

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología



**“Caracterización de los exopolisacáridos producidos
por microorganismos halófilos pertenecientes a los
géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*,
Palleronia y *Salipiger*”**

Juan Antonio Mata Gómez
Tesis Doctoral, 2006

**Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología**

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia
D. Juan Antonio Mata Gómez para aspirar al grado de Doctor

Granada, 2006

VºBº Los directores

Fdo. Dra. Emilia Quesada Arroquia
Catedrática de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. Dra. Victoria Béjar Luque
Profesora Titular de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. Inmaculada Llamas Company
Doctora contratada
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

El Doctorando

Fdo. Juan Antonio Mata Gómez

Esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por las ayudas del Plan Nacional de Biotecnología:

Título: **“Taxonomía polifásica de bacterias halófilas productoras de exopolisacáridos”**

Investigador principal: Victoria Béjar Luque

Entidad financiadora: CICYT; BOS2000-1519.

Así mismo, durante la realización de la Tesis Doctoral, el doctorando ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador otorgada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones

Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M., Quesada, E. Characterisation of exopolysaccharides produced by the halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. Res. Microbiol. En prensa.

Comunicaciones a congresos

Martínez-Checa, F., Béjar, V., Llamas, I., **Mata, J.A.**, Quesada, E. Saline habitats provide a source of bacteria which produce new exopolysaccharides. Biomicroworld. Badajoz 2005.

Mata, J.A., Quesada, E., Molina, I. Actividad antiproliferativa sobre células T de EPS sulfatados producidos por microorganismos halófilos moderados. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Córdoba 2005.

Béjar, V., **Mata, J.A.**, Llamas, I., Quesada, E. Characterization of fucose-rich polysaccharides produced by three halophilic bacteria. FEMS 2006. 2nd Congress of European Microbiologist. Madrid 2006.

AGRADECIMIENTOS

Una vez llegados a este punto, no puedo más que dedicar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han permitido llegar hasta aquí, a toda la buena gente que me ha rodeado durante estos años, a todos los que me hacéis sentir afortunado y feliz.

En primer lugar, quiero dar gracias a mis directoras de Tesis, la Dra. Emilia Quesada, la Dra. Victoria Béjar y la Dra. Inmaculada Llamas, por todo el tiempo que han invertido en mí, por todo el esfuerzo que han dedicado a este trabajo. Emilia y Victoria, sois dos personas excepcionales, científica y personalmente hablando; gracias por vuestra comprensión todos estos años, parafraseando a mi amigo Páez, este trabajo ha salido adelante gracias a vosotras y a pesar de mí. Inma, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí en los últimos meses; sin tu aliento y sin tus conocimientos todo habría sido un poco más complicado. Mil gracias, de corazón. Eres una máquina, y tendrás pronto tu recompensa, seguro; yo estaré allí para celebrarlo contigo.

A mis otras “jefas”, la Dra. Ana del Moral y la Dra. Marita Ferrer; cada una a vuestra manera, con vuestro propio estilo, habéis sido un ejemplo para mí.

Continuando el repaso mental al Departamento, llego al laboratorio de Exopolisacáridos Microbianos, lleno de gente maravillosa que, por supuesto, no son sólo compañeros de trabajo, son amigos, y de los buenos. Gracias a Fernando, por facilitarme siempre que lo he necesitado las cosas...con la informática, con la Taxonomía, con el coche...Ánimo, en poco tiempo alcanzarás tus objetivos, ya verás; espero que pronto Elenita tenga un hermanito...A Carmen María, futura Ministra; no dejes la Tesis (je, je), que falta muy poco, sin darte cuenta en breve te verás en estos menesteres, no hay duda. Mientras sigue disfrutando de la Taxonomía, de las visitas fuera de horario, del wok, de tus salidas los Jueves...has sido una gran compi de labo, hemos pasado muy buenos momentos juntos, así que gracias por todo, eres un primor.

No puedo olvidarme de todos los que estuvieron en el laboratorio, y me precedieron en el duro paso de asomar la cabeza en el mundo real una vez terminada la Tesis; a Samir, mi primer jefe; gracias por tus consejos, espero que nos sigas visitando de vez en cuando. A María José, nuestra murcianica, que me acogió como pupilo durante la Tesina, compartimos mucho durante esas horas en las que poníamos tapones de algodón a los tubitos, gracias por recibirme en todo momento con una sonrisa. A Paquita,

siempre hemos tenido un feeling especial, gracias por todo tu apoyo desde el Instituto del Agua. A Cristina, con la que también sufrí los rigores de las pruebas fenotípicas, y a Montse, que continúa su vocación genética en Sevilla. Un recuerdo especial para los que habéis abandonado el nido más recientemente; muchas gracias a Yolanda, con la que tanto he compartido y con la que tanto me he reído, suerte también en tu etapa de reencuentro con el estudio, pronto mis impuestos financiarán una nueva funcionaria; espero visitar pronto Antequera...como dirían en Un, Dos, Tres, tarjetita por aquí, hasta ahí puedo leer...Mil gracias a Rafa Páez, "polisacarídico" como un servidor, compañero de conciertos de música Indie, y que también parece que se ha apuntado a la moda de cobrar del Estado...siempre supe que eras un tío listo...Insisto, mil gracias por todo, suerte en tu inminente matrimonio. Mi más sincero agradecimiento a Sole, mi "comae"; podría escribir páginas y páginas recordando mil detalles, tanto profesionales como personales, pero aguantaré la tentación; sólo gracias por estar ahí, bien sabes todo lo que te debo, no hace falta dejarlo patente por escrito; no te preocupes que de vez en cuando me presentaré en Bordeaux para visitarte, no te librarás de mí tan fácilmente...el 23 de Septiembre disfrutaré como un enano viéndote feliz en San Pedro...

Gracias también a todos los que han formado parte de nuestro grupo: Juan Ignacio, María José Sánchez, Jose Manuel, Jorge, M^a Carmen, Tesi, Manolo (gracias por el descubrimiento de Piñar), Asun, Carmen Bosch, Patricia (suerte en tu nueva etapa de residente), y por supuesto también a las nuevas adquisiciones, Eutimio, nuevo aprendiz de Fernando, y Jose, por participar de forma activa en algunos de los resultados obtenidos en este trabajo.

Fuera ya de las cuatro paredes de nuestro laboratorio, muchas gracias a todos los compañeros del Departamento, presentes y pasados: Virginia, Bea, Elena, Carmen, Quico, Paco, Mathias, Araceli, Esteban, Jose Romera, Belén, Laura, Cathy, Victor, Marga, Rafa, Jose Antonio (espero que termines pronto, ánimo), Tere Quesada, Tere Cuerda, Susana, Raquel Ferrer, Piru, Ana y María. Un recuerdo muy especial para la pequeña Magdalena, gracias por todo lo bueno que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, gracias por todas las salidas autodestructivas, gracias por ser como eres, suerte en todo lo que te propongas. Mi profunda gratitud a Lourdes y a Gloria, el miembro más entrañable de esta gran familia. A todos los profesores del Departamento por el interés mostrado, en especial a José Martínez y Teresa de la Rubia, por dejarme utilizar vuestro FPLC, y por interesaros por mí en todo momento.

Gracias a todos los compañeros del Departamento de Bioquímica, en especial a Rafael Salto y Loles Girón, por vuestro interés, vuestro ánimo, y por la centrífuga. A Jesús Porres, del Departamento de

Fisiología, por ayudarme en la determinación del contenido en cenizas de los exopolisacáridos, y por tu simpatía y apoyo. A todo el personal del Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada, en especial Juan Moliz por la determinación del contenido en sulfatos y fosfatos, Bendi, por la celeridad en realizar los ensayos de captación de metales pesados, y a Conchi, David y Ambrosio por las fotos de microscopía electrónica. Al Dr. Trout, nuestro corrector de publicaciones, por su paciencia y dedicación.

A toda la Unidad de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, mil gracias. A Ignacio por permitirme trabajar en su laboratorio unos meses, y por introducirme en un mundo que me ha fascinado. A M^a Carmen y Enrique, los otros jefes inmunólogos, por su trato cordial, y por interesarse en todo momento por el microbiólogo. A todos los doctorandos, Irene, Raquel, Osmany, Bea, Miguel, Zulema, Guirish, y en especial, a JuanDi, no solo compañero de laboratorio.

A la Dra. María C. Urdaci del Departamento de Microbiologie et Biochimie Appliquée de la ENITA de Bordeaux, por acogerme en su laboratorio, y por intentar en todo momento que mi estancia en sus instalaciones fuera lo más agradable posible; gracias por preocuparte por los derroteros que tomaba mi vida durante esos meses, a pesar de que no fuera agradable. A Richard Tallon, mi escudero durante ese tiempo, por explicarme todas las técnicas, por estar pendiente de mí, por hacer de paño de lágrimas, por todo. Todavía te debo unas cuantas Alambra 1925 para pagar todo lo que hiciste por mí; suerte en EEUU. A Muriel, Benoît y Anne-Marie, por su agradable compañía. A Phillippe Bressollier, del Departamento de Biologie Appliquée del INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE de Limoges, el Salvador Dalí de la cromatografía, parte activa de este trabajo, un gran bioquímico y una mejor persona. A Caroline, a pesar de todo.

Al margen del ámbito científico, son muchas las personas a las que tengo bastante que agradecer, empezando por mi familia. Papá, mamá, no tuvisteis la oportunidad de estudiar; ahora, gracias a vosotros, aspiro al más alto grado académico que otorga la Universidad, y es gracias a vuestro apoyo. Mil gracias, os quiero. A mi hermana Maribel, la mejor abogada penalista del mundo mundial (con permiso del clan Ceres), y a mi hermana pequeña Susana, que lleva la vocación de la educación en las venas, y que comparte conmigo la ansiedad/ilusión de haber adquirido un mini piso, gesto valiente en los tiempos que corren. También gracias a Raúl, que en todo momento ha mostrado mucho interés por mi Tesis. A Richi, la alegría de la casa, el perro más bonito y más coñacete que nadie podría imaginar.

Gracias a mis amigos, a los de Farmacia, y a los de los Maristas. Si la riqueza de un hombre se mide por la calidad de sus amigos, yo debo ser más rico que el más rico de los jeques árabes de este mundo.

Gracias a Luis y Curra, que ahora comparten su vida y sus ilusiones en Boston, a Rafita, compañero de carrera, de fiestas y de laboratorio, y a Sophie, suerte en vuestra aventura belga, no os olvidéis de nosotros, volved pronto a la madre patria, os esperamos. Gracias a Alberto Lamenca y Ana Rosa, siempre os estaré agradecido por la boda que nos regalasteis, inolvidable. Gracias a Edu, que casi es un miembro más de nuestro laboratorio, ánimo, ya te queda muy poco, vales mucho. A Carlos, suerte con tu bebito, todavía tenemos que tomarnos unas copas para contarnos la vida. Gracias también a Chemari, el más listo de la clase, que ya hacía negocios cuando nuestra única preocupación era pegarnos una buena fiesta. Gracias a Asier y Paco, que ahora continúan su formación con los hijos de la Gran Bretaña, por las fiestas, las risas, por todo.

Mil gracias a Alberto, Goretti, Jose, Amelia, Antonio, Javi, Sonsoles, José Tuno, Ainhoa, Nacho, María del Mar, Carlos, Elvira, Ismael, María, Alfonso, Eugenia, Patricia, Edu, Ángela, Silverio, Carolina, Inma, Nela, Susana, Cristina, Antonio, Aurea, Vicky, Pablo, Ángela, Miguel, Antonio Jesús y a cualquier otro que se me pueda olvidar, que somos el ciento y la madre. Ya quisiera mucha gente un grupo de amigos de esta calidad a estas alturas de la vida; espero que siempre sigamos así de unidos, aunque los churumbeles nos van quitando un poco de tiempo a más de uno. A toda la gente de los Grupos de Amistad y los Grupos de Vida Cristiana, en especial a mis niños, y a José Carlos, José Luis, Antonio Quintanal, José Manuel, Juan Pablo y JuanVi. Me habéis hecho mejor persona. El destino quiso que mis padres no me dieran hermanos, aunque luego la vida se encargó de ponerlos en mi camino. Mil gracias a Pepito, Alberto, y Yul; me quito el sombrero ante vosotros, no tengo palabras, es más, las palabras sobran, os quiero hermanos.

Por último mil millones de gracias a Belén, mi niña, que después de todo lo que me ha pasado, se ha encargado en el último año y pico de volver a llenar mi vida de esperanza e ilusiones; a ti especialmente dedico este trabajo, también es tuyo, eres lo mejor que me ha pasado en esta vida, no cambies nunca.

A TODOS, MIL GRACIAS, OS QUIERO.

A Belén
A mi familia
A todos los que me han ayudado a llegar hasta aquí

INTRODUCCIÓN

1. Microorganismos halófilos	1
1.1. Ambientes salinos. Generalidades	1
1.2. Clasificación de los microorganismos según sus requerimientos salinos	2
1.3. Adaptación de los microorganismos a los ambientes salinos	3
a) Osmoadaptación	3
b) Modificación en la morfología celular y estructura	7
1.4. Taxonomía de los microorganismos halófilos	8
a) Taxonomía de las arqueas halófilas	8
b) Taxonomía de las bacterias halófilas	9
2. Los polisacáridos	
2.1. Polisacáridos vegetales	12
2.2. Polisacáridos de algas marinas	13
2.3. Polisacáridos microbianos	14
3. Exopolisacáridos microbianos	16
3.1. Concepto de exopolisacárido	16
3.2. Funciones biológicas	17
3.3. Composición química	21
3.3.1. Carbohidratos	21
3.3.2. Sustituyentes orgánicos	22
3.3.3. Sustituyentes inorgánicos	23
3.4. Estructura	25
3.4.1. Homopolisacáridos	25
3.4.2. Heteropolisacáridos	27
3.5. Conformación molecular	31
3.6. Biosíntesis de los exopolisacáridos	32
3.7. Genética de los exopolisacáridos	34
3.8. Ingeniería genética aplicada a la mejora de cepas productoras de exopolisacáridos	37
3.9. Propiedades físicas	40
3.9.1. Masa molecular	40
3.9.2. Actividad emulgente	41
3.9.3. Propiedades reológicas	43
3.9.4. Formación de geles	47
3.9.5. Captación de metales pesados	51
3.10. Relación entre la composición/estructura química y propiedades físicas	52
3.11. Producción de exopolisacáridos microbianos	53
3.11.1. Fermentación industrial	53
3.11.2. Recuperación	54
3.11.3. Factores determinantes en la producción	55
3.11.4. Influencia de las condiciones de cultivo sobre la masa molecular	62
3.12. Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos	63
3.12.1. Industria alimentaria	64
3.12.2. Industria farmacéutica y medicina	66
3.12.3. Aplicaciones en la industria cosmética	68
3.12.4. Exopolisacáridos microbianos como fuente de L-fucosa	69
3.12.5. Otras aplicaciones	70
OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. Cepas bacterianas	77
2. Mantenimiento de las cepas	77
3. Estudio filogenético de las cepas	79
4. Proceso de extracción de los EPS	79
5. Optimización de la producción de los EPS	81

5.1. Tiempo de incubación	81
5.2. Concentración de sales	81
5.3. Fuente de Carbono y Nitrógeno	81
5.4. Concentración de la fuente de Carbono	82
5.5. Temperatura	82
5.6. Agitación	82
6. Composición química de los exopolisacáridos	82
6.1. Análisis colorimétricos	83
6.2. Determinación del contenido en cenizas	83
6.3. Purificación de los exopolisacáridos	87
6.3.1. Determinación del contenido en sulfatos y fosfatos	87
6.3.2. Análisis de los monosacáridos constituyentes de los EPS	88
7. Determinación de la masa molecular	88
8. Estudios de microscopía electrónica	88
9. Propiedades físicas de los exopolisacáridos	89
9.1. Propiedades reológicas	89
9.1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas	89
9.1.2. Factores que influyen en la viscosidad de las preparaciones acuosas del exopolisacárido producido por la cepa B100 de <i>Halomonas maura</i>	89
9.1.3. Características reológicas de las preparaciones acuosas del exopolisacárido producido por la cepa B100 de <i>Halomonas maura</i>	91
9.1.4. Efecto sinérgico del exopolisacárido producido por la cepa B100 de <i>Halomonas maura</i> con otros agentes viscosizantes	93
9.2. Propiedades emulgentes	93
9.2.1. Controles	93
9.2.2. Actividad emulgente	94
9.2.3. Determinación del poder tensioactivo	94
9.2.4. Grado de dispersión	95
9.2.5. Desproteínización de los exopolisacáridos	95
9.2.6. Electroforesis de proteínas	95
9.3. Captación de metales pesados	96
10. Actividad antiproliferativa sobre células hematopoyéticas de exopolisacáridos microbianos sulfatados	97
10.1. Desulfatación de los EPS	97
10.2. Sulfatación de los EPS	98
10.3. Cultivos celulares	98
10.4. Test de proliferación celular	98
11. Estudio de la participación de los EPS en la formación de biofilms	99
11.1. Cuantificación de la formación de biofilms mediante tinción con cristal violeta	99
11.2. Microscopía electrónica de barrido	100
11.3. Obtención de mutantes deficientes en la síntesis de EPS	100
a) Protocolo de mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5 Km2	100
b) Mutagénesis dirigida	107
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
SECCIÓN I. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS	113
SECCIÓN II. CARACTERIZACIÓN DE LOS EPS	119
Capítulo 1. Optimización de la producción de los exopolisacáridos	121
Tiempo de incubación	122
Concentración de sales	131
Fuente de carbono y nitrógeno	139
Concentración de la fuente de carbono	147
Temperatura de incubación y agitación de los cultivos	156
Capítulo 2. Composición química y masa molecular de los exopolisacáridos	159
2.1. Análisis colorimétricos de los exopolisacáridos obtenidos en condiciones de cultivo	

óptimas. Determinación de cenizas	160
2.2. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico	162
2.3. sulfatos y fosfatos	164
2.4. Monosacáridos constituyentes de los EPS	166
2.5. Determinación de la masa molecular	168
Capítulo 3. Estudios de microscopía electrónica	171
SECCIÓN III. POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS EPS	179
Capítulo 1. Propiedades reológicas de los exopolisacáridos	181
1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos	183
1.2. Factores que influyen en la viscosidad del polímero B100	184
1.3. Características reológicas de las preparaciones acuosas del polímero B100	191
Pseudoplasticidad	191
Tixotropía	193
1.4. Estudio de las propiedades viscoelásticas del polímero B100. Ensayos de oscilación	194
1.5. Efecto sinérgico con otros agentes viscosizantes	199
Capítulo 2. Estudio de las propiedades emulgentes de los exopolisacáridos	203
2.1. Actividad emulgente	204
2.2. Poder tensioactivo	213
2.3. Desproteínización de los exopolisacáridos Al12 y Al16. Electroforesis de proteínas	214
Capítulo 3. Estudio de la captación de metales pesados	217
Capítulo 4. Actividad antiproliferativa sobre células tumorales de EPS sulfatados	223
4.1. Desulfatación e hipersulfatación de los exopolisacáridos	225
4.2. Actividad antiproliferativa sobre células hematopoyéticas de los exopolisacáridos con distinto grado de sulfatación	226
Capítulo 5. Exopolisacáridos microbianos como fuente de L-fucosa	237
SECCIÓN IV. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS EPS	241
Capítulo 1. Estudio de la participación de los EPS en la formación de biofilms	243
1.1. Tinción con cristal violeta	246
1.2. Obtención de mutantes deficientes en la síntesis de EPS: participación de los exopolisacáridos en la estructura de los biofilms	248
CONCLUSIONES	255
BIBLIOGRAFÍA	259

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mar Muerto (A) y Gran Lago Salado (B).	1
Figura 2. Movimiento de iones en las arqueas aerobias halófilas de la familia <i>Halobacteriaceae</i>	4
Figura 3. Algunos solutos compatibles encontrados en los microorganismos halófilos y halotolerantes	5
Figura 4. Fotografía de microscopía electrónica de bacterias productoras de EPS en un biofilm	18
Figura 5. Celulosa sintasa	25
Figura 6. Estructura de los dextranos	26
Figura 7. Estructura química del xantano	28
Figura 8. Molécula del gelano	29
Figura 9. Distintos tipos de conformación molecular de los exopolisacáridos microbianos. (A) Laminar, (B) doble hélice y (C) triple hélice	32
Figura 10. Etapas generales de la biosíntesis de exopolisacáridos, cápsulas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas.	33
Figura 11. Clúster de genes <i>gumB-M</i> de <i>Xanthomonas campestris</i>	36
Figura 12. Biosíntesis del gelano	38
Figura 13. Reogramas de los principales tipos de fluídos en función de su comportamiento reológico	44
Figura 14. L-fucosa.	69
Figura 15. Unidad repetitiva del clavano	69
Figura 16. Salinas de Asilah, al Norte de Marruecos, y humedal de Rambla Salada, en Murcia	77
Figura 17. Aspecto de las colonias de <i>Halomonas maura</i> B100 tras 48 horas de la siembra en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales	78
Figura 18. Proceso de extracción del EPS	80
Figura 19: Reómetro Bohlin CSR-10 y detalle del sistema de medida para pequeñas muestras	89
Figura 20. Fotografía de una placa <i>microtiter</i> empleada en la cuantificación de la formación de biofilms	99
Figura 21. Plásmido pUT portador del transposón mini-Tn5Km2.	102
Figura 22. Esquema del protocolo de mitagénesis insercional	103
Figura 23. Construcción del mutante X2 <i>epsA::lacZ</i>	108
Figura 24. Relaciones filogenéticas entre las cepas M4, X8, X2, B40, B100, N12, A16 y otras cepas pertenecientes al género <i>Halomonas</i> .	117
Figura 25. Relaciones filogenéticas entre la cepa B35 y otras cepas pertenecientes a los géneros <i>Idiomarina</i> , <i>Alteromonas</i> y otros géneros relacionados de la clase γ - <i>Proteobacteria</i> .	118
Figura 26. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. maura</i> X2 y sobre la producción de EPS	123
Figura 27. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. maura</i> B40 y sobre la producción de EPS	123
Figura 28. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. maura</i> B100 y sobre la producción de EPS	123
Figura 29. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. maura</i> N12 y sobre la producción de EPS	124
Figura 30. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. maura</i> A16 y sobre la producción de EPS	124
Figura 31. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. eurihalina</i> M4 y sobre la producción de EPS	124
Figura 32. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. eurihalina</i> X8 y sobre la producción de EPS	125
Figura 33. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. ventosae</i> A112 ^T y sobre la producción de EPS	125
Figura 34. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. ventosae</i> A115 y sobre la producción de EPS	125
Figura 35. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. ventosae</i> A116 y sobre la producción de EPS	126
Figura 36. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T y sobre la producción de EPS.	126

Figura 37. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. anticariensis</i> FP34 y sobre la producción de EPS	126
Figura 38. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. anticariensis</i> FP36 y sobre la producción de EPS	127
Figura 39. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>H. almeriensis</i> M8 ^T y sobre la producción de EPS	127
Figura 40. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>S. mucosus</i> A3 ^T y sobre la producción de EPS	127
Figura 41. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>P. marisminoris</i> B33 ^T y sobre la producción de EPS	128
Figura 42. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>I. fontislapidosi</i> F23 ^T y sobre la producción de EPS	128
Figura 43. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>I. ramblicola</i> R22 ^T y sobre la producción de EPS	128
Figura 44. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>A. hispanica</i> F32 ^T y sobre la producción de EPS	129
Figura 45. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de <i>A. hispanica</i> B35 y sobre la producción de EPS	129
Figura 46. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> X2	132
Figura 47. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> B40	132
Figura 48. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> B100	132
Figura 49. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> N12	133
Figura 50. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> A16	133
Figura 51. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. eurihalina</i> M4	133
Figura 52. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. eurihalina</i> X8	134
Figura 53. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A112 ^T .	134
Figura 54. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A115	134
Figura 55. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A116	135
Figura 56. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T .	135
Figura 57. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP34	135
Figura 58. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP36	136
Figura 59. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. almeriensis</i> M8 ^T	136
Figura 60. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>S. mucosus</i> A3 ^T	136
Figura 61. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>P. marisminoris</i> B33 ^T	137
Figura 62. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>I. fontislapidosi</i> F23 ^T	137
Figura 63. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>I. ramblicola</i> R22 ^T	137
Figura 64. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>A. hispanica</i> F32 ^T	138
Figura 65. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>A. hispanica</i> B35	138

Figura 66. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> X2	140
Figura 67. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> B40	140
Figura 68. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas maura</i> B100	140
Figura 69. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas maura</i> N12	141
Figura 70. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas maura</i> A16	141
Figura 71. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas eurihalina</i> M4	141
Figura 72. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas eurihalina</i> X8	142
Figura 73. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T	142
Figura 74. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas ventosae</i> A115	142
Figura 75. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas ventosae</i> A116	143
Figura 76. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas anticariensis</i> FP35 ^T	143
Figura 77. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas anticariensis</i> FP34	143
Figura 78. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas anticariensis</i> FP36	144
Figura 79. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas almeriensis</i> M8 ^T	144
Figura 80. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Salipiger mucosus</i> A3 ^T	144
Figura 81. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Palleronia marisminoris</i> B33 ^T	145
Figura 82. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T	145
Figura 83. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T .	145
Figura 84. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Alteromonas hispanica</i> F32 ^T	146
Figura 85. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Alteromonas hispanica</i> B35	146
Figura 86. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Halomonas maura</i> X2.	148
Figura 87. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> B40	148
Figura 88. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> B100	148
Figura 89. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> N12	149
Figura 90. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. maura</i> A16	149
Figura 91. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. eurihalina</i> M4	149
Figura 92. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. eurihalina</i> X8.	150
Figura 93. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A112 ^T	150
Figura 94. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A115	150

Figura 95. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. ventosae</i> A116	151
Figura 96. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP35 ^T	151
Figura 97. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP34	151
Figura 98. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. anticariensis</i> FP36	152
Figura 99. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>H. almeriensis</i> M8 ^T	152
Figura 100. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Salipiger mucosus</i> A3 ^T	152
Figura 101. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Palleronia marisminoris</i> B33 ^T	153
Figura 102. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Idiomarina fontislapidosi</i> F23 ^T	153
Figura 103. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>I. ramblicola</i> R22 ^T	153
Figura 104. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>Alteromonas hispanica</i> F32 ^T	154
Figura 105. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en <i>A. hispanica</i> B35	154
Figura 106. Cromatogramas obtenidos en la purificación de los exopolisacáridos A115 de <i>Halomonas ventosae</i> , M8 de <i>Halomonas almeriensis</i> , F23 de <i>Idiomarina fontislapidosi</i> y R22 de <i>Idiomarina ramblicola</i> , a un gradiente de elución de 0-1,5 M de NaCl	163
Figura 107. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa B100 de <i>Halomonas maura</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	172
Figura 108. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa M4 de <i>Halomonas eurihalina</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas	172
Figura 109. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa A112^T de <i>Halomonas ventosae</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	173
Figura 110. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa FP35^T de <i>Halomonas anticariensis</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	173
Figura 111. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa M8^T de <i>Halomonas almeriensis</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	173
Figura 112. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa A3^T de <i>Salipiger mucosus</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas	174
Figura 113. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa B33^T de <i>Palleronia marisminoris</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	174
Figura 114. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa F23^T de <i>Idiomarina fontislapidosi</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	175
Figura 115. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa R22^T de <i>Idiomarina ramblicola</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B)	175
Figura 116. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa F32^T de <i>Alteromonas hispanica</i> en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas	176
Figura 117. Fotografía de microscopía electrónica de una solución acuosa al 1% (p/v) de polímero B100 de <i>Halomonas maura</i>	177
Figura 118. Viscosidad de las preparaciones acuosas al 0,5% (p/v) de los polímeros objeto de estudio a un gradiente de deformación de 59,5 s ⁻¹ .	183

Figura 119. Efecto de la concentración del EPS B100 de <i>H. maura</i> sobre la viscosidad de sus preparaciones acuosas	184
Figura 120. Efecto de la temperatura (25, 35, 45 y 55°C) sobre la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de <i>H. maura</i>	185
Figura 121. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de las soluciones al 0,5% (p/v) del EPS B100	186
Figura 122. Recuperación que experimenta la viscosidad de las soluciones al 0,5% (p/v) del EPS B100 de <i>H. maura</i> tras enfriamiento a 25°C (E25) y 4°C (E4), a un gradiente de deformación de 59,5 s ⁻¹	186
Figura 123. Efecto del pH sobre la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de <i>H. maura</i> a un esfuerzo de cizalla de 3 Pa	188
Figura 124. Viscosidad de preparaciones al 0,5% (p/v) del polímero B100 en agua destilada adicionadas con distintas cantidades de NaCl	189
Figura 125. Evolución de la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de <i>H. maura</i> en un ciclo de gradiente de deformación creciente (90 s ⁻¹) y decreciente (3 s ⁻¹)	193
Figura 126. Ensayo de “stress sweep”. Evolución del módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') de una solución al 1% (p/v) de polisacárido B100 de <i>H. maura</i> en un intervalo de esfuerzo de cizalla de 0,1-20 Pa a una frecuencia de 1 Hz	195
Figura 127. Espectro mecánico de soluciones al 1 y 1,5 % (p/v) del polímero B100 de <i>H. maura</i> en un intervalo de frecuencia 0,01 -20 Hz y a un esfuerzo de cizalla de 6 Pa	195
Figura 128. Espectro mecánico de soluciones al 1 y 1,5% (p/v) del polímero B100 adicionadas con 0,1M NaCl en un intervalo de frecuencia 0,007-20 Hz a una esfuerzo de cizalla de 6 Pa	196
Figura 129. Espectro mecánico de soluciones al 1% (p/v) de maurano a temperaturas de 25, 45 y 70°C en un intervalo de frecuencia 0,007-20 Hz a un esfuerzo de cizalla de 6 Pa	198
Figura 130. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), goma guar (GG) y las mezclas B100/GG a un gradiente de deformación de 2 s ⁻¹	199
Figura 131. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), carragentato (C) y las mezclas B100/C a un gradiente de deformación de 85 s ⁻¹	200
Figura 132. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y las mezclas B100/HPMC a un gradiente de deformación de 85 s ⁻¹	200
Figura 133. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), pectina (P) y las mezclas B100/P a un gradiente de deformación de 10 s ⁻¹	200
Figura 134. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), goma de Plantago Ovata (PO) y las mezclas B100/PO a un gradiente de deformación de 30 s ⁻¹	201
Figura 135. Emulsión aceite de oliva-agua (A) y keroseno-agua (B) estabilizada por el EPS B100 de <i>Halomonas maura</i>	212
Figura 136. Emulsión estabilizada por el EPS M4 utilizando keroseno	213
Figura 137. SDS-PAGE de los exopolisacáridos en estado nativo y tras ser sometidos a desproteínezación por el método del fenol caliente (Apo-EPS) producidos por las cepas Al12 ^T y Al16 de <i>Halomonas ventosae</i>	216
Figura 138. Sulfatación de polisacáridos con el complejo piridina-SO ₃	225
Figura 139. Test de proliferación celular empleando MTT	226
Figura 140. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de <i>Halomonas anticariensis</i> FP34	227
Figura 141. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de <i>Halomonas anticariensis</i> FP34	227
Figura 142. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de <i>Halomonas anticariensis</i> FP34	228
Figura 143. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de <i>Halomonas maura</i> B100	228
Figura 144. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de <i>Halomonas maura</i> B100	229
Figura 145. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de <i>Halomonas maura</i> B100	229
Figura 146. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de <i>Halomonas maura</i> N12	230
Figura 147. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de <i>Halomonas maura</i> N12	230
Figura 148. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de <i>Halomonas maura</i> N12	231
Figura 149. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS FP34 de <i>Halomonas anticariensis</i> , tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml	231

Figura 150. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS B100 de <i>Halomonas maura</i> , tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml	232
Figura 151. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS N12 de <i>Halomonas maura</i> , tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml	232
Figura 152. Esquema mostrando las etapas en el proceso de formación del biofilm	244
Figura 153. Formación de biofilms a las 16, 24, 40 y 48 horas de incubación en medio MY al 5% (p/v) de sales	246
Figura 154. Formación de biofilms en medio MY al 3, 5, 7,5 y 10% (p/v) de sales tras 40 horas de incubación	247
Figura 155. Formación de biofilms en medio MY al 5% (p/v) de sales y medio Koser al 5% (p/v) de NaCl tras 40 horas de incubación	247
Figura 156. Fotografía del crecimiento de <i>Halomonas eurihalina</i> TK95 (A), mostrando su fenotipo colonial liso, y <i>Halomonas eurihalina</i> M4 (B) en medio sólido MY 7,5% (p/v) de sales tras 3 días de incubación a 32°C	249
Figura 157. Comprobación de la recombinación del gen <i>epsA::lacZ</i> -pVIK112 en <i>Halomonas maura</i> X2 por PCR	250
Figura 158. Fotografía del crecimiento de <i>Halomonas maura</i> X2 (A) y <i>Halomonas maura</i> X2 <i>epsA::lacZ</i> , mostrando su fenotipo colonial liso, en medio sólido MY 7,5% (p/v) de sales tras 3 días de incubación a 32°C	251
Figura 159. Formación de biofilms por las cepas X2 y X2 <i>epsA::lacZ</i> de <i>Halomonas maura</i> y M4 y TK95 de <i>Halomonas eurihalina</i> en medio MY 5% (p/v) de sales, tras 40 horas de incubación	252
Figura 160. Microfotografías electrónicas de barrido de <i>Halomonas maura</i> X2 (A) y <i>Halomonas eurihalina</i> M4 (B)	252
Figura 161. Microfotografías electrónicas de barrido en las que se muestra la formación de microcolonias por <i>Halomonas maura</i> cepa X2 (A) y el mutante deficiente en la síntesis de EPS X2 <i>epsA::lacZ</i> (B)	253

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Miembros del género <i>Halomonas</i>	11
Tabla 2. Principales polisacáridos de origen vegetal	13
Tabla 3. Principales familias de algas marinas y polisacáridos producidos por ellas	13
Tabla 4. Principales polisacáridos microbianos de interés comercial	15
Tabla 5. Sustituyentes orgánicos e inorgánicos más frecuentes de los exopolisacáridos microbianos	24
Tabla 6. Principales agentes emulgentes producidos por microorganismos	42
Tabla 7. Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos	64
Tabla 8. Cepas productoras de exopolisacáridos objeto de estudio, hábitat de aislamiento e identificación	77
Tabla 9. Sales metálicas y concentraciones (ppm) utilizadas en el estudio de captación de metales pesados por el exopolisacárido	97
Tabla 10. Cepas donadora y receptoras utilizadas en este trabajo	102
Tabla 11. Sonda utilizada en la hibridación	107
Tabla 12. Porcentajes de semejanza y divergencia filogenética entre las cepas M4, X8, <i>Halomonas eurihalina</i> y <i>Halomonas elongata</i>	115
Tabla 13. Porcentajes de semejanza y divergencia filogenética entre las cepas X2, B40, B100, N12, A16 y <i>Halomonas maura</i> S31 ^T	116
Tabla 14. Efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de EPS y la biomasa celular	156
Tabla 15. Efecto de la agitación de los cultivos sobre la producción de exopolisacárido y la biomasa celular	157
Tabla 16. Composición química de los exopolisacáridos obtenidos en condiciones óptimas	160
Tabla 17. Masa molecular y monosacáridos constituyentes (% p/p) de los exopolisacáridos	166
Tabla 18. Parámetros reológicos (K, índice de consistencia; n, índice de pseudoplasticidad) del ajuste al modelo de Ostwald-de-Waele de los reogramas a las diferentes concentraciones de polímero B100	192
Tabla 19. Parámetros reológicos (K, índice de consistencia; n, índice de pseudoplasticidad) del ajuste al modelo de Ostwald-de-Waele de los reogramas de soluciones de polímero B100 al 0,5% (p/v) a diferentes temperaturas	192
Tabla 20. Frecuencia de transición (Hz) de las preparaciones acuosas del exopolisacárido B100 en función de la concentración de polímero, la presencia de sales y la temperatura	196
Tabla 21. Actividad emulgente de los controles sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno	205
Tabla 22. Actividad emulgente de los controles sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano	205
Tabla 23. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas X2, B40, B100, N12, A16, M4, X8, AI12, AI15 y AI16 sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno	206
Tabla 24. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas X2, B40, B100, N12, A16, M4, X8, AI12, AI15 y AI16 sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano	207
Tabla 25. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas FP35, FP34, FP36, M8, A3, B33, F23, R22, F32 y B35 sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno	208
Tabla 26. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas FP35, FP34, FP36, M8, A3, B33, F23, R22, F32 y B35 sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano	209
Tabla 27. Tensión superficial (mN/m) de las preparaciones acuosas de los EPS X2, B40, B100, M4 AI12 y F23, y del surfactante químico utilizado como control Polisorbato 60	213
Tabla 28. Actividad emulgente de los exopolisacáridos AI12 y AI16 de <i>Halomonas ventosae</i> en estado nativo y tras ser sometidos a desproteínización química y enzimática sobre diversos sustratos	215
Tabla 29. Captación de metales pesados por los exopolisacáridos. Los resultados indican los miligramos de metal captados por gramo de EPS	219

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se describen los exopolisacáridos (EPS) producidos por distintas cepas de microorganismos halófilos que se han caracterizado como pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*, aislados por nuestro grupo de investigación en diferentes hábitats hipersalinos.

