

# Estudio de aplicabilidad como aditivo alimentario de un nuevo exopolisacárido obtenido de *Paenibacillus jamilae*

*Study of the use of a new exopolysaccharide obtained from Paenibacillus jamilae in food additives*

GARCÍA RIBERA, R.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. Granada. 18071. España. E-mail: rafaelgr@ugr.es

## RESUMEN

*Paenibacillus jamilae* es una nueva especie bacteriana formadora de esporas, recientemente descrita por nuestro grupo de investigación y aislada a partir de una muestra de compost de maíz tratado con alpechín. *P. jamilae* es capaz de producir un nuevo exopolisacárido (EPS) en medio con sacarosa como única fuente de carbono. Este nuevo EPS ofrece algunas características reológicas de interés. La suspensión de este EPS en leche entera al 1% (p/V) presentó una viscosidad 5.7 veces mayor a la ofrecida en agua destilada a la misma concentración y mostró un claro carácter pseudoplástico. El gel formado con carragenanos, polímeros muy utilizados en la industria alimentaria, presentó buenas características en su aplicación como posible aditivo alimentario por una menor pérdida de agua. PALABRAS CLAVE: Exopolisacáridos. Polímeros. Industria alimentaria. *Paenibacillus*.

## ABSTRACT

*Paenibacillus jamilae* is an endospore-forming strain isolated from corn-compost treated with olive-mill wastewater ("alpechín"). This strain has been recently described by our research group. A new exopolysaccharide (EPS) was produced from *Paenibacillus jamilae* when grown in a medium containing sucrose as a sole carbon source. This EPS presents interesting rheological properties. The suspension of this EPS in milk at 1% (p/V) showed an interesting viscosity and a pseudoplastic behaviour. The gel formed with carrageenan, polymer used in the food industry, revealed good characteristics for its use as a possible food additive due to its lower water loss.

KEY WORDS: Exopolysaccharides. Polymers. Food industry. *Paenibacillus*.

## INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos bacterianos (EPS) son biopolímeros constituidos fundamentalmente por unidades glucídicas, producidos por diversos microorganismos y localizados en el exterior de la célula microbiana.

Dentro del potencial biotecnológico de estos polímeros se encuentra su uso como espesantes y gelificantes por su propiedad de formar líquidos espesos con el agua, la leche o cualquier

## INTRODUCTION

The bacterial exopolysaccharides (EPS) are biopolymers that are fundamentally composed of glucidic units produced by several microorganisms localized on the exterior of the microbial cell.

Part of the bio-technological potential of these polymers is to be found in their use as thickeners and gellers due to their capacity to form thick liquids with water, milk or any foodstuff

alimento que contenga agua. Se agrupan así dentro de los denominados hidrocoloides.

La búsqueda de nuevos aditivos naturales es continua; las investigaciones más recientes se han centrado en el estudio de la obtención de aditivos por medio de la Biotecnología (células vegetales y cultivos de tejidos, tecnología enzimática, obtención de aditivos por medio de microorganismos, tecnología de manipulación genética,...). Este campo requiere una mayor investigación encaminada a la mejora de estas nuevas técnicas para que puedan competir con la síntesis química (Informe de vigilancia tecnológica elaborado por el Instituto Tecnológico, Pesquero y Alimentario (1)).

En trabajos previos nuestro grupo de investigación seleccionó distintas cepas bacterianas, con aspecto claramente mucoso, que fueron aisladas de distintas muestras de compost. Además, algunas cepas fueron capaces de formar polímeros de tipo exopolisacárido en su desarrollo en medios adicionados con alpechín como única fuente de carbono y energía (2). Fruto de nuestro trabajo ha sido la reciente descripción de la especie y *Paenibacillus jamilae* (3).

Por otro lado nuestras investigaciones han demostrado que el nuevo exopolisacárido BP-7 ("jamilano"), producido por *Paenibacillus jamilae*, tiene gran interés por sus propiedades fisicoquímicas (4).

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de algunas propiedades reológicas del exopolisacárido "jamilano" con vista a una posible aplicación en industria alimentaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa utilizada fue *Paenibacillus jamilae* CECT 5266, conservada por resiembras sucesivas en medio YM-agar,(Difco).

