surface polysaccharide: structure and function. *Int Rev Cytol* 113, 187-231.
 6. Chen, J. H., Lion, L. W., Ghiorse, W. C. y Shuler, M. L. (1995). Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water. Res* 29, 421-430.
 7. Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. y Quesada, E. (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J. Biotechnol.* 61, 135-141.
 8. Calvo, C., Ferrer, M. R., Martínez-Checa, F., Béjar, V. y Quesada, E. (1995). Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 45-54.
 9. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Béjar, V. y Quesada, E. (1998). Effect of cations, pH and sulphate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 205-209.
 10. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. y Quesada, E. (2002). Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 347-351.
 11. Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M. R., Tallon, R., Quesada, E. y 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.
 12. Mata, J. A., Bejar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C. y Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res. Microbiol.* 157, 827-835
 13. Mata, J. A., Bejar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C., Quesada, E. y Llamas, I. (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. *J. Appl. Microbiol.* 105, 521-528.
 14. Llamas, I., Mata, J. A., Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C., Quesada, E. y Béjar, V. (2010). Caracterización de un polisacárido exopolisacárido producido por *Salipiger mucosus* A3T, una bacteria halofílica Alphaproteobacteria aislada en el Mar Mediterráneo español. *Marine Drugs* 8, (10.3390) en prensa.
 15. Llamas, I., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Martínez-Canovas, M. J., Molina, I. y Quesada, E. (2010). *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (en prensa)
 16. Ruiz-Ruiz, M. C., Srivastava, G. K., Carranza, D., Mata, J. A., Llamas, I., Santamaría, M., Quesada, E. y Molina, I. J. (2010). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (en prensa)
 17. Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbiol. Ecol.* 7, 235-243.
 18. Moraine, R. A. y Rogovin, P. (1966). Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation.
-

-
- Biotechnol. Bioengin. 8, 511-524.
19. Quesada, E., Béjar, V. y Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49, 1037-1041.
 20. Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-355.
 21. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 22. Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
 23. McComb, E. A. y Mcready, R. M. (1957). Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction. *Anal. Chem.* 29, 819-821.
 24. Cooper, D. y Goldenberg, G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 224-229.
 25. Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. y Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261.
 26. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
 27. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, K., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997). The ClustalX window interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 4876-4882.
 28. Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. y Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2302-2310.
 29. Bouchotroch, S., Quesada, E., Izquierdo, I., Rodríguez, M. y 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.
 30. Fett, W. F., Wells, J. M., Cescutti, P. Y Wijey, C. (1995). Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent *Pseudomonas* associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 513-517.
 31. Pidoux, M., Marshall, V. M., Zanoni, P. y Brooker, B. (1990). Lactobacilli isolated from sugary kefir frains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 311-317.
 32. Kaplan, N., Zosin, Z. y Rosenberg, E. (1987). Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 440-446.
 33. Ghai, S. K., Hisamatsu, M., Amekura, A. y Harada, T. (1981). Production and Chemicals composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 122,33-40.
 34. Bailey, S. A. y Ward, B. (1997). Emulsification of crude oil by *Rhodococcus erythropolis* strain St-2 via a cell-surface, lysozyme-sensitive glycoprotein. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 545-548.
 35. de Philipps, R. y Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible application. *FEMS Microbiol Rev* 22, 151-175.
 36. Sutherland, I. W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12, 393-448.
 37. Ashtaputre, A. A. y Shah, A. K. (1995). Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J. Microb. Biot.* 11, 219-222/
 38. Sutherland, I. W. (1990). Biotechnology of microbial exopolysaccharides. En: *Cambridge Studies in Biotechnology*. Baddiley, J., Carey, N. H., Higgins I. J. y Pitter, W. G. (eds). Vol. 9. Cambridge University Press. Cambridge.
-