La primera etapa del trabajo consistió en optimizar la producción de los distintos EPS; en general, la síntesis de polímero es un proceso parcialmente asociado al crecimiento bacteriano, pues aunque comienza en la fase exponencial de crecimiento, alcanza el máximo durante la fase estacionaria, entre 72 y 120 horas de incubación, según el microorganismo. En general, las condiciones que condujeron a la máxima producción de exopolisacárido fueron las mismas que permitieron el mayor crecimiento de los microorganismos.

La caracterización química de los EPS puso de manifiesto que todos los biopolímeros son heteropolisacáridos constituidos fundamentalmente por carbohidratos, aunque en su composición también encontramos distintos sustituyentes orgánicos e inorgánicos. El carácter ácido de los EPS se debe a la presencia de ácidos urónicos, grupos fosfato, piruvato y a los restos sulfato, inusuales entre los EPS de origen microbiano. En este trabajo hemos puesto de manifiesto la actividad moduladora sobre la proliferación de células tumorales humanas de los heteropolisacáridos FP34 de *Halomonas anticariensis*, B100 y N12 de *Halomonas maura*, y hemos demostrado la importancia de los grupos sulfato en dicha actividad biológica, comparando la acción de dichos polímeros con sus análogos sulfatados y desulfatados químicamente. Entre los EPS ensayados destaca el producido por *Halomonas maura* cepa B100, el cual, tras ser sometido a un proceso de sulfatación química disminuye dramáticamente la proliferación de las líneas celulares ensayadas.

En relación a sus propiedades funcionales, el polímero B100 de *Halomonas maura* destaca entre los estudiados en este trabajo por ser un poderoso agente viscosizante. Este hecho, junto a su comportamiento pseudoplástico, tixotrópico y viscoelástico, lo hace comparable a otros exopolisacáridos como el maurano o el xantano. Todos los polímeros ensayados fueron capaces de estabilizar mezclas oleoacuosas en las que la fase oleosa era un hidrocarburo o un aceite vegetal o mineral, destacando los exopolisacáridos B100 de *Halomonas maura* y B33 de *Palleronia marismenoris*. Los exopolisacáridos A112 y A116 producidos por *Halomonas ventosae*, con una considerable actividad emulgente, y que no actúan estabilizando emulsiones por un aumento de la viscosidad, deben en gran medida sus buenas propiedades como bioemulgentes al contenido en proteínas que presentan en su composición química, como hemos demostrado por eliminación química y enzimática del contenido proteico de los mismos. Por tanto, nuestros EPS podrían encontrar aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética o en biorremediación. Por último, todos los EPS sintetizados por nuestras bacterias halófilas fueron capaces de captar considerables cantidades de plomo, cobre y cobalto, debido a su carácter ácido, destacando el

EPS X2 de *Halomonas maura*, capaz de captar más de 53,5 mg Pb²⁺/g EPS, lo cual es de gran interés en procesos de biorremediación.

Durante la última fase del estudio, se ha realizado una aproximación preliminar al papel fisiológico desempeñado por los exopolisacáridos sintetizados por nuestros microorganismos halófilos, determinando la propensión de los mismos a formar biofilms bajo diferentes condiciones ambientales. Todas las cepas ensayadas fueron capaces de formar biofilms. A continuación, estudiamos la participación de los exopolisacáridos en la estructura de los biofilms. Para ello elegimos las cepas X2 de *Halomonas maura* y M4 de *Halomonas eurihalina*, es decir, aquellas que daban lugar a una mayor formación de biofilms en todas las condiciones ensayadas, comparando su capacidad para formar estas biopelículas con la de mutantes de ambas cepas deficientes en la síntesis de exopolisacárido, demostrando que la presencia de exopolisacáridos en el medio es fundamental para la formación de biofilms por parte de nuestros microorganismos.

INTRODUCCIÓN

1. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

1.1. Ambientes hipersalinos. Generalidades

Un medio ambiente extremo es aquel en el que existen condiciones físico-químicas extremas e inusuales (Brock, 1969). A los microorganismos que viven en estos ambientes se les denomina extremófilos (Horikoshi, 1997). Un tipo de ambiente extremo son los hábitats hipersalinos, que contienen una elevada concentración de sal.

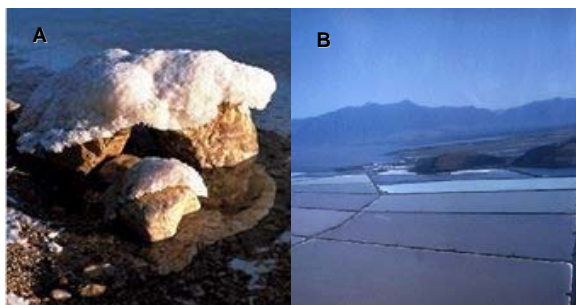


Figura 1. Mar Muerto (A) y Gran Lago Salado (B).

Las aguas hipersalinas se definen por tener una concentración de sales inorgánicas más elevada que la del agua del mar. Se pueden dividir en talasosalinas (del término griego “thalasso”, mar) y atalasalinas. Las primeras poseen una composición semejante a la del agua del mar, como el Gran Lago Salado (Figura 1B) o las lagunas costeras hipersalinas (Javor, 1989), que se encuentran distribuidas por todas las zonas

cálidas del planeta. Por el contrario, los medios atalasalinos se caracterizan por tener una concentración de sales cualitativamente diferente a la del mar, como el Mar Muerto (Figura 1A) o los lagos alcalinos de Gran Valle de Rift africano (Tindall, 1988).

Dentro de los hábitats hipersalinos se encuentran también los desiertos de sal que cubren enormes áreas de mundo, en los que la evaporación del agua es mucho mayor que la precipitación (Fitter y Hay, 1987). En estos suelos hay una gran concentración de sales solubles neutras, suficiente para interferir seriamente en la actividad microbiana y en la fertilidad de los suelos (Sarig y col., 1993), y también en el crecimiento de la mayoría de las plantas (Zahran, 1989).

Pero los ambientes hipersalinos son también aprovechados e incluso provocados por el hombre, como es el caso de las salinas, donde se extrae sal, mediante la evaporación de agua rica en sales. En estos lugares, los suelos próximos también son hipersalinos.

Los medios hipersalinos presentan una baja actividad de agua (a_w). Esta es una medida de la disponibilidad de agua que, debido a la elevada cantidad de sales está muy limitada. Ello implica una adaptación de los organismos que se desarrollen en estos ambientes, ya que hay menos agua para disolver los nutrientes, para los procesos metabólicos generales, y para la hidratación de proteínas y ácidos nucleicos (Litchfield, 1998).

Además de la actividad del agua, la composición iónica es un parámetro importante que define los ambientes hipersalinos. Esta composición influye en las necesidades que presentan los microorganismos. Así, por ejemplo, debido a que el Ca^{2+} empieza a precipitar a una concentración de sales totales de 6-8% (p/v), la mayoría de los microorganismos halófilos no requieren elevadas concentraciones de este ión para desarrollarse. Por el contrario, los cationes K^+ y Mg^{2+} se encuentran en concentraciones elevadas, especialmente en sistemas talasosalinos, por lo que muchos microorganismos halófilos requieren altas concentraciones de estos iones para crecer en medios artificiales (Litchfield, 1998).

En ambientes atalasosalinos predominan otros iones además del Na^+ . Por ejemplo, en el Mar Muerto los cationes principales son Mg^{2+} , Na^+ y Ca^{2+} (Larsen, 1980). Por lo tanto, las arqueas halófilas del Mar Muerto presentan su óptimo de crecimiento a concentraciones elevadas de estos cationes (Grant y Larsen, 1989).

Además de la elevada cantidad de sales, los medios hipersalinos se suelen caracterizar por registrar generalmente temperaturas elevadas, una luz intensa, un pH alcalino, y la presencia de otros aceptores de electrones alternativos al oxígeno (Litchfield, 1998). De este modo, los seres vivos que habitan estos lugares, normalmente arqueas halófilas, bacterias halófilas y algas como *Dunaliella*, se encuentran adaptados a esas condiciones.

1.2. Clasificación de los microorganismos según sus requerimientos salinos

Los microorganismos que requieren elevadas concentraciones de sal se denominan halófilos. Kushner y Kamekura, en 1988, propusieron las siguientes categorías de microorganismos teniendo en cuenta sus requerimientos de NaCl:

No halófilos: Su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl inferior a 0,2 M (1% p/v). Existen microorganismos no halófilos capaces de crecer en medios hasta con 2,5 M de NaCl (15% p/v), denominándose halotolerantes.

Halófilos débiles: También llamadas bacterias marinas. Su crecimiento óptimo se produce a una concentración de NaCl de 0,2-0,5 M (1-3% p/v).

Halófilos moderados: Crecen de forma óptima a concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,5 y 2,5 M (3-15% p/v).

Halófilos extremos: Tienen un crecimiento óptimo entre 2,5 y 5,2 M (15-32% p/v) de NaCl.

1.3. Adaptación de los microorganismos a los ambientes salinos

a. Osmoadaptación

Las bacterias adaptadas a vivir en ambientes hipersalinos han de enfrentarse a un medio con una fuerza iónica elevada (Galinski y Truper, 1994). Debido a que las envueltas celulares son permeables al agua, las células que no están adaptadas no pueden mantener una a_w del citoplasma mayor que la del medio externo, ya que se produciría una deshidratación y la consiguiente muerte de la célula (Brown, 1990). La adaptación al medio ambiente hipersalino consiste en equilibrar la presión osmótica interna con la externa, a fin de mantener la integridad celular y las funciones vitales.

Nos referimos al término **osmoadaptación**, mejor que osmorregulación, ya que este último se refiere a una respuesta inmediata frente a la acción de un sensor o agente desencadenante, mientras que osmoadaptación es un término más extenso. Se refiere tanto a los cambios fisiológicos como a los genéticos que se producen frente a la escasa actividad del agua (Galinski, 1995).

Los microorganismos que viven en ambientes hipersalinos han adoptado dos estrategias de osmoadaptación: mediante la acumulación de grandes cantidades de sal, en concreto KCl, en el interior de la célula, y mediante el empleo de solutos compatibles orgánicos.

La adaptación a la elevada fuerza iónica exterior significa un gasto energético para el microorganismo. La estrategia del KCl es menos costosa que la acumulación de solutos compatibles pero requiere grandes adaptaciones de la maquinaria celular, de modo que se lleva a cabo por un proceso más complejo y largo desde el punto de vista evolutivo (Dennis y Shimmin, 1997). Esta opción sólo la realizan los grupos de procariotas especializados, como las arqueas halófilas y las bacterias anaerobias halófilas, que obtienen cantidades limitadas de energía debido a su metabolismo fermentador. El resto de los microorganismos utilizan solutos compatibles orgánicos, que son más costosos energéticamente (Oren, 1999).

Los microorganismos que **acumulan KCl** son las arqueas halófilas del orden *Halobacteriales* (Kushner, 1985), y las bacterias halófilas del orden *Haloanaerobiales* (Oren, 1999; Oren y col., 1997). También acumulan esta sal *Acetohalobium* (Oren, 1991), y algunas bacterias sulfato reductoras (Ollivier y col., 1994). En este caso, todos los enzimas y componentes estructurales de la célula se encuentran adaptados a la elevada salinidad del citoplasma. Estas modificaciones incluyen un exceso de aminoácidos ácidos, y pequeñas cantidades de aminoácidos hidrofóbicos. De esta forma, la molécula se rodea de mayor cantidad de agua, es decir, se forma una capa de hidratación alrededor de ella, para compensar la escasa a_w del medio circundante (Sleator y Hill, 2001).

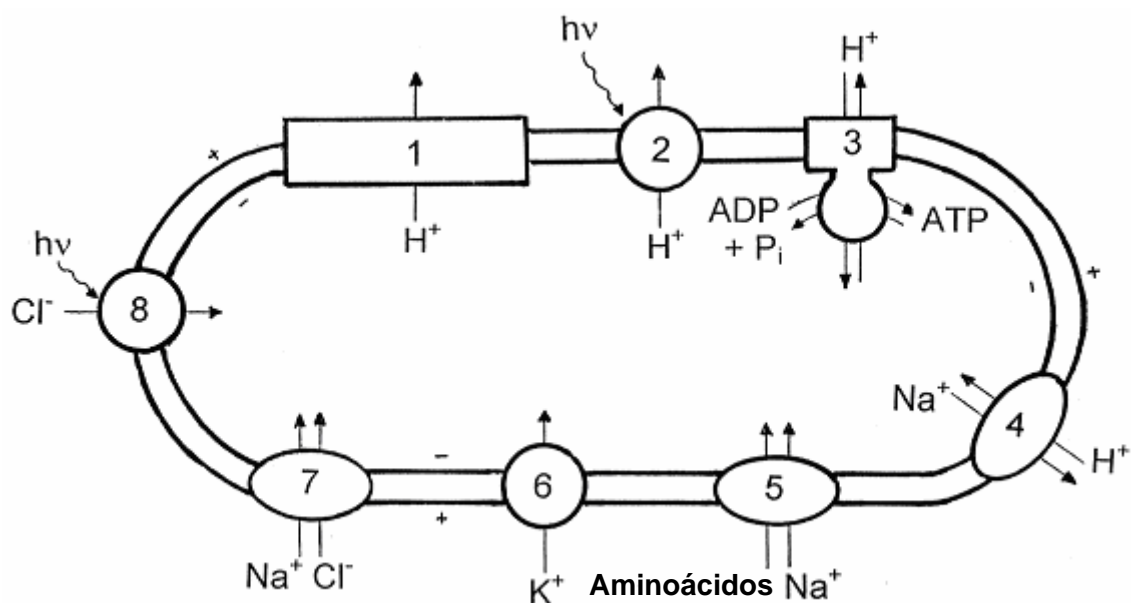


Figura 2. Movimiento de iones en las arqueas aerobias halófilas de la familia *Halobacteriaceae* (Oren y col., 1999). 1: Eliminación de protones por la cadena respiratoria de transporte de electrones; 2: Expulsión de protones mediada por bacteriorodopsina; 3: Formación de ATP por la ATP sintasa; 4: Bomba antiporter Na⁺/H⁺; 5: Gradiente de sodio asociado al transporte de aminoácidos; 6: Transporte de potasio generado por el potencial de membrana; 7: Transporte de cloruro independiente de la luz, probablemente asociado al transporte de sodio; 8: Halorodopsina, una bomba que incorpora cloruro a la célula gracias a la luz.

En la familia *Halobacteriaceae*, este aumento de la concentración intracelular de K⁺ se consigue por una eliminación de Na⁺ de forma activa, mediante un antiporter con H⁺, y una entrada pasiva de K⁺. El ión Cl⁻ penetra sin consumo de energía para compensar las cargas (Hochstein y Bogomolni, 1999) (Figura 2).

La estrategia de los **solutos compatibles** orgánicos la han adoptado la mayoría de las bacterias halófilas y halotolerantes, y algunas arqueas halófilas, como las metanógenas (Robertson y col., 1992; Lai y col., 1991). Se trata de pequeñas moléculas polares sintetizadas por el microorganismo o capturadas del medio exterior, con alta solubilidad y que no presentan carga a pH fisiológico (Galinski, 1995). Se acumulan en gran cantidad en la célula (más de 1 mol/kg de agua) (Galinski y Trüper, 1994). Este mecanismo no requiere que las proteínas celulares estén adaptadas, como ocurre en el caso de la acumulación de KCl en el citoplasma.

Los solutos compatibles actúan aumentando la fuerza iónica intracelular y estabilizando macromoléculas celulares (Csonka y Hanson, 1991; Lippert y Galinski, 1992). Su mecanismo de acción está relacionado con la estabilización de la capa de hidratación de las proteínas, al localizarse en zonas

más alejadas de la superficie molecular, y permitiendo una unión más fuerte del agua con la molécula (Arakawa y Timasheff, 1985; Sleator y Hill, 2001).

En cuanto a la naturaleza química de los solutos compatibles (Figura 3), pueden ser polioles (glicerol y arabitol), azúcares y derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), aminoácidos (prolina y glutamina), derivados de aminoácidos (N-acetilisina, N-acetilornitina) que se han detectado en algunos Gram positivos (Wohlfarth y col., 1993), y aminas cuaternarias (glicina betaína) (Galinski, 1995).

Cada microorganismo tiene unos solutos compatibles característicos, y unas rutas para conseguir su osmoadaptación. Hay bacterias no halófilas, como las enterobacterias, que tienen mecanismos de transporte eficaces para algunos omolitos como ectoína y glicina betaína. Por lo tanto, un microorganismo puede adquirir un cierto grado de tolerancia a la sal al capturar solutos compatibles presentes en sedimentos marinos, liberados por otras bacterias al medio ambiente, o cuando estos solutos se adicionan al medio de cultivo (Koo y col., 1991; Cayley y col., 1992; Jebbar y col., 1992; Kempf y Bremen, 1998; Poolman y Glaasker, 1998; Nagata y Wang, 2001; García-Esteva y col., 2006).

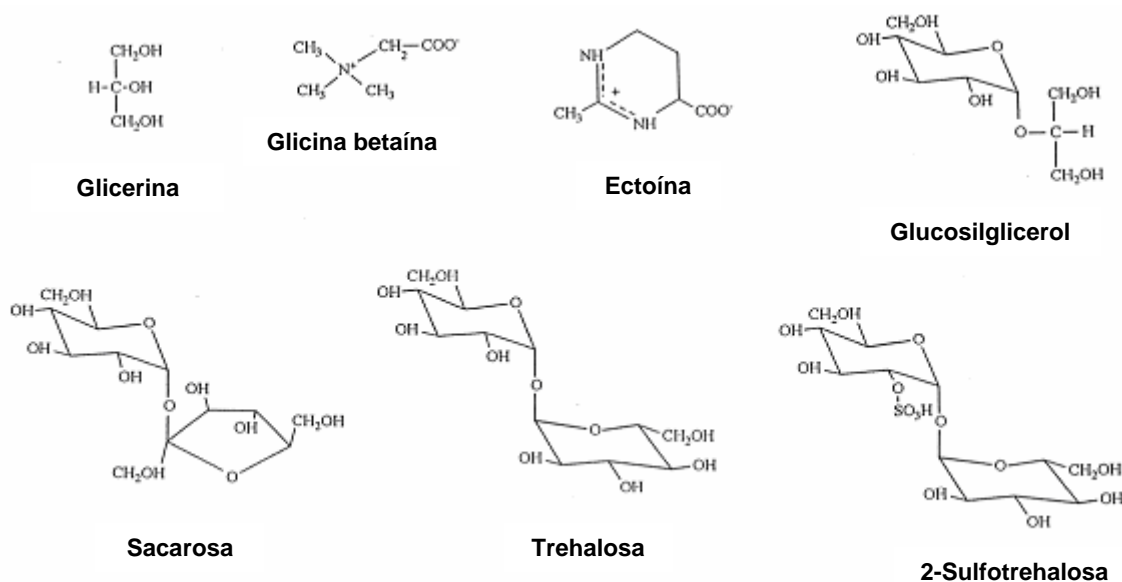


Figura 3. Algunos solutos compatibles encontrados en los microorganismos halófilos y halotolerantes (Oren y col., 1999).

La **glicina betaína** (Figura 3) es un compuesto importante. Lo sintetizan las bacterias halófilas fotosintéticas (Galinski, 1995) y las cianobacterias halófilas (Reed y col., 1984). También puede ser capturada del medio por muchos heterótrofos para conseguir el equilibrio osmótico (Ventosa y col., 1998), o sintetizada, junto con otros compuestos por las arqueas metanógenas halófilas (Robertson y col., 1992).

Finalmente, también puede ser obtenida por síntesis de *novo* por algunos heterótrofos como *Actinopolyspora halophila* (Galinski, 1995).

Otro compuesto interesante es la **ectoína** (Figura 3). Se trata de un aminoácido cíclico que se detectó por primera vez en el género *Ectothiorhodospira* (Galinski, 1991). Junto con la **hidroxiectoína** es el soluto compatible más ampliamente localizado en el dominio *Bacteria* (Ventosa y col., 1998). Se ha encontrado en bacterias fotosintéticas del género *Halorhodospira* (Galinski, 1995), en metanotrofos halotolerantes como *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z (Reshetnikov y col., 2006), en *Vibrio cholerae* (Pflughoeft y col., 2003), y está presente en altas concentraciones en especies del género *Halomonas* y otros géneros relacionados. En *Halomonas elongata* se ha estudiado la síntesis de *novo* de ectoína e hidroxiectoína, que tiene lugar en ausencia de otros agentes protectores en el medio (Cánovas y col., 1997). Se han caracterizado los genes implicados en esta síntesis en dos cepas de *H. elongata* (Cánovas y col., 1998a; Göller y col., 1998). Esta bacteria también acumula glicina betaína y otros solutos semejantes estructuralmente. La glicina betaína capturada del medio inhibe parcial o totalmente la síntesis de *novo* de ectoína, dependiendo de la concentración de NaCl del medio (Cánovas y col., 1996). Además de captar glicina betaína del medio externo, la bacteria es capaz de sintetizarla, a partir de su precursor, la colina. Este sistema se encuentra regulado por la salinidad y por la disponibilidad de glicina betaína (Cánovas y col., 1998b). Estos genes han sido caracterizados (Cánovas y col., 2000).

La acumulación de solutos compatibles depende de la fuerza osmótica, de la fase de crecimiento del cultivo, de la fuente de carbono y de la presencia de osmolitos en el medio de cultivo (Smith y col., 1994). Las condiciones de crecimiento son muy importantes; por ejemplo, *Chromohalobacter israelensis* acumula principalmente trealosa cuando crece a concentración de NaCl inferior a 0,6 M, pero a mayores concentraciones el soluto principal es la ectoína (Regev y col., 1990).

Muchas bacterias que acumulan solutos orgánicos también contienen altas concentraciones intracelulares de Na⁺ y K⁺ (Ventosa y col., 1998; Kraegeloh y col., 2005). No está claro si esto implica una combinación de ambas estrategias o se debe a problemas técnicos en la medida de la concentración iónica intracelular (Imhoff, 1993; Ventosa y col., 1998). Además, las proteínas celulares de *Halomonas elongata* son algo más ricas en aminoácidos ácidos que las de los microorganismos no halófilos (Gandbhir y col., 1995), lo que puede significar un cierto grado de adaptación de la maquinaria intracelular a la sal, aunque se trate de bacterias que principalmente utilizan solutos compatibles.

En otro orden de cosas, los solutos compatibles pueden utilizarse como estabilizadores y agentes protectores de células y de enzimas de interés industrial (Galinski y Lippert, 1991; Ventosa y Nieto, 1995; Lamosa y col., 2000; Faria y col., 2003; Neelon y col., 2005). In vivo, las aplicaciones biotecnológicas de los solutos compatibles se han centrado en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a la desecación. Así, por ejemplo, se está trabajando con los genes que codifican para la ectoína en *Chromohalobacter salexigens* (Calderon y col., 2004), transfiriendo de dichos genes a las

plantas y a las bacterias de interés agrícola, como *Rhizobium*, con el fin de aumentar la tolerancia a las condiciones de stress osmótico. Su aplicación más inmediata es la mejora en la fijación biológica de nitrógeno para la recuperación de suelos áridos y semiáridos mediante el cultivo de estos organismos transgénicos (Nieto y col., 2001). También se han realizado estudios para conferir tolerancia a la salinidad a la planta del tabaco (Nakayama y col., 2000; Rai y col., 2006) y al maíz (Barkla y col., 1999; Paranychianakis y Chartzoulakis, 2005).

Se ha estudiado en *Halomonas elongata* un proceso de extracción de ectoína conocido como “bacterial milking” (Sauer y Galinski, 1998). Consiste en alternar el cultivo del microorganismo en medios con alta y baja concentración de sales, con el fin de provocar la salida de ectoína de la célula. Se pueden obtener hasta 155 mg de ectoína por gramo de peso seco celular en cada ciclo.

b. Modificación en la morfología celular y estructura

Las bacterias que normalmente crecen en condiciones no salinas pueden mostrar grandes modificaciones cuando se someten a una elevada concentración de sal. El engrosamiento, el alargamiento y la reducción del volumen de las células son las modificaciones más frecuentes. Se trata de una respuesta común en algunas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (Baldwin y col., 1988), *Pseudomonas fluorescens* (Parente y Silva, 1984) y *Rhizobium* (Zahran y col., 1993). Las bacterias del género *Rhizobium* aisladas de suelos afectados por la sal presentan una alteración de la forma de las células, de la ruta de síntesis de proteínas y LPS, así como una modificación de la estructura genómica (Zahran, 1991; 1992a,b). Estas alteraciones pueden afectar a la simbiosis entre *Rhizobium* y la leguminosa correspondiente.

Las bacterias Gram positivas como *Bacillus* y *Staphylococcus* también modifican su estructura. Al 10% (p/v) de NaCl, las células de *Bacillus* presentan un alargamiento, un engrosamiento y un aumento en la formación de cadenas de estreptobacilos. Además, el volumen celular se reduce con un 10-20% (p/v) de NaCl (Zahran, 1997).

Por otro lado también se han encontrado modificaciones estructurales en las bacterias halófilas. Un aspecto importante es el cambio en la pared celular y en las membranas. Las adaptaciones estructurales de la membrana principalmente se refieren a alteraciones en la composición y síntesis de proteínas, lípidos y ácidos grasos (Russell, 1989; Thiemman e Imhoff, 1991). Sin embargo sólo ocurren cambios profundos en la estructura y composición química de las bacterias a concentraciones de sal superiores a 2M de NaCl (Kogut, 1991).

Las propiedades de las membranas bacterianas dependen en gran medida, de su composición lipídica. Una característica común de la respuesta adaptativa a la elevada salinidad es el aumento de los fosfolípidos cargados negativamente (Russell y Adams, 1991; Thiemman e Imhoff, 1991) Este hecho se

ha observado en las bacterias del género *Ectothiorhodospira* (Thiemman e Imhoff, 1991), y en *Halomonas elongata*. Dicha bacteria es capaz de vivir en una amplia variedad de concentraciones salinas (0,05-3,4M) debido a la alteración de la fisiología de la célula, que consiste en una mejora de la integridad estructural de las paredes y un aumento de lípidos cargados negativamente (Vreeland y col., 1984; 1991). Sin embargo, la bacteria halófila *Haloanaerobium prevaleense* muestra una respuesta diferente, ya que el contenido en lípidos de la célula no varía bajo una elevada concentración salina (Zeikus y col., 1983).

La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos también se regula por la salinidad del medio de cultivo y es importante en el mantenimiento de la estructura de la bicapa (Imhoff y Thiemman, 1991; Sutton y col., 1991). En *Halomonas salina* se produce un descenso de la proporción de ácidos grasos monoinsaturados, aumentando los ácidos grasos con cadenas de ciclopropano, en situaciones de elevada salinidad. Se cree que de este modo, se mantiene la fluidez de la membrana y se contribuye a preservar la integridad de la misma (Valderrama y col., 1998). Este comportamiento coincide con el de otras bacterias relacionadas como *H. halophila* (Monteoliva-Sánchez y col., 1988) y *Pseudomonas halosaccharolytica* (Monteoliva-Sánchez y col., 1993). Sin embargo, en el caso de *Salinivibrio costicola*, la elevada salinidad no favoreció la ciclación de los ácidos grasos (Hanna y col., 1984).

1.4. Taxonomía de los microorganismos halófilos

a. Taxonomía de las arqueas halófilas

La mayoría de las arqueas halófilas se consideran halófilas extremas, ya que su óptimo de crecimiento se encuentra a 3,5-4,5 M de NaCl. Se denominaban comúnmente halobacterias (actualmente haloarqueas), y quedan agrupadas en el orden *Halobacteriales* (Grant y Larsen, 1989), con una sola familia, *Halobacteriaceae* (Gibbons, 1974; Tindall, 1992). Este grupo incluye cocos, bacilos, y multitud de formas pleomórficas como las triangulares y cuadradas. Requieren al menos un 1,5 M de NaCl, y las colonias de la mayoría de las cepas tienen colores rojizos debido a la presencia de carotenoides C₅₀ (bacterioruberina), que proporcionan dichas tonalidades a las aguas donde se desarrollan. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las arqueas halófilas es de 35-50° C. Son quimioorganotrofos, capaces de usar aminoácidos o carbohidratos como fuente de carbono y energía (Grant y col., 2001). Algunos de estos microorganismos contienen un pigmento derivado del retinal, denominado bacteriorodopsina, capaz de producir movimientos de iones a través de la membrana celular por acción de la luz, o funcionar como fotosensores (Figura 2). Dicha sustancia se ha detectado en *Halobacterium salinarium* y parece ser una característica excepcional entre estos microorganismos (Oren, 1999).

También se han descrito algunas arqueas metanógenas halófilas extremas pertenecientes a los géneros *Methanohalobium* (Zhilina y Zavarin, 1987) y *Methanohalophilus* (Paterek y Smith, 1988), que se incluyen en la familia *Methanosarcinaceae*.

b. Taxonomía de las bacterias halófilas

Bacterias halófilas extremas

La mayoría de las bacterias halófilas se clasifican como moderadas o débiles. Es difícil encontrar verdaderas bacterias halófilas extremas, entre ellas podemos nombrar *Acetohalobium arabaticum* (Zhilina y Zavarzin, 1990), y también las especies del género *Halorhodospira* (Imhoff y Süling, 1996). Otro microorganismo halófilo extremo es el actinomiceto *Actinopolyspora halophila* (Gochner y col., 1975; Skerman y col., 1980). Sin embargo, en 2002, Antón y colaboradores describieron *Salinibacter ruber*, que necesita al menos un 15% (p/v) de sal para crecer, y que se considera una de las bacterias conocidas con unos requerimientos salinos más elevados, y que es muy frecuente en aguas hipersalinas de Alicante y Mallorca.

Bacterias halófilas moderadas

El orden *Halanaerobiales* incluye bacilos Gram negativos anaerobios. Este orden reúne la familia *Halanaerobiaceae*, con los géneros *Halanaerobium*, *Halothermothrix* y *Halocella*, y la familia *Halobacteriodaceae*, que incluye los géneros *Halobacteroides*, *Acetohalobium*, *Haloanaerobacter*, *Sporohalobacter* y *Orenia* (Rainey y col., 1995). Excepto *Acetohalobium*, formado por bacterias halófilas extremas, todos agrupan a bacterias halófilas moderadas.

Otros representantes anaerobios se incluyen en los géneros *Clostridium* (Fendrich y col., 1990), *Desulfohalobium* (Ollivier y col., 1991), *Desulfotomaculum* (Tardy Jacquenod y col., 1998) y *Desulfovibrio* (Caumette y col., 1991a), entre otros. También hay microorganismos fotosintéticos anoxigénicos, entre ellos *Chromatium* (Caumette y col., 1988), *Ectothiorhodospira* (Oren y col., 1989) y *Thiocaspa* (Caumette y col., 1991b).

En relación a los microorganismos aerobios, hay bacterias halófilas moderadas que se encuadran en géneros que agrupan únicamente especies halófilas moderadas, aunque la mayoría de las especies forman parte de géneros que incluyen también bacterias marinas (halófilas débiles) y en algunos casos bacterias no halófilas (Ventosa y col., 1998).

Con respecto a las bacterias Gram positivas, excepto el género *Bacillus*, el resto de géneros incluye sólo microorganismos con requerimientos salinos. Estos géneros son *Salibacillus*, *Gracibacillus*, *Halobacillus*, *Marinococcus*, *Nesterenkonia*, *Salinicoccus* y *Tetragenococcus*. La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de Gram positivos de bajo contenido en G+C, excepto *Nesterenkonia halobia* que se incluye en los de alto contenido en G+C (Mota y col., 1997).

Los representantes Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos parecen ser mucho más frecuentes en los ambientes hipersalinos (Quesada y col., 1982; del Moral y col., 1987; Martínez-Cánovas y col., 2004a). La familia *Halomonadaceae* (Franzmann y col., 1988), que se incluye a su vez en la clase γ -*Proteobacteria*, incluye tres géneros de bacterias halófilas, *Halomonas* (Vreeland y col., 1980; Dobson y Franzmann, 1996; Ventosa y col., 1998), *Chromohalobacter* (Ventosa y col., 1989) y *Cobetia* (Arahal y col., 2002a), junto a *Zymobacter* (Dobson y Franzmann, 1996), que no presenta requerimientos salinos.

Uno de los grupos de microorganismos halófilos moderados más ampliamente distribuido en las aguas y suelos salinos, independientemente de su situación geográfica, lo constituyen los miembros del **género *Halomonas***. Las especies de dicho género son bacilos quimioheterótrofos Gram negativos, catalasa positivos y no formadores de esporas. Tienen un metabolismo respiratorio y utilizan el oxígeno como último aceptor de electrones, aunque algunos de ellos crecen en anaerobiosis en presencia de nitrato. Las especies del género *Halomonas* no constituyen un grupo monofilogenético; estudios recientes han demostrado que se pueden distinguir varios grupos filogenéticos con especies de líneas evolutivas diferentes como por ejemplo *H. marisflavi* (Arahal y col., 2002b). Desde el punto de vista fenotípico, el género *Halomonas* es también heterogéneo. En los últimos años se ha podido demostrar que las especies de este género pueden dividirse en tres grupos según la capacidad de producir ácidos de los azúcares y su versatilidad nutricional (Mata y col., 2002).

En total, el género *Halomonas* está formado por **35 especies**, la mayoría halófilas moderadas, aunque también se encuentran algunas halotolerantes como la propia especie tipo *H. elongata* (Dobson y Franzmann, 1996; Vreeland y col., 1980), *H. halodurans* (Hebert y Vreeland, 1987) y *H. meridiana* (James y col., 1990). Este género engloba microorganismos haloalcalófilos como *H. pantellerensis* (Romano y col., 1996) o *H. campisalis* (Mormille y col., 1999), bacterias desnitrificantes como *H. halodenitrificans* (Robinson y Gibbons, 1952), bacterias productoras de enzimas como *H. elongata* (Vreeland y col., 1980) y bacterias productoras de EPS entre las que destacan *H. eurihalina* (Quesada y col., 1990), *H. maura* (Bouchotroch y col., 2001), *H. anticariensis* (Martínez-Cánovas, 2004b), *H. ventosae* (Martínez-Cánovas, 2004c), la recientemente descrita *H. almeriensis* (Martínez-Checa y col., 2005a) y la cepa CRSS de *Halomonas* (Poli y col., 2004). También se incluyen bacterias de muy diversa procedencia como *H. alimentaria*, aislada de alimentos fermentados (Yoon y col., 2002), *H. muralis*, aislada de biofilms microbianos procedentes de pinturas murales y paredes (Heyrman y col., 2002) y *H. halocynthiae*, aislada de las branquias del invertebrado marino *Halocynthia aurantium* (Romanenko y col., 2002). Muchas de las especies del género *Halomonas*, y en general, muchas bacterias halófilas moderadas son productoras de enzimas hidrolíticas como amilasas, DNAsas, lipasas, proteasas y pululanasas (Sánchez-Porro y col., 2003). En la actualidad se continúan aislando y caracterizando nuevos microorganismos halófilos moderados, por lo que es probable que este género sufra en el futuro nuevas reordenaciones.