El medio de producción de exopolisacárido, a partir de sacarosa al 2% (p/V), se desarrolló siguiendo los parámetros establecidos en bibliografía (5).

La obtención del exopolisacárido se llevo a cabo usando 1L de medio de cultivo en fermentador de tanque agitado BIOSTAT B (Braun-Biotech, Melsungen AG, Alemania) de 2 L de capacidad con camisa para baño termostático, según las condiciones de cultivo de pH 7, temperatura de 30°C y agitación de 250 rpm. La

containing water. It is possible therefore to classify these polymers within the so called hydrocolloid group.

The search for new natural additives is continuous. The most recent research has been focussed on obtaining additives through biotechnological means (vegetable cell and tissue culture, enzymatic technology, additives obtained from micro-organisms, genetic manipulation technology, etc.). However, this field requires further research directed towards the improvement of these new techniques to be able to compete effectively with chemical synthetic methods, (as stated in the technological surveillance report produced by the Institute for Technology, Fisheries and Foodstuffs (1)).

In previous work our research group selected different bacterial strains with a clearly mucous type appearance, that had been isolated from different compost samples. Additionally, some of the strains had the capability of being able to form exopolysaccharide type polymers during their development in media where olive-mill waste water had been added as the sole source of carbon and energy. The fruit of this work has been the recent description of the *Paenibacillus jamilae* specie(3).

On the other hand our research has demonstrated that the new exopolysaccharide BP-7 ("Jamilano"), produced by *Paenibacillus jamilae*, may be considered as being of great interest due to its physicochemical properties (4).

The objective of the present work was to evaluate some of the rheological properties of the exopolysaccharide "jamilano" with a possible application within the food industry.

## MATERIALS AND METHODS

The strain used was *Paenibacillus jamilae* CECT 5266, preserved through successive subcultures in YM-agar media,(Difco).

The exopolysaccharide production medium from sucrose at 2% (p/V), was developed following the parameters established in the bibliography (5).

In order to obtain the exopolysaccharide, 1L of culture medium was introduced in a BIOSTAT B fermentor of 2L capacity (Braun-Biotech, Melsungen AG, Germany) equipped with thermostate jacket and stirrer system, to accom-

formación de espuma se controló con la adición de 1 mL de propilenglicol P2000 al medio de cultivo. Se suministró aire al cultivo con una bomba y a través de una membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). La unidad de fermentación se esterilizó en autoclave a 112°C durante 30 minutos con el medio de producción. Finalmente se añadió como inóculo 5mL de un cultivo de 12 horas en YM-Broth (Difco), manteniéndose el proceso de fermentación durante 72 horas.

Para la determinación de la biomasa y la extracción del EPS, el cultivo se diluyó añadiendo igual volumen de agua y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos para retirar las células, el precipitado se lavó con agua destilada en sucesivas centrifugaciones a 7000 rpm durante 20 minutos, determinándose el peso seco celular tras liofilización del pellet resultante. El EPS se extrajo del sobrenadante libre de células, al cual se le añadió un 2% de NaCl y se precipitó con la adición de 2 volúmenes de etanol a -20°C, dejándolo en reposo toda la noche. Después, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos; el precipitado se dejó secar y, tras resuspender en agua destilada, se dializó durante 48 horas. Finalmente se liofilizó. El mantenimiento de las condiciones de cultivo, especialmente el pH, se realiza para obtener un producto estable, ya que si se cambian las condiciones de cultivo no suele variar la estructura glucídica sino los sustituyentes no hidrocarbonados del polímero (<sup>6</sup>).

La medida de viscosidad en cP se llevó a cabo con un viscosímetro Brookfield LVTDV-II usando un husillo SC4-18 y el adaptador para pequeñas muestras 13R. Con estas características, la velocidad de cizalla, expresada en 1/s, se calculó a través de la fórmula 1.32N, siendo N las rpm prefijadas en el aparato.