Recientemente, el grupo de investigación Exopolisacáridos Microbianos, ha descrito dos nuevos géneros de bacterias halófilas moderadas, pertenecientes a la clase α -*Proteobacteria*, *Salipiger* (Martínez-Cánovas y col., 2004d), con una única especie, *Salipiger mucosus*, y *Palleronia* (Martínez-Checa y col., 2005b), que también incluye sólo a la especie *Palleronia marisminoris*. Ambas especies incluyen bacilos quimioheterótrofos Gram negativos inmóviles, con un metabolismo aerobio estricto, baja versatilidad nutricional, y capacidad de producir exopolisacáridos.

Tabla 1. Miembros del género *Halomonas*.

TAXÓN	REFERENCIA
<i>Halomonas alimentaria</i>	Yoon y col., 2002
<i>Halomonas almeriensis</i>	Martínez-Checa y col., 2005a
<i>Halomonas anticariensis</i>	Martínez-Cánovas y col., 2004b
<i>Halomonas aquamarina</i>	ZoBell y Upham, 1944; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas axialensis</i>	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas boliviensis</i>	Quillaguamán y col., 2004
<i>Halomonas campaniensis</i>	Romano y col., 2005
<i>Halomonas campisalis</i>	Mormile y col., 1999
<i>Halomonas cupida</i>	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas desiderata</i>	Berendes y col., 1997
<i>Halomonas elongata</i>	Vreeland y col., 1980
<i>Halomonas eurihalina</i>	Quesada y col., 1990; Mellado y col., 1995
<i>Halomonas halmophila</i>	Dobson y col., 1990
<i>Halomonas halocynthiae</i>	Romanenko y col., 2002
<i>Halomonas halodenitrificans</i>	Robinson y Gibbons, 1952; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas halodurans</i>	Hebert y Vreeland, 1987
<i>Halomonas halophila</i>	Quesada y col., 1984; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas hydrothermalis</i>	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas koreensis</i>	Lim y col., 2004
<i>Halomonas magadiensis</i>	Duckworth y col., 2000
<i>Halomonas marisflavi</i>	Yoon y col., 2001
<i>Halomonas maura</i>	Bouchotroch y col., 2001
<i>Halomonas meridiana</i>	James y col., 1990
<i>Halomonas muralis</i>	Heyrman y col., 2002
<i>Halomonas neptunia</i>	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas organivorans</i>	García y col., 2004
<i>Halomonas pacifica</i>	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas pantellerensis</i>	Romano y col., 1996
<i>Halomonas salina</i>	Valderrama y col., 1991; Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas subglaciescola</i>	Franzmann y col., 1987
<i>Halomonas sulfidaeris</i>	Kaye y col., 2004
<i>Halomonas taeaanensis</i>	Lee y col., 2005
<i>Halomonas variabilis</i>	Fendrich, 1988 Dobson y Franzmann, 1996
<i>Halomonas ventosae</i>	Martínez-Cánovas y col., 2004c
<i>Halomonas venusta</i>	Baumann y col., 1972; Dobson y Franzmann, 1996

Bacterias halófilas débiles

Se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes marinos, denominándose generalmente bacterias marinas. Desde el punto de vista taxonómico, se distinguen géneros de bacterias anaerobias facultativas fermentadoras como *Vibrio*, *Photobacterium*, *Moritella* y *Colwellia*, no fermentadoras o débilmente fermentadoras como *Shewanella* y *Ferrimonas*, y aerobios estrictos, distribuidos en géneros que incluyen microorganismos halófilos y halotolerantes como *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Cycloclasticus*, *Fundibacter*, *Gelidibacter*, *Glaciecola*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Marinospirillum*, *Neptunomonas*, *Oceanospirillum*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* y *Thalassomonas*.

2. LOS POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos son moléculas complejas formadas por unidades simples repetitivas de azúcares, unidas mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a una estructura lineal o ramificada que puede llegar a estar constituida por miles de unidades de monosacáridos.

2.1. Polisacáridos vegetales

Los polisacáridos procedentes de plantas presentan una gran variabilidad en cuanto a su composición química, propiedades y procedencia.

Estos compuestos pueden actuar como material de reserva o almacenamiento, tal es el caso del almidón, goma guar o goma garrofín; contribuir a la integridad estructural del tejido vegetal, entre ellos la celulosa y pectinas, o tener función protectora frente a infecciones bacterianas, papel que desempeñan los exudados vegetales. Respecto a su origen, existen gomas procedentes de semillas, de exudados de plantas o de subproductos vegetales (Lapasin y Pricl, 1995; Doublier y col., 1992).

La principal propiedad de los polisacáridos de origen vegetal es su poder espesante y gelificante, aunque también deben a su capacidad de estabilización de emulsiones o de retención de agua algunas de sus aplicaciones industriales. En la Tabla 2 se relacionan algunos de los principales polímeros de origen vegetal así como su número CEE (denominación asignada por la Comunidad Económica Europea a cada uno de los aditivos alimentarios aceptados según las normas del Codex Alimentarius consistente en el prefijo E seguido de un número de 3 cifras).

La celulosa constituye la cadena polisacáridica por excelencia del reino vegetal y representa la fuente natural renovable más abundante del mundo. Además tiene interés porque a partir de ella se ha obtenido diversos derivados aceptados como aditivos alimentarios. Generalmente, estos derivados proceden de una modificación química de la glucosa por esterificación con objeto de lograr una macromolécula hidrosoluble que le confiera propiedades espesantes (Doublier y col., 1992).

Tabla 2. Principales polisacáridos de origen vegetal (Doublier y col., 1992).

Origen	Polímero	Especie	Aplicación	nº CEE
Extractos de semillas	goma guar	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	Espesante	E412
	goma garrofin	<i>Ceratonia siliqua</i>	Espesante	E410
	goma arábica	<i>Acacia</i> sp.	Estabilizante	E414
Exudados de plantas	goma tragacanto	<i>Astragalus</i> sp.	Espesante	–
	goma karaya	<i>Sterculia ureus</i>	Espesante	–
	goma índica	<i>Anogeissus latifolia</i>	Espesante	–
Extractos de subproductos vegetales	pectinas		Estabilizante	E440 a y b
	metilcelulosa		Espesante	E461
Derivados de la celulosa	carboximetilcelulosa		Espesante	E466
	hidroxipropilcelulosa		Espesante	–
	hidroxipropilmetilcelulosa		Espesante	–

2.2. Polisacáridos de algas marinas

En las algas marinas, los polisacáridos llevan a cabo un papel estructural parecido al de la celulosa en las plantas. Así, estas moléculas confieren a las algas una estructura más flexible que les permite soportar las fuerzas y movimientos a los que se encuentran sometidas por la acción de las corrientes de agua (Lapasin y Pricl, 1995).

Las numerosas especies de algas marinas existentes se clasifican en cinco categorías fundamentales en función de sus pigmentos y cada familia produce polisacáridos de diferentes tipos (Tabla 3).

Tabla 3. Principales familias de algas marinas y polisacáridos producidos por ellas (Doublier y col., 1992).

Familia	Compuestos polisacáridicos
<i>Cyanophyceae</i> (algas verde azuladas)	Glucógeno, Lipopolisacáridos
<i>Xanthophyceae</i> (algas amarillo verdosas)	Laminarano, Celulosa, 1,6 β -D glucanos, Xilanos
<i>Chlorophyceae</i> (algas verdes)	Almidón, Laminarano, Celulosa, Glucomananos, Xilanos
<i>Rhodophyceae</i> (algas rojas)	Agar, Carragenatos, Furcelarano
<i>Phaeophyceae</i> (algas marrones)	Alginatos, Heteroglicanos sulfatados, Laminarano

Desde el punto de vista industrial, cabe destacar a los carragenatos y alginatos producidos por algas rojas y algas marrones, respectivamente. Ambos polisacáridos se emplean en la industria alimentaria gracias a su capacidad para formar geles y estabilizar emulsiones.

En cuanto a los alginatos, estos compuestos se comercializan en forma de sal sódica o como derivado esterificado, como por ejemplo el alginato de propilenglicol (PGA, E405) que se emplea en alimentación y en la industria farmacéutica (Espevick y col., 1993; Clementi, 1997).

Los carragenatos son polisacáridos lineales con un alto contenido en sulfatos, y según el grado de sulfatación se distinguen distintos tipos. La presencia de estos sustituyentes es determinante en la mayoría de sus aplicaciones.

Los polisacáridos sulfatados, muy frecuentes entre los producidos por algas, presentan la capacidad de interferir en la adsorción y penetración de algunos virus, por lo que potencialmente se podrían emplear como antivirales (Nakashima y col., 1987; Bagasra y Lischner, 1988; Hasui y col., 1995; Hayashi y Hayashi, 1996; Hayashi y col., 1996; Witrouw y de Clercq, 1997; Hoshino y col., 1998). En estos polímeros se ha detectado asimismo actividad antitumoral (Itoh y col., 1993; Riou y col., 1996; Haroun-Bouhedja y col., 2000; Patel y col., 2002).

En relación directa con la presencia de grupos sulfato en estas moléculas, también se ha puesto de manifiesto una actividad anticoagulante (Farias y col., 2000; Shanmugam y col., 2001). Por otra parte, estos polímeros sulfatados parecen ser útiles en clínica, concretamente en el tratamiento de la glomerulonefritis (Ogawa y col., 2002) y cuadros de cistitis (Ho y col., 1999).

2.3. Polisacáridos microbianos

Aunque los productos de origen microbiano se han utilizado desde siempre, con el paso de los años los microorganismos han pasado a ser considerados como una fuente renovable de sustancias útiles como los polisacáridos y se han utilizado para la obtención de metabolitos empleados en la industria (Pace, 1987; Tombs y Harding, 1997).

Los polisacáridos microbianos ofrecen una serie de ventajas frente a los de origen vegetal o los biopolímeros de algas. Entre ellas podemos citar la gran versatilidad de los microorganismos para sintetizar polisacáridos neutros o con carga, con una gran variedad en cuanto a su composición y propiedades funcionales, a lo que habría que sumar que su producción es a partir de una fuente renovable e inagotable y puede llevarse a cabo bajo condiciones controladas (Pace, 1987; Tombs y Harding, 1997). Otra ventaja a tener en cuenta es la posibilidad de manipulación genética que permite la obtención de productos de mejores propiedades funcionales e incluso mayor calidad (Van Kranenburg y col., 1999).

Estos polisacáridos de origen microbiano constituyen una alternativa a los polímeros de plantas (pectina, goma guar o goma garrofín) o algas (carragentatos y alginatos) usados tradicionalmente como agentes viscosizantes en la industria y que presentan el inconveniente de no estar disponibles siempre en la calidad y con las propiedades requeridas a causa de la variabilidad estacional (Harvey y Mc Neil, 1998). Ello se ha intentado suplir mediante la modificación química de estas moléculas para mejorar su estructura y propiedades reológicas (Roller y Dea, 1992; Tombs y Harding, 1997); sin embargo el uso de estos compuestos modificados se encuentra muy restringido, de ahí el creciente interés por los biopolímeros producidos por microorganismos.

El interés por el estudio de los polisacáridos microbianos se ha basa en tres razones fundamentales. En primer lugar, los polisacáridos son un componente estructural de las células microbianas, por lo que su investigación tiene un interés teórico. En segundo lugar, los polisacáridos son reconocidos como determinantes antigénicos de la superficie celular de muchas bacterias, con lo que el conocimiento de su estructura es de gran importancia en medicina. Por último, los microorganismos son una fuente de polímeros con propiedades únicas. Estos son argumentos de peso para justificar el estudio de la estructura, propiedades y producción a escala piloto e industrial de estos compuestos (Neu y Lawrence, 1999).

Sin embargo, sólo una pequeña parte de los exopolisacáridos microbianos conocidos son explotados en el ámbito industrial y gozan de un nicho de mercado, bien con aplicaciones exclusivas o compitiendo con otros productos de origen vegetal o sintético (Harvey y McNeil, 1998). Dichos polisacáridos están recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. Principales polisacáridos microbianos de interés comercial.

Poliscáridos	Microorganismos	Referencia
HOMOPOLISACÁRIDOS		
Celulosa	<i>Acetobacter xylinum</i>	Delmer y Amor, 1995 Colquhoun y col., 1995
Curdiano	<i>Acetobacter</i> sp.	Son y col., 2000
	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i>	Harada y col., 1966 Lawford y Rousseau, 1992
	<i>Agrobacterium</i> spp.	Hisamatsu y col., 1978 Nakanishi y col., 1976 Jeanes, 1974
Dextranos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	<i>Lactobacillus</i> spp.	
	<i>Streptococcus</i> spp.	
Elsinano	<i>Elsinoe leucospila</i>	Sutherland, 1990
Escleroglucano	<i>Rhizobium trifolii</i> J60	Ghai y col., 1981
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Sutherland, 1990
	<i>Schizophyllum commune</i>	"
Levano	<i>Bacillus polymixa</i>	Keith y col. 1991
	<i>Erwinia herbicola</i>	"
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Gancel y Novel, 1994a y b
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Shin y col., 1989

Tabla 4. Continuación

Polisacáridos	Microorganismos	Referencia
HETEROPOLISACÁRIDOS		
Ácido hialurónico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kendall y col., 1937
	Estreptococos grupo A y C	"
Alginatos	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Gorin y Spencer, 1996
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Skjak-Braek y col., 1986
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Peciña y Paneque, 1994
Desulfatoheparina	<i>Escherichia coli</i> K5	Linker y Jones, 1964; 1966
Emulsano	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Conti y col., 1994
		Sutherland, 1990
		Rosemberg y col., 1979b
		Zuckerberg y col., 1979
		Kaplan y Rosemberg, 1982
		Kaplan y col., 1985
		Rosemberg y Kaplan, 1987
Esquizofilano	<i>Schizophyllum commune</i>	Marín y col., 1996
		Sutherland, 1990
Gelano	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Misaki y col., 1993
		Lobas y col., 1992
		Pollock, 1993
Rhamsano	<i>Alcaligenes</i> sp.	Sutherland y Kennedy, 1996
Succinoglicano	<i>Sinorhizobium</i> sp.	Ghai y col., 1981
	<i>Agrobacterium</i> spp.	"
	<i>Alcaligenes</i> spp.	"
Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>	Zevenhuizen, 1997
		Lilly y col., 1958
		Jansson y col., 1975
		Melton y col., 1976
		Stankowski y col., 1993
XM6	<i>Enterobacter</i> XM6	Nisbet y col., 1984
Welano	<i>Sphingomonas</i> sp.	Sutherland y Kennedy., 1996
Otros	<i>Rhizobium</i> sp.	Dantas y col., 1994
	<i>Zoogloea ramigera</i>	Stauffer y col., 1980
		Rha y col., 1989
	<i>Azotobacter beijerinckia</i>	Ogawa y col., 1996
	<i>Alteromonas</i> sp.	Bozzi y col., 1996a y b

3. EXOPOLISACÁRIDOS MICROBIANOS

3.1. Concepto de exopolisacárido

Muchos microorganismos producen polisacáridos que son excretados al medio o bien quedan adheridos a la célula en forma de cápsula. El término "exopolisacárido" ha sido ampliamente usado para aquellos polisacáridos localizados en la superficie externa de las células microbianas, entre los que se ha encontrado polímeros de diversa composición química y propiedades físicas. Para designar a este tipo de sustancias se ha acuñado el término EPS, que se usa para hacer referencia a los "polisacáridos extracelulares", "exopolisacáridos" o "exopolímeros" (Wingender y col., 1999).

Los exopolisacáridos que forman cápsulas se encuentran unidos a la superficie de la célula bacteriana mediante interacciones no covalentes, aunque en ocasiones, pueden unirse covalentemente a los fosfolípidos o moléculas de lípido A de la membrana celular (Roberts, 1996). En aquellos casos en los que las uniones del EPS con la célula son débiles, éste se encuentra originando cápsulas periféricas difusas, o bien, es vertido al medio en forma de una sustancia amorfa y mucilaginosa (Costerton y col., 1992; Tombs y Harding, 1997).

Resulta interesante establecer una diferencia entre el término “exopolisacárido” y otros como “glicocálix” o “mucílago”. El término “glicocálix” fue introducido por Costerton y colaboradores (1981) y describe a una sustancia de origen microbiano localizada en la superficie celular; pero que, a diferencia del término EPS, abarca a un complejo de moléculas entre las que se incluyen componentes extracelulares y de la pared bacteriana, de naturaleza polisacáridica o no. De modo similar, en procariotas, el término “mucílago” es más general, y define a aquellos agregados coloidales presentes alrededor de bacterias, que habitan fundamentalmente en ecosistemas acuáticos, constituidos por diversos compuestos entre los que se encuentran los de naturaleza polisacáridica (Leppard, 1995).

La presencia de exopolisacáridos asociados a las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias mucosas en el crecimiento del microorganismo en medio sólido, o bien por un aumento de viscosidad e incluso a veces la formación de un gel en medios líquidos (Sutherland, 1988).

Para la detección y visualización de los exopolisacáridos se utilizan diversas técnicas. Mediante microscopía óptica es posible distinguir estas estructuras utilizando colorantes apropiados teniendo en cuenta la naturaleza aniónica de muchos de estos polisacáridos. En otros casos se realizan tinciones negativas que ofrecen la ventaja de poder distinguir entre los polisacáridos capsulares y aquellos más dispersos. Otras técnicas utilizadas con éxito son la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las metodologías empleadas para llevar a cabo la detección de exopolisacáridos microbianos por cualquiera de las técnicas ha de salvar el problema añadido del alto contenido de agua de estos compuestos (de hasta un 99%), lo cual dificulta la preparación de las muestras (Sutherland, 1994).

3.2. Funciones biológicas

Los polímeros extracelulares producidos por los microorganismos desempeñan múltiples funciones que generalmente se traducen en acciones beneficiosas para los mismos (Chen y col., 1995a,b).

Los exopolímeros intervienen en la **adhesión microbiana a superficies** (Allison y Sutherland, 1987). En medios acuosos se ha descrito la participación de los polisacáridos extracelulares en la adhesión microbiana de bacterias aisladas de agua dulce (Sutherland, 1980) y de bacterias marinas

(Corpe, 1970; Floodgate, 1972), provocando la unión de éstas a un determinado material y su posterior crecimiento en él, o promoviendo la formación de una compleja película viscosa alrededor de las células microbianas. Estas biopelículas o **biofilms** constituyen un entorno dinámico en el que las células bacterianas parecen alcanzar un estado de homeostasis y una óptima organización para hacer uso de todos los nutrientes disponibles (Sutherland, 2001b).

La mayoría de los microorganismos presentes en el cuerpo humano se encuentran adheridos a alguna superficie. Así, el cuerpo de un individuo sano presenta tres tipos principales de superficies a las cuales pueden adherirse las bacterias: mucosas, piel y dientes. Asimismo, las prácticas médicas y quirúrgicas modernas emplean un gran número de materiales tales como catéteres, juntas artificiales y válvulas cardíacas que son susceptibles de sufrir la adhesión bacteriana (Wilson y col., 2002). La formación de biofilms sobre estas superficies es uno de los mayores problemas asociados al uso de estos dispositivos, ya que las biopelículas confieren a los microorganismos una gran resistencia a los antibióticos. Así, la presencia de alginato asociado con Ca^{2+} en *Pseudomonas aeruginosa* y del EPS de *Pseudomonas cepacia* reduce la actividad antimicrobiana de la tobramicina y en menor grado, de la ciprofloxacina frente a estas especies (Mah y col., 2003; Moskowitz y col., 2004). Este hecho tiene importantes implicaciones clínicas en lo que se refiere a tratamientos de infecciones provocadas por microorganismos productores de exopolisacárido, cuya presencia se relaciona con el carácter virulento de los mismos (Allison y Matthews, 1992; Ichimiya y col., 1994; Kumon y col., 1994).

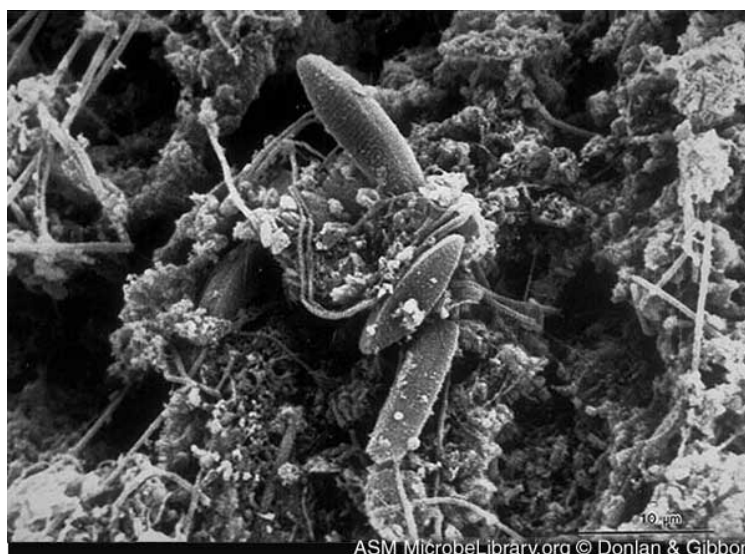


Figura 4. Fotografía de microscopía electrónica de bacterias productoras de EPS en un biofilm (www.asm.org)

De modo similar, los exopolisacáridos pueden promover la adhesión de microorganismos a ciertos materiales específicos (Costerton y col., 1987), como ocurre con *Pseudomonas fluorescens*, con

capacidad de unirse rápidamente a las superficies de acero inoxidable (Hood y Zottola, 1997). Este hecho puede proporcionar a las células el acceso a mayores concentraciones de sustrato y a su vez protección frente a la fagocitosis (Bitton y Marshall, 1980).

Legionella pneumophila es el agente causal de la legionelosis, una enfermedad respiratoria aguda, que se produce cuando la bacteria penetra hasta los alvéolos pulmonares introduciéndose en el citoplasma de las células respiratorias produciendo su lisis. *Legionella* vive en ambientes acuáticos naturales de agua dulce (Fliermans y col., 1981) y tiende a colonizar los sistemas de distribución de agua que utilizan para su funcionamiento las torres de refrigeración, los condensadores evaporativos, aparatos de enfriamiento evaporativo, humectadores, etc (Martín Bourgon y Pelaz, 1992). En estos casos, si estas instalaciones funcionan produciendo aerosoles, los microorganismos se dispersan transportados por las pequeñas partículas acuosas (Ishimatsu y col., 2001), y las que tienen un tamaño inferior a 5 μ pueden penetrar en los alvéolos pulmonares, infectando a las personas que respiran el aire contaminado.

Legionella persiste en los sistemas hídricos en los que encuentra temperaturas adecuadas para su reproducción, nutrientes y protección, especialmente en los biofilms de las torres de refrigeración (Rogers y Keevil, 1992; Wright y col., 1992), preferentemente si existe presencia de determinados protozoos (Barbaree y col., 1986; Nahapetian y col., 1991) con los que se comporta de forma endobiótica (Winiecka-Krusnell y Linder, 1999) y frente a los que puede desarrollar diferentes mecanismos de entrada y salida celular (Harb y col., 1998; Cirillo y col., 2002).

La legionelosis se pone de manifiesto en forma de casos esporádicos, pero también de brotes epidémicos. Ello ha condicionado que desde 1996 sea considerada como enfermedad de declaración obligatoria en España, donde se han producido importantes brotes en los últimos años.

Para la desinfección de las torres de refrigeración, recomendada al menos dos veces al año, existen diversos métodos, ninguno de los cuales asegura la eliminación total de *Legionella*. La mayoría de estos métodos son eficaces a corto plazo, pero con el tiempo van perdiendo efectividad debido a las limitaciones asociadas a cada método (Lin y col., 1998). En cualquier caso, antes de proceder a la desinfección de este tipo de instalaciones, es imprescindible efectuar una limpieza mecánica de las mismas, para combatir la protección que la suciedad y los biofilms proporcionan a *Legionella*, lo que implica una mayor demanda de biocida, y dificulta el contacto entre éste y el microorganismo.

En la industria alimentaria, la formación de biofilms es también un proceso que preocupa, ya que puede llegar a causar serios problemas higiénicos y grandes pérdidas económicas (Carpentier y Cerf, 1993); por tanto, resulta fundamental encontrar formas de prevenir y/o eliminar la aparición de biofilms en cañerías, torres de refrigeración, sistemas de lubricación, etc (Meyer, 2003). Una estrategia para prevenir la formación de biofilms es la desinfección regular de todas las instalaciones, antes de que el biofilm aparezca. En el caso de que la biopelícula ya haya aparecido, la superficie afectada debe tratarse con un

biocida suficientemente agresivo. El cloro es el agente de elección en la lucha contra la formación de biofilms (Alasri y col., 1992), ya que no solo mata a los microorganismos, también elimina los exopolisacáridos de las superficies afectadas debido a su carácter oxidante, por lo que la adhesión de nuevos microorganismos y la consiguiente formación de nuevos biofilms está menos favorecida. Otra manera de luchar contra los biofilms bacterianos, es la utilización de superficies que impiden la adhesión microbiana, y por tanto la aparición de estas biopelículas. En cualquier caso, ninguna de estas estrategias es efectiva al 100%, y es que cada biofilm es casi único, por lo que en cada caso habrá que estudiar la posible solución del problema, con una sola estrategia o con la combinación de varias (Meyer, 2003).

Los EPS participan en **procesos de morfogénesis**, entre ellos, la formación de cuerpos fructificantes de mixosporas, en las cuales el exopolisacárido parece tener una doble función: como lubricante de las células vegetativas y posterior adhesivo para facilitar la cohesión entre éstas (Sutherland, 1988).

Otra función de los exopolisacáridos microbianos es la de **proteger la célula bacteriana frente a la desecación y fluctuaciones potenciales del agua**, ya que pueden actuar como reservorios de agua en condiciones drásticas (Robertson y Firestone, 1992; Whitfield y Valvano, 1993) y ralentizan la desecación de las bacterias del suelo o de las hifas de los hongos (Evans y col., 1991; Whitfield y Valvano, 1993). A ello hay que añadir **su efecto protector frente a agentes antimicrobianos y cationes metálicos tóxicos**. En función de la naturaleza iónica del exopolisacárido, éste será eficaz para unirse a un determinado tipo de agente antimicrobiano. Así lo demuestran los estudios realizados con el alginato producido por *Pseudomonas aeruginosa* y el gelano de *Pseudomonas elodea* frente a gentamicina (Kumon y col., 1994). En cuanto a la capacidad de adsorber cationes tóxicos como Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{+} y Sr^{2+} , existen multitud de exopolisacáridos con esta propiedad, que pueden aplicarse en biorremediación a la vez que son agentes protectores frente a estos compuestos (Geddie y Sutherland, 1993).

Los exopolímeros bacterianos pueden actuar como una **barrera funcional para las células del sistema inmune**, aumentando la resistencia frente a mecanismos mediados por anticuerpos y complemento. De ahí que muchos microorganismos capsulados deban su patogenicidad a la presencia de una cápsula polisacáridica alrededor de la célula. Entre ellos podemos citar a *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae* (De Vuyst y Degeest, 1999; Wingender y col., 1999).

En muchas de las bacterias patógenas de plantas, la producción de polisacárido resulta crucial y en gran medida determinante en el **proceso de infección de la planta**. Concretamente, el exopolisacárido excretado por el microorganismo, en forma de un fluido viscoso, puede alterar el suministro del agua y nutrientes solubles para la planta y con ello disminuir su biodisponibilidad (Sutherland, 2001a). En este sentido, se han realizado estudios con *Xanthomonas campestris* var. *phaseoli*. En el caso de *Sinorhizobium meliloti*, el EPS juega un papel importante en el proceso de

simbiosis con la planta así como en la formación de nódulos y por lo tanto en la fijación de N₂ (Keller y col., 1988; Kannerberg y Brewin, 1994; González y col., 1996).

Los exopolisacáridos microbianos son utilizados en casos muy limitados como **reserva de nutrientes y energía**. La mayor parte de las bacterias productoras no son capaces de catabolizar el EPS que ellas mismas producen (Cerning, 1990), sin embargo estos compuestos pueden favorecer la retención de nutrientes. De hecho, la acumulación en la matriz del EPS de nutrientes que posteriormente pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía, es un proceso común entre los microorganismos (Freeman y col., 1995; Wolfaardt y col., 1995); por ejemplo, pueden unir proteínas cuya posterior hidrólisis puede constituir un suministro de aminoácidos y péptidos necesarios para el crecimiento bacteriano.

3.3. Composición química

Los EPS están compuestos principalmente por carbohidratos, formando homo o heteropolímeros, que además pueden contener diversos sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Los homopolisacáridos son EPS compuestos por un sólo tipo de monosacárido, aunque difieran en su estructura y propiedades. Estos EPS pueden ser de origen bacteriano como el curdlano o fúngico como el escleroglucano. Los heteropolisacáridos presentan en su estructura de 2 a 5 monosacáridos diferentes y son mayoritarios dentro de los EPS microbianos.

3.3.1. Carbohidratos

Existe una gran diversidad entre los carbohidratos constituyentes de los polisacáridos de origen microbiano. En la mayor parte de los EPS bacterianos están presentes los azúcares D-glucosa, D-galactosa y D-manosa; y se encuentran también con gran frecuencia los monómeros L-fucosa, L-ramnosa y las 6-desoxihexosas (Lindberg, 1990).

La ausencia generalizada de pentosas en los polímeros producidos por organismos procariontes puede ser una propiedad característica de éstos y una clara distinción con los productos procedentes de eucariotas. No obstante, se han encontrado algunas excepciones, entre ellas las cianobacterias (De Philippis y col., 1993) y más recientemente algunos polisacáridos producidos por especies de *Sinorhizobium* entre cuyos monosacáridos se encontraron D-ribosa y ácido D-riburónico (Hisamatsu y col., 1997).

Además de los monosacáridos más comunes que se han citado, algunos polisacáridos pueden contener azúcares más raros, entre los que podemos citar las L-hexosas o la glucosa y galactosa en su forma furanosa. Dentro de este grupo de azúcares menos extendidos se encuentran también los aminoazúcares de algunos polisacáridos de *Escherichia coli*. La presencia de N-acetilaminoazúcares también se ha puesto de manifiesto en determinados casos, aunque estas moléculas no han sido

detectadas en ninguno de los exopolisacáridos microbianos de interés industrial o comercial. Entre los más comunes se encuentran las N-acetilhexosaminas, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina; siendo más inusuales la N-acetil-manosamina y otros aminoazúcares como la fucosamina y talosamina. El polímero extracelular de *Staphylococcus aureus* cepa M contiene 2-cetoamido-desoxi-D-fucosa y ácido acetamida-2-desoxi-D-galacturónico (Okutani y Tandavanitj, 1991). Otros EPS como los extraídos de los géneros *Xanthomonas* y *Klebsiella* entre otros, carecen de aminoazúcares.

La mayor parte de los exopolisacáridos microbianos son de naturaleza polianiónica, debido a la presencia en muchos de ellos de ácidos urónicos, componentes habituales de las moléculas polisacáridicas. El más frecuentemente encontrado es el ácido D-glucurónico, mientras que en menor número de polímeros se han detectado los ácidos D-manurónico y D-galacturónico. Aún más inusual es el ácido L-idurónico, descrito en el EPS de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Por último habría que citar a los ácidos hexosaminurónicos, dado que se han venido identificando en bastantes exopolímeros bacterianos (Sutherland, 2001a).

Aunque la mayor parte de los exopolisacáridos contienen un solo tipo de ácido urónico, los alginatos bacterianos representan una excepción al encontrarse en ellos ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico. De igual forma, en algunos polisacáridos de *Rhizobium* se ha encontrado ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (Lindberg, 1990). Esta singular característica también se ha observado en polisacáridos aislados de bacterias marinas (Guezennec y col., 1994).

Un último azúcar bastante inusual encontrado como constituyente de algunos exopolisacáridos microbianos es el ácido cetodeoxioctónico (KDO), componente universal de la porción core o central de los lipopolisacáridos de la pared de bacterias Gram negativas. Ha sido identificado en varios polisacáridos extracelulares de cepas de *Escherichia coli* (Sutherland, 1990).

3.3.2. Sustituyentes orgánicos

En la composición de los EPS microbianos aparecen diferentes sustituyentes unidos mediante enlace éster o cetal (Tabla 4). Entre los primeros se encuentran los **restos acetato**, que no contribuyen a la carga total de la macromolécula, aunque están implicados en su conformación molecular. Además se han encontrado otros grupos unidos de igual forma como propionato, glicerato, succinato o 3-hidroxibutanoato. Estos sustituyentes contribuyen, como el acetato, a la naturaleza lipofílica del polisacárido, lo cual le permitirá ser útil para determinadas aplicaciones industriales. El succinoglicano producido por especies de *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* presenta además de sustituyentes O-acetato y piruvato, grupos O-succinato (Sutherland, 1999; 2001a).

En muchos exopolisacáridos, los grupos acetilo se encuentran en proporción estequiométrica con los monosacáridos presentes, aunque no siempre ocurre así. En el caso concreto de los alginatos

bacterianos o xantano, un determinado monosacárido puede encontrarse múltiplemente acetilado, lo cual determina un contenido total de acetilos bastante elevado. Los alginatos presentan del orden del 15-20% (p/p) de acetilos y únicamente se encuentran acetilados los restos de ácido manurónico.

Los **restos piruvato** se unen mediante enlace cetil y junto a los **ácidos urónicos** confieren naturaleza aniónica al exopolisacárido. Normalmente estos restos están presentes en proporción estequiométrica con los azúcares integrantes del polímero y usualmente se encuentran unidos a una hexosa neutra. De forma ocasional se han localizado unidos a un resto urónico o una metilpentosa; este último caso en un EPS de *Klebsiella aerogenes* (Lindberg, 1976).

Si bien lo más común es que la carga aniónica total de la molécula polisacáridica se deba a la presencia de ácidos urónicos y restos piruvato, en algunos casos el piruvato es el único responsable de este carácter, lo cual ha podido ser constatado para los polisacáridos de algunas especies de *Escherichia coli*, *Sinorhizobium* y el material polimérico producido por *Zoogloea ramigera* (Sutherland, 1994).

Por último, entre los sustituyentes orgánicos habría que citar algunos **aminoácidos**. Así, se ha detectado la presencia de serina o ácido L-glutámico en exopolisacáridos de *Escherichia coli* K40 y *Klebsiella aerogenes* tipo 82, respectivamente. En otros exopolímeros se ha puesto de manifiesto la presencia de taurina (Sutherland, 1994). Más recientemente, se ha descrito un heteropolisacárido de naturaleza ácida producido por una especie de *Paenibacillus*, en el que se ha detectado la presencia de tirosina (Weon-Taek y col. 1999).

3.3.3. Sustituyentes inorgánicos

Los sustituyentes inorgánicos cuya presencia se encuentra más extendida, son los grupos **fosfato**. Muchos de estos exopolisacáridos fosforilados se asemejan a los ácidos teicoicos de la pared celular de bacterias Gram positivas. Estos sustituyentes no se han encontrado en polisacáridos producidos por bacterias Gram negativas como *Klebsiella*, *Sinorhizobium*, *Xanthomonas* o *Pseudomonas*, aunque sí se han identificado en polímeros de *Escherichia coli* así como en el EPS de *Streptococcus pneumoniae* (Sutherland, 1994).

Aunque hasta hace unos años se pensaba que la presencia de **grupos sulfato** era exclusiva de los polisacáridos de organismos eucariotas, se ha demostrado la existencia de estos grupos en algunos exopolisacáridos microbianos. Así, además de estar presentes en polímeros de ciertas especies de cianobacterias, también se han encontrado en el polisacárido producido por la arquea halófila *Haloferax mediterranei*, que se caracteriza por una elevada masa molecular, además de por originar soluciones viscosas, presentando un 6% (p/p) de sulfatos (Antón y col., 1988; Rodríguez-Valera y col., 1991) así como en un EPS de *Staphylococcus epidermis* (Arvaniti y col., 1994). Algunas bacterias marinas del

género *Pseudomonas* (Matsuda y col., 1993) también se caracterizan por la detección de sulfatos en sus exopolisacáridos.

Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto la presencia de elevadas cantidades de sulfato en los exopolisacáridos producidos por tres bacterias halófilas moderadas como son *Halomonas eurihalina* (Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998), *Halomonas maura* (Arias y col., 2003; Bouchotroch y col., 2001) y *Halomonas ventosae* (Martínez-Cánovas y col., 2004c).

Tanto los grupos sulfato como fosfato se unen a la molécula del polisacárido mediante enlaces tipo éster (Lindberg, 1990).

Los cationes también forman parte de la estructura de los EPS y se encuentran especialmente en polímeros polianiónicos. Así, algunos alginatos llevan fuertemente unidos cationes divalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+} ; mientras que el polisacárido XM6 de *Enterobacter* presenta cationes mono y bivalentes como Na^+ y Ca^{2+} . Estos iones quedan adheridos al polisacárido durante su producción, pero pueden ser desplazados por procesos tales como intercambio iónico, electrodiálisis, etc.

Tabla 5. Sustituyentes orgánicos e inorgánicos más frecuentes de los exopolisacáridos microbianos (Sutherland, 2001a).

Sustituyentes	Unión	Microorganismo
ORGÁNICOS		
Acetato	Éster	<i>Klebsiella</i> spp.
Glicerato	Éster	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Hidroxibutanoato	Éster	<i>Rhizobium trifolii</i> , <i>R. leguminosarum</i> .
Propionato	Éster	Algunas cepas de <i>Escherichia coli</i>
Piruvato	Cetal	<i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Klebsiella</i> spp.
Succinato	Éster	<i>Rhizobium</i> spp., <i>Agrobacterium</i> spp.
INORGÁNICOS		
Fosfato	Éster	Bacterias Gram positivas Cianobacterias, <i>Haloferax mediterranei</i> ,
Sulfato	Éster	<i>Halococcus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Halomonas</i> spp.

3.4. Estructura

Las causas de la enorme variedad de exopolisacáridos son la diversidad de las unidades básicas que los constituyen, la cantidad en que están presentes y los distintos tipos de enlaces que determinan la configuración final.

Los **homopolisacáridos** se pueden clasificar en función del tipo de enlace en β -D-glucanos y α -D-glucanos. Los β -D-glucanos son polímeros lineales formados por moléculas neutras unidas mediante un sólo tipo de enlace (curdlano y celulosa) y polímeros que presentan ramificaciones y dos tipos de enlaces (escleroglucano y levano). Los α -D-glucanos son polímeros que presentan ramificaciones en sus estructuras y tres o más tipos de uniones (dextransos).

Los **heteropolisacáridos** están constituidos por unidades repetidas que varían en cuanto a naturaleza y tamaño (disacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, etc.). En las unidades repetidas, cada hexosa puede presentar un enlace de tipo α o β , o los dos a la vez (heparina), además de estar presente en su forma piranósica o furanósica. El punto de enlace de los azúcares varía también entre las posiciones 2, 3, 4 ó 6.

3.4.1. Homopolisacáridos

3.4.1.a. β -D-glucanos

- **Celulosa**

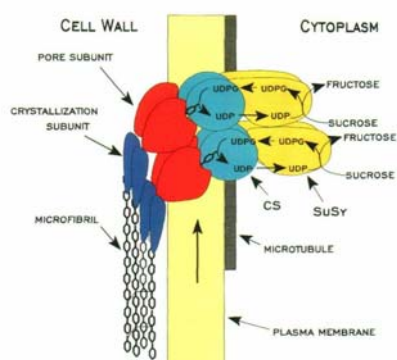


Figura 5. Celulosa sintetasa

Tradicionalmente se ha considerado como un polímero exclusivo de plantas y algas, pero hay algunas bacterias Gram negativas como *Acetobacter xylinum* que también lo producen (Colquhoun y col., 1995; Delmer y Amor, 1995). Este exopolisacárido, constituido por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces β -1,3, se excreta al medio y rápidamente se agrega formando microfibrillas (Sutherland, 1988), como puede apreciarse en la Figura 5. La celulosa bacteriana es un producto de alto valor por sus aplicaciones y usos específicos (Ross y col., 1991; Vandamme y col., 1998). Comercialmente, se produce en la forma llamada l-celulosa, polímero de alta pureza y libre de lignina.

- **Curdano**

Un gran número de bacterias, incluyendo *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (Harada y col., 1966), distintas especies del género *Agrobacterium* (Nakanishi y col., 1976; Hisamatsu y col., 1978) y la cepa *Rhizobium trifolii* J60 (Ghai y col., 1981) sintetizan este polímero.

El curdlano presenta una estructura simple con una baja masa molecular y enlaces β -1,3 entre las moléculas de D-glucosa que lo constituyen. Es insoluble en agua y forma geles en solución (Harada y col., 1966). Lawford y Rousseau (1992) patentaron la producción de curdlano por *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (ATCC 31749), utilizando una fermentación aeróbica seguida de una limitación de nitrógeno asimilable.

- **Escleroglucano**

Con este nombre se designa a una serie de polisacáridos neutros producidos por varias especies de hongos, particularmente del género *Sclerotium* (Sutherland, 1990). Su estructura primaria es una cadena lineal de unidades de D-glucosa unidas mediante enlace β -1,3 con cadenas ramificadas de un único monómero de D-glucosa, cada 3 unidades azucaradas de la cadena principal. La diferencia entre la gran variedad de β -D-glucanos fúngicos radica en el número de ramificaciones y en la longitud de las cadenas laterales. La masa molecular de la mayor parte de ellos se encuentra entre $3,2 \times 10^5$ y 1×10^6 Da.

3.4.1.b. α -D-glucanos

- **Dextrano**

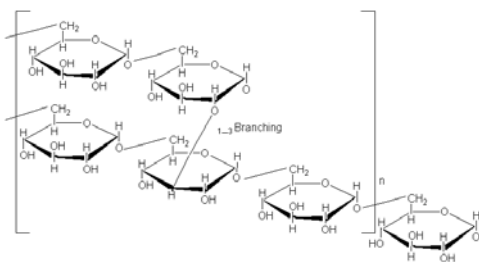


Figura 6. Estructura de los dextranos

Los dextranos están constituidos por residuos de D-glucosa unidos por enlaces α -1,6 en su mayoría, aunque hasta un 50% pueden ser enlaces α -1,2, α -1,3 y α -1,4 (Figura 6). Los que se comercializan contienen principalmente enlaces α -1,6. La mayoría son exopolímeros de alto peso molecular y su producción industrial se realiza principalmente a partir de *Leuconostoc mesenteroides* (Jeanes, 1974), que origina un EPS con un 95% de enlaces α -1,6 y un 5% de uniones α -1,3. Tiene una masa molecular aproximada de $6-9 \times 10^5$ Da.

- **Elsinano y Pululano**

El elsinano es un exopolisacárido producido por *Elsinoe leucospila* (Sutherland, 1990) muy parecido estructuralmente al pululano, exopolisacárido sintetizado por el hongo dimórfico *Aureobasidium pullulans* compuesto por unidades repetidas de maltotriosa unidas por enlaces α -1,6. La única diferencia entre ellos radica en el tipo de enlace mediante el que se unen los monosacáridos ya que en el elsinano encontramos enlaces α -1,3. Recientemente se ha estudiado la producción de pululano a partir de residuos hidrolizados de almidón de patata (Barnett y col., 1999). Otras especies de hongos, como *Tremella mesenterica*, originan unos productos muy similares (de Baets y col., 2002).

3.4.2. Heteropolisacáridos

- **Alginatos bacterianos**

La producción de alginato no es exclusiva de las algas. Entre las bacterias capaces de sintetizar polímeros del tipo de los alginatos (alginatos bacterianos) podemos citar a *Pseudomonas aeruginosa* (Linker y Jones, 1964; 1966) y *Azotobacter vinelandii* (Gorin y Spencer, 1966). Más recientemente se ha descrito la producción de este exopolisacárido en *A. chroococcum* (Peciña y Paneque, 1994), *P. fluorescens* y *P. putida* (Conti y col., 1994) y otras especies de *Pseudomonas*, incluidas algunas patógenas de plantas (Fett y col., 1986; Osman y col., 1986).

Los alginatos bacterianos se caracterizan por presentar una estructura muy irregular, sin una unidad repetitiva determinada. En su molécula no existen monosacáridos neutros, encontrándose compuestos por ácido D-manurónico (M) (unidos por enlaces β -1,4) y ácido L-gulurónico (L) (unidos por enlaces α -1,4) (Clare, 1993). A lo largo de la cadena se localizan tres tipos de secuencias: de ácido D-manurónico, de ácido L-gulurónico y mixtas. Es bastante frecuente que los restos manosil se encuentren acetilados, siendo la presencia de los grupos O-acetilo una característica de los alginatos bacterianos que les distingue de los producidos por algas (Sime, 1990). Precisamente el grado de acetilación y el contenido en ácido D-manurónico y L-gulurónico es lo que determina las diferencias estructurales y funcionales de los distintos alginatos bacterianos (Sutherland, 1994; Clementi y col., 1997).

- **Emulsano y polisacáridos relacionados**

Acinetobacter calcoaceticus, bacteria Gram negativa degradadora de hidrocarburos, produce exopolisacáridos con alta capacidad emulsionante. Esta propiedad es característica de la especie pues se han descrito en biopolímeros de distintas cepas de la misma (Rosemberg y col., 1979a).

En concreto, la cepa *A. calcoaceticus* RAG-1 produce un heteropolímero aniónico (emulsano), que contiene N-acetil-D-galactosamina, ácido N-acetil-aminurónico y un aminoazúcar (Zuckerberg y col., 1979). Este emulsano, además de una potente actividad emulsionante, tiene la capacidad de fijar uranio.

En el estudio de los polímeros similares al emulsano producidos por otras cepas de *A. calcoaceticus*, como la cepa BD413 y la BD4, se comprobó que la distinta actividad emulsionante de estas moléculas no era debida a diferencias en las estructuras químicas, ya que estas moléculas son muy similares. No obstante, la presencia en el emulsano de ácidos grasos de elevado peso molecular unidos covalentemente parece estar relacionada con su capacidad emulgente (Kaplan y col., 1987).

- **Xantano**

Este polímero, el de origen microbiano de mayor interés, es de naturaleza aniónica y es secretado exocelularmente por *Xanthomonas campestris* (Lilly, 1958). Su estructura primaria se basa en una cadena lineal de moléculas de D-glucosa unidas por enlace β -1,4. En la posición C₃ de los residuos D-glucosídicos alternos existe una cadena lateral trisacárida constituida por ácido D-glucurónico y D-manosa en proporción molar 1:2 (Jansson y col., 1975; Melton y col., 1976). Esta ramificación es una cadena del tipo β -D-manosa-(1,4)- β -D-glucurónico-(1,2)- α -D-manosa. La manosa terminal presenta grupos piruvato en las posiciones 4 y 6; y la unidad de manosa interna se encuentra acetilada en la posición 6. El grado de acetilación y piruvatación de la molécula puede variar dependiendo de la cepa de *X. campestris* productora así como de las condiciones de producción. La estructura del xantano está representada en la Figura 7.

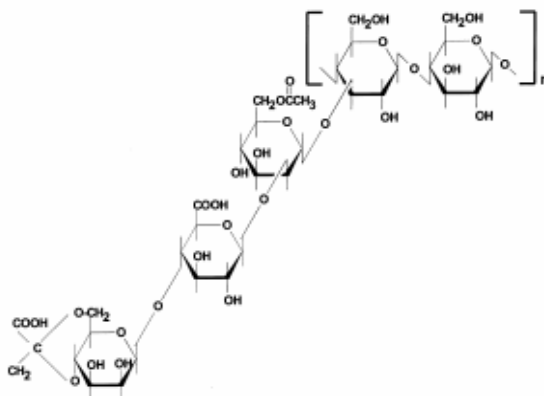


Figura 7. Estructura química del xantano

- **Gelano y polímeros relacionados**

Este exopolisacárido producido por *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 (Pollock, 1993), antes *Pseudomonas elodea* (Lobas y col., 1992), es un heteropolisacárido lineal constituido por D-glucosa, ácido D-glucurónico y L-ramnosa en proporción 2:1:1; siendo la unidad de repetición un tetrasacárido (Figura 8). A lo largo de la cadena principal están presentes grupos O-acetilo y O-L-glicerilo. La presencia o no de los restos acetilo en la molécula es crucial ya que determina las propiedades del gel originado por este polímero. Otros polímeros relacionados estructuralmente con el gelano son el welano y el rhamsano (Sutherland y Kennedy, 1996).

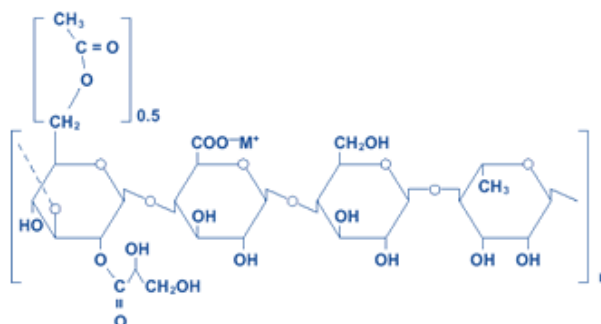


Figura 8. Molécula de gelano

- **Exopolisacáridos de *Halomonas eurihalina***

El EPS **V2-7** es producido por la cepa F2-7 de *Halomonas eurihalina* (Quesada y col., 1993). Es un heteropolisacárido con carácter ácido cuya producción y composición química varía en función de los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Béjar y col., 1996). Sus soluciones acuosas presentan una viscosidad intermedia bastante termoestable. Esta propiedad, junto con la capacidad de formar verdaderos geles a pH ácido y su poder emulgente, le confiere unas cualidades óptimas para diversos usos industriales (Calvo y col., 1995). Respecto a su composición química, está formado por glucosa, manosa y ramnosa en proporción 2,9:2,5:1. Es importante resaltar la presencia en este polímero de un porcentaje superior al 10% (p/v) de restos sulfato (Béjar y col., 1996; 1998), algo inusual entre los polisacáridos microbianos. Su composición química podría ser responsable de su efecto inmunomodulador; de hecho, se ha comprobado su capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T humanos extraídos de sangre periférica cuando se utiliza como estímulo antigénico de anticuerpo monoclonal AntiCD3 (Pérez y col., 2000).

El exopolisacárido **H96** es producido por la cepa H96 de *Halomonas eurihalina* (Quesada y col., 1993), este polímero es obtenido con un rendimiento de 1,3 g EPS/l y origina soluciones de viscosidad intermedia a neutro (pH=7). Sin embargo, a pH ácido (pH=3) presenta un comportamiento similar al

polímero V2-7, produciéndose un incremento de la viscosidad hasta unos 30.000 mPa.s, lo que ocasiona la formación de un gel (Béjar y col., 1998). La máxima viscosidad se obtiene en presencia de KCl 10^{-4} M (Calvo y col., 1998). Otra propiedad de este polímero es su poder emulgente sobre hidrocarburos y otras sustancias lipídicas (Calvo y col., 1998). En su composición también se ha detectado la presencia de restos sulfato además de un elevado contenido de ácidos urónicos (Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998).

- **Maurano, exopolisacárido producido por *Halomonas maura***

El maurano (Arias y col., 2003) es producido por *Halomonas maura* cepa S-30 (Bouchotroch y col., 2001). Se caracteriza por su poder viscosizante y propiedades emulgentes (Bouchotroch y col., 2000). Así, sus soluciones acuosas son altamente viscosas y muestran un comportamiento pseudoplástico, viscoelástico y tixotrópico. La viscosidad se mantiene estable a un amplio rango de valores de pH (3-11), tras procesos de congelación y descongelación y en presencia de sacarosa, sales y surfactantes. Presenta una alta capacidad de captación de plomo y otros cationes, lo que permitiría su uso potencial en procesos de biorremediación. De su composición química destaca su alto contenido en restos sulfato. Su masa molecular es de $4,7 \times 10^6$ Da, y está compuesto por manosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico en proporciones 34,8%, 14%, 29,3% y 21,9% (p/p), respectivamente.

Otros heteropolisacáridos microbianos de diversa procedencia son:

Polisacáridos capsulares producidos por *Burkholderia pseudomallei*. Se trata de tres polisacáridos diferentes sintetizados por *B. pseudomallei*. En medios sin glicerol se producen los tipos CP1a y CP1b, tratándose de un glucano con uniones 1-4 el primero y un polímero de galactosa y ácido 3-desoxi-D-manooctulosómico el segundo. En medios con glicerol al 5% (p/v) se produce el tercer polisacárido, el CP2. Éste presenta en su composición galactosa, ramnosa, manosa, glucosa y ácido urónico en proporciones 3:1:0,3:1:1 (Kawahara y col., 1998).

Polisacárido de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. Es un heteropolisacárido compuesto por galactosa y glucosa en proporción 2:3 (Van Casteren y col., 2000).

Polisacárido producido por especies del género *Pseudomonas*. En 1996, Watanabe y colaboradores identificaron la producción de EPS por bacterias del género *Pseudomonas* capaces de utilizar hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono. La función de este exopolisacárido parece ser la de proteger a la célula de los componentes tóxicos del medio.

Alasano. Producido por la cepa *Acinetobacter radioresistens* KA53 (Juni y Janick, 1969; Juni, 1978). Este heteropolisacárido está formado por monómeros de galactosa, galactosamina, alanina, glucosamina, glucosa, proteínas y presenta una gran actividad emulgente cuando crece en medios con etanol como fuente de carbono (Navon-Venezia y col., 1995).

Polisacárido WN9, producido por *Paenibacillus sp.* (Weon-Taek y col., 1999). Está formado por D-glucosa y D-manosa (1:1,4) y posee una masa molecular de $31,5 \times 10^6$ Da. Los estudios reológicos han demostrado que su comportamiento pseudoplástico y la viscosidad de sus soluciones permanecen estables a diferentes valores de temperatura y pH.

Jamilano. Producido por *Paenibacillus jamilae* (Aguilera y col., 2001). Está formado por glucosa, manosa, galactosa, fucosa y ramnosa. Tras someterse a estudios reológicos mostró una marcada capacidad viscosizante y un comportamiento pseudoplástico. Asimismo, este polisacárido mostró capacidad para captar metales pesados, especialmente plomo (García-Ribera, 2003).

Polisacáridos producidos por *Aerobasidium pullulans* (Cescutti y col., 2002). Este microorganismo, al crecer sobre glucosamina como fuente de carbono, no sólo sintetiza pululano, sino también una mezcla compleja de otros dos polisacáridos constituidos de forma mayoritaria por manosa y galactosa. Un estudio mediante RMN mostró que uno de los polímeros estaba formado exclusivamente por manosa mientras que el otro contenía restos galactofuranosilos y manopiranosilos.

Polisacáridos producidos por *Lactobacillus plantarum EP56* (Tallon y col., 2003). Este microorganismo, aislado de un silo de maíz, cuando es cultivado en medio definido, es capaz de producir dos tipos de exopolisacárido: una fracción que permanece unida a la célula, y otra que es liberada al medio de cultivo. La fracción unida a la célula está constituida por un único exopolisacárido de una masa molecular de $8,5 \times 10^5$ Da, y está constituido por glucosa, galactosa y N-acetilgalactosamina. La fracción liberada en el medio de cultivo está constituida a su vez por dos exopolisacáridos, uno igual al que constituye la fracción unida a la célula, más otro de menor masa molecular (4×10^4 Da) y compuesto de glucosa, galactosa y ramnosa. Ambas fracciones contienen grupos fosfato, lo que les confiere carga negativa, y potenciales aplicaciones en medicina, ya que estos sustituyentes son necesarios para la activación de los linfocitos (Kitazawa y col., 2000; Nishimura-Uemura y col., 2003) y para la actividad antitumoral (Ebina y col., 1995; Kitazawa y col., 1998).

3.5. Conformación molecular

A pesar de existir muchos polímeros con estructuras químicas primarias similares, se ha comprobado que difieren en solubilidad y algunas propiedades físicas; de ahí que el análisis de la estructura terciaria o superestructura de la molécula polisacarídica, así como el de las interacciones intermoleculares, sea de gran importancia para encontrar los determinantes de ciertas propiedades fisicoquímicas de los exopolisacáridos (Sutherland 1994).

Las cadenas lineales de los polisacáridos pueden asociarse de diversos modos, dando lugar a la formación de un entramado complejo que vendrá condicionado por la flexibilidad y rigidez de las cadenas. Así, se encuentran diferentes conformaciones moleculares como la laminar y la doble o triple hélice

(Figura 9). El tipo de estructura terciaria adoptada es, en gran medida, dependiente de los tipos de sustituyentes presentes en la molécula y su disposición.

En muchos de los EPS examinados, la conformación más favorable presenta las fracciones cargadas de las moléculas en la periferia, donde pueden interactuar con las moléculas de agua y con distintos iones (Atkins y col., 1973). Estos grupos cargados determinan la solubilidad del polímero en agua.

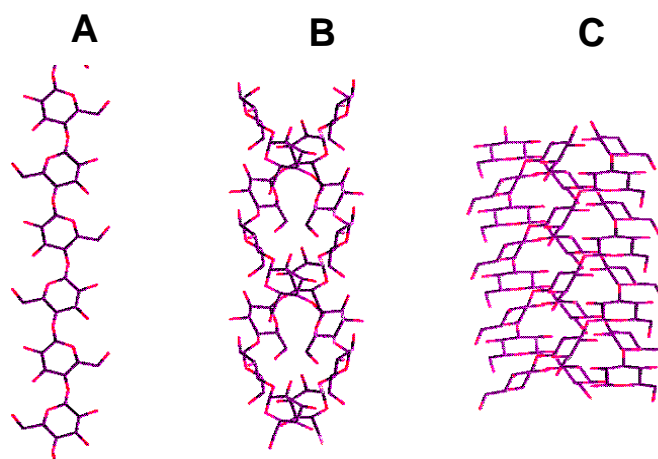


Figura 9. Distintos tipos de conformación molecular de los exopolisacáridos microbianos. **(A)** Laminar, **(B)** doble hélice y **(C)** triple hélice.

Para determinar la estructura y la conformación de un polisacárido bacteriano, se puede utilizar la técnica de difracción de rayos X de las formas cristalinas de los polímeros (Atkins y col., 1973; Sutherland, 1990). Asimismo se emplean técnicas de dispersión de luz o “light scattering” que aportan datos acerca del estado ordenado o desordenado de los polisacáridos e indican la temperatura a la cual ocurre la transición de uno a otro estado (Sutherland, 1988). Los estudios reológicos, fundamentalmente los ensayos de oscilación, además de la determinación de la viscosidad de las soluciones de exopolímero, contribuyen en cierto grado al conocimiento de los dos tipos de conformación y acerca de la temperatura a la que se produce la transición de un estado ordenado a otro desordenado, denominada “temperatura de transición conformacional” o T_m (Macosko, 1994; Pelletier y col., 2001).

3.6. Biosíntesis de los exopolisacáridos

La biosíntesis de los exopolisacáridos microbianos en bacterias Gram negativas es un proceso que en líneas generales se asemeja al de la síntesis del peptidoglicano o del lipopolisacárido de la pared celular bacteriana. Se pueden distinguir cinco etapas (Figura 10):

- a) **Síntesis de precursores activados:** UDP-glucosa, UDP-glucurónico, GDP-manosa, etc. Las enzimas responsables están localizadas en el citoplasma (Whitfield, 1988).
- b) **Ensamblaje de las unidades:** Tiene lugar la formación de un glicolípido intermediario por acción de glicosil-transferasas específicas, situadas probablemente sobre la cara interna de la membrana citoplasmática donde los precursores se encuentran disponibles (Reuber y Walker, 1991). Se produce una transferencia secuencial de los correspondientes precursores activados a un lípido aceptor intermediario, localizado en la membrana plasmática (Leigh y Coplin, 1992). Este lípido es un isoprenoide monofosforilado del tipo undecaprenol fosfato ($C_{55}\text{-P}$), similar al descrito para la síntesis del LPS y del peptidoglicano (Whitfield, 1988).

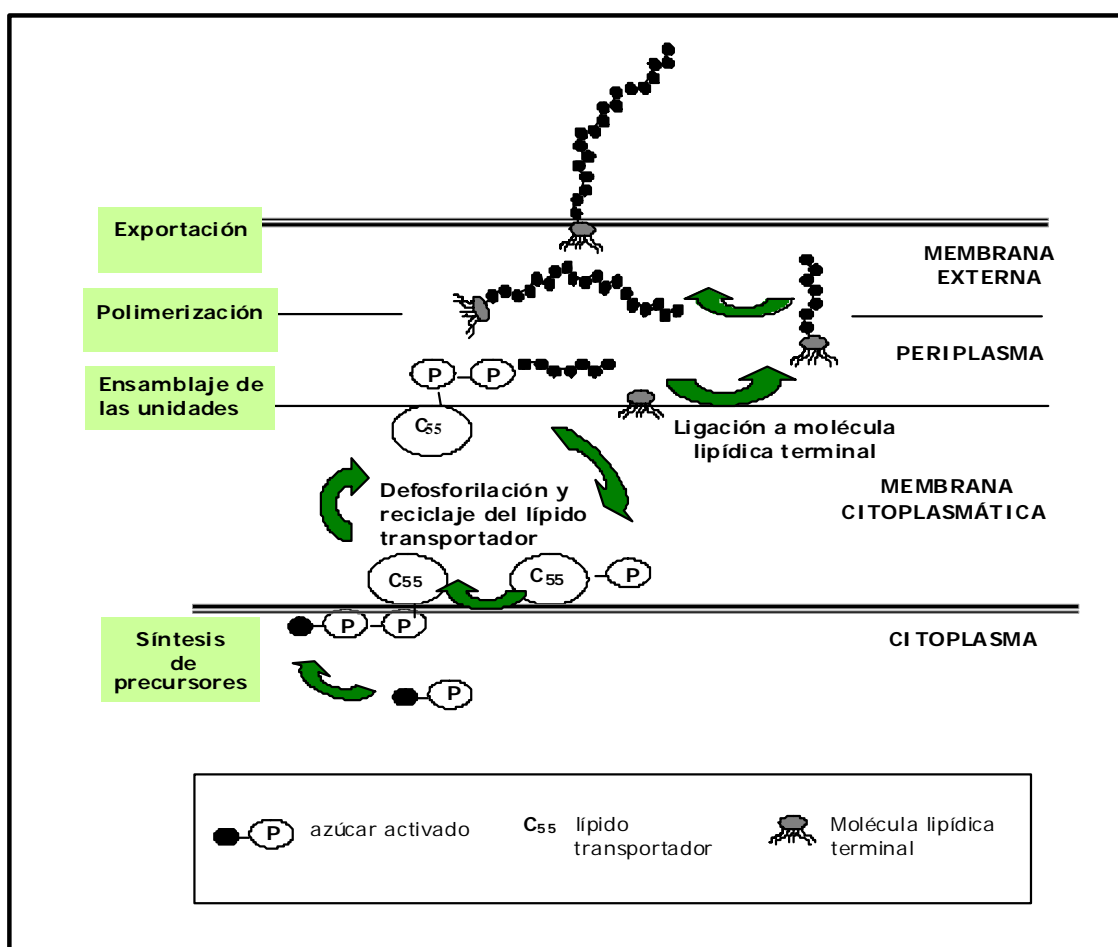


Figura 10. Etapas generales de la biosíntesis de exopolisacáridos, cápsulas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas.

- c) **Adición de sustituyentes:** El acetato y el piruvato son transferidos a partir de acetil-CoA y fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la acción de las enzimas acetiltransferasas I y II, y cetalpiruvato-transferasas (Ielpi y col., 1981; 1983; Stankowski, 1993).

- d) **Polimerización:** Estudios *in vitro* indican que este proceso se realiza por transferencia de la cadena en crecimiento al extremo reductor de una nueva unidad básica que se encuentra unida al transportador (Ielpi y col., 1993). El transportador lipídico es eliminado de la molécula en crecimiento durante la reacción de adición por desfosforilación, proporcionando así energía para la polimerización. Estas reacciones tienen lugar en la cara interna de la membrana citoplasmática.

- e) **Exportación del polisacárido a la superficie celular:** Esta etapa es la menos conocida. Algunos autores creen que existen sistemas de traslocación específicos como proteínas transportadoras (Fath y Kolter, 1993), a través de las cuales los polímeros son conducidos en sus formas más extendidas o casi lineales (Palmen y col., 1994). Sin embargo, otros autores consideran que la secreción del EPS ocurre al mismo tiempo que la polimerización de sus unidades, ya que ésta última se vería impedida por el tamaño del mismo (Ielpi y col., 1993). Existen modelos propuestos de complejos de proteínas implicadas en la biosíntesis y transporte para el ensamblaje de las cápsulas de *Escherichia coli* (Whitfield y Roberts, 1999).

3.7. Genética de los exopolisacáridos

Los estudios genéticos llevados a cabo en esta área indican que los genes implicados en la biosíntesis de los EPS se encuentran generalmente en el cromosoma bacteriano, y se organizan en clústers con más de una unidad transcripcional (Whitfield y Valdano, 1993). No obstante, se han encontrado determinantes genéticos de producción de EPS en plásmidos (Vedamuthu y Neville, 1986; Vescoso y col., 1989; Von Wright y Thinkkynen, 1987). Algo similar ocurre en la disposición de los genes que codifican para la síntesis y exportación de los polisacáridos capsulares (CPS) (Roberts, 1996). Muchos de esos genes ya se encuentran caracterizados.

En los últimos años, la investigación en exopolisacáridos también se dirige a la búsqueda de los genes implicados en la despolimerización, asimilación y transporte de los mismos al interior de las bacterias, cuando son utilizados como fuente de carbono y energía (Hashimoto y col., 1999). Se han caracterizado y purificado distintas enzimas con actividad liasa específicas que degradan el xantano, producidas por *Paenibacillus alginolyticus* XL-1 (Ruijsenaars y col., 1999) y por algunas especies de *Bacillus* (Nankai y col., 1999) y otra que despolimeriza los alginatos, producida por *Azotobacter chroococcum* (Pecina y col., 1999).

Actualmente, los estudios sobre el acetano (Griffin y col., 1996a,b; 1997a,b), el succinoglicano (Glucksmann y col., 1993; Reuber y Walter, 1993a,b; Leigh y Walter, 1994; González y col., 1996; 1998; Mendrygal y González, 2000; Niemeyer y Becker, 2001; Quester y Becker, 2004; Yao y col., 2004), el emulsano (Bayer y col., 1983; Nakar y Gutnick, 2001), el metanolano (Yoshida y col., 2003), algunas bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* (Lamothé y col., 2002) y especialmente el **xantano**, como detallamos a continuación, constituyen los modelos más complejos de la biosíntesis y regulación genética de los exopolisacáridos.

Aspectos genéticos de la biosíntesis del xantano

Xanthomonas campestris es un microorganismo patógeno de plantas causante de la podredumbre negra, que ocasiona marchitamiento por oclusión de los vasos del xilema e interfiere en el transporte de agua. Esta bacteria produce un exopolisacárido extracelular conocido como xantano, que interviene en dicha infección y presenta un enorme interés industrial (Coplin y Cook., 1990; Leigh y Coplin, 1992). Su estudio se ha visto estimulado por el éxito alcanzado en su comercialización, ya que es utilizado en la preparación de adhesivos, alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, pinturas, etc., como ya hemos indicado anteriormente. Tiene particular importancia en la industria del petróleo, para la recuperación secundaria de los yacimientos.

En los estudios genéticos realizados en este microorganismo, se ha demostrado que los genes involucrados en la síntesis de azúcares activados (regiones *xpsIII*, *IV* y *VI*), están físicamente separados de los que codifican el ensamblaje de los intermediarios lipídicos, polimerización y secreción del xantano (región *xpsI* o genes *gum*). La **región *xpsIII*** contiene los genes *xanA* y *xanB*: *xanA* codifica una enzima con actividad fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa y *xanB* codifica para una enzima bifuncional con actividad fosfomanosaisomerasa y GDP-manosa pirofosforilasa. Mutaciones en la **región *xpsIV*** afectan la actividad de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa, mientras que mutaciones en la **región *xpsVI*** elimina por completo los niveles de UDP-glucosa deshidrogenasa (Harding y col., 1993). Los genes que codifican estas actividades se han secuenciado y los distintos mutantes han sido caracterizados (Lin y col., 1995; Wei y col., 1996). Todos ellos originan el mismo fenotipo: no producen xantano *in vivo*, pero producen intermediarios lipídicos y oligosacáridos cuando se adicionan azúcares activados en sistemas *in vitro* (Harding y col., 1993).

Los genes responsables de la síntesis de intermediarios lipídicos, ensamblaje y exportación del xantano, se encuentran agrupados en una región de 16kb denominada ***xpsI* o *gum***. Dicha región ha sido secuenciada y en ella se identifican 12 marcos abiertos de lectura u ORF (*Open Reading Frame*) (Figura 11), denominados *gumB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* y *M* (Harding y col., 1987), cuyas funciones se describen a continuación (Katzen y col., 1998).

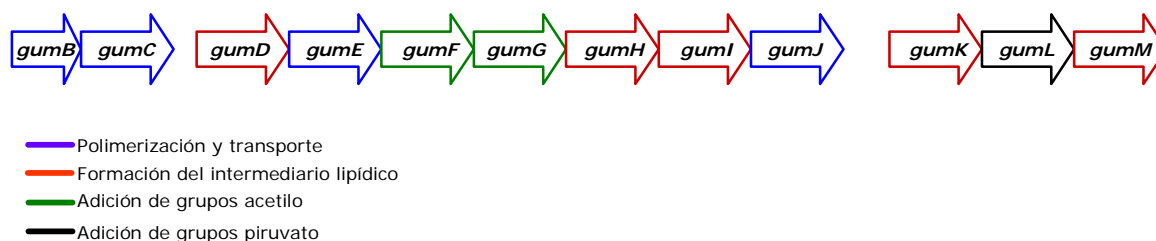


Figura 11. Clúster de genes *gumB-M* de *Xanthomonas campestris*.

La biosíntesis de xantano tiene lugar a partir de precursores de azúcares activados, acetil-CoA y fosfoenol piruvato presentes en el citoplasma, y un lípido poli-isoprenol fosfato localizado en la membrana citoplasmática que actúa como aceptor de azúcares (Ielpi y col., 1981; 1983; 1993). La síntesis de las unidades básicas comienza con la transferencia de glucosil-1-P desde UDP-glucosa hasta el poli-isoprenol fosfato por acción de la proteína GumD. A continuación, la proteína GumM cataliza la adición de una segunda glucosa enlazada por unión β -1,4 y seguidamente se transfiere una manosa por enlace α -1,3 mediante GumH, para continuar con ácido glucurónico formando un enlace β -1,2, gracias a GumK y finalizar con la adición de una segunda molécula de manosa en enlace β -1,4 por GumI. El pentasacárido adherido al lípido es adicionado de residuos acetilo y pirúvico, donados por las moléculas acetil-CoA y fosfoenolpiruvato respectivamente. GumL incorpora residuos piruvato a la manosa externa, mientras que los grupos acetilos son incorporados a la manosa interna por GumF y a la externa mediante GumG. El estudio del proceso de polimerización indica que el xantano crece a nivel del extremo reducido (Ielpi y col., 1993). El mecanismo de liberación del EPS no ha sido bien determinado pero parece estar asociado al proceso de polimerización. Mutaciones en los genes *gumB*, *gumC* y *gumE* dan lugar a la acumulación intracelular de unidades de xantano, lo cual indica que estos genes son necesarios para la polimerización y el transporte del polímero. El papel de la proteína GumJ aún no se ha determinado.