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<sup>-1</sup>) 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 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 (<sup>7</sup>).

plish the culturing conditions at pH 7, temperature at 30°C and stirring at 250 rpm. The formation of foam was controlled by adding 1mL of propylenglycol P2000 to the culture medium. Air was supplied to the culture by means of air pump applied through a filtering membrane with a pore diameter of 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore). The unit of fermentation was sterilized in autoclave sterilizer at 112°C for 30 minutes with the production medium. Finally, 5mL of 12 hour culture in YM-Broth (Difco), was added as inoculum and the process of fermentation was maintained for 72 hours.

Bio-mass and EPS extraction was determined by diluting the culture in an equal volume of water which was subsequently centrifuged at 9000 rpm for 30 minutes in order to remove the cells. The precipitate was washed with distilled water in successive centrifugation at 7000 rpm for 20 minutes. Cellular dry weight was determined following the lyophilization of the resulting pellet. The EPS was extracted from the cell free supernatant added 2% of NaCl. Precipitation was induced through the addition of 2 volumes of ethanol at -20°C left overnight. Subsequently, the precipitate was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and left to dry. After re-suspension in distilled water the suspension was dialysed for 48 hours. Finally, a process of lyophilization was carried out. The maintenance of constant culture conditions, specially pH, was able to obtain a stable product, given that if culture conditions change, it is not the glucidic structures that vary but the non-hydrocarbonates substitutes of the polymer that change (<sup>6</sup>).

The measurement of viscosity in cP was carried out with a Brookfield LVTDV-II viscosimeter using a SC4-18 spindle and a 13R adapter suitable for small samples. With such characteristics, shear rate, expressed in 1/s, was calculated by means of the 1.32N formula, where N represents the pre-determined rpm values set on the apparatus.

The behaviour of the exopolysaccharide was studied in different solvents such as; distilled water, whole milk and skimmed milk in solutions containing EPS at 1% (p/V) and viscosity measurements were carried out at 30 rpm (39.6 s<sup>-1</sup>) at a temperature of 25°C. Subsequently, a scan of shear rate with whole milk was carried out together with EPS solutions at 1% (p/V) in skimmed milk and whole milk. It is important

En el estudio de las propiedades de sinergismo con otros polímeros (carragenanos) y de gelificación, se observó la actuación del EPS en mezclas con distintas proporciones de dichos polímeros, adicionados de un 5% de glucosa para favorecer la solubilidad de la mezcla. Además, se usó el xantano en mezcla patrón comparativa. Se realizó una solución acuosa de la mezcla al 1% (p/V) y se estudiaron los parámetros de color, solubilidad, pH, viscosidad (spindle nº3, 60 rpm) y gelificación (80°C-10min.) de las distintas mezclas. También se observaron las características de los geles resultantes: transparencia, dureza y sinéresis (pérdida de agua).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El exopolisacárido "jamilano" fue obtenido de *Paenibacillus jamilae* en un medio de cultivo con alta proporción C/N, característico de medios productores de EPS, cuya fuente hidrocarbonada fue la sacarosa. En la actualidad se está llevando a cabo estudios para mejorar la producción de polímero, así como la caracterización química del mismo, composición cualitativa y cuantitativa.

Los estudios de viscosidad realizados en sistemas alimentarios 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 1).

to specify the proportion used given that the rheological behaviour of the polymer depends upon the concentration used in the study (7).

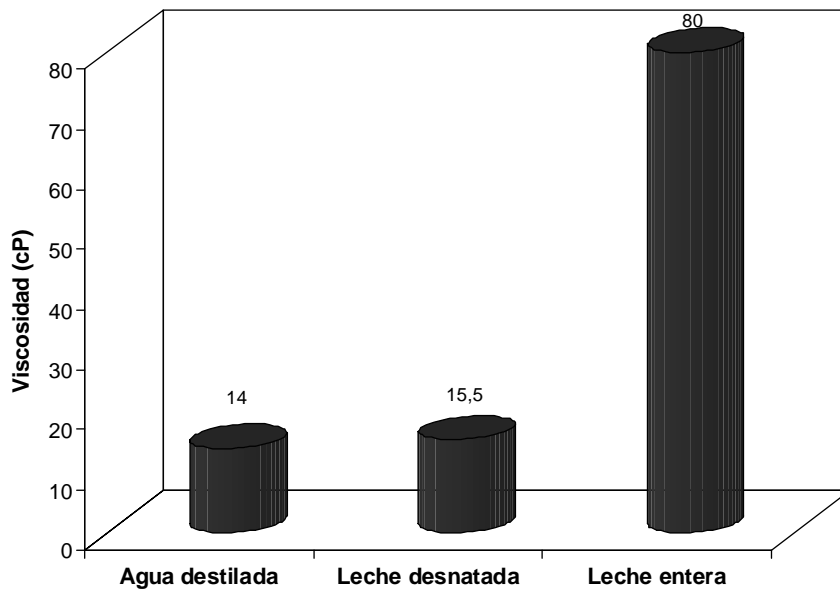
In the study of synergism properties with other polymers (carrageenans) and in the study of gelling properties, the effect of EPS in mixtures with different proportions of such polymers together with 5% of added glucose to facilitate the solubility of the mixture, was observed. Additionally, xanthan was used as comparative standard control. An aqueous solution of the mixture at 1% (p/V) was produced where parameters such as colour, solubility, pH, viscosity (spindle nº3, 60 rpm) were studied together with gelling properties (80°C -10mins.) of the different mixtures. Furthermore, the characteristics of the resulting gels were analysed for transparency, hardness and syneresis (water loss).

## RESULTS AND DISCUSSION

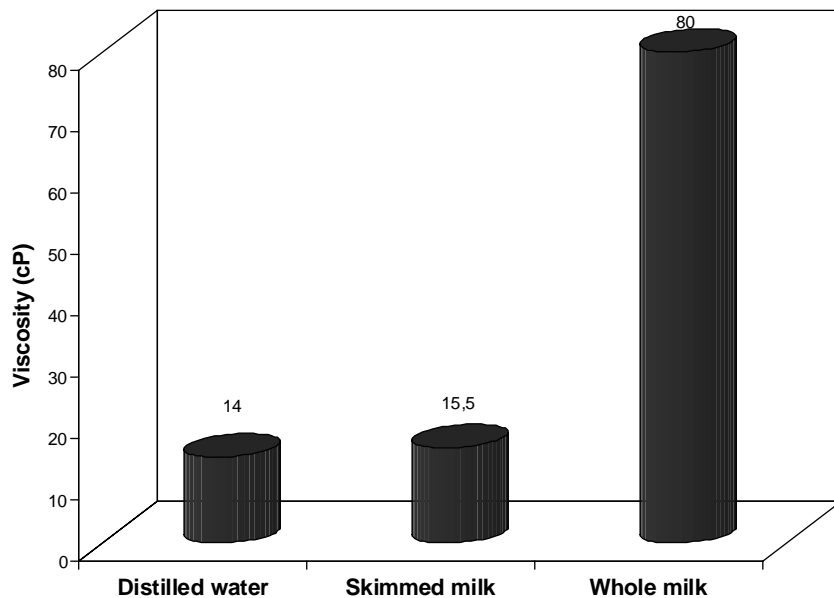
The exopolysaccharide "jamilano" was obtained from *Paenibacillus jamilae* in a culture medium with a high proportion of C/N, being characteristic of EPS productive media, whose source of hydrocarbonate was sucrose. Studies aimed at improving the production process of the polymer are currently being carried out, as well as analyses of its chemical characterisation, and qualitative and quantitative composition

The viscosity studies carried out in foodstuffs, such as skimmed and whole milk, have revealed a positive effect with regard to viscosity in EPS suspensions at 1% (p/V) in whole milk (figure 1).

**FIGURA I.** Viscosidad de las dispersiones del EPS "jamilano" 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  $39.6 \text{ s}^{-1}$  y temperatura de  $25^\circ\text{C}$ ).