Mediante análisis transcripcional se ha demostrado que los genes *gum* se expresan como un operón, desde un único promotor localizado corriente arriba del primer gen, *gumB*, aunque se han identificado promotores secundarios delante del gen *gumK* (Katzen y col., 1996) y *gumD* (Pollock y col., 1994; Vanderslice y col., 1990).

Con respecto a la regulación de la biosíntesis de xantano, no se conocen sistemas de control específicos. Los conocimientos que se tienen derivan de estudios de fitopatogenicidad. Aunque el xantano no es esencial para la virulencia sobre la planta (Katzen y col., 1998), las etapas iniciales de su biosíntesis parecen estar reguladas como parte de un regulón de patogenicidad (Coplin y Cook, 1990).

3.8. Ingeniería genética aplicada a la mejora de cepas productoras de exopolisacáridos

Las propiedades funcionales de un exopolisacárido determinan su aplicación en el ámbito industrial. Dichas propiedades, a su vez, vienen determinadas por su masa molecular, enlaces establecidos entre los distintos azúcares, grado de ramificación y composición química. La aplicación de la ingeniería genética en el campo de los exopolisacáridos va dirigida a la obtención de cepas con un mayor rendimiento en la síntesis de EPS, o que sintetizen polisacáridos con distinta composición química, estructura o de longitud de cadena diferente.

Una buena posibilidad para la obtención de cepas con mayor producción de EPS es posible en aquellos casos en los que la eficiencia de conversión de la fuente de carbono en polisacárido sea baja. Un ejemplo lo encontramos en *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 en el que la tasa de conversión de azúcar en gelano es tan sólo del 40-50% (Vartak y col., 1995) comparado con el 60-80% obtenido por *Xanthomonas campestris* en la síntesis de xantano (Linton, 1990). La aplicación industrial de los EPS producidos por bacterias ácido-lácticas está fuertemente reñida con los bajos niveles de producción que varía entre 50 y 500 mg/l. Concretamente, la cantidad de EPS sintetizada por *Streptococcus thermophilus* es normalmente menor del 1% de la fuente de carbono presente en el medio (De Vuyst y Degeest, 1999).

En *Sphingomonas paucimobilis* ATCC31461 se han realizado esfuerzos para aumentar la eficiencia de síntesis de gelano a partir de azúcares. Una de las estrategias seguidas fue el bloqueo de la ruta de síntesis de poli- β -hidroxibutirato, mediante mutagénesis al azar, ya que este compuesto se sintetiza a partir de los mismos azúcares que el gelano; sin embargo, no se obtuvo un efecto positivo en la eficiencia de producción (Baird y Cleary, 1994). Por otro lado, mediante mutagénesis dirigida se interrumpió el gen *zwf*, que codifica para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, con el fin de dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de gelano, pero no se obtuvieron los resultados esperados (Vartak y col., 1995).

También mediante mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5, se ha obtenido un mutante superproductor de maurano (mutante TK26), EPS sintetizado por la cepa S-30 de *Halomonas maura*. Dicho mutante produjo un EPS, denominado maurano 26, con un 28% más de rendimiento que la cepa salvaje. El maurano 26 presentó la misma composición química y propiedades reológicas que el maurano. Por ello, la cepa TK26 ha sido protegida bajo patente (Arias y col., 2002).

Se ha intentado controlar la producción de gelano a nivel de la biosíntesis de azúcares activados. En la Figura 12 se muestra la ruta propuesta para la biosíntesis de este polímero (Martins y Sá-Correia, 1993), donde la enzima crucial en el proceso es la fosfoglucomutasa (PGM) que cataliza la síntesis de glucosa-1-fosfato (G1P) a partir de glucosa-6-fosfato (G6P). La G6P es utilizada en procesos de glucólisis para la obtención de biomasa, poder reductor y energía, mientras que la G1P se emplea en la biosíntesis de azúcares precursores para la formación de polisacáridos celulares. A partir de G1P, en una reacción

catalizada por UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP), se sintetiza UDP-glucosa que indirectamente está implicada en la síntesis de otros azúcares activados, como UDP-ácido glucurónico mediante la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa. El aumento de la expresión individual de los genes que codifican para ambas enzimas (PGM y UGP), así como para la glicosiltransferasa que cataliza la adición de la primera molécula de azúcar al lípido transportador, no causó un efecto positivo en la producción de gelano (Martins y Sá-Correia, 1993). Sin embargo, el incremento simultáneo de los niveles de PGM y UDP-glucosa pirofosforilasa dio lugar a un aumento del 20% de la producción de gelano y sus preparaciones acuosas presentaron además mayor viscosidad. Un resultado similar fue obtenido para el esfingano S7 producido por *Sphingomonas* S7 (Thorne y col., 2000). En *Sphingomonas termophilus* LY03, la expresión simultánea de ambos genes también dio lugar a un aumento significativo de la producción de EPS (Levander y col., 2002).

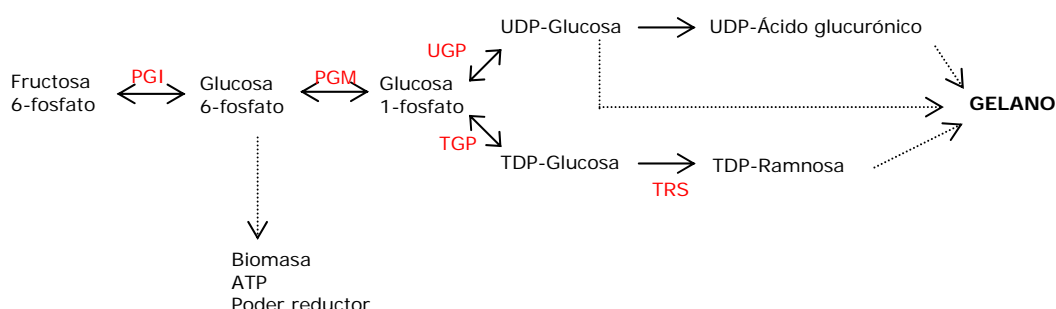


Figura 12. Biosíntesis del gelano (Martins y Sá-Correia, 1993). PGI, fosfoglucosa isomerasa; PGM, fosfoglucosa mutasa; UGP, UDP-glucosa pirofosforilasa; UDP-glucosa, uridina 5-difosfato D-glucosa; UDP-ácido glucurónico, uridina 5-difosfato ácido D-glucurónico; TGP, timidina 5-difosfato D-glucosa pirofosforilasa; TDP-glucosa, timidina 5-difosfato D-glucosa; TRS, timidina 5-difosfato L-ramnosa sintetasa; TDP-ramnosa, timidina 5-difosfato L-ramnosa.

La posibilidad de obtener incrementos considerables en la producción de xantano parece improbable ya que, como acabamos de comentar, el proceso de síntesis de xantano es muy eficiente debido a la gran tasa de conversión a partir de fuente de carbono. Por lo tanto, la mejora en la cantidad y calidad del xantano se basa en el diseño de nuevos equipos de fermentación y medios de cultivo. *X. campestris* no usa eficientemente la lactosa debido a que presenta niveles bajos de actividad β -galactosidasa, por lo tanto, el suero lácteo no es una fuente de carbono indicada para la producción de xantano. Fu y Tseng (1990) introdujeron un plásmido que portaba un gen que codifica para una β -galactosidasa en el genoma de *X. campestris*. La cepa resultante fue capaz de sintetizar xantano en medio que contenía suero lácteo, pero el plásmido no se mantuvo sin presión selectiva. También es de interés la obtención de nuevas cepas que faciliten el proceso de extracción y purificación del xantano. Algunas cepas productoras de xantano sintetizan diversas enzimas extracelulares como celulasas (Gough y col., 1988; 1990) que degradan el xantano cuando se encuentra en forma desordenada (Sutherland, 1984). El xantano a veces es adicionado a productos que contienen celulosa o derivados de la misma. Estas enzimas se destruyen mediante tratamiento con calor o con productos químicos (Empey y Pettit,

1978); no obstante, la obtención de mutantes a los que les faltara esta enzima podía simplificar los procesos de obtención y purificación.

Otra línea de investigación está destinada a producir xantano con sustratos de bajo costo. En este sentido, se han empleado compuestos petroquímicos como hidrocarburos, alcoholes y ácidos como medios de fermentación, cuando el petróleo era más barato, aunque prácticamente no se emplearon de forma significativa (Ward, 1989). En la actualidad, las fuentes de carbono y energía más importantes en los procesos de fermentación son materias primas renovables que contienen azúcares y, en menor grado, grasas y aceites, como cereales enteros (cebada, maíz, avena, etc.); derivados de plantas (pulpa de remolacha, harina integral de semillas de algodón, extractos de destilerías secas, etc.); derivados de animales (harina de pescado, harina de hueso, etc.); y derivados de microorganismos (hidrolizados de levaduras). En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se ha ensayado la producción de xantano y gelano a partir de coproductos de la industria azucarera, siendo la melaza de remolacha el coproducto que mejor resultado dio y obteniéndose rendimientos superiores a 7 g/l para ambos productos. La composición química del xantano y del gelano fue similar a la de los polímeros comercializados, al igual que sus propiedades funcionales, siendo las más importantes la capacidad viscosizante y gelificante respectivamente (Páez, 2004).

Las investigaciones para generar **exopolisacáridos “de diseño”** son aún preliminares y la mayoría de ellos se basan en el control de la estructura del EPS mediante el estudio de las glicosiltransferasas, ya que éstas determinan la composición química y enlaces establecidos entre los azúcares. Betlach y colaboradores (1987) construyeron un mutante que producía xantano sin residuos de ácido glucurónico, ni sustituciones de piruvato. Las soluciones del xantano obtenido fueron muy viscosas. También se introdujo en *X. campestris* un plásmido que portaba parte de la región *gum* (Harding y col., 1987); la cepa resultante sintetizó un xantano con un elevado contenido en restos piruvato. Además se han obtenido mutantes que producen xantano con ausencia de grupos piruvato (Hassler y Doherty, 1990; Wernau, 1979; 1980). La expresión heteróloga de glicosiltransferasas podría permitir la adición de azúcares distintos en posiciones concretas para generar EPS con nuevas propiedades.

Es de gran interés la obtención de polisacáridos con gran viscosidad, bien porque posean una masa molecular elevada, o bien porque sus cadenas polisacáridicas tengan una gran rigidez. Aún no se ha establecido claramente la relación entre la composición de un polisacárido y la rigidez de sus cadenas, pero sí se sabe que los enlaces β -1,4 entre los monosacáridos dan lugar a cadenas más rígidas comparado con los enlaces β -1,2 o β -1,3, así como que los enlaces α dan mayor flexibilidad a la cadena que los enlaces tipo β . Además, las ramificaciones y sustituciones influyen en la rigidez de la cadena (Lapasin y Pricl, 1995).

3.9. Propiedades físicas

3.9.1. Masa molecular

La masa molecular es uno de los factores determinantes de las propiedades funcionales de los exopolisacáridos microbianos (Cerning y col., 1992; van den Berg y col., 1995) ya que tiene una influencia directa sobre su comportamiento reológico y especialmente sobre su viscosidad (Rizzoti, 1994); de ahí que sea una de las propiedades más importantes para decidir la comercialización de un determinado polímero (Gilbert, 1995).

Los valores de la masa molecular de los biopolímeros de origen microbiano están comprendidos entre 1×10^3 y 5×10^7 Da (Sutherland, 1994; Lapasin y Pricl, 1995).

La masa molecular para un determinado exopolisacárido puede variar en función de las condiciones de cultivo así como del método de aislamiento y purificación del polímero (De Vuyst y Degeest, 1999). Por otra parte, en una misma especie bacteriana, los polímeros producidos por las distintas cepas pueden presentar masas moleculares diferentes. Este hecho se ha puesto de manifiesto entre la mayoría de exopolisacáridos ya conocidos como el escleroglucano, pululano o xantano (Sutherland, 1994) así como en otros de más reciente descripción como el polímero producido por *Enterobacter cloacae* (Isobe y col., 2001).

La determinación de la masa molecular de los exopolisacáridos bacterianos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante cromatografía de exclusión de tamaño molecular (GPC: Gel Permeation Chromatography) empleando polímeros de masa molecular conocida como patrones (dextrano, pululano). Sin embargo, esta determinación presenta problemas debido a que los polisacáridos en solución tienen una elevada viscosidad que dificulta la cromatografía. La tendencia de muchos polisacáridos a asociarse en solución origina grandes variaciones en los valores registrados y todo ello puede conducir a errores que en definitiva impiden que la determinación de la masa molecular sea exacta (Sutherland, 1990; 1994).

En el xantano, la determinación de su masa molecular se ve dificultada enormemente por la elevada viscosidad de sus soluciones e incluso la formación de microgeles. Algunos autores afirman que ello conduce a una gran variabilidad de resultados en las determinaciones, pudiéndose considerar un intervalo de masa molecular muy amplio: $1,1-47 \times 10^6$ Da (Sutherland, 1994), o expresado como peso molecular (M_w): $4-12 \times 10^6$ g/mol (Born y col., 2002).

Existen otras técnicas para conocer la masa molecular de un polímero que no presentan estos inconvenientes, como la técnica de "light scattering" y GPC-MALLS. Esta última consiste en una cromatografía de exclusión de tamaño que presenta acoplado un equipo láser de luz dispersa ("light

scattering”) y permite la estimación de la masa molecular de un polímero sin necesidad de utilizar controles, ni un método de calibración de la columna (Mourey y Coll, 1995).

3.9.2. Actividad emulgente

Un gran número de especies microbianas sintetizan exopolisacáridos con actividad emulgente, también denominados bioemulgentes.

Se han propuesto tres funciones para los bioemulgentes en general: (i) incrementar el área de superficie entre dos fases inmiscibles, el agua y una fase oleosa o substrato insoluble; (ii) incrementar la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos mediante el aumento de su solubilidad; (iii) regular la adhesión y separación de los microorganismos a / de las superficies (Rosenberg y Ron, 1999).

Los emulgentes se caracterizan por presentar en su estructura una parte hidrofílica (aminoácidos, péptidos, cadena polisacáridica, cationes mono o divalentes) y una parte no polar hidrofóbica constituida por ácidos grasos saturados o insaturados (Desai y Banat, 1997). Los exopolisacáridos constituyen un grupo dentro de los compuestos con actividad emulgente de origen bacteriano y pueden deber su actividad emulgente a su capacidad viscosizante o a una simple asociación de una fracción proteica al polímero.

En base a su masa molecular los bioemulgentes, en general, pueden ser divididos en i) bioemulgentes de pequeña masa molecular y ii) bioemulgentes de elevada masa molecular.

Dentro de los bioemulgentes de pequeña masa molecular se encuentran glucolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos. Su mecanismo de acción se basa generalmente en la disminución de la tensión superficial e interfacial de las emulsiones, y por ello son compuestos con actividad surfactante o tensioactiva y pueden ser considerados **biosurfactantes**.

El grupo de los de mayor masa molecular, está integrado por lipopolisacáridos y compuestos polisacáridicos en general. Pueden provocar una disminución de la tensión superficial de las interfases aunque no tan marcada como los emulgentes de menor masa molecular. Fundamentalmente actúan estabilizando las emulsiones y por ello se consideran más **bioemulgentes estabilizadores** que compuestos surfactantes (Rosenberg y Ron, 1999).

Algunos de los principales bioemulgentes (de naturaleza polisacáridica o no) producidos por microorganismos se han recogido en la Tabla 6.

Entre los bioemulgentes de elevada masa molecular, donde se encuadran la mayor parte de los exopolisacáridos microbianos con actividad emulgente, destaca el **emulsano** por ser el más estudiado

actualmente. Este compuesto es un complejo constituido por un heteropolisacárido aniónico y una fracción proteica, en el que también se encuentran presentes ácidos grasos (en un 15% p/p) (Rosenberg y Kaplan, 1987); tiene una producción máxima en medios mínimos con un 2% de etanol como única fuente de carbono y energía. Presenta gran actividad emulgente a bajas concentraciones (0,01-0,01% p/v), aunque no emulsiona hidrocarburos alifáticos, aromáticos o cíclicos puros, sino únicamente mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en adecuadas proporciones (Rosenberg y Ron., 1999; 2002).

En los últimos años, mediante técnicas de ingeniería genética, se está intentando mejorar sus propiedades a través de la construcción de análogos obtenidos a partir de mutantes del microorganismo productor, en los que se pretende controlar la sustitución de la cadena polisacáridica por ácidos grasos (Gorkovenko y col., 1997; Johri y col., 2002).

Tabla 6. Principales agentes emulgentes producidos por microorganismos (adaptado de Rosenberg y Ron, 1999; Banat y col., 2000)

Emulgente	Microorganismo productor	Referencia
<u>Baja Masa Molecular</u>		
Glucolípidos		
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas spp.</i>	Rendell y col., 1990; Sim y col., 1997; Lang y Wullbrandt, 1999
Trehalolípidos	<i>R. erythropolis</i> <i>Arthrobacter sp.</i>	Ristau y Wagner, 1983; Kim y col., 1990 Li y col., 1984
Soforolípidos	<i>Candida sp.</i> <i>T. bombicola</i>	Hommel y col., 1994 Inoue y Itoh, 1982; Davila y col., 1997
Lipopéptidos		
Surfactina	<i>B. subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i>	Arima y col., 1968; Wei y Chu, 1998; Morikawa y col., 1992; Kim y col., 1997
Viscosina	<i>P. fluorescenes</i>	Neu y Poralla, 1990; Laycock y col., 1991
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>	Yakimov y col., 1995; Lin y col., 1994
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>	Suzuki y col., 1965
Gramicidina	<i>B. brevis</i>	Katz y Demain, 1977
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter spp.</i>	Kaeppli y Finnerty, 1980
<u>Elevada Masa Molecular</u>		
Emulsano RAG-1	<i>A. calcoaceticus</i> RAG1	Rosemberg y col., 1979a y b
Emulsano-BD4	<i>A. calcoaceticus</i> BD413	Kaplan y Rosemberg, 1982
Alasano	<i>A. radioresistens</i> KA53	Navon-Venecia y col., 1995
Biodispersano	<i>A. calcoaceticus</i> A2	Rosemberg, 1993
Liposano	<i>C. lipolítica</i>	Cirigliano y Carman, 1994
EPS acetilados	<i>P. tralucida</i> <i>S. paucimobilis</i>	Appaiah y Karanth, 1991 Ashtaputre y Shah, 1995
EPS sulfatados	<i>Halomonas eurihalina</i> <i>Halomonas maura</i>	Calvo y col., 1998; Martínez-Checa y col., 2002 Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003

En el alasano y otros muchos polímeros con actividad emulgente no se ha detectado la presencia de ácidos grasos. En estos casos existe una fracción proteica que tiene un papel esencial en la actividad

de la molécula como emulgente, ya que son precisamente las proteínas las que inicialmente se unen a los hidrocarburos y es la cadena polisacárida la responsable de estabilizar la emulsión. Se ha podido comprobar que en el caso concreto del alasano, la desproteínización conduce a una pérdida importante de su capacidad para emulsionar sustratos hidrofóbicos (Navon-Venezia y col., 1998).

Dada su naturaleza polimérica y el tamaño de sus moléculas, los exopolisacáridos microbianos, al igual que otros muchos hidrocoloides utilizados en la industria, actúan como emulgentes estabilizadores, tal y como se ha comentado. La mayor parte de ellos estabilizan las emulsiones al provocar un aumento de la viscosidad y reducir la movilidad de las gotículas. De hecho, parece ser que forman una especie de gel rodeando las gotículas de fase oleosa que actúa a modo de barrera impidiendo la coalescencia y rotura de la emulsión (Garti y Leser, 2001).

3.9.3. Propiedades reológicas

Entre las propiedades físicas de los exopolisacáridos microbianos, las características reológicas de sus soluciones determinan muchas de las aplicaciones de estos biopolímeros, generalmente usados a nivel industrial gracias a su poder viscosizante y gelificante (Sutherland, 1999; 2001a). La mayoría de ellos se caracterizan por originar soluciones de elevada viscosidad, dado el tamaño de sus moléculas así como las interacciones existentes entre las mismas.

Las propiedades reológicas de los EPS microbianos dependen en gran medida de la masa molecular de los polímeros así como de determinados grupos funcionales presentes en la molécula polisacárida (Van den Berg y col., 1995). A su vez, la viscosidad de un exopolisacárido en solución se ve influenciada por multitud de factores tales como la concentración de polímero, temperatura, pH así como la fuerza iónica.

El xantano es el exopolisacárido mejor estudiado desde el punto de vista reológico dadas sus interesantes propiedades, y por ello constituye un modelo o referencia para el estudio de las propiedades reológicas de otros muchos polímeros.

a. Comportamiento reológico de los exopolisacáridos en solución

Los fluidos pueden clasificarse en función de su comportamiento reológico en newtonianos y no newtonianos.

Son **fluidos newtonianos**, aquellos que cumplen la ley de Newton en la que $\sigma = \mu \times \dot{\gamma}^0$, y donde μ es una constante característica de la naturaleza y condiciones físicas del fluido llamada viscosidad. En los fluidos newtonianos, la fuerza o esfuerzo de cizalla (σ , shear stress) aplicado es directamente

proporcional a la velocidad o gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$, shear rate) y por tanto la viscosidad es igual, independientemente de la deformación provocada.

Los **fluidos no newtonianos** a diferencia de los anteriores, no presentan una relación lineal entre el esfuerzo y el gradiente de deformación. Dentro de ellos existen fluidos que requieren un valor umbral de esfuerzo de cizalla para comenzar a fluir (fluidos plásticos Bingham) y otros que no lo precisan. Entre los fluidos no newtonianos sin umbral de fluencia, los fluidos pseudoplásticos se caracterizan por experimentar una disminución de la viscosidad con un incremento del gradiente de deformación (al aumentar la fuerza, la velocidad de deformación aumenta más rápidamente), mientras que en los fluidos dilatantes se produce un incremento de la viscosidad al aplicar velocidades de deformación crecientes (un aumento de la fuerza da lugar a un aumento proporcionalmente menor de la velocidad de deformación) (Ferguson y Kemblowski, 1991; Barnes y col., 1993; Macosko, 1994).

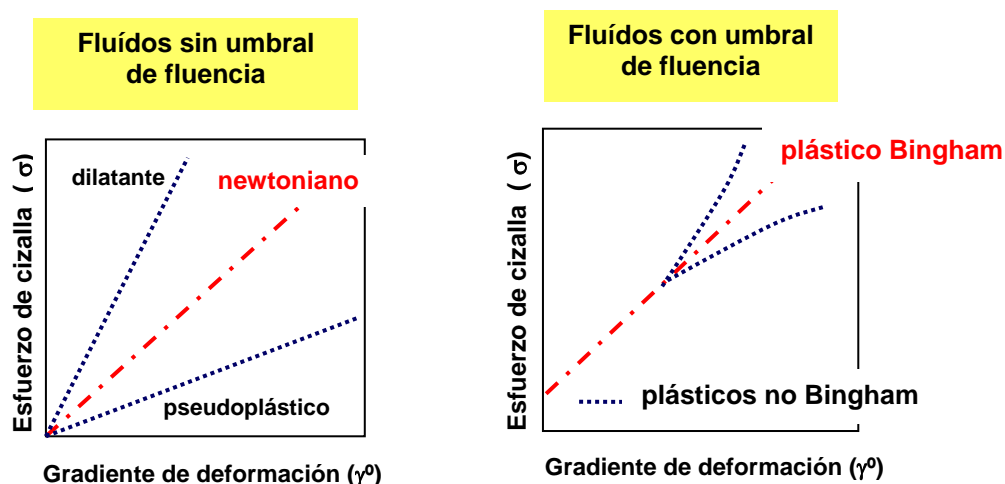


Figura 13. Reogramas de los principales tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico.

En la Figura 13 se han representado los reogramas o curvas de flujo característicos de los principales tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico.

Una de las propiedades de mayor interés del xantano es que en solución presenta un **comportamiento pseudoplástico**, como la mayoría de los exopolisacáridos microbianos. Dicho carácter pseudoplástico es muy marcado al producirse una fuerte disminución de la viscosidad al aumentar el gradiente de deformación (Milas y Rinaudo, 1986; Richardson y Ross-Murphy, 1987; Nolte y col., 1992). Existen numerosos polímeros con excelentes propiedades pseudoplásticas, como los EPS de bacterias ácido-lácticas (Van den Berg y col., 1995) o algunos producidos por bacterias de origen marino, como el producido por *Vibrio alginolyticus* (Muralidharan y Jayachandran, 2003).

El comportamiento pseudoplástico de las soluciones puede ser descrito matemáticamente mediante la **ley de Ostwald-de Waele o de la Potencia**, según la cual $\sigma = K \times (\dot{\gamma})^n$, siendo K el índice de consistencia y n el índice de pseudoplasticidad (menor de 1 para fluidos pseudoplásticos). Las soluciones de xantano se caracterizan por presentar valores elevados para K y valores bajos para n (Amanullah y col., 1996), típico de moléculas semirígidas (Andrews y col., 1998). Para el xantano comercial (Kelco), K y n presentan valores aproximados de 34,5 y 0,23, respectivamente.

Mediante la aplicación de este modelo matemático se ha podido estudiar la influencia de algunos parámetros sobre la pseudoplasticidad del xantano, y se ha podido comprobar que este comportamiento puede variar dependiendo de la concentración del polímero o la adición de sales y el sistema se puede comportar como un fluido newtoniano o pseudoplástico (Born y col., 2002). Por tanto, las soluciones muy diluidas tienden a un comportamiento newtoniano, al igual que al incrementar la temperatura en ausencia de sales (Dolz y col., 2002).

La pseudoplasticidad a su vez determina el que muchos biopolímeros bacterianos puedan ser empleados eficazmente en la industria alimentaria al contribuir a una textura y propiedades sensoriales del producto adecuadas (Lapasin y Pricl, 1995). En los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido-lácticas esta propiedad es esencial y determinante para utilizar el EPS como viscosizante de productos lácteos, ya que en reposo el producto ha de mantener una consistencia que impida que haya sedimentación de algunas partículas y en el momento del consumo se requiere una disminución de la viscosidad para favorecer una textura cremosa (Tuinier y col., 1999).

El xantano además se caracteriza por presentar un determinado valor de esfuerzo de cizalla umbral (conocido como “yield stress”) que ha de ser alcanzado para que se produzca el flujo de la muestra (Sutherland, 1994; García-Ochoa y Casas, 1994). Este esfuerzo de cizalla umbral disminuye al aumentar la temperatura de las soluciones (Hannote y col., 1991).

Otra propiedad del xantano en solución es su **naturaleza tixotrópica**, o capacidad de recuperación inmediata de la viscosidad tras retirada del esfuerzo de cizalla. Esta tendencia de las soluciones de xantano a recuperar su estado original tras la deformación, puede ser reflejo de la combinación de un comportamiento típico elástico (de un sólido) y viscoso (de un fluido) lo cual también es determinante del **carácter viscoelástico** de las soluciones de este polímero (Sutherland, 1998; 1999).

b. Efecto de la temperatura

La conformación molecular de los exopolisacáridos microbianos y la transición entre un estado ordenado y desordenado determina las propiedades reológicas de los mismos. La influencia de los

diversos factores sobre la viscosidad de las soluciones viene determinada por los cambios conformacionales que se produzcan (Ferguson y Kemblowski, 1991; Sutherland, 1994).

Así, el estado de agregación de las moléculas de los exopolisacáridos microbianos, y por tanto sus propiedades reológicas, pueden verse afectadas por tratamientos térmicos (Oviatt y Brant, 1993; 1994), sobre todo si se supera la temperatura de transición conformacional (T_m).

A temperaturas superiores a la T_m se produce una disociación de las cadenas que se traduce en una disminución de la viscosidad de las soluciones. Para soluciones concentradas, cuando se supera esta temperatura, puede producirse incluso un aumento de la viscosidad como consecuencia de un aumento del volumen hidrodinámico de las moléculas al producirse una proyección de las cadenas laterales hacia el exterior al inicio de la desorganización molecular (Capron y col., 1998). En caso de verse afectada la viscosidad a elevadas temperaturas, las soluciones tienden a recuperar su viscosidad inicial tras el enfriamiento de las muestras como consecuencia de una nueva reorganización y ensamblaje molecular que incluso puede originar soluciones más viscosas que antes del calentamiento (Capron y col., 1998; Pelletier y col., 2001).

c. Interacción con cationes

En general, la adición de sales determina un aumento de la viscosidad de casi todos los exopolisacáridos microbianos estudiados. En cuanto a la naturaleza de las sales, la presencia de cationes divalentes es la responsable en la mayoría de los casos de dicho incremento ya que además, generalmente los EPS presentan una mayor afinidad para interactuar con sales divalentes.

La mayoría de los polisacáridos con potencial interés comercial presentan restos de ácidos carboxílicos procedentes tanto de ácidos urónicos como de cetales de piruvato, que pueden originar complejos con cationes (Morris y col., 1975). En algunas preparaciones, la interacción está particularmente marcada con iones de un radio determinado, pero también puede tener lugar con otros iones.

Algunos EPS, incluyendo los producidos por distintas especies del género *Zoogloea*, parecen unirse fuertemente a iones que intervienen en la floculación (Sutherland, 1988). Sin embargo, el mecanismo exacto de unión a cationes por este grupo de polímeros no está todavía claro.

El polisacárido producido por *Alteromonas* cepa 1644 muestra una gran selectividad entre iones divalentes y monovalentes, con afinidad hacia los primeros. Sin embargo, esta afinidad se ve reducida en el caso del Mg^{2+} (Bozzi y col., 1996a).

d. Efecto del pH

La modificación del pH produce una variación de la carga iónica de las soluciones de los exopolisacáridos, que es responsable de cambios en la viscosidad.

En el caso de exopolisacáridos de naturaleza aniónica, la concentración de polímero es determinante en el efecto del pH sobre la viscosidad de las soluciones. En estudios llevados a cabo con el xantano, se ha puesto de manifiesto que para concentraciones de polímero inferiores al 0,2% (p/v) se produce un cierto aumento de viscosidad con el incremento del pH; mientras que para soluciones más concentradas (superiores al 0,35-0,4% p/v), las soluciones con pH ácido son más viscosas que las de pH 6 (Clark, 1992; Pastor y col., 1994). La explicación de este fenómeno es similar a lo que ocurre con la fuerza iónica y radica en alteraciones en las fuerzas de atracción o repulsión entre las cadenas.

Aún así, al igual que ocurre con la temperatura y fuerza iónica, se puede considerar que la viscosidad de las soluciones de xantano es prácticamente independiente del pH en un amplio intervalo (1-13). El carácter compacto de las dobles hélices, protegidas por el repliegue de las cadenas laterales impide la penetración del ácido o álcali y evita la degradación por hidrólisis (Sutherland, 1998; 1999).

El comportamiento observado entre otros exopolímeros frente al pH difiere bastante, aunque en varios de ellos (la mayoría de naturaleza ácida) se ha podido observar que a pH extremos (de extrema acidez o basicidad) se produce una disminución de la viscosidad, consecuencia de una alteración de la carga neta del polímero. El EPS producido por *Bacillus circulans*, aislado de una muestra de suelo, presenta su viscosidad máxima a un pH de 5,5 (Isobe y col., 1992) y tiene esta tendencia al disminuir o aumentar bruscamente el pH. Un comportamiento similar se observó en los polímeros producidos por *Paenibacillus* spp. o *Vibrio alginolyticus* (Weon-Taek y col., 1999; Muralidharan y Jayachandran, 2003).

3.9.4. Formación de geles

La capacidad de formar geles de muchos exopolisacáridos microbianos es una propiedad enormemente atrayente desde el punto de vista industrial.

La gelificación puede ser una propiedad inherente de un polisacárido o puede requerir la presencia de cationes mono o multivalentes. En otros casos, puede tratarse de una gelificación sinérgica con otro polímero, como ocurre con polisacáridos como el xantano que únicamente forma geles en mezclas con galacto o gluco-mananos (Sutherland, 1999).

Las características de un gel vienen determinadas por el tipo de uniones que se establecen entre las cadenas poliméricas. Ross-Murphy y Shatwell (1993) clasificaron los geles de exopolímeros en tres

categorías fundamentales: i) geles en los que las uniones se establecen con enlaces covalentes; ii) geles con uniones físicas fáciles de disgregar y iii) geles que originan redes compactas.

Entre los exopolisacáridos microbianos con capacidad gelificante cuya estructura y propiedades han sido más ampliamente estudiadas se encuentran el gelano, el curdlano y los alginatos.

Más recientemente se han descrito nuevos exopolisacáridos microbianos con esta propiedad. Entre ellos, habría que citar el polímero producido por *Sinorhizobium meliloti*, que origina geles termorreversibles en presencia de cationes mono, di o trivalentes (Heyraud y col., 1994; Dantas y col., 1994), o al "beijerano", producido por *Azotobacter beijerinckia* YNM1 (Ogawa y col., 1996). Por último, el polímero XM6, de *Enterobacter*, también forma geles tras desacetilación (Nisbet y col., 1984).

Gelano

El gelano es uno de los exopolímeros de origen bacteriano más interesantes desde el punto de vista comercial e industrial.

En su forma comercial, los grupos acetilo presentes en su estructura son eliminados mediante un tratamiento alcalino, ya que las propiedades gelificantes de este polímero se intensifican tras la desacetilación además de la eliminación de los grupos O-gliceril de la molécula (Jay y col., 1998). Ambos sustituyentes (O-acetil y O-gliceril) se encuentran unidos a la unidad de glucosa adyacente al ácido D-glucurónico de la cadena.

El polímero en su estado nativo origina geles débiles y elásticos mientras que tras la eliminación de estos grupos se obtienen geles firmes, transparentes y de mejores propiedades (Kang y col., 1982; Sutherland, 1999).

La presencia de cationes mono o divalentes es determinante en el proceso de formación del gel; de hecho, el gelano no forma geles en agua destilada sin sales (Chandrasekaran y col., 1992; Tang y col., 1994, Manna y col., 1996). En solución acuosa las moléculas de gelano aumentan de volumen y las estructuras helicoidales tienden a agregarse y a establecer uniones entre ellas en presencia de sales metálicas. Ello conduce a la formación de un gran entramado molecular en el que quedan atrapadas además de los cationes metálicos, moléculas de agua, produciéndose finalmente la gelificación (Yuguchi y col., 1993). Mediante microscopía electrónica se ha podido observar esta estructura microcíclica (Stokke y col., 1993).

Las propiedades gelificantes del gelano, por tanto, se ven mejoradas en presencia de cationes metálicos, ya que el número de uniones entre las cadenas se incrementa, y es posible la construcción de

una estructura más resistente a la temperatura y otros factores (Yuguchi y col., 1993; Giavasis y col., 2000).

La dureza y propiedades del gel varían en función del catión presente. Entre los cationes monovalentes la dureza disminuye desde el cesio al litio ($\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$). En el caso de los cationes divalentes, la firmeza del gel es muy similar para el Mg^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+} ; aunque menor que la conseguida con el Zn^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} ($\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$) (Chandrasekaran y Rhada, 1995; Larwood y col., 1996; Sutherland, 1999).

Concretamente, los cationes divalentes son más eficaces para lograr geles de mayor dureza. Incluso a baja concentración de gelano (0,2% p/v), se obtiene un gel de alta fuerza y consistencia cuando la máxima concentración de calcio o magnesio es de 0,004% (p/v) ó 0,005% (p/v), respectivamente. En igualdad de condiciones, se obtienen geles de propiedades similares requiriéndose mayores concentraciones de cationes monovalentes, alrededor del 0,16% (p/v) de sodio ó 0,12% (p/v) de potasio; lo cual, a nivel industrial resulta menos rentable (Sanderson y Clark, 1983; Giavasis y col., 2000).

Entre las propiedades más importantes del gelano, destaca su estabilidad y la de sus geles en un amplio intervalo de pH (2-10) así como frente a elevadas temperaturas (Morris, 1994). La temperatura de fusión de los geles puede encontrarse alrededor de los 100 °C; aunque a elevadas concentraciones de sales o de polímero puede incrementarse (Moritaka y col., 1992). La apariencia cristalina de sus geles, incluso con un elevado porcentaje de azúcares (15%) ha determinado también gran parte de su éxito. Por todo ello, el gelano ofrece un amplio abanico de propiedades funcionales (Pszczola, 1993; Crescenci, 1995; Harvey y McNeil, 1998).

Ninguno de los polisacáridos relacionados estructuralmente con el gelano forman geles, sólo originan soluciones viscosas con termoestabilidad considerable (Sutherland, 1999).

Curdiano

Este polímero puede dar lugar a dos tipos de geles diferentes sin necesitar la presencia de iones (Harada y col., 1994): i) geles de bajo punto de fusión y ii) geles de elevado punto de fusión.

Aquellos de bajo punto de fusión se obtienen a partir de soluciones alcalinas de curdlano, tras neutralización de las mismas o calentamiento de sus soluciones acuosas hasta 60°C y posterior enfriamiento. En el segundo caso, se produce la formación del gel tras calentamiento de las soluciones acuosas de curdlano por encima de 80°C, de modo que durante el enfriamiento las cadenas de polímero adoptan una estructura triple helicoidal que origina un gel muy resistente. El mecanismo de formación de estos geles se fundamenta en que, en solución alcalina, el curdlano presenta un estado conformacional al

azar y tras la neutralización, el polímero adopta una estructura de hélice de una sola cadena ó bien de triple hélice (Lee y col, 2000).

El curdlano difiere de otros exopolisacáridos microbianos en su capacidad para formar geles a elevadas temperaturas. Estos geles presentan mayor fuerza así como mayor resistencia a la hidrólisis por 1,3-β-D-glucanasas y ácidos, al incrementarse la temperatura y el tiempo de calentamiento en el proceso de gelificación (Sutherland, 1999).

Alginatos

Las propiedades gelificantes de los alginatos se deben a su capacidad para unirse a cationes mono o divalentes; siendo los más comunes los geles obtenidos con iones Ca^{2+} . La gelificación tiene lugar mediante el conocido modelo de "egg-box"; que consiste en una interacción del Ca^{2+} con las secuencias de ácido L-gulurónico (G) (de más de 20 unidades) de la molécula, de modo que las cadenas de reorganizan y encierran a los iones en una especie de caja similar a las que se usan en el comercio para los huevos (Grant y col., 1973; Steginsky y col., 1992). La firmeza de los geles depende del número de uniones que se establezcan con los cationes, y en definitiva aquellos alginatos con una proporción manurónico/gulurónico baja (predominio de secuencias de ácido gulurónico) darán lugar a geles de mayor fuerza (Clare, 1993; Moe y col., 1995; Clementi y col., 1997).

Gelificación sinérgica

El xantano constituye un claro ejemplo de gelificante sinérgico. Cuando se calientan y posteriormente se enfrían soluciones acuosas de mezclas de xantano y gluco o galacto-mananos de origen vegetal se obtienen geles a causa del efecto sinérgico entre estas gomas (Sutherland, 1999; 2001a). Hemos de decir que en el ámbito industrial a los hidrocoloides como el xantano se les llama gomas.

Los sustituyentes acetilo de la cadena de xantano son responsables de la interacción del xantano con la goma guar, LBG (locust bean gum) y manano Konjac, y el proceso de formación de geles se favorece cuando el xantano se encuentra desacetilado (Ross-Murphy y col., 1996). En ausencia de estos residuos, la concentración de xantano requerida para la formación de gel es menor (Sutherland, 2001a). No obstante, el xantano en estado nativo también presenta un efecto sinérgico cuando se asocia con LBG o manano Konjac, obteniéndose soluciones de elevada viscosidad (Goycoolea y col., 1995).

Para las asociaciones xantano-LBG, se consigue la máxima viscosidad cuando la proporción de ambos hidrocoloides es 2:4, obteniéndose el gel con las mejores propiedades cuando se calientan las soluciones de xantano y LBG hasta 40 y 80°C, respectivamente (Casas y García-Ochoa, 1999). En cuanto

a las mezclas xantano-goma guar, el efecto sinérgico es máximo para una proporción 3:3 de estas gomas (Casas y col., 2000).

3.9.5. Captación de metales pesados

Existe un gran número de exopolisacáridos microbianos capaces de interactuar con cationes metálicos (Kaplan y col., 1987; Geesey y Jang, 1989; Chen y col., 1995 a y b)

La unión de los metales con los EPS se establece mediante interacciones electrostáticas con grupos funcionales con carga negativa. Es por ello que los exopolisacáridos capaces de retener iones metálicos se caracterizan por ser de naturaleza ácida.

Los principales responsables de estas interacciones son los grupos carboxilo de los ácidos urónicos. La presencia de estos sustituyentes es común entre los exopolisacáridos microbianos, con un porcentaje muy variado, aproximadamente entre un 5 y 25% (p/p). Se ha comprobado que juegan un papel esencial en polímeros como los producidos por distintas especies de *Pseudomonas*, con gran capacidad de captación de metales, donde se ha llegado a detectar hasta un 21% (p/p) de ácidos urónicos (Uhlinger y White, 1983; Kang y col., 1982). En *P. putida*, el ácido glucurónico determina la retención de plomo y cadmio por este polímero (Kachlany y col., 2001). Los ácidos urónicos también son los responsables principales de la capacidad de quelar metales (cadmio, cobre y cobalto) por parte del exopolisacárido producido por *Enterobacter cloacae* (Iyer y col., 2004; 2005)

Otros grupos funcionales que contribuyen a la interacción con cationes metálicos, aunque en menor grado, son los restos piruvato, fosfato o sulfato (Chen y col., 1995a).

Por otra parte, los grupos hidroxilo, portadores de átomos de oxígeno donadores débiles de electrones, también pueden contribuir a la formación de enlaces que hacen más estable el complejo catión-polímero, tal y como se ha visto en los alginatos (Geddie y Sutherland, 1993).

La interacción de los exopolisacáridos con metales también está influenciada por otros factores como el grado de acetilación de los EPS. 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).

Las propiedades químicas y físicas de los metales, cantidad de metal en proporción con los sitios de unión en el exopolímero, así como la conformación molecular de los polisacáridos, también son factores a considerar en estos mecanismos de interacción (Manzini y col., 1984; Lion y col., 1988).

En cuanto al efecto de condiciones ambientales como la temperatura o el pH; hay que señalar que tanto a temperaturas elevadas como a pH extremadamente ácidos, la retención de metales por los EPS se ve dificultada (Geddie y Sutherland, 1993).

3.10. Relación entre la composición/estructura química y propiedades físicas

Las propiedades físicas de cualquier EPS microbiano vienen determinadas por su estructura química, conformación y masa molecular.

La solubilidad es una de las propiedades más dependientes de la composición química y de la estructura de los exopolisacáridos. La presencia de cadenas laterales, generalmente con grupos cargados (urónicos, sulfatos, etc.), condiciona, en gran medida, la solubilidad del polímero en agua, mientras que la cadena lineal de azúcares libre de sustituyentes tiende a ser insoluble (Sutherland, 1994). Las ramificaciones en las cadenas polisacáridicas lineales promueven una desorganización conformacional e impiden alcanzar un estado de mayor orden, lo que permite la solubilización del polímero.

La estructura primaria de un exopolisacárido microbiano tiene una gran influencia sobre la capacidad de formación de geles. El gelano presenta una estructura lineal que le permite la formación de geles; en cambio, los demás polisacáridos de su grupo contienen mono o disacáridos en sus cadenas laterales que interaccionan entre sí e impiden su formación.

En cuanto a la naturaleza de los enlaces entre los monosacáridos de la cadena polisacáridica, los enlaces β -1,4 confieren mayor rigidez al polímero mientras que las uniones α -1,2 determinan una mayor flexibilidad, como ocurre en los dextranos (Sutherland, 2001a).

El efecto de los grupos acetato y piruvato sobre las propiedades físicas y funcionales de los polímeros bacterianos es especialmente importante y ha sido estudiado en multitud de ocasiones (Gamini y col., 1991). Asimismo, el grado de acetilación es un factor importante en el proceso de gelificación de muchos exopolisacáridos (Ross-Murphy, 1995; 1996). En numerosos exopolímeros de naturaleza ácida, la acetilación afecta a la selectividad de unión de este polímero con cationes metálicos, de tal forma que, generalmente, el polímero desacetilado presenta mayor afinidad con cationes monovalentes y en su estado nativo son más selectivos en su unión con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Geddie y Sutherland, 1993). Parece ser que los alginatos constituyen una excepción a este hecho y su desacetilación favorece la unión con cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Sr^{2+} (Geddie y Sutherland, 1994).

Otros grupos como los succinatos determinan, mediante su eliminación, un incremento de la pseudoplasticidad de las soluciones de succinoglicano (Ridout y col., 1997).

3.11. Producción de exopolisacáridos microbianos

3.11.1. Fermentación industrial

Al igual que cualquier otro proceso microbiano, la producción de exopolisacáridos requiere una fuente de carbono barata, fermentadores esterilizables, aire estéril y un medio de cultivo. El éxito del proceso de fermentación se basa, en gran medida, en el control del entorno. Así, la elección del medio de crecimiento y las condiciones ambientales determinan la calidad del producto y la máxima eficiencia de conversión obtenible (gramos de polímero por gramo de fuente de carbono). Los procesos de fermentación industrial deben ser diseñados de tal forma que la velocidad global, la eficiencia y la concentración de producto estén limitadas, en último término, por la capacidad de transferencia de masa y de calor del fermentador, de forma que se aproveche al máximo la energía disponible (Kennedy y col., 1984).

Las propiedades reológicas de los cultivos de polímeros microbianos se deben al propio producto disuelto en la fase líquida continua. Esto puede conducir a marcadas diferencias en el efecto de la reología sobre la difusión del oxígeno y de los nutrientes en estos tipos de fermentación.

La influencia de la reología sobre los fenómenos de transporte en las fermentaciones de exopolisacárido no se ha determinado completamente y no es fácil obtener ecuaciones de diseño.

La principal característica reológica que tienen la mayor parte de los fluidos de cultivos de polisacáridos es su extrema viscosidad a una concentración de producto relativamente baja y su comportamiento pseudoplástico. A medida que aumenta la concentración del producto durante el crecimiento, tanto la viscosidad como la naturaleza pseudoplástica del caldo aumentan. En algunos casos, como en las fermentaciones de pululano y de alginato con *Azotobacter vinelandii*, la viscosidad del fluido del cultivo pueden descender hacia el final de la fermentación debido a actividad enzimática (Peña y col., 2002).

Los fermentadores utilizados para la producción comercial de polisacáridos microbianos consisten en recipientes aireados dotados de agitación mecánica que proporciona la turbulencia necesaria para la formación de pequeñas burbujas y el mezclado, lo que garantiza una buena transferencia de masa. El diseño de un fermentador eficiente incluye un equilibrio entre la energía suministrada para la aireación y la destinada a la capacidad de bombeo del impulsor (o flujo de masa) que determina la transferencia de calor y el mezclado en el fermentador (Kennedy y col., 1982).

3.11.2. Recuperación

La recuperación y el procesamiento de los exopolisacáridos microbianos utilizan una tecnología parecida a la empleada para muchos otros polímeros solubles en agua como las gomas de algas o de plantas. Son numerosas las técnicas disponibles para conseguir el aislamiento y la purificación de las gomas y los métodos usados actualmente dependen del objetivo del procedimiento y de su coste.

Las células pueden ser eliminadas utilizando la centrifugación o la filtración, aunque, a veces, el cultivo tiene que ser diluido o calentado para disminuir los efectos de la viscosidad sobre la separación. Alternativamente se usan métodos químicos o enzimáticos para degradar las células, que pueden ser complementados con posteriores operaciones de purificación y concentración. La retirada de las células se lleva a cabo cuando su presencia puede afectar al comportamiento del producto, su aspecto en solución o su toxicología. Por ejemplo, la presencia de células de *Azotobacter* en alginatos microbianos utilizados en la obtención de pasta de imprenta puede dar lugar a precipitados (López-Munguía y col., 1993).

El método de elección para la recuperación primaria de los polímeros microbianos es la precipitación utilizando isopropanol, etanol, metanol o acetona. La precipitación constituye un punto crítico en la rentabilidad económica del proceso, por ello, el solvente empleado se recupera mediante destilación. Después, el precipitado se separa, se deshidrata mecánicamente y se seca.

El producto seco se muele y luego se empaqueta en recipientes con una baja permeabilidad al agua. El tamaño de partícula del producto molido tiene una influencia considerable sobre su dispersabilidad y su velocidad de hidratación.

Se han descrito diferentes métodos alternativos para la recuperación primaria de los polisacáridos microbianos. Estos se centran principalmente en la producción de una forma insoluble del polímero por adición de ciertas sales o por ajuste del pH. Por ejemplo, el alginato puede ser recuperado por formación de una sal cálcica insoluble o por acidificación, para precipitar ácido algínico. También pueden secarse directamente los extractos acuosos que contienen la goma. Sin embargo, debido a que solamente se elimina el agua, el producto resultante es relativamente impuro comparado con el cosechado utilizando un método de precipitación.

El proceso de obtención, la exposición al calor y la tensión mecánica pueden modificar o degradar el producto. Por ejemplo, la desecación rápida a alta temperatura puede dar lugar a un producto poco soluble y con propiedades reológicas muy deficientes. Asimismo, los polisacáridos pueden ser tratados física o químicamente durante la recuperación con el fin de modificar su pureza, reología y otras propiedades.

3.11.3. Factores determinantes en la producción

Numerosas condiciones ambientales y nutricionales pueden influir sobre la producción de exopolisacáridos microbianos. Algunas de las más significativas son la fuente de carbono o nitrógeno y su concentración en el medio de cultivo, la temperatura de incubación, el pH, la relación C/N o la limitación de ciertos nutrientes. Estas condiciones, que determinan la producción óptima de los EPS, varían de unas especies microbianas a otras e incluso entre cepas bacterianas de la misma especie (Farres y col., 1997).

a. Composición del medio de cultivo

La mayoría de los microorganismos productores de exopolisacáridos utilizan los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía (Sutherland, 2001a). Muchos de estos carbohidratos se pueden convertir directamente en polisacáridos, pero lo más frecuente es que en la biosíntesis, los microorganismos utilicen metabolitos derivados de ellos.

Las fuentes de nitrógeno más frecuentemente utilizadas son las sales de amonio o los aminoácidos y rara vez los nitratos. Algunas especies emplean los aminoácidos como fuente de carbono y de nitrógeno simultáneamente. Determinadas bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de producir EPS y su crecimiento es más elevado si el nitrógeno procede de una fuente de sales de amonio (Ahmad y McLaughlin, 1985).

Influencia de la fuente de carbono

La utilización de diferentes fuentes de carbono puede afectar no sólo a la producción sino a la composición de azúcares neutros, acilación del polímero, su calidad y sus propiedades físicas.

La glucosa y la sacarosa son los azúcares que permiten una producción de EPS más rentable en la mayoría de los casos (Roseiro y col., 1992; García-Ochoa y col., 1997; Lo y col., 1997; Leela y Sharma, 2000; Rao y Sureshkumar, 2001).

Para algunos microorganismos, el tipo de hidrato de carbono presente en el medio influye en el tipo de exopolisacárido sintetizado. Así, un exceso de sacarosa incrementa la producción del levano en el caso de *Pseudomonas syringae* var. *glycinae*. Por el contrario, si la bacteria crece en presencia de glucosa, el polímero sintetizado es el alginato. Para las bacterias lácticas formadoras de exopolisacárido se puede generalizar que la composición de sus polímeros es independiente de la fuente de carbono presente en el medio (Cerning, 1990). *Streptococcus thermophilus* (Cerning y col., 1988) y *Lactobacillus casei* CG11 presentan una máxima producción de polisacárido en un medio con glucosa y menor cuando los sustratos hidrocarbonados son lactosa y sacarosa (Cerning y col., 1994).

Asimismo, la producción de heteroglicano por *Sporobolomyces alborubescens* aumenta si se utiliza glucosa como fuente de carbono (Ananeva y col., 1998). Sin embargo, en el caso del succinoglicano producido por *Agrobacterium tumefaciens*, se obtienen unos niveles óptimos de producción si se emplea sacarosa (Stredansky y col., 1998).

La cepa F2-7 de *Halomonas eurihalina*, que es capaz de desarrollarse sobre un amplio número de sustratos, presenta una mayor productividad cuando la fuente de carbono es el citrato o la glucosa. Asimismo, la composición del polímero varía según el sustrato utilizado en el medio de cultivo (Béjar y col., 1996). La adición de citrato puede aumentar la producción de EPS por un efecto estimulador, debido a un aumento en la solubilización de componentes del medio como las sales de calcio y hierro o por la estimulación de la actividad del ciclo de Krebs (Kennedy y Bradshaw, 1984).

La cepa S30 de *Halomonas maura* también es capaz de crecer y producir su exopolisacárido, el maurano, a partir de una gran variedad de fuentes de carbono, aunque la mayor productividad la encontramos cuando el sustrato empleado es la glucosa (Arias y col., 2003). Además, la viscosidad de las preparaciones acuosas de maurano no se ve afectada de manera significativa por la sustitución de la glucosa por otros azúcares, por lo que ésta es la fuente de carbono de elección para la producción de este exopolisacárido de interés en biotecnología, biorremediación y medicina.

El empleo de fuentes de carbono alternativas para la producción de exopolisacáridos ha sido ensayado en numerosas ocasiones con el fin de disminuir los costes y aumentar la rentabilidad global del proceso. Así, las melazas de remolacha y caña de azúcar, coproductos de la industria azucarera, constituyen unas fuentes de carbono muy atractivas desde el punto de vista industrial. Recientemente, nuestro Grupo de Investigación ha estudiado la producción de xantano y gelano a partir de este tipo de sustratos, gracias a la colaboración establecida con la empresa Azucarera Ebro S.L., obteniendo productos de considerable calidad, en un proceso que a expensas de futuros y más profundos estudios, parece rentable desde el punto de vista económico y empresarial (Páez, 2004).

Finalmente, hemos de señalar que la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo es un factor crucial para el crecimiento y producción de los exopolisacáridos y en líneas generales, a concentraciones crecientes de ésta, la producción de EPS se ve aumentada. No obstante, es muy importante seleccionar cuidadosamente la concentración de fuente de carbono ya que un exceso de la misma puede conducir a una inhibición tanto del crecimiento bacteriano como de la producción de biopolímero (Sutherland y col., 1993). Así, se ha demostrado que un aumento de la concentración de azúcar puede conducir a una utilización menos eficiente de la misma al aumentar la síntesis de otros metabolitos en detrimento de la producción de exopolisacárido (Farres y col., 1997). Este hecho se observa en otros microorganismos como *Acetobacter xylinum* (Bielecki y col., 2002). Así, cuando la oxidación de la glucosa 6P se encuentra activada, la acumulación de gluconato disminuye enormemente

el pH del medio de cultivo con un efecto inhibitorio de la producción de celulosa. Este efecto ocurre a porcentajes de glucosa superiores al 4% (p/v) (Son y col., 2001).

Influencia de la fuente de nitrógeno

El equilibrio entre los diferentes sustratos y la deficiencia en nutrientes es de gran importancia en la producción del polisacárido. De hecho, la fuente de nitrógeno es necesaria para el crecimiento de los microorganismos y para la síntesis de exopolisacáridos, pero un exceso de la misma puede hacer disminuir la conversión del sustrato carbonado en EPS (Duguid y Wilkinson, 1953). Pese a ello, se han descrito excepciones tales como la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* y de gelano por *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314), que disminuye en medios deficientes en nitrógeno (Dudman, 1960; Lobas y col., 1992).

La elección de una fuente de nitrógeno orgánica o inorgánica depende de su efecto sobre la producción de exopolisacárido y de la capacidad de los microorganismos para metabolizar dichos sustratos. De hecho, algunas especies de *Acetobacter* productoras de celulosa no pueden utilizar fuentes de nitrógeno inorgánicas (Son y col., 2001). La producción de polisacárido se ve aumentada en el caso de *Sporobolomyces albo rubescens* al emplear una fuente de nitrógeno orgánica (Ananeva y col., 1998).

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).

En los medios de producción de exopolisacáridos también se pueden utilizar compuestos nitrogenados más complejos como peptonas, extractos de carne o malta, hidrolizados de caseína, levadura, soja o derivados solubles de destilería, entre otros (Sutherland, 1990; Becker y col., 1998). La utilización de estas fuentes de nitrógeno de mayor complejidad permite obtener, en multitud de ocasiones, mayores tasas de crecimiento y mejores rendimientos de EPS. Sin embargo, para algunos microorganismos el uso de fuentes de nitrógeno complejas tiene un efecto negativo sobre la producción y crecimiento bacteriano, posiblemente debido a una escasa actividad proteolítica de la cepa bacteriana (Stredansky y col., 1998).

Una de las fuentes de nitrógeno complejas más comúnmente utilizadas es el extracto de levadura. Este sustrato contiene abundantes componentes nitrogenados así como multitud de factores de crecimiento; de ahí que su adición estimule, en muchos casos, la producción de exopolisacárido (de Souza y Sutherland, 1994). Así, al adicionar extracto de levadura al 0,1% (p/v) al medio de cultivo para la producción de celulosa (Son y col., 2001) se produce un efecto estimulante, también descrito para el gelano (West y Strohfus, 1999). Sin embargo, puesto que este factor nutricional es de coste relativamente

elevado, se ha cuestionado la necesidad de esta suplementación, fundamentalmente en la producción de los polímeros a escala industrial, ya que en determinados casos no resulta económicamente rentable.

b. Balance fuente de carbono-nutriente limitante

El balance entre sustrato-utilizable y nutriente-limitante es de suma importancia en la producción de exopolisacáridos microbianos y de hecho la síntesis de la mayor parte de estos biopolímeros se encuentra favorecida por un desequilibrio de los nutrientes.

En general, la producción del polímero se favorece con una alta relación carbono/ nitrógeno, mientras que la relación inversa estimula el crecimiento (Souw y Demain, 1979; Sutherland, 2001a). Tal es el caso de la producción de mauroano (Arias y col., 2003), xantano (Lo y col., 1997), curdlano (Lee, 2002), alginatos (Clementi, 1997) o de los polisacáridos de *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Sutherland, 2001a) o *Klebsiella* (Farres y col., 1997), entre otros.

Una excepción a este hecho la constituyen las bacterias ácido lácticas, en las que la producción de exopolisacáridos no parece estimularse por una limitación de nitrógeno (Degeest y col., 1997; De Vuyst y col., 1998; Kimmel y col., 1998).

La concentración de fosfato influye significativamente y de forma variable en el crecimiento bacteriano y en la síntesis de numerosos exopolisacáridos. Así, en medios con concentraciones limitantes de fosfato, se ha obtenido el máximo rendimiento de producción de alginato. El fosfato en el medio actúa impidiendo una brusca fluctuación del pH y por ello una disminución de este componente se ha de contrarrestar con la incorporación de otro tampón como la sal sódica del ácido propano sulfónico (Clementi y col., 1995). Del mismo modo, bajo limitación de fosfato se incrementa la producción del polímero sintetizado por *Klebsiella* I-714 (Farres y col., 1997). Para el curdlano, la ausencia de fosfatos conduce a la obtención de niveles muy bajos de polímero, mientras que a bajas concentraciones tiene lugar el óptimo de producción de exopolisacárido (Lee, 2002).

Asimismo, la producción de celulosa únicamente es eficaz en presencia de un 0,8% (p/v) de sales de fosfato (Son y col., 2001). Por otra parte, en distintas cepas de *Pseudomonas* productoras de alginato, el proceso es más rentable a elevadas concentraciones de fosfato (Conti y col., 1994).

c. Requerimientos iónicos

La concentración de magnesio, potasio y calcio en el medio afecta en distinta medida a la producción de EPS (Sutherland, 1990). Aunque los requerimientos salinos de muchos microorganismos son muy bajos, la presencia de trazas de sales puede provocar un aumento en la producción del EPS.

Se ha visto que un incremento en la concentración de las sales magnésicas está asociado con un mayor rendimiento en la producción de polímero por *Azotobacter vinelandii*, en medios con ácidos 4-hidroxibenzoico (Vargas-García y col., 2001). En este mismo trabajo se comprobó que modificaciones de otras sales inorgánicas no afectan a la síntesis de EPS, lo cual es indicativo del papel relevante del Mg^{2+} en este proceso frente a otros iones.

La presencia de sales minerales también afecta a la producción de exopolisacáridos por bacterias ácido lácticas (Mozzi y col., 1995; Gamar y col., 1997).

d. Efecto de otros parámetros

Tiempo de incubación

La síntesis de los exopolisacáridos puede estar asociada al crecimiento o no. Cuando existe esa asociación, generalmente comienza la síntesis del EPS al iniciarse el crecimiento exponencial, con un máximo al final de la fase activa de crecimiento. En esta cinética, el exopolímero es considerado un metabolito primario (Abbad Andaloussi y col., 1995; De Vuyst y col., 1998).

La asociación del proceso de producción de EPS y el crecimiento bacteriano se ha descrito en bacterias ácido lácticas termófilas, de modo que la producción de polímero tiene lugar bajo las condiciones óptimas de crecimiento (De Vuyst y col., 1998), a diferencia de lo que ocurre en bacterias ácido lácticas mesófilas (De Vuyst y Degeest, 1999).

Existen otros muchos casos en los que el crecimiento celular y producción de polisacárido tienen requerimientos nutricionales diferentes (Petronella y Hugenholtz, 1999; Cheirsilp y col., 2001; Davey y Amos, 2001).

Por otra parte, algunos EPS son sintetizados a lo largo de todas las etapas de crecimiento, y no sólo durante la fase exponencial o estacionaria tardía (Sutherland, 1990; 2001a).

Temperatura

La gran mayoría de polímeros microbianos presentan óptimos de producción a una temperatura de 30°C, siendo ésta la temperatura de elección en el xantano (Leela y Sharma, 2000), gelano (Giavasis, 2000) y celulosa (Son y col., 2001), entre otros. Los alginatos presentan una temperatura óptima de producción ligeramente superior (34-35°C) (Clementi, 1997). Recientemente se ha descrito que *Pseudoalteromonas* CAM025, microorganismo aislado en el Antártico, produce su exopolisacárido con un rendimiento 30 veces superior a -2°C y 10°C que a 20°C (Mancuso-Nichols y col., 2005).

Varios autores coinciden en afirmar que la producción de exopolisacáridos se induce a estas temperaturas debido a que el crecimiento bacteriano se ralentiza. Ello determina una síntesis menor de los constituyentes de la pared celular y por consiguiente, una mayor disponibilidad de transportadores para los compuestos intermediarios y precursores del EPS (Whitfield, 1988). Este hecho argumenta, de igual forma, la mayor producción de exopolisacárido en la fase estacionaria de crecimiento de algunas bacterias (Petty y col., 2000; Sutherland, 2001a).

Por otra parte, la temperatura óptima que permite una máxima producción de EPS puede coincidir con aquella temperatura a la que se incrementa la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de precursores del polisacárido, tal y como se ha comprobado en *Klebsiella pneumoniae* (Mengistu y col., 1994). A temperaturas superiores, puede además favorecerse la utilización del sustrato carbonado del medio para la síntesis de otro producto extracelular, con la consiguiente disminución del exopolisacárido producido.

pH

El pH del medio de cultivo indiscutiblemente influye en el crecimiento y metabolismo bacteriano afectando a la síntesis de enzimas y al transporte de sustratos implicados en la producción de EPS (Sutherland, 1990).

El óptimo de producción para la mayoría de biopolímeros microbianos se da a valores de pH próximos a la neutralidad (6,5-7,5). Sin embargo, existen algunas excepciones en las que en condiciones de neutralidad la síntesis de polímero no se favorece, como en el caso del pululano, que requiere un pH entre 5 y 6,1 para su máxima producción (Lacroix y col., 1985) o el del escleroglucano, cuyo pH óptimo está comprendido entre 3,5-4,5 (Wang y McNeil, 1995). Incluso a pH extremadamente ácido, se estimula el proceso de producción de determinados exopolisacáridos como el de la levadura *Rhodotorula acheniorum* que requiere un pH entre 1,7 y 2 (Grigorova y col., 1999).

En algunos microorganismos, el valor del pH en el medio de cultivo se incrementa transitoriamente al final de la fase exponencial del crecimiento y principio de la fase estacionaria, variación que coincide con el aumento en el contenido en grupos acilo y en la viscosidad (Tait y col., 1986).

En la mayoría de los casos, no sólo es esencial proporcionar el pH óptimo al inicio del proceso de fermentación, sino que la producción de polímero es mayor bajo condiciones de pH controlado, por ello determinados medios llevan adicionada una sustancia tamponante como las sales de fosfato, empleadas en el medio de producción del alginato (Clementi y col., 1995). En este sentido, la utilización del fermentador es enormemente ventajosa pues el control de pH se encuentra monitorizado y su ajuste es permanente mediante la adición de ácido o álcali.

La producción de EPS es también significativamente mayor bajo control de pH en las bacterias ácido lácticas (Mozzi y col., 1996; Gassem y col., 1997), así como en la obtención de curdlano. En este caso, el control de pH se realiza en dos etapas. Puesto que el pH óptimo para el crecimiento de *Agrobacterium* es 7 y la producción de curdlano es mayor a pH 5,5, en una primera etapa ha de mantenerse la neutralidad y en una segunda, provocar una ligera acidificación para obtener la máxima cantidad de polímero. Además, la elevada viscosidad de los cultivos puede ser minimizada operando a pH ácido en la segunda parte del proceso de fermentación ya que el curdlano es insoluble bajo estas condiciones (Lee, 2002).

Disponibilidad de oxígeno

La mayor parte de los microorganismos productores de EPS son aerobios o anaerobios facultativos, aunque en estos últimos la síntesis de exopolisacárido ocurre cuando el microorganismo crece aerobicamente. Por ello, la aireación del medio de cultivo juega un papel fundamental en la síntesis de los exopolisacáridos (Sutherland, 1990).

Sin embargo, Rau y colaboradores (1992) observaron una mejora en la producción de exopolisacárido en cultivos de *Schizophyllum commune* y *Sclerotium glucanicum* bajo limitación de oxígeno. En condiciones similares también se obtiene una adecuada producción de polímero por *Sinorhizobium meliloti* (Sutherland, 1990), al igual que ocurre con las bacterias ácido lácticas, que producen polímero tanto en presencia de bajas tensiones de oxígeno como en condiciones de anaerobiosis (De Vuyst y Degeest, 1999).

Para el resto de los microorganismos aerobios, uno de los mayores problemas asociados con el proceso de fermentación es el aumento de la viscosidad de los cultivos que afecta enormemente a la biodisponibilidad del oxígeno y nutrientes, cuya disminución repercute directamente en la producción del EPS (Becker y col., 1998; Amanullah y col., 1997; Flores y col., 1994). De modo especial este hecho supone una importante limitación en la producción de xantano y gelano, entre otros, y es esencial garantizar una aireación y agitación del cultivo adecuada que evite la existencia de zonas estanco de anaerobiosis (Nakajima y col., 1990; Amanullah y col., 1998b).

A ello se suma el hecho de que bajo condiciones de limitación de oxígeno, puede favorecerse la síntesis de otros productos como los poli- β -hidroxialcanoatos (PHA), lo cual justifica también una disminución en los rendimientos de producción del exopolisacárido tal y como ocurre con el alginato (Brivonese y Sutherland, 1989).

En el gelano resulta adecuada una agitación de los cultivos (alrededor de 250 rpm). Se ha podido comprobar que una agitación menor resulta insuficiente, y niveles de agitación muy elevados (600-800

rpm) pueden originar zonas estanco de aire que hacen el cultivo muy heterogéneo, dificultándose la transferencia de calor y sustratos (Dreveton y col., 1994).

La agitación mecánica en el xantano resulta crucial e incluso permite un proceso de producción mucho más rápido y eficaz que cuando únicamente se utilizan otros sistemas de aireación en los biorreactores. Por ello, en la producción industrial se utilizan tanques con agitación mecánica. Algunos autores establecen un valor fijo para la velocidad de agitación durante todo el proceso (Pinches y Pallent, 1986; Shu y Yang, 1990) mientras que otros aumentan la agitación a medida que la viscosidad del cultivo se hace mayor. A medida que la concentración de xantano en el medio aumenta, se produce una acumulación de polímero en forma de una película alrededor de la célula que impide la difusión de los nutrientes y el oxígeno al interior celular, disminuyendo la productividad específica de xantano (Amanullah y col., 1998a). Por tanto, la velocidad de agitación no debe mantenerse constante sino que se ha de incrementar gradualmente para compensar la caída del oxígeno disuelto debido al aumento de viscosidad (García-Ochoa y col., 1997). La velocidad de agitación idónea oscila entre un mínimo de 250-300 rpm, pudiendo alcanzar un máximo de hasta 1000 rpm (Umashankar y col., 1996; García-Ochoa y col., 1995; Azuaje y Sanchez, 1999).

En relación a los niveles de oxígeno disuelto, la concentración de xantano así como su calidad y propiedades vienen determinadas por este factor. En la fase de producción del polímero los niveles de oxígeno crítico se encuentran entre el 6 y 10% (v/v), de modo que a porcentajes de oxígeno inferiores al 6% (v/v) la producción específica de xantano se encuentra disminuída significativamente (Amanullah y col., 1998b).

Para el maurano, se ha descrito que la producción óptima de exopolisacárido se produce cuando la agitación de los cultivos es de 100 rpm, de manera que una aireación menor es insuficiente, mientras que niveles superiores de agitación (200 rpm) pueden originar zonas estanco de aire, viendose dificultada la producción del polímero por parte de la bacteria (Arias y col., 2003).

3.11.4. Influencia de las condiciones de cultivo sobre la masa molecular

Una de las propiedades físicas más influenciadas por las condiciones de cultivo es la masa molecular de los exopolisacáridos.

La masa molecular del zooglano, exopolisacárido producido por *Zoogloea ramigera*, puede modificarse según la composición del medio de cultivo (Guillouet y col., 1999). Para ello, se estudiaron las propiedades del polímero producido en un medio definido con y sin extracto de levadura. Aunque la composición del zooglano en ambos medios es idéntica, los componentes presentes en el medio tienen un gran efecto sobre su grado de polimerización y concretamente en el medio adicionado de extracto de levadura, el zooglano tiene una masa molecular superior. Esto se explica porque el extracto de levadura

contiene una enorme variedad de componentes que pueden provocar la inducción de la síntesis y actividad de polimerasas o despolimerasas. En el caso de *Zoogloea*, se ha comprobado que se produce un mayor grado de polimerización.

La naturaleza de la fuente de carbono también puede llegar a condicionar la masa molecular de un determinado polímero. En medios con almidón, *Aureobasidium pullulans* produce pululano de menor masa molecular que cuando la fuente de carbono es glucosa o sacarosa (Silman y col., 1990).

Otros factores que afectan a la masa molecular de los polímeros son la concentración de fosfatos y la osmolaridad del medio, tal y como ocurre con el pululano o el succinoglicano producido por *Sinorhizobium meliloti* (Breedveld y col., 1990; McNeil y Harvey, 1993). Por otra parte, la adición de un surfactante no iónico como el Brij[®]76 al medio de producción de succinoglicano permitió obtener un producto de mayor masa molecular (Stredansky y col., 1998).

Por último, resulta muy interesante el caso de aquellos microorganismos en los que tiene lugar la producción simultánea de dos exopolisacáridos. En *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* LC 330, productora de dos EPS de diferente masa molecular, una limitación de nitrógeno en el medio determina preferentemente la producción del polímero de mayor tamaño de modo que se puede inducir la producción de la fracción polisacáridica de mayor interés modificando tanto las condiciones de cultivo como la composición del medio (Marshall y col., 1995).