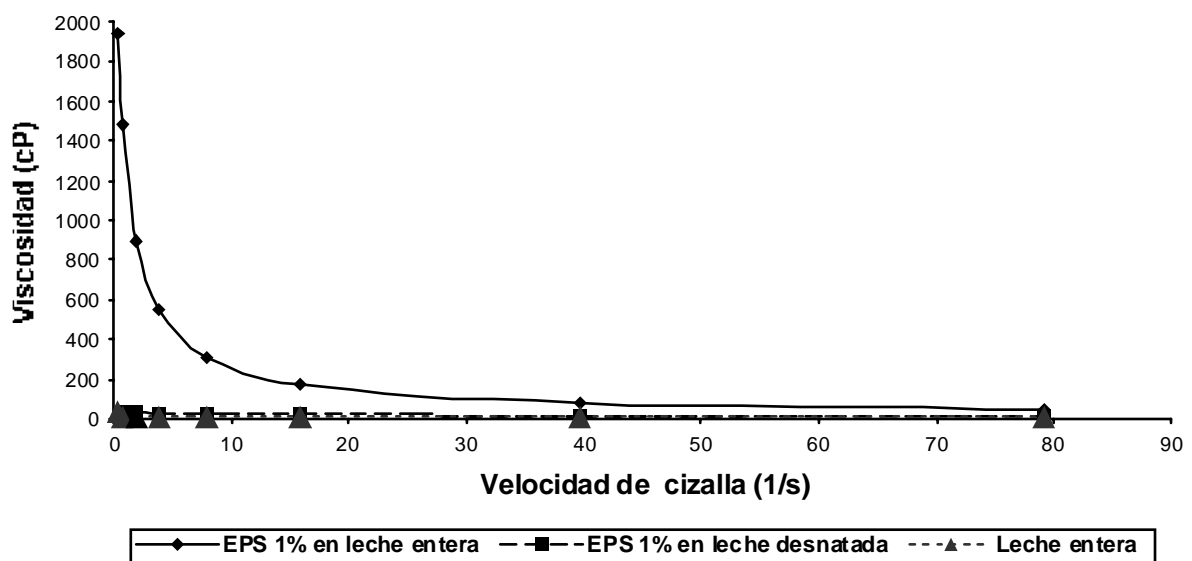
**FIGURE I.** Viscosity of EPS "jamilano" dispersions at 1% (p/V) in distilled water, skimmed milk and whole milk. (Viscosity measurements were carried out in a Brookfield LVTDV-II using an SC4-18 screw and a 13R adapter suitable for small samples, at a shear rate of  $39.6 \text{ s}^{-1}$  and a temperature of  $25^\circ\text{C}$ ).



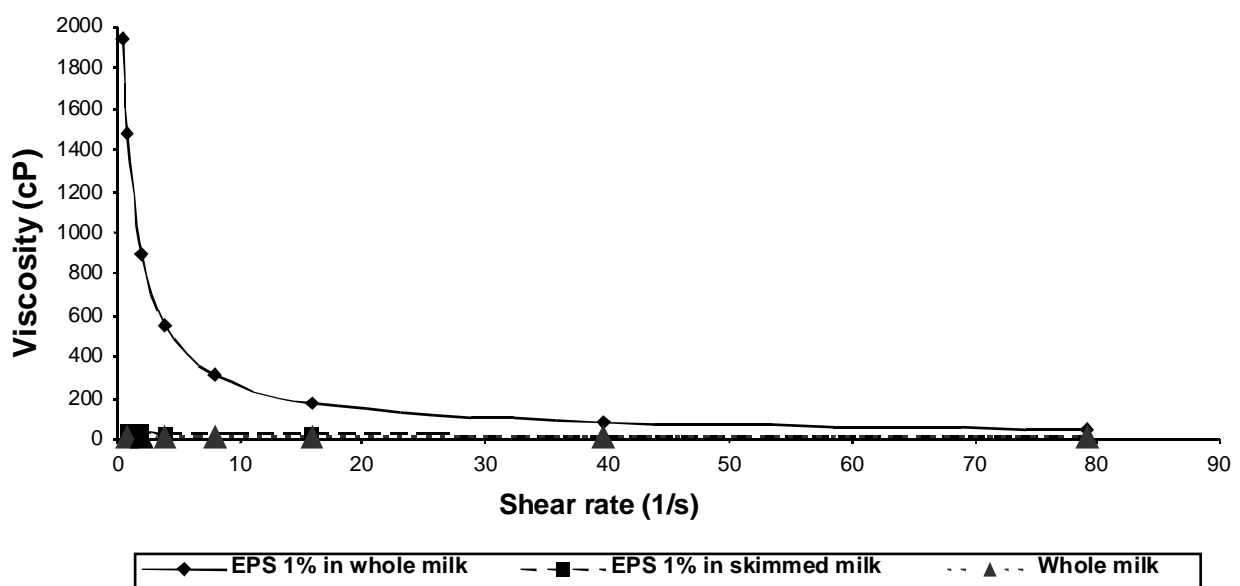
Además, podemos ver el carácter pseudoplástico de esta suspensión por la disminución de la viscosidad al aumentar la velocidad de cizalla (figura 2). Por todo ello, creemos tener una importante vía de investigación en la aplicación de nuestro EPS en productos lácteos.

Furthermore, the pseudo-plastic character of this suspension may be observed due to the fact that a decrease of viscosity is produced when the shear rate is increased (figure 2). After having taken all of these findings into account, we believe that we have laid the foundations for a new area of research directed towards the application of our EPS in dairy products.

**FIGURA II.** Comportamiento pseudoplástico de la disolución del EPS “jamilano” en leche entera al 1% (p/V) frente al comportamiento del EPS en leche desnatada y solamente leche entera. (Medidas de viscosidad realizadas en un Brookfield LVTDV-II usando un husillo SC4-18 y el adaptador para pequeñas muestras 13R; variando la velocidad de cizalla a tiempos constantes y temperatura termostatzada de 25°C).



**FIGURE II.** Pseudo-plastic behaviour of the dissolution of EPS “jamilano” in whole milk at 1% (p/V) compared with EPS skimmed milk and pure whole milk without additives. (Viscosity measurements carried out in a Brookfield LVTDV-II using an SC4-18 screw and a 13R adapter suitable for small samples; with variations of guillotine velocities at constant times and a thermostat temperature of 25°C).



Las pruebas de sinergismo con los carragenanos, polímeros utilizados ampliamente en la industria alimentaria, dan información de interés en lo que respecta a las propiedades del gel obtenido. Este gel, con un 25% de jambilano da un mejor resultado por una menor sinéresis (pérdida de agua) y buenas características de dureza y transparencia si lo comparamos con los otros geles estudiados (tabla 1). Además, nuestro gel procede de una suspensión con una menor viscosidad, lo que parece una ventaja a la hora de la manipulación de la suspensión previa al proceso de gelificación.

Actualmente se han comenzado a llevar a cabo las aplicaciones en distintos sistemas alimentarios en colaboración con la empresa granadina DOMCA S. A. a través del convenio existente con nuestro grupo de investigación.

Synergy tests with carrageenans, widely used polymers in the food industry, have given interesting information with regard to the properties of the gel obtained. In comparison with the other gels studied (table 1), this gel, containing 25% of jambilano, produces better results due to lower syneresis (water loss) and good hardness and transparency characteristics. Moreover, our gel is obtained from a suspension of lower viscosity which appears to be an advantage when handling the suspension before the gelling process.

Applications within different food production processes, in collaboration with the Granada company DOMCA S.A., are currently being carried out through an agreement with this research group.

**TABLA I.** Propiedades fisicoquímicas de las mezclas del exopolisacárido de *Paenibacillus jamilae* (jamilano) con carragenanos a distintas proporciones y de la mezcla de xantano (patrón) con carragenanos; características físicas de los geles obtenidos a partir de estas mezclas .

Mezcla (1% p/V)	Solubilidad	pH	Viscosidad	Gelificación	Gel de Color	Dureza	Transparencia	Sinéresis
<b>Carragenano 95% glucosa 5%</b>	++ <sup>a</sup>	8.47	235 cP	Positiva	Gris	+++	+++	Alta
<b>Jamilano 25% Carragenano 70% glucosa 5%</b>	+	8.30	114 cP	Positiva	Gris	++	++	Media
<b>Jamilano 50% Carragenano 45% glucosa 5%</b>	++	7.98	18 cP	Negativa	-	-	-	-
<b>Jamilano 75% Carragenano 20% glucosa 5%</b>	+++	7.6	14 cP	Negativa	-	-	-	-
<b>Jamilano 95% glucosa 5%</b>	+++	6.94	12.0 cP	Negativo	-	-	-	-
<b>Xantano 25% Carragenano 70% glucosa 5%</b>	+	7.40	484 cP	Positiva	Crema	+	+	Alta

<sup>a</sup> +: Valor bajo; ++: Valor medio; +++: Valor alto.