3.12. Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos

Desde el punto de vista comercial, los exopolisacáridos microbianos han despertado gran interés. Actualmente han sido comercializados algunos exopolisacáridos microbianos con aplicación en múltiples sectores industriales. Estos productos incluyen la celulosa bacteriana, el curdlano, el gelano y el xantano, entre otros (Tabla 7).

De entre estos exopolisacáridos producidos a nivel industrial, la legislación únicamente ha aprobado para su uso alimentario en Europa y Estados Unidos al xantano y gelano; mientras que el curdlano sólo se encuentra aceptado como aditivo alimentario en Japón (Sutherland, 1998; 2001a).

Dadas sus interesantes propiedades, el xantano sigue siendo considerado como el polímero de referencia para el amplio grupo de exopolisacáridos microbianos existentes y de nueva aparición. En 1969 fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y en 1980 recibió su aprobación por la Unión Europea, a la vez que se le asignó el número E-415.

Tabla 7. Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos (adaptado de Sutherland, 1990; 1998; 2001a).

Propiedades	Aplicación	Polímero
Naturaleza antigénica que origina respuesta de anticuerpos	Agentes antitumorales, antivirales, inmunomoduladores	β -D-glucanos
Anticoagulantes	La misma de la heparina	EPS de <i>Escherichia coli</i> K5
Naturaleza polisacáridica	Sustratos de enzimas Preparación de oligosacáridos	EPS de <i>Escherichia coli</i> K5 Curdano, pululano, escleroglucano
Estabilizantes de emulsiones	Helados, aderezos de ensaladas	Xantano
Formadores de fibras elásticas	Membranas acústicas	Celulosa bacteriana
Formadores de películas	Cubiertas protectoras de alimentos y de formas farmacéuticas	Pululano Celulosa bacteriana
Agentes floculantes	Extracción de minerales	Varios
Estabilizantes de espumas	Cerveza, extintores de incendios	Xantano
Agentes gelificantes	Tecnología celular y enzimática Pastelería, postres lácteos, gelatina Recuperación de petróleo	Gelano Curlano, gelano Curlano, xantano
Agentes hidratantes	Cosméticos y productos farmacéuticos	Acido hialurónico
Inhibidores de la formación de cristales	Alimentos congelados, pastillas y jarabes azucarados	Xantano
Agentes suspensores	Formulación de pesticidas y sprays	Xantano
Agentes viscosizantes	Tintas de impresoras, tintes textiles, pinturas Mermeladas, salsas y jarabes	Xantano

3.12.1. Industria alimentaria

El uso de los exopolisacáridos microbianos en alimentación se debe principalmente a su capacidad para alterar las propiedades reológicas del agua presente en los productos alimenticios así como para modificar su textura. De hecho, la mayor parte de los EPS empleados en este sector se comportan como agentes espesantes o gelificantes.

Existe un gran número de exopolisacáridos microbianos que pueden ser utilizados como **agentes gelificantes**, no obstante, cada uno de ellos presenta propiedades gelificantes específicas y por tanto, sólo serían válidos para determinados alimentos. Son de especial importancia en alimentación los geles de gelano, curdlano, así como geles de xantano-galactomananos.

En relación con su **poder viscosizante** y en particular con el comportamiento pseudoplástico de muchos biopolímeros, estos compuestos originan una sensación agradable en el paladar en aquellos

alimentos a los que son adicionados. En definitiva, algunas características organolépticas de los alimentos como su apariencia, sabor o color pueden estar influenciadas por la presencia de polisacáridos microbianos. El almidón de maíz y xantano producen, por ejemplo, un agradable sabor dulce.

En la industria alimentaria, **las bacterias ácido-lácticas** (BAL) se incorporan intencionadamente a una gran variedad de productos como leche, carnes o derivados cárnicos y verduras, con el propósito de conseguir un producto final estable y seguro con características sensoriales únicas y un valor nutritivo adecuado (Caplice y Fitzgerald, 1999; Gilliland, 1985). La industria láctea ha logrado desarrollar una gran variedad de productos derivados de la leche con distintas texturas y propiedades organolépticas usando diferentes tecnologías y gracias a la fermentación llevada a cabo por las BAL. Estos microorganismos provocan una acidificación rápida del producto por la fermentación de la lactosa, lo cual preserva a la leche de la proliferación de otros microorganismos y permite la obtención de productos fermentados como el yogur o el queso (Ruas-Madiedo y col., 2002). La textura y viscosidad de los derivados lácteos fermentados se debe en gran parte a la síntesis de exopolisacáridos por la mayoría de bacterias ácido-lácticas. Por ello, la producción de EPS resulta crucial y de gran significado tecnológico en la obtención de estos productos, debido a sus propiedades viscosizantes, estabilizantes y a su capacidad de retención de agua. La utilización de cepas BAL productoras de EPS en la elaboración de derivados lácteos fermentados es una práctica habitual incluso en países en los que la incorporación de aditivos de origen vegetal o animal está prohibida. En la fabricación de yogur se utilizan cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que son productoras de EPS y mejoran la textura, evitando la sinéresis e incrementando la viscosidad del yogur. Otras cepas productoras de EPS, como distintas especies de *Lactococcus*, son de uso común en la elaboración de un lácteo similar al yogur, el viili, en Escandinavia (Ruas-Madiedo, y col., 2002).

Algunos exopolisacáridos microbianos se adicionan a los alimentos como **agentes estabilizadores de emulsiones** (Sutherland, 1990). Las emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite son muy comunes en alimentación. Existen muchos productos (salsas, cremas, patés, etc.), en los que aceites, compuestos lipídicos, agua y otros ingredientes se incorporan conjuntamente. En ocasiones estos sistemas multifásicos son desecados para una reconstitución en el momento de ser consumidos; como ocurre con las sopas instantáneas, postres o salsas, entre otros. El xantano se emplea para la elaboración de este tipo de productos alimenticios desecados; puesto que se disuelve en agua fría o caliente dando lugar a dispersiones de naturaleza tixotrópica que pueden ser calentadas o refrigeradas sin sufrir ninguna alteración. La adición de este tipo de polímeros impide la separación de las fases constituyentes del producto asegurando una prolongada estabilidad del mismo. La estabilidad del xantano en un amplio rango de pH, así como su compatibilidad con la mayor parte de los ingredientes, lo hacen especialmente útil en este tipo de productos, salsas, cremas o yogur, en los que normalmente el pH es ácido (Sutherland, 1998; 2001a; Yilmazer y col., 1991).

Los exopolisacáridos son fuente de 6-desoxiazúcares para la síntesis de **agentes saborizantes** como el furaneol y sus derivados (Graber y col., 1988). El furaneol confiere sabor a caramelo, aunque mediante una serie de modificaciones puede originar distintos sabores. Debido a su elevado coste, la búsqueda de nuevas fuentes para la obtención de estos compuestos, entre ellas los biopolímeros microbianos, es de gran interés (Sutherland, 1990).

3.12.2. Industria farmacéutica y medicina

Los exopolisacáridos tienen un gran número de aplicaciones relacionadas directa o indirectamente con la medicina, que se basan en sus propiedades funcionales y/o sus propiedades biológicas.

Los dextranos son utilizados como **sustitutos del plasma** a una concentración del 6 % (p/v), lo que origina una viscosidad y comportamiento osmótico similar al del plasma sanguíneo humano. Estos compuestos no se degradan rápidamente y causan menor daño hepático que otros sustitutivos del plasma.

Una aplicación de los alginatos procedentes de algas consiste en utilizar las fibras de alginato cálcico en la elaboración de **vendas** destinadas a absorber los exudados de una herida, pues además de ser hemostáticas, no irritan la piel. Con esta misma finalidad se pueden emplear los alginatos microbianos de similar composición a los procedentes de algas (Crescenzi y col., 1989).

Asimismo, se está empleando la celulosa de origen bacteriano que es capaz de formar una especie de "piel artificial" sobre quemaduras graves (Bielecki y col., 2002).

Con interés en clínica citaremos también el ácido hialurónico, de utilidad en **cirugía ocular**, donde encuentra aplicación por su gran similitud con el material encontrado en el humor vítreo. Este compuesto, además de poder incluirse en lágrimas artificiales, se utiliza como ingrediente de varias preparaciones farmacéuticas (Sutherland, 1998).

La heparina se emplea como fármaco **antitrombótico y antilipémico**; son numerosos los estudios que tratan de mejorar la eficacia terapéutica de este polímero y reducir sus efectos secundarios mediante la modificación de su estructura química y tamaño molecular.

Los alginatos y otros polisacáridos, como el gelano, tienen potenciales aplicaciones en el desarrollo de productos encapsulados para la **liberación retardada de fármacos y hormonas** (Benedetti y col., 1989; Craig y col., 1997).

Por otra parte, los oligosacáridos derivados de fuentes microbianas como los β -glucanos de *Rhizobium* parecen ser útiles para la síntesis de nuevos productos con actividad farmacológica.

Los polisacáridos capsulares de bacterias patógenas son responsables de la mayor parte de interacciones hospedador-patógeno y activan el sistema inmunológico de defensa. La respuesta de los anticuerpos frente a un antígeno polisacárido varía según las propiedades físicas y químicas del mismo (Sutherland, 1990). En función a estas características se han llegado a diseñar vacunas con EPS microbianos que ofrecen ventajas sobre las obtenidas con microorganismos completos. Un problema asociado con las vacunas elaboradas con exopolisacáridos de bacterias Gram negativas es la presencia de pequeñas cantidades de lipopolisacárido procedente de la pared bacteriana. La retirada de este componente es un paso crucial y crítico para prevenir reacciones de shock en los pacientes (Adam y col., 1995). Existe otro problema relacionado con el uso de estos polisacáridos bacterianos como vacunas y es la escasa respuesta que provoca en niños menores de 2 años, casualmente el grupo de mayor riesgo frente a estas infecciones. Para solventar este problema se han llevado a cabo numerosos estudios y se ha realizado la unión de los polisacáridos a un transportador de naturaleza proteica, por lo que actualmente las vacunas conjugadas han sustituido en algunos casos a las constituidas únicamente por polisacáridos (O'Brien y Santosham, 2004). Las tres **vacunas** de polisacáridos microbianos más importantes son:

- vacuna frente a *Haemophilus influenzae* tipo b.
- vacuna frente a meningococos del serogrupo Y, A y C.
- vacuna multivalente frente a *Streptococcus pneumoniae*

La actividad protectora, no específica, frente a un gran número de virus ha sido demostrada en varios polisacáridos, principalmente polímeros de eucariotas, entre los que destacan la heparina y el carragenato (Sutherland, 1990).

La heparina muestra un potente efecto inhibitorio de la replicación de los herpesvirus, aunque únicamente es activa en las primeras etapas de replicación viral. Puesto que es una molécula polianiónica, se ha sugerido como mecanismo que ésta interacciona con las cargas positivas presentes en el virus o en la superficie celular, inhibiendo de este modo la adsorción viral (González y col., 1987). De modo similar se ha encontrado que el carragenato tiene un potente efecto inhibitorio del virus del herpes simple (VHS-1) (González y col., 1987). Ambos polisacáridos carecen de efectos citotóxicos y su modo de actuación es mediante el bloqueo de la adsorción y la multiplicación viral.

Una característica de algunos 1,3- β -D glucanos de origen fúngico es su **actividad antitumoral**. Todos ellos son glucanos relacionados por su estructura con el escleroglucano, aunque varían en cuanto a su solubilidad en agua y la naturaleza de sus cadenas. Un ejemplo de estos polímeros son los

producidos por basidiomicetos lignocelulolíticos, como *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor*. Con algunos de estos glucanos fúngicos se ha demostrado experimentalmente una reducción en los tumores de ratones (Burns y col., 1994).

El polisacárido microbiano curdlano también presenta actividad antitumoral *in vivo* a dosis similares a las empleadas de β -D glucanos fúngicos. Se ha sugerido que los polisacáridos sulfatados de origen no microbiano inhiben metástasis tumorales por el bloqueo de heparinasas desarrolladas en el tumor, acción que no se ha confirmado para el caso de los β -D glucanos (Sutherland, 1990). Asimismo se ha estudiado la actividad antitumoral del exopolisacárido producido por *Lactobacillus kefiranofaciens* (Santos y col., 2003), del EPS de *Agaricus blazei* (Shu y Wen, 2003) y de un derivado del dextrano nativo (Bastias y col., 2002).

La principal fuente de polisacáridos bacterianos sulfatados la proporcionan las cianobacterias, aunque actualmente cada vez es mayor el número de polímeros aislados con estas características de origen bacteriano. Existen numerosas publicaciones sobre el efecto de los polisacáridos sulfatados sobre distintos virus *in vivo*, incluidos virus de inmunodeficiencia humana (Baba y col., 1988; Bagasra y Lischner, 1988; Lynch y col., 1994; Javan y col., 1997; Neurath y col., 2002). Otros estudios han puesto de manifiesto la actividad contra el herpesvirus del polisacárido sulfatado producido por microalgas rojas (Huleihel y col., 2003), mientras que Yim y colaboradores (2003; 2004) estudiaron el exopolisacárido sulfatado sintetizado por la cepa KG03 de la microalga marina *Gyrodinium impudicum*, y Carlucci y colaboradores (2002) los carragenatos producidos por el alga marina *Gigartina skottsbergii*. Finalmente, Ono y colaboradores (2003) estudiaron la actividad antiviral *in vivo* e *in vitro* de galactomananos sulfatados contra el virus de la fiebre amarilla y el virus Dengue 1.

El tratamiento clínico con polisacáridos sulfatados aún no ha tenido éxito en la terapia de infecciones víricas humanas por su actividad anticoagulante, debida a su alto contenido de sulfatos o su gran tamaño molecular que le impide atravesar fácilmente las membranas. A esto hay que añadir su pobre absorción oral (Okutani, 1992; Okutani y Shigesta, 1993; Yim y col., 2004).

3.12.3. Aplicaciones en la industria cosmética

Los materiales empleados en este campo son principalmente de origen vegetal, o procedentes de algas, incluidos los alginatos, aunque también han encontrado aplicación polisacáridos microbianos entre los que destacamos el xantano.

En cuanto a las propiedades utilizadas de los polímeros, son muy similares a las empleadas en alimentación, y es importante la ausencia de sabor de los polisacáridos que serán incorporados a determinadas preparaciones.

El xantano, por su carácter pseudoplástico, y gracias a la sensación que origina en el paladar se incorpora a pastas de dientes y otros productos. En base a sus propiedades gelificantes, el gelano también se emplea en productos dentales y de cuidado personal, como los desodorantes y geles cosméticos, en los que se requiere una menor concentración de este polímero que de la mezcla carragenano-goma garrofín, de uso tradicional (Giavasis y col., 2000). Por su elevada capacidad de retención del agua, el ácido hialurónico también se utiliza en numerosos productos cosméticos (Sutherland, 1998).

3.12.4. Exopolisacáridos microbianos como fuente de L-fucosa

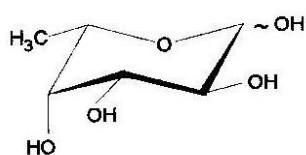


Figura 14. L-fucosa.

Algunos exopolisacáridos microbianos, normalmente conocidos por sus propiedades reológicas, su capacidad para formar geles, o su actividad emulgente, podrían constituir una fuente para la obtención de azúcares poco frecuentes como L-fucosa (Figura 14), que tiene potenciales aplicaciones en **Medicina** (antitumoral, antiinflamatorio, contra la artritis reumatoide, producción de anticuerpos) (Bauer y Reutter, 1978; Kieda y Monsigny, 1986; Roszkowski y col., 1989; Kamel y Serafi, 1995) y en **Cosmética** (como hidratante y reafirmante de la piel) (Molina, 1998; Robert y col., 2004a y b).

La síntesis química de L-fucosa es un proceso muy laborioso y de bajo rendimiento (Tanimura, 1961; Chiba y Tejima, 1979; Defaye y col., 1984; Gesson y col., 1992; Dejter-Juszynski y Flowers, 1973; Kristen y col., 1988; Sarbajna y col., 1995), y la obtención a partir de algas marrones es costosa y está sujeta a variaciones estacionales en cuanto a cantidad y calidad (Black y col., 1952; Schwerger, 1966; Takemura y col., 1986; 1988). La síntesis enzimática está siendo actualmente sometida a investigación (Wong y col., 1995). La hidrólisis química o enzimática de exopolisacáridos ricos en L-fucosa abre nuevas líneas de trabajo para una obtención eficiente de este azúcar inusual (Vanhooren y Vandamme, 1999).

El crecimiento y la producción de EPS por parte de *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 12657 y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa LMG 5604 han sido ampliamente estudiados (Vanhooren, 1997) ya que los exopolisacáridos que sintetizan contienen L-fucosa en su composición. *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 12657, en condiciones óptimas, produce 2,5 g/l de EPS, que se corresponden con 0,5 g/l de L-fucosa, mientras que *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa LMG 5604, una vez establecidas las mejores condiciones

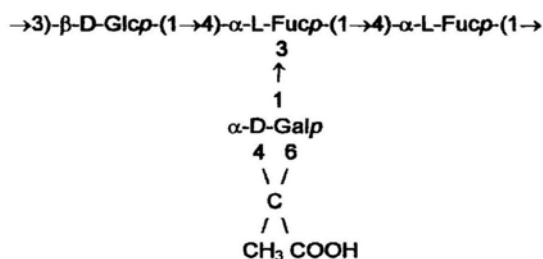


Figura 15. Unidad repetitiva del clavano.

para el crecimiento y la producción del polímero (denominado clavano, Figura 15), produce 19,7 g/l de EPS, que suponen 7,4 g/l de L-fucosa.

3.12.4. Otras aplicaciones

El empleo de los EPS, fuera de las aplicaciones clínicas y en alimentación, refleja varios de sus atributos físicos. Es en el sector de la **industria del petróleo** donde los exopolisacáridos han sido realmente aceptados en competencia con gomas de plantas, sus derivados y compuestos químicos sintéticos. En este campo, se emplea la solución de polímero para movilizar al petróleo que, en otras circunstancias, permanecería *in situ*. Asimismo, pueden emplearse para aumentar la viscosidad y, por tanto, disminuir la movilidad del agua que se inyecta en los pozos de crudo. Así, los polímeros empleados en este campo deben poseer un tamaño molecular que les permita atravesar los poros de la roca, deben dar lugar a soluciones de alta viscosidad que no se vean afectadas por altas concentraciones de sal, altas temperaturas y presiones o por las deformaciones inherentes a las operaciones de bombeo (Sutherland, 1982).

Además de en la industria del petróleo, existen otra serie de aplicaciones industriales para aquellos EPS con otras propiedades físicas.

Así, los geles de polisacáridos producidos por bacterias, hongos y algas son ampliamente utilizados en la inmovilización de enzimas y células (el-Naggar y col., 2003; Jahnz y col., 2003; Zohar-Pérez y col., 2003; Le-Tien y col., 2004).

Los polisacáridos se emplean como espesantes en la **industria de pinturas** y adherentes para la aplicación de tintes. Los geles son destinados también a la preparación de medios de cultivo en microbiología, como por ejemplo los de gelano, como principal alternativa por presentar propiedades específicas (Giavasis y col., 2000).

Los alginatos son de utilidad en **agricultura**, donde se aplican como agentes de revestimiento cuando se plantan árboles jóvenes o arbustos; las raíces se sumergen en una solución de polisacárido con el fin de recubrirlas con una película protectora que evite su desecación mientras tiene lugar el trasplante (Vanhooren y Vandamme, 1998; Chand y Singh, 2004). Curiosamente, tales soluciones polisacarídicas también se han empleado para sumergir en ellas a los árboles de Navidad con objeto de prolongar el periodo en que éstos permanecen sin marchitarse en un ambiente seco y cálido.

Otro de los usos potenciales de los polisacáridos reside en su contenido en ácidos urónicos, que permite la unión de la célula a superficies y la adsorción de compuestos. Los EPS con alto porcentaje de ácidos urónicos tienen mucho interés desde el punto de vista biotecnológico y se utilizan para la **adsorción de metales pesados** (Kaplan y col., 1987; Geddie y Sutherland, 1993).

OBJETIVOS

El Grupo de Investigación “Exopolisacáridos Microbianos” (CVI 188) de la Universidad de Granada, desarrolla actualmente su trabajo en las siguientes líneas de investigación:

- Biodiversidad de ambientes hipersalinos.
- Taxonomía y filogenia de bacterias halófilas.
- Caracterización molecular de genes de especies del género *Halomonas*.
- Estudio de exopolisacáridos de interés biotecnológico producidos por bacterias halófilas.

En los últimos años hemos estudiado distintos ambientes hipersalinos; con el fin de dotar a nuestras investigaciones de un carácter aplicado, se realizaron aislamientos dirigidos a encontrar específicamente bacterias halófilas productoras de exopolisacáridos. Como resultado de estos esfuerzos hemos descrito seis nuevas especies de microorganismos halófilos productores de EPS: *Halomonas ventosae*, *Halomonas anticariensis*, *Halomonas almeriensis*, *Idiomarina ramblicola*, *Idiomarina fontislapidosi* y *Alteromonas hispanica*, y dos nuevos géneros, *Salipiger mucosus* y *Palleronia marismminoris*. Aún así, nuestra colección de microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos es muy amplia, y no todas las cepas que la constituyen están caracterizadas. A fin de iniciar el estudio taxonómico de los microorganismos que aún no están identificados, de producir de manera eficaz los EPS sintetizados por nuestras bacterias, y de conocer en profundidad su composición química y propiedades funcionales, se plantearon los siguientes objetivos para la presente Tesis Doctoral:

- 1. Comenzar la caracterización taxonómica de las cepas productoras de EPS de nuestra colección que todavía no han sido validamente descritas por nuestro Grupo de Investigación, mediante el análisis filogenético de las mismas.**
- 2. Optimizar el proceso de producción de los EPS.**
- 3. Analizar la composición química, la masa molecular y las propiedades físicas de los EPS.**
- 4. Evaluar las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los EPS.**
- 5. Conocer el papel fisiológico de los EPS.**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Los microorganismos empleados para la realización del presente estudio se detallan a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Cepas productoras de exopolisacáridos objeto de estudio, hábitat de aislamiento e identificación.

CEPA	HÁBITAT	MUESTRA	IDENTIFICACION*
X2	Salinas de Souk El Arbaa (Marruecos)	Suelo	<i>Halomonas maura</i>
B40	Salinas de La Malá, Granada (España)	Suelo	"
B100	Salinas de Sabinar, Murcia (España)	"	"
N12	Salinas de San Pedro de Pinatar, Murcia (España)	"	"
A16	Salinas de Marchamalo, Murcia (España)	"	"
M4	Salinas de Cabo de Gata, Almería (España)	"	<i>Halomonas eurihalina</i>
X8	Salinas de Asilah (Maruecos)	Suelo	"
AI12 ^T	Barranco de la Salina, Jaén (España)	"	<i>Halomonas ventosae</i>
AI15	"	"	"
AI16	"	"	"
FP34	Laguna Redonda, Málaga (España)	"	<i>Halomonas anticariensis</i>
FP35 ^T	"	"	"
FP36	"	"	"
A3 ^T	Salinas de Calblanque, Murcia (España)	"	<i>Salipiger mucosus</i>
M8 ^T	Salinas de Cabo de Gata, Almería (España)	Agua	<i>Halomonas almeriensis</i>
B33 ^T	Salinas de Marchamalo, Murcia (España)	Suelo	<i>Palleronia marisminoris</i>
F23 ^T	Laguna de Fuente de Piedra, Málaga (España)	"	<i>Idiomarina fontislapidosi</i>
R22 ^T	Rambla Salada, Murcia (España)	Agua	<i>Idiomarina ramblicola</i>
F32 ^T	Laguna de Fuente de Piedra, Málaga (España)	"	<i>Alteromonas hispanica</i>
B35	Salinas de Marchamalo, Murcia (España)	"	<i>Alteromonas spp.</i>

*Ver Capítulo I de Resultados y Discusión, Caracterización taxonómica de las cepas.



Figura 16. Salinas de Asilah, al Norte de Marruecos, y humedal de Rambla Salada, en Murcia

2. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Para el mantenimiento de los microorganismos se hizo una resiembra periódica, cada 3 meses, en tubos de medio MY (Moraine y Rogovin, 1966), adicionado de agar al 2% (p/v), y suplementado con

una solución de sales cualitativamente similar al agua del mar (Rodríguez-Valera y col., 1981) hasta una concentración final de sales del 7,5% (p/v). El pH del medio se ajustó a pH 7,2 con NaOH 1M. Dichos tubos se incubaron durante 24 horas a 32 °C. Igualmente, las cepas se mantuvieron liofilizadas para su conservación a largo plazo.



Figura 17. Aspecto de las colonias de *Halomonas maura* B100 tras 48 horas de la siembra en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales.

Medio MY (Moraine y Rogovin, 1966)

Glucosa anhidra (Panreac)	10g
Proteosa Peptona nº3 (Cultimed)	5g
Extracto de Malta (Cultimed)	3g
Extracto de Levadura (Cultimed)	3g
Solución de Sales al 30%	250 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Solución de sales al 30% (p/v) (Rodríguez-Valera, 1981)

NaCl (Panreac)	205,2g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O (Merk)	36,0g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (Merk)	52,0g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (Merk)	0,8g
KCl (Merk)	5,2g
NaHCO ₃ (Merk)	0,2g
NaBr (Merk)	0,6g
Solución al 0,5% (p/v) de FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,65 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

3. ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS

Amplificación del gen ADNr 16S: Se amplificaron las secuencias del gen ADNr 16S de las cepas que formaron parte de este trabajo y que hasta el momento no han sido definitivamente caracterizadas desde el punto de vista taxonómico. Para ello, se utilizó ADN de las cepas disuelto en agua bidestilada, y se amplificó el gen por PCR, utilizando el protocolo de Saiki y colaboradores (1988). Se utilizó el cebador directo 16F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), que se une a las posiciones 8-27, y el cebador reverso 16R1488 (5'-CGGTTACCTTAGGACTTCACC-3') (Pharmacia), unido a las posiciones complementarias 1511-1488 [*E. coli* numbering (Brosius y col., 1978)]. Para completar toda la secuencia del gen, se diseñaron nuevos cebadores, complementarios a las posiciones intermedias.

Secuenciación del fragmento de ADN amplificado: Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Microcon® PCR, para purificación de fragmentos de PCR, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra de Granada, utilizando el aparato Applied Biosystems (modelo 373 STRECHT). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator, que utiliza en la reacción de extensión el enzima AmpliTaq ADN polymerase y emplea didesoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

Análisis filogenético: Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de los genes ADNr 16S disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL obtenidas de la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica, usando BLAST search. Se realizó un árbol filogenético con las secuencias ADNr 16S de las cepas incluidas en este trabajo más otras cepas de referencia, utilizando el software MEGA 3.0 (Kumar y col., 2004) y el alineamiento de secuencias mediante el método Clustal_X (Thompson y col., 1997). Las distancias filogenéticas y los agrupamientos se determinaron utilizando el método "neighbour-joining". La fiabilidad de los agrupamientos se aseguró por un análisis "bootstrap" (1000 réplicas).

4. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

Los exopolisacáridos, que recibieron como denominación las mismas siglas que los microorganismos que los producen, se obtuvieron según la metodología descrita por Quesada y colaboradores en 1993 (Figura 18).

Se partió de un cultivo de 5 ml de cada una de las cepas en medio MY al 5% (p/v) de sales, obtenido tras el crecimiento de las mismas durante 24 horas a 32°C. Con dicho cultivo se inocularon con un volumen de 1 ml, cuatro matraces erlenmeyer de 500ml que contenían 150ml de medio MY 5% (p/v) de sales y se incubaron a 32°C durante cinco días en agitación (100rpm).

Transcurrido este tiempo, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 60 minutos (Centrífuga Sorvall RC-5B, rotor GSA). Al sobrenadante se le añadieron tres volúmenes de etanol 96% (v/v) frío (-80° C) y tras 12 horas a 4° C se recogió el precipitado del material extracelular (EPS) mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 10 minutos, con el fin de eliminar el alcohol.

A continuación, se dejaron evaporar totalmente los posibles restos de alcohol en el precipitado y éste se solubilizó en agua destilada. El material extracelular en solución se purificó mediante ultracentrifugación a 50.000 rpm durante 60 minutos (Ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor 50Ti). Posteriormente, el sobrenadante se dializó empleando membranas de diálisis Midicell de tamaño de poro 12-14000 Daltons, durante 72 horas en agua destilada y por último, se liofilizó para que estuviera exento de agua y así poder determinar la producción por gravimetría.

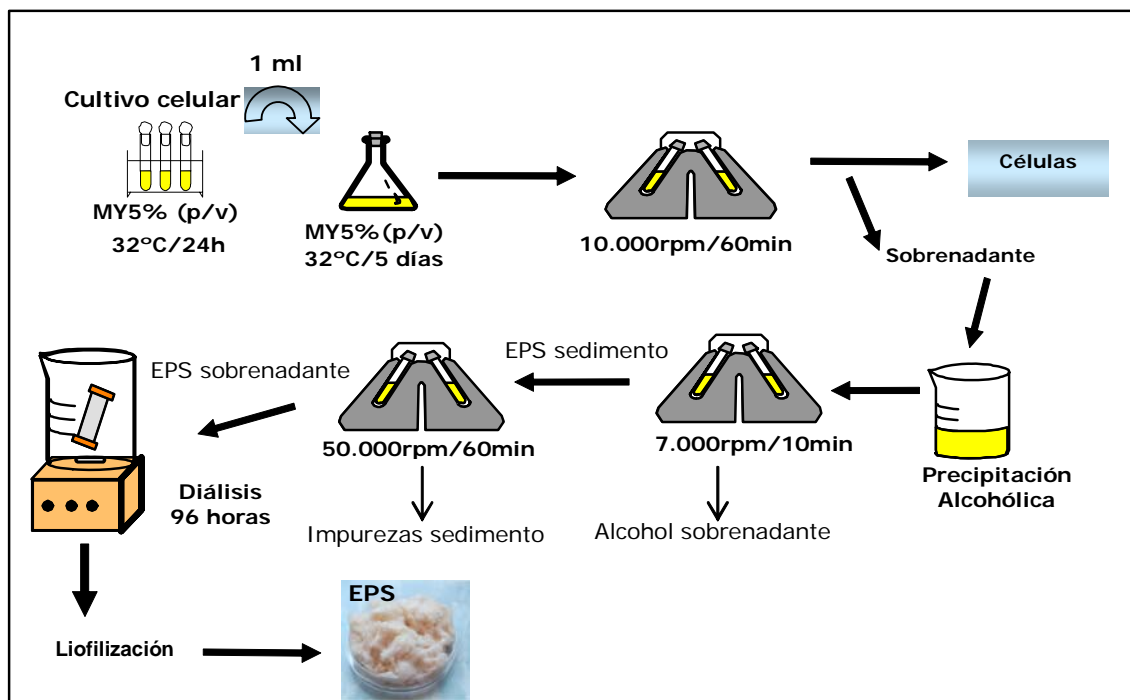


Figura 18. Proceso de extracción del EPS.

La productividad de cada cepa se expresó en gramos de EPS (producto final liofilizado) por litro de medio de cultivo y con respecto al peso seco celular (gramos de EPS por gramo de peso seco celular). Este producto purificado se utilizó para los posteriores estudios químicos, y determinación de la masa molecular.

5. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

El estudio de la influencia sobre la producción del exopolisacárido, de distintas condiciones de cultivo así como de la adición de diversos nutrientes en medio complejo, se llevó a cabo a partir del medio de cultivo MY.

Para todos los ensayos, partimos de unas condiciones de cultivo estándar que son las siguientes: cultivo en matraces erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio MY al 7,5 % (p/v) de sales, incubación a 32°C y 100 rpm durante 5 días. Cada uno de los matraces se sembró con un 1 % de inóculo (con una densidad óptica entre 1 y 1,2 a una longitud de onda de 600 nm) preparado en el mismo medio. Estas condiciones se mantuvieron, introduciéndose una serie de variaciones en cada caso en función del parámetro estudiado, las cuales se indican a continuación.

En cada uno de los ensayos, realizados por triplicado, se determinó la producción de exopolisacárido (g EPS/l y g EPS/g PSC) y la biomasa celular (g PSC/l). El método de extracción de polímero empleado fue el descrito por Quesada y colaboradores en 1993.

5.1. Tiempo de incubación

Con objeto de determinar en que fase del crecimiento se produce la mayor cantidad de exopolisacárido se realizaron por triplicado las siguientes determinaciones: D.O. de los cultivos a 600 nm, g biomasa/l y g EPS/l a distintos tiempos de incubación: 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas (8 días).

Para ello se prepararon tres series de 8 matraces cada una, que se incubaron en las mismas condiciones, siguiendo las pautas estandarizadas y a los distintos tiempos de incubación se procedió a llevar a cabo las diferentes determinaciones.

5.2. Concentración de sales

La concentración óptima de sales se determinó adicionando al medio MY una mezcla de sales (Rodríguez-Valera y col., 1981) hasta un porcentaje final del 2,5; 5; 7,5 y 10 % (p/v).

5.3. Fuente de carbono y nitrógeno

Se ensayaron las siguientes fuentes de carbono incorporadas a una concentración final del 1% (p/v) en el medio MY al 7,5% (p/v) en sales: glucosa, sacarosa, manosa y galactosa. También se ensayó

la sustitución en el medio MY, con glucosa como fuente de carbono, de la proteosa peptona y los extractos de malta y levadura por bacto-peptona.

5.4. Concentración de la fuente de carbono

Se ensayó la adición de glucosa como fuente de carbono al medio MY a las concentraciones del 1, 2, 5, 7 y 10 % (p/v). De igual forma, se determinó la productividad del exopolisacárido y la biomasa en el mismo medio en ausencia de fuente de carbono.

5.5. Temperatura de incubación

A partir del medio MY como medio de producción del exopolisacárido se ensayó la influencia de la incubación durante cinco días a distintas temperaturas: 22, 32 y 42 °C.

5.6. Agitación

Se ensayó el efecto de la agitación de los cultivos a 100 y 200 rpm, en comparación con aquellos incubados en reposo.

6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

6.1. ANÁLISIS COLORIMÉTRICOS

6.1.1. Determinación del contenido de carbohidratos (Dubois y col., 1956).

Este método se basa en la presencia ésteres metílicos en los mono, oligo y polisacáridos así como en sus derivados, los cuales son grupos potencialmente reductores que dan una coloración amarillo-anaranjada estable cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico provoca la hidrólisis del polisacárido de modo que al quedar los monómeros libres reaccionan con el fenol y se obtiene la coloración que servirá para la cuantificación de los carbohidratos presentes en la muestra.

Reactivos:

Ácido sulfúrico de pureza 95-98% (v/v) (Panreac)

Solución de fenol al 5% (p/v) (Sigma). Dicha solución presenta un aspecto blanquecino y suele amarillear aproximadamente tras un año de almacenamiento.

Técnica:

A partir de una suspensión de 1mg/ml de exopolisacárido en agua destilada, se tomaron 30 µl y se completó hasta 200 µl con agua destilada. A esta mezcla se adicionó 200 µl de fenol al 5% (p/v); se

agitó vigorosamente y se añadió bruscamente 1 ml de ácido sulfúrico, con objeto de que la solución entrara en ebullición para que la reacción transcurriera correctamente. Tras 10 minutos de reposo, se volvió a agitar con vigor y se incubaron las muestras 10-20 minutos a 25-30° C. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución de glucosa (Sigma) en agua destilada a concentración de 1 mg/ml.

6.1.2. Determinación del contenido de proteínas (Bradford, 1976).

Esta técnica está basada en la formación de un compuesto azulado debido a la formación de un complejo entre las proteínas y el reactivo colorante "Azul de Comassie". Se trata de un método más sensible que el tradicional de Lowry (Lowry y col., 1951) que permite detectar pequeñas cantidades de proteínas.