**TABLE I.** Physicochemical properties of the exopolysaccharide mixtures of *Paenibacillus jamilae* (jamilano) with carrageenans at different proportions and of the Xanthan mixture (control) with carrageenans. The physical characteristics of the gels obtained from these mixtures.

Mixture (1% p/V)	Solubility	pH	Viscosity	Gelling	Gel Colour	Hardness	Transparency	Syneresis
<b>Carrageenan 95% glucose 5%</b>	++ <sup>a</sup>	8.47	235 cP	Positive	Grey	+++	+++	High
<b>Jamilano 25% Carrageenan 70% glucose 5%</b>	+	8.30	114 cP	Positive	Grey	++	++	Medium
<b>Jamilano 50% Carrageenan 45% glucose 5%</b>	++	7.98	18 cP	Negative	-	-	-	-
<b>Jamilano 75% Carrageenan 20% glucose 5%</b>	+++	7.6	14 cP	Negative	-	-	-	-
<b>Jamilano 95% glucose 5%</b>	+++	6.94	12.0 cP	Negative	-	-	-	-
<b>Xanthan 25% Carrageenan 70% glucose 5%</b>	+	7.40	484 cP	Positive	Cream	+	+	High

<sup>a</sup> +: Low value ++ Medium value +++ High value.

## CONCLUSIONES

1- Dentro del estudio reológico del exopolisacárido obtenido de *Paenibacillus jamilae* se ha determinado un aumento importante de la viscosidad en su disolución al 1% (p/V) en leche entera, comparado con la producida en agua destilada a la misma concentración. Además, esta suspensión tiene un carácter claramente pseudoplástico. Por todo ello, pensamos que puede tener una aplicación de interés en su aplicación sobre productos lácteos.

2- En el estudio de sinergismo con carragenanos, polímeros utilizados ampliamente en la industria alimentaria, el jamilano ofrece unas buenas características al gel formado en cuanto a una menor pérdida de agua, lo que es un factor esencial para la aplicación en determinados productos alimentarios.

## CONCLUSIONS

1- The results of the rheological study of the exopolysaccharide obtained from *Paenibacillus jamilae* have determined that a high increase in viscosity in solutions at 1% (p/V) in whole milk may be achieved in comparison with that produced in distilled water at the same concentration. Furthermore, this suspension presents a clearly pseudo-plastic character. Therefore, we believe that it is of interest for applications in dairy products.

In synergy studies with carrageenans, polymers that are widely used in the food industry, Jamilano presents good gelling characteristics with regard to lower water loss. Such a property is an essential factor for its use in determined food products.



## AGRADECIMIENTOS

La investigación fue llevada a cabo gracias al Ministerio de Ciencia y Tecnología, España (proyectos OLI96-2189 y REN2000-1502).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out thanks to the Ministry of Science and Technology, Spain (projects OLI96-2189 & REN2000-1502).

## BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Informe de Vigilancia Tecnológica en el Sector de Aditivos: Aditivos naturales.(1998) AZTI & AINIA.
2. Ramos-Cormenzana A., Guerra V. y Monteoliva-Sánchez M. (1997). Production of microbial polysaccharides in waste water from olive oil mills. International Symposium on Environmental Biotechnology. Oostende. Belgium.
3. Aguilera M., Monteoliva-Sánchez M., Suárez A., Guerra V., Lizama C., Bennasar A. y Ramos-Cormenzana A. (2001). *Paenibacillus jamilae* sp. Nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1687-1692.
4. Guerra V., Monteoliva-Sánchez M., Aguilera M. y Ramos-Cormenzana A. (1999). Propiedades fisicoquímicas de un nuevo EPS producido por *Paenibacillus jamilae* sp. nov. a partir de alpechín. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Granada (España).
5. Sutherland I. W. (1983). Extracellular polysaccharides. Biotechnology (Ed. H. J. Rehm and G. Reed). **3**:531-574. Verlag Chemie. Weinheim.
6. Whitfield C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. Can. J. Microbiol. **34**: 415-420.
7. Glasser W. G. y Hatakeyama H. (1992). Viscoelasticity of biomaterials. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC 1992.