Reactivos:

Reactivo de Bradford o Coomassie Brilliant Blue 250 (Sigma).

Técnica:

A partir de una suspensión de 1 mg/ml de exopolisacárido en agua destilada, se tomaron 200 µl y se completaron hasta 800 µl con agua destilada. A esta solución se le añadieron 250 µl del reactivo de Bradford, agitando la muestra vigorosamente para finalmente medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 590 nm.

El reactivo empleado origina una coloración azul con las proteínas que permanece estable al menos durante una hora, a partir de la cual el complejo tiende a agregarse pudiendo aparecer un precipitado que provoca la alteración de las medidas, Así, para mayor precisión de la determinación, la medida de absorbancia de las muestras debe realizarse entre los 5 y 20 minutos siguientes a la adición del reactivo.

Se preparó una solución de 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (Sigma) a partir de la cual se hizo una dilución 1/10 (100 µg/ml) que constituyó la solución madre para llevar a cabo la curva patrón.

6.1.3. Determinación del contenido de ácidos urónicos (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

Este método está basado en la hidrólisis del polisacárido por reacción con el sulfúrico-tetraborato, liberándose los ácidos urónicos que reaccionan con el 3-fenil-fenol, apareciendo un cromógeno de color rosado.

Reactivos:

3-fenil-fenol: solución de 3-fenil-fenol al 0.15% (p/v) (Sigma) en NaOH al 0.5% (p/v) (Panreac).

Ácido sulfúrico tetraborato: solución de tetraborato sódico (Sigma) a concentración 0.0125 M en ácido sulfúrico concentrado (Panreac).

Técnica:

A partir de una suspensión de exopolisacárido en agua destilada a una concentración de 10 mg/ml, se tomaron 200 µl y se le adicionaron 1.2 ml de ácido sulfúrico-tetraborato mientras se mantenía la muestra refrigerada en hielo. Tras una agitación vigorosa se calentó durante 5 minutos a 100° C y transcurrido este tiempo se enfrió la muestra en hielo. En ese momento se adicionaron 20 µl de 3-fenil-fenol, se agitó vigorosamente y tras 5 minutos de reposo se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 590 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre de 1 mg/ml de ácido glucurónico en agua destilada.

6.1.4. Determinación del contenido de restos acetilo (McComb y McCready, 1957).

El fundamento de esta determinación radica en que los grupos éster con hidroxilamina en medio básico dan lugar a los ácidos hidroxámicos, que se combinan con los restos acetilo para formar los ácidos acetohidroxámicos y originar un complejo soluble rojo en presencia de iones hierro.

Reactivos:

Hidróxido sódico al 9.4% (p/v) (Panreac)

Hidroxilamina al 3.7% (p/v) (Sigma)

Perclorato férrico:

Solución A: Se disolvieron 1,93 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Probus) en HCl concentrado (Panreac). Posteriormente se añadieron 5 ml de ácido perclórico al 70% (v/v) (Merck) y se evaporó hasta sequedad. Por último se completó esta dilución hasta un volumen de 100 ml con agua destilada.

Solución B: A 12 ml de la solución A se le añadieron 1,66 ml de ácido perclórico 70% (v/v). Esta mezcla se enfrió en hielo y se completó hasta 100 ml con metanol (Panreac) frío absoluto. Esta solución puede ser conservada hasta 1 semana a temperatura ambiente.

Solución ácida de metanol: 7 ml de ácido perclórico al 70% (v/v), completando hasta los 100 ml con metanol frío absoluto en hielo.

Técnica:

A partir de una suspensión de exopolisacárido en agua destilada (10 mg/ml), se tomaron 0.8 ml y se le añadieron 0.2 ml de la solución de hidroxilamina y 0.2 ml de la solución de NaOH, esta última gota a gota. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos y pasado este tiempo se tomó 0.8 ml de la

misma a la que se adicionaron 2 ml de agua destilada y 2 ml de solución ácida de metanol completando finalmente hasta 10 ml con la solución B añadida poco a poco y en agitación. Por último, con objeto de eliminar el precipitado formado por los ácidos urónicos, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 520 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre que contiene 108.9 mg de pentaacetato de β -D-glucosa (Sigma) en 5 ml de alcohol etílico. Tras calentar ligeramente, se completó hasta 100 ml con agua destilada. A partir de ella se tomaron 2, 4, 5 y 7 ml, que se completaron hasta 50 ml con agua destilada. Así, 5 ml de estas nuevas soluciones representan 120, 240, 300 y 400 μ g de acetilos.

6.1.5. Determinación del contenido de restos piruvato (Sloneker y Orentas, 1962).

Para llevar a cabo este ensayo se procedió en primer lugar a la hidrólisis del exopolisacárido, para lo cual se disolvió el polímero en ácido clorhídrico 1 N a una concentración de 1mg/ml, manteniéndose a 100° C durante 3 horas.

Transcurrido este tiempo, 2 ml de dicha solución se mezclaron con 1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina (Sigma) al 0.5% (p/v) en ácido clorhídrico 2 M durante 5 minutos. Esta mezcla de reacción se extrajo con 5 ml de acetato de etilo (Sigma), descartándose la fase acuosa.

La fase correspondiente al acetato de etilo fue extraída mediante la adición de 5 ml de carbonato sódico al 12% (p/v) en agua destilada, proceso que se repitió en tres ocasiones. El extracto obtenido se diluyó hasta un volumen final de 25 ml con esa misma solución. La concentración de piruvato se determinó mediante medida de la absorbancia a una longitud de onda de 375 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre de piruvato sódico (0.1 mg/ml) (Sigma).

6.1.6. Determinación del contenido en hexosaminas (Johnson, 1971)

Reactivos:

Na₂CO₃ 1,5N

Reactivo A: Acetilacetona al 4% en Na₂CO₃ 1,5N, preparado extemporáneamente.

Reactivo B: (Reactivo de Ehrlich): p-dimetilaminobenzaldehído al 2,67% (p/v) en una solución 1:1 de etanol al 95% Hcl concentrado.

Técnica

Para llevar a cabo este ensayo se procedió a la previa hidrólisis del exopolisacárido, para lo cual se disolvió el polímero en ácido sulfúrico 0,5 N a una concentración de 20 mg/ml, manteniéndose a 100° C durante 3 horas.

Transcurrido ese tiempo, la muestra se disolvió en 1 ml de agua destilada en tubos Pirex de 17 mm x 150 mm, y se le añadió 1 ml del Reactivo A. A continuación se hirvió 30 minutos, y se enfrió en agua a temperatura ambiente unos 5 minutos, para después añadir 5 ml de etanol 95% y agitar. Seguidamente se añadió 1 ml de Reactivo B, y tras una espera de 25 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 529 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre de clorhidrato de glucosamina (2 mg/ml) (Sigma).

6.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CENIZAS

El contenido en cenizas se determinó gravimétricamente mediante diferencia de pesada tras calcinación de la muestra (EPS liofilizado) a 550° C durante 6 horas.

6.3. PURIFICACIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

La purificación de los EPS se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con un cromatógrafo Pharmacia LKB. Se utilizó una columna de sefarosa Hi Prep 16/10 Q FF (Pharmacia, Inc.).

El polímero (15 mg) se disolvió en 15 ml de Tris-CIH 0,02M (Sigma) (pH 7,5). Tras inyección de la muestra en la columna se eluyó inicialmente con 50 ml del mismo tampón para arrastrar el exceso de EPS no adherido a la matriz de sefarosa. A continuación se programó un gradiente de elución lineal de 0-1,5M de NaCl con una velocidad de flujo de 5 ml/min; para lo cual se empleó como tampón de elución Tris-CIH 0,02M (pH 7,5) con NaCl 1,5M. Finalmente se realizó una elución con 50 ml del tampón 1,5M de NaCl para eliminar los restos de polisacárido en la columna.

La muestra fue sonicada previamente a esta determinación. La detección de polímero en las fracciones recogidas se realizó mediante la determinación de carbohidratos según el protocolo de Dubois y colaboradores (1956).

6.3.1. Determinación del contenido en sulfatos y fosfatos.

El contenido en sulfatos y fosfatos de los exopolisacáridos purificados se determinó mediante cromatografía iónica con un cromatógrafo Dionex DX 300. El eluyente empleado fue una mezcla

$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ preparado mediante dilución de 10 ml de eluyente concentrado (0,18 M de Na_2CO_3 /0,17 M NaHCO_3) hasta un volumen final de 1 litro en agua desionizada. Como solución regenerante se empleó una solución 17.5 M de H_2SO_4 .

6.3.2. Análisis de los monosacáridos constituyentes de los EPS.

La composición en monosacáridos de los exopolisacáridos purificados se determinó en base a una modificación del método propuesto por Chaplin (1982).

El polímero purificado (100 μg) se sometió a metanolisis, consistente en la adición de 200 μl de ácido clorhídrico metanólico 0,9 M y calentamiento de las muestras a 80° C durante 16 horas. La mezcla resultante de metilglicósidos se llevó a sequedad en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. A continuación se sometieron a un proceso de re-N-acetilación, para lo cual se adicionaron 50 μl de metanol seco, 5 μl de piridina y 5 μl de ácido acético anhidro. Tras el secado de las muestras bajo atmósfera de nitrógeno, se trataron con 15 μl de trimetil-silil-imidazol durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los glicósidos N-acetilados y transformados se analizaron a) 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 (Fisions Instruments), equipado de una columna PTE (PTE 5 fused-silica capillary, 30m x 32 mm, Supelco); en este caso el programa del horno incluía 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 μl de hexano y se centrifugan 5 minutos a 5000 rpm.

7. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR

Se realizó a partir de los exopolisacáridos purificados mediante cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución, con un cromatógrafo Varian 9012 acoplado a un refractómetro Varian RI-4 como detector.

Esta determinación se llevó a cabo con una columna PL aquagel-OH 60 8 μm (Polymer Laboratorios), utilizando como eluyente acetato sódico 0,2 M (pH 5.1) a un flujo de 0,8 ml/min. Las muestras fueron sonicadas antes de ser inyectadas en la columna para evitar la formación de agregados que pudieran interferir en la determinación de la masa molecular.

Como controles se emplearon dextranos comerciales de diferentes masas moleculares (7 x 10⁴, 1,5 x 10⁵, 4,1 x 10⁵, 7,5 x 10⁵, 1,8 x 10⁶ y 4,9 x 10⁶ Da).

8. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Estos ensayos se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Se utilizaron de células en fase exponencial, que se fijaron con glutaraldehído (2,5% [p/v]) y rojo de rutenio (0,05% [p/v]), en tampón cacodilato sódico, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05M, y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2mM (pH 7,4).

Este tratamiento se realizó a 4° C durante 4 horas. Después de un lavado con cacodilato sódico 0,1M, las células se sometieron a una segunda fijación con OsO_4 , a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, las células se deshidrataron en varias series con etanol (30, 50, 70, 90 y 100% v/v) a temperatura ambiente, durante 20 minutos cada deshidratación.

Las células deshidratadas se infiltraron en una mezcla de resina/etanol (1:1 v/v) durante una noche, seguido de una infiltración en una resina pura, también durante una noche. Después, las células se transfirieron a una cápsula de gelatina que se llenó con un monómero de resina. Esta resina se polimerizó durante 8 horas a 60° C. Tras este proceso, se realizaron unas secciones ultra finas con un ultramicrotomo Reichter Ultracut S, equipado con una cuchilla de diamante, recogándose en una rejilla de cobre.

Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo (1% [p/v]) y citrato de plomo. Finalmente, las preparaciones se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss TEM EM 10C, 30 μm de apertura de objetivo y 80 KV de voltaje de aceleración).

La observación de las preparaciones acuosas de los distintos polímeros se realizó mediante tinción negativa con rojo de rutenio (0,05% [p/v]). Previamente se trataron las muestras con DNAsa, para lo cual se preparó una solución al 1% (p/v) del polímero en el tampón cuya composición se detalla a continuación.

Tampón DNAsa I

Tris-ClH 0,1M pH 7,6	10 μl
KCl (Merck) 0,5M	10 μl
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merk) 15mM	10 μl
H_2O c.s.p.	100 μl

A 2 ml de esta solución con el polímero se le adicionaron 10 μ l de DNAsa y se mantuvo en agitación durante 2 horas a 37°C.

9. PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

9.1. PROPIEDADES REOLÓGICAS

9.1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas

Las muestras liofilizadas de los distintos exopolisacáridos se disolvieron en agua destilada para obtener soluciones al 0,5% (p/v). Las medidas de viscosidad de las preparaciones acuosas del polímero y en general todos los ensayos reológicos se realizaron con un reómetro Bohlin CSR-10 de stress controlado. Para todas las determinaciones se seleccionó el sistema de medida para pequeñas muestras (small sample cell; SSC) y salvo en las excepciones que se indican se realizaron a una temperatura de 25° C. Se sometió a las preparaciones a un esfuerzo de cizalla que originó un gradiente de deformación comprendido entre 2 y 160 s⁻¹. Como controles se utilizaron el maurano y el xantano.



Figura 19: Reómetro Bohlin CSR-10 y detalle del sistema de medida para pequeñas muestras.

9.1.2. Factores que influyen en la viscosidad de las preparaciones acuosas del exopolisacárido producido por la cepa B100 de *Halomonas maura*

La muestra liofilizada se resuspendió en agua destilada y se evaluó el efecto de diversos parámetros, que se detallan a continuación, sobre la viscosidad de tales preparaciones. Todos los ensayos se llevaron a cabo con soluciones con una concentración de polímero del 0,5% (p/v), excepto en el ensayo en el que se modificó la concentración de exopolisacárido.

Las medidas llevadas a cabo consistieron en la determinación de la viscosidad en función del gradiente de deformación (shear rate) o esfuerzo de cizalla (shear stress) aplicado. La preparación de las soluciones en cada uno de los ensayos, según el parámetro evaluado, se detalla a continuación.

a) Concentración del polímero

Se determinó la viscosidad de preparaciones de exopolisacárido en agua destilada a una concentración de polímero del 0,5, 0,6, 0,8 y 1% (p/v) aplicando a las muestras un esfuerzo de cizalla comprendido entre 2 y 7 Pa, correspondiente a un rango de gradientes de deformación de 0,1 a 150 s⁻¹.

b) Temperatura

En primer lugar, se determinó la viscosidad a 25, 35, 45 y 55°C, mediante el incremento gradual de la temperatura de las preparaciones de EPS (0,5% p/v).

En segundo lugar, las preparaciones acuosas del polímero al 0,5% (p/v) fueron calentadas a 70 y 90°C durante 10 minutos en un baño y posteriormente se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente o bien manteniendo las muestras a 4°C durante toda una noche. Se determinó la viscosidad de las soluciones tras el calentamiento y una vez que las muestras se enfriaron por ambos procedimientos.

En ambos ensayos la viscosidad se determinó en un rango de gradiente de deformación comprendido entre 3,2 y 162,4 s⁻¹ (2-15 Pa de esfuerzo de cizalla).

La viscosidad correspondiente a cada una de las temperaturas se comparó a un gradiente de deformación de 59,5 1/s.

c) pH

Con objeto de establecer la influencia del pH sobre la viscosidad de las preparaciones acuosas de EPS, se determinó este parámetro en un intervalo de pH de 3 a 9, aplicando a las muestras un esfuerzo de cizalla comprendido entre 1 y 5 Pa. La viscosidad correspondiente a los distintos pH se comparó a un esfuerzo de cizalla de 3 Pa.

El pH de las soluciones se ajustó una vez que el polímero fue disuelto en agua destilada con HCl ó NaOH 1N.

d) Efecto del proceso de congelación-descongelación

Se determinó el efecto de la congelación de las preparaciones sobre su comportamiento reológico determinando la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del EPS tras ser congeladas y

posteriormente descongeladas. La viscosidad de las muestras se determinó aplicando un esfuerzo de cizalla entre 1 y 5 Pa.

e) Efecto del proceso de esterilización en autoclave de vapor

Se determinó la viscosidad de las soluciones de EPS al 0,5% (p/v) tras ser esterilizadas en el autoclave durante 30 minutos a 112°C. La viscosidad de las muestras se determinó aplicando un esfuerzo de cizalla comprendido entre 1 y 5 Pa.

f) Presencia de sales en solución

Se estudió el efecto de adicionar NaCl al 2,5, 5 y 7,5% (p/v) a las preparaciones de exopolisacárido en agua destilada al 0,5% (p/v).

Las medidas de viscosidad se realizaron en un rango de gradientes de deformación comprendido entre 15 y 180 s⁻¹.

g) Efecto de la presencia de azúcares en solución

Se estudió el efecto de la adición de sacarosa al 2% (p/v) a las preparaciones en agua destilada de EPS al 0,5% (p/v), determinándose la viscosidad mediante la aplicación a las muestras de un esfuerzo de cizalla entre 1 y 10 Pa.

9.1.3. Características reológicas de las preparaciones acuosas del exopolisacárido producido por la cepa B100 de *Halomonas maura*

- **Pseudoplasticidad**

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

Dicho modelo es la ley de la potencia o de Ostwald-de Waele, según la cual: $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$, donde K y n son los parámetros reológicos del modelo; siendo K el índice de consistencia y n el índice de pseudoplasticidad. Dado que el comportamiento de un fluido newtoniano se caracteriza por ser n=1, la diferencia entre n y la unidad es una medida del grado de desviación del comportamiento newtoniano de modo que los fluidos pseudoplásticos se caracterizan por ser n < 1 y en el caso de un fluido dilatante n > 1.

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

- **Tixotropía**

El comportamiento tixotrópico del polímero en solución se determinó sometiendo la muestra a un gradiente de deformación elevado (90 s^{-1}) durante 5 minutos y disminuyendo posteriormente el mismo hasta 3 s^{-1} durante 10 minutos. El proceso completo consistió en dos ciclos, sin interrupción, durante un periodo de tiempo de 30 minutos, determinándose simultáneamente la viscosidad de las soluciones.

El material tixotrópico, al ser sometido a un esfuerzo de cizalla o gradiente de deformación elevado presentará una disminución brusca de su viscosidad, la cual recuperará más tarde al disminuir la fuerza aplicada.

- **Estudio de las propiedades viscoelásticas. Ensayos de oscilación**

El estudio del comportamiento viscoelástico del exopolisacárido B100 en solución se llevó a cabo mediante ensayos de oscilación consistentes en aplicar a la muestra un esfuerzo de cizalla o gradiente de deformación que varía de forma sinusoidal en función del tiempo. Se determinaron los siguientes parámetros viscoelásticos:

- **Módulo elástico, G' (Pa)** : relacionado con la respuesta elástica del material.
- **Módulo viscoso, G'' (Pa)** : relacionado con la respuesta viscosa del material.

La determinación de dichos parámetros se ha de realizar dentro de la región viscoelástica lineal del material; para lo cual se inició este estudio con un ensayo de “stress sweep”.

a) Ensayo de “stress sweep”.

Este ensayo, llevado a cabo para determinar la región viscoelástica lineal de la muestra objeto de estudio, consistió en aplicar a la misma un esfuerzo de cizalla creciente a una frecuencia determinada. Así, se determinará el esfuerzo de cizalla a partir del cual el módulo elástico experimenta una disminución frente al aumento del módulo viscoso, denominado “punto crítico” y por debajo del cual se encuentra delimitado el dominio viscoelástico lineal de la muestra.

Dicha determinación se realizó a partir de una preparación en agua destilada al 1% (p/v) de EPS, a la cual fue aplicada un rango de esfuerzos de cizalla desde 0,11-19,3 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz; obteniéndose los valores para los parámetros viscoelásticos del módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'').

b) Propiedades viscoelásticas de las soluciones de EPS dentro de la región viscoelástica lineal.

El estudio del comportamiento viscoelástico mediante ensayos de oscilación se llevó a cabo con soluciones al 1% (p/v) de EPS siendo el esfuerzo de cizalla aplicado de 6 Pa (seleccionado dentro de la región viscoelástica lineal de la muestra) y cuya variación sinusoidal se ha aplicado dentro del rango de frecuencias comprendido entre 0,007 y 20 Hz. Se determinaron los siguientes parámetros viscoelásticos: G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso).

9.1.4. Efecto sinérgico del exopolisacárido producido por la cepa B100 de *Halomonas maura* con otros agentes viscosizantes

Realizamos un estudio con objeto de comprobar si existía un efecto sinérgico entre el polímero sintetizado por la cepa B100 de *Halomonas maura* y algunos agentes viscosizantes empleados con frecuencia en la industria alimentaria. El ensayo que llevamos a cabo consistió en partir de soluciones al 0,5% de todos los biopolímeros, a partir de las cuales realizamos mezclas B100 / agente viscosizante en proporción 1:4; 2:3; 3:2 y 4:1.

Se determinó la viscosidad de las mezclas y de las soluciones al 0,5% (p/v) de cada uno de los polímeros por separado, a un gradiente de deformación de 2 s^{-1} para las mezclas del exopolisacárido B100 con goma guar, 10 s^{-1} con pectina, 85 s^{-1} con carragenato e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y 30 s^{-1} con la goma de *Plantago ovata*.

9.2. PROPIEDADES EMULGENTES

9.2.1. Controles

En el estudio del poder emulgente de los polímeros producidos por las cepas objeto de estudio se han empleado como controles los siguientes surfactantes químicos de uso habitual en la industria:

- Polisorbato 60 (suministrado por SKW/Biosystems S.A.)
- Tween 20 (Probus)
- Sugin 472 C/IKV (suministrado por SKW/Biosystems S.A.)

- Tritón X-100 (Sigma)

También se ha incluido como control el xantano (SIGMA), un exopolisacárido microbiano con capacidad emulgente además de viscosizante.

9.2.2. Actividad emulgente

Para la realización de este estudio se siguió la metodología descrita por Cooper y Goldenberg (1987). En el ensayo se utilizaron tubos de base redonda, en los que se dispusieron 1,5 ml de fase oleosa, y 1,5 ml de fase acuosa, consistente en una preparación del polímero al 0,5% (p/v). El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, y las fases oleosas empleadas fueron: aceite de girasol, aceite mineral ligero (Sigma), miristato de isopropilo (suministrado por Gley de Brech S.A.) y keroseno (Panreac). Como controles se utilizaron: Tween 20 (probus), Polisorbato 60 (suministrado por SKW/Biosystems S.A.), Xantano (suministrado por Sanaví S.A.) y lauril eter (suministrado por Gley de Brech S.A.).

Para la determinación del porcentaje de emulsión, los tubos se agitaron en un homogeneizador Polytron de alta velocidad (6000-21000 rpm) con varilla de dimensiones 105 x 7 mm, a 9750 rpm durante 1 minuto. Tras la agitación las muestras se dejaron reposar, tomándose las medidas del porcentaje de la fase emulsionada a la hora y a las 24 horas, para determinar la actividad emulgente y la estabilidad de las preparaciones. La actividad emulgente representa la fracción emulsionada (la altura de la misma) respecto al volumen total de la muestra (altura en el tubo).

$$\% \text{ actividad emulgente} = \text{altura emulsión} / \text{altura mezcla} \times 100$$

9.2.3. Determinación del poder tensioactivo

La determinación de la tensión superficial se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Weser (1980). Las medidas de tensión superficial se realizaron con un tensiómetro digital KRUSS modelo K11 que básicamente consiste en un dinamómetro de precisión. El valor del parámetro σ (tensión superficial) (mN/m) se obtuvo por lectura directa en el tensiómetro digital con una precisión de $\pm 0,1$ mN/m. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente. La determinación de la tensión superficial a las distintas concentraciones de cada uno de los emulgentes nos permitió calcular la concentración micelar crítica (CMC) (Phale y col., 1995) como aquella concentración de emulgente a partir de la cual la tensión superficial no se ve modificada.

9.2.4. Grado de dispersión

El grado de dispersión, que representa el tamaño comparativo de las gotas de la fase interna de la emulsión (Voigt y Bornschein, 1979), se determinó por procedimiento microfotográfico para lo cual se utilizó un microscopio con una cámara fotográfica acoplada. El examen se realizó con un objetivo de 10 \times .

9.2.5. Desproteización de los exopolisacáridos

Para determinar si la fracción proteica de los exopolisacáridos AI12 y AI16 de *H.ventosae* desempeña un papel importante en la actividad emulgente de los mismos, procedimos a la eliminación de sus proteínas tanto por métodos químicos como enzimáticos. La **desproteización química** de los polímeros se realizó por el método del fenol caliente (Westphal and Jann, 1965): 500 mg de EPS en 100 ml de agua destilada se calentaron a 70° C y se agitaron con el mismo volumen de fenol al 90% (v/v) durante 15 minutos. Tras ese tiempo, se enfriaron a 0° C, y se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa se dializó en agua destilada durante 72 horas y se liofilizó. A los EPS así desproteizados se les llamó Apo-EPS (Navon-Venezia y col., 1995). La **desproteización enzimática** de los polímeros se realizó con proteinasa K y tripsina; en el primer caso, las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos (0,5% p/v) se trataron con 20 mg/ml de enzima, a 37°C durante 30 minutos, y en el segundo caso, las soluciones acuosas de los polímeros (0,5% p/v) fueron tratadas con 2 mg/ml de enzima durante 2 horas a 37°C.

9.2.6. Electroforesis de proteínas

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo según el protocolo de Laemmli (1970) para determinar la presencia de proteínas en los polímeros. A los EPS (40 μ l, 25 mg/ml) se les añadió 10 μ l del tampón para muestras, y a continuación se calentaron a 100°C unos 5 minutos. Tras el tratamiento, 25 μ l de estas muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida, y se dejaron correr 45 minutos a 200 V. Los geles se tiñeron con Azul de Comassie durante 15 minutos, y finalmente se destiñeron. Patrones preteñidos de rango medio (Bio-Rad, California) se utilizaron como marcadores de masa molecular.

Tampón de elución (x5)		Tampón para disolver muestras (x5)	
Trizma 0, 125 M	5,1 g	Glicerol	5 ml
Glicina 0,96 M	2 g	SDS	1 g
SDS 0,5%	5 g	β -mercaptoetanol	2,56 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 + SDS 0,4 %	5 g
		Azul de bromofenol	Trazas

Geles de acrilamida (10 ml)		
	“Stacking” Gel (4% p/v)	“Resolving” Gel (12% p/v)
Archilamida/Bis 30%	1,3 ml	4 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml
Agua destilada	6,1 ml	3,4 ml
TEMED ^a	10 µl	5 µl
APS 10% ^{a,b}	50 µl	50 µl

^a Estos componentes se añaden a la fórmula al final

^b Preparado extemporáneamente

Solución para teñir los geles		Solución para desteñir los geles	
Metanol	500 ml	Metanol	150 ml
Ácido acético	100 ml	Ácido acético	100ml
Agua destilada	400 ml	Agua destilada	750 ml
Azul de Comassie	2,5 g		

9.3. CAPTACIÓN DE METALES PESADOS

La metodología seguida se basó en la descrita por Geddie y Sutherland en 1993. Antes de realizar el experimento es muy importante lavar escrupulosamente todo el material con ácido nítrico al 25% (v/v), y enjuagar después muy bien con agua bidestilada.

Una vez disueltos los polímeros en agua bidestilada, dichas soluciones se pasaron a través de una resina Amberlita IR 120H⁺ (Avocado) de intercambio iónico, con objeto de conseguir la forma ácida de los polisacáridos.

Tras liofilización de las muestras, se prepararon soluciones al 0,5% (p/v) de los exopolisacáridos y se dispusieron 5 ml de cada una de ellas en membranas de diálisis que se introdujeron en matraces con 200 ml de las soluciones de distintas sales metálicas, incubándose durante 24 horas a 30°C en agitación (100 rpm). Como control se utilizó un tubo de diálisis con agua bidestilada y sin exopolisacárido.

Las sales metálicas que se han utilizado en este estudio, junto con las concentraciones ensayadas se recogen en la Tabla 9. Las soluciones de estas sales metálicas se prepararon en agua bidestilada y las concentraciones de cada una de ellas se ajustaron al rango de linealidad y sensibilidad del espectrómetro empleado en la posterior detección de los metales. El pH de las soluciones metálicas se ajustó a 7 con NaOH ó HCl 1N.

Tabla 9. Sales metálicas y concentraciones (ppm) utilizadas en el estudio de captación de metales pesados por el exopolisacárido.

Sales metálicas	Concentración (ppm)
Cloruro de cobalto	2
Sulfato de cobre	4
Acetato de plomo	10
Arsenato sódico	50
Cromato potásico	2,5

La captación de metales por los polímeros se determinó mediante espectrometría de absorción atómica, restando a la cantidad de metal inicial, la cantidad de metal remanente en solución. Esta determinación se llevó a cabo en un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer® a partir de alícuotas de las soluciones recogidas a tiempo cero y tras 24 y 48 horas de incubación. Los miligramos de metal captado se refirieron a un gramo de EPS. Este ensayo se realizó por triplicado.

10. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE EXOPOLISACÁRIDOS MICROBIANOS SULFATADOS

Basándonos en la naturaleza sulfatada de los exopolisacáridos sintetizados por nuestras bacterias, y de acuerdo con los antecedentes existentes, hemos estudiado la acción moduladora sobre la proliferación de células hematopoyéticas tumorales de los polímeros que forman parte de este estudio que presentaron un mayor contenido en sulfatos, es decir, los producidos por las cepas B100 y N12 de *H. maura* y FP34 de *H. anticariensis*, utilizando como controles estos mismos polisacáridos desulfatados e hipersulfatados químicamente, para estudiar la importancia de los grupos sulfato en la actividad biológica de estas macromoléculas.

10.1. Desulfatación de los EPS

Los EPS desulfatados se obtuvieron por solvolisis en dimetilsulfóxido según la metodología de Nagasawa y col. (1977), con algunas modificaciones (Haroun-Bouhedja, 2000).

250 mg de EPS se disolvieron en 3,2 ml de agua bidestilada, y ésta solución se pasó por una resina de Amberlita IR 120H⁺ (Avocado), para obtener la forma ácida del polímero, posteriormente neutralizada con 2 ml de piridina. Las muestras se evaporaron a 40° C bajo vacío, y posteriormente se adicionaron 20 ml de metanol (4 veces), el cual también se evaporó bajo vacío. El compuesto obtenido se disolvió en una mezcla dimetilsulfóxido/metanol/piridina (90:9:1), y se calentó a 100° C 60 minutos. La

reacción se detuvo por adición de agua (20 ml), el pH se ajustó a 9 con NaOH 3 M y la solución se dializó con agua destilada y se liofilizó para recuperar el polímero.

10.2. Sulfatación de los EPS

Los EPS fueron químicamente sulfatados de acuerdo al protocolo de sulfatación de fucanos de Nishino y Nagumo (1992).

Aproximadamente 0,5 g de EPS se disolvieron en 50 ml de dimetilformamida, y la solución se mantuvo en agitación 2 horas a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se incubó 2 horas a 45° C, para favorecer la dispersión del EPS en el disolvente. A continuación se adicionó lentamente un exceso del complejo piridina-SO₃, y la reacción se mantuvo 2 horas a 45° C. La reacción se detuvo por adición de agua (20 ml), y el pH se ajustó a 9 con NaOH 3 M y la solución se dializó con agua destilada y se liofilizó para recuperar el polímero.

10.3. Cultivos celulares

Los ensayos de actividad biológica se han desarrollado con tres estirpes de células humanas tumorales hematopoyéticas (células JURKAT, HEL y CEM), siendo el medio de cultivo empleado el medio RPMI suplementado con glutamina (5 ml/500 ml), penicilina-estreptomicina (5 ml/500 ml), fungizona (5 ml/500 ml) y suero bovino fetal (10% v/v).

A partir de una concentración inicial de 12500 y 25000 células/pocillo, se ensayó la adición a cada uno de los cultivos de dosis crecientes de EPS: 5, 50 y 500 ng/ml y µg/ml, respectivamente. Tras la incubación a 37° C en atmósfera de CO₂, durante tiempos comprendidos entre 24 y 72 horas, procedimos a evaluar la proliferación celular en cada caso.

10.4. Test de proliferación celular

El test empleado para cuantificar la proliferación celular es el que utiliza el compuesto MTT (Mosmann, 1983), el cual una vez incorporado y reducido por las células vivas, origina una coloración medida como absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de inhibición de la proliferación celular se determinó por triplicado mediante a la siguiente fórmula:

$$\%I = [1-(Gf/Gm)] \times 100,$$

donde **Gf** es la proliferación de las células tratadas con los exopolisacáridos, y **Gm** la proliferación de las células sin tratar.

11. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS EPS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

Con el fin de atribuir una función fisiológica a los exopolisacáridos sintetizados por las bacterias halófilas que forman parte de este trabajo, estudiamos la propensión de las mismas a formar biofilms o biopelículas sobre superficies inertes, para a continuación determinar si los EPS se encuentran implicados de forma activa en este proceso tan frecuente en la naturaleza.

11.1. Cuantificación de la formación de biofilms mediante tinción con cristal violeta (O'Toole and Kolter, 1998a)

Se partió de un inóculo de 24 horas en medio SWYE 5% (p/v) de sales con el que se hizo una dilución 1:100 en medio Koser al 5% (p/v) NaCl adicionado de glucosa (1% p/v), casaminoácidos (0,5% p/v) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (25mM) y en medio MY al 2,5, 5, 7,5 y 10% (p/v) de sales. La dilución se transfirió a placas *microtiter* que se incubaron a 32° C y en agitación, durante 16, 24, 40 y 48 horas. A continuación se midió la densidad óptica de los cultivos a 600nm, se vació el contenido líquido y se lavaron las placas *microtiter* con agua destilada estéril. Las células adheridas a las paredes de las placas fueron teñidas con una solución al 0,5% de cristal violeta en etanol de 95° (v/v), durante 15 minutos, pasados los cuales, se lavó con abundante agua para eliminar el colorante no adherido a las células. Posteriormente, los biofilms fueron resuspendidos en etanol de 95° (v/v) mediante agitación vigorosa, y se midió la densidad óptica de la suspensión resultante a 540nm. Para cada caso se empleó como blanco el medio de cultivo sin inocular.

Medio SWYE (Nieto y col., 1989)		Medio de Koser (Koser, 1923)	
Extracto de Levadura (Cultimed)	5 g	NaCl (Panreac)	50 g
Solución de sales al 30%	166 ml	KCl (Merck)	2 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	KNO ₃ (Merck)	1 g
		(NH ₄) ₂ PO ₄ H (Merk)	0,5 g
		Agua destilada c.s.p	1000ml

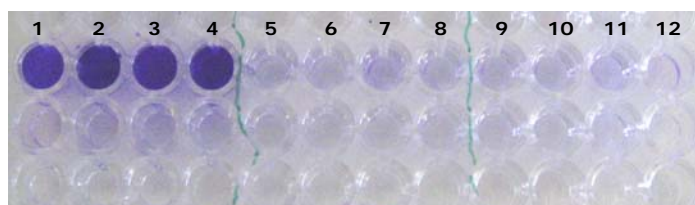


Figura 20. Fotografía de una placa *microtiter* empleada en la cuantificación de la formación de biofilms. Pocillos 1-4. Bacteria formadora de biofilms. Pocillos 5-12. Bacteria no formadora de biofilms.

11.2. Microscopía electrónica de barrido

Estos ensayos se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Se partió de un cultivo de 24 horas, de las cepas X2 de *H. maura* y M4 de *H. eurihalina*, en medio SWYE 5% (p/v) de sales, y 2 ml de diluciones 1:100 de los mismos se vertieron sobre una placa petri de 10 ml. A cada placa se incorporó un par de cubreobjetos con el fin de que las células se adhirieran en él. Se incubaron durante 48 horas a 32° C en agitación, pasadas las cuales, las células adheridas al cristal, se fijaron con una capa de poli-L-lisina durante una noche a 4° C en atmósfera saturada de vapor de gluteraldehído.

Posteriormente, las preparaciones se lavaron con una solución de cacodilato sódico 0,1M y se les añadió rojo de rutenio 0,05% (p/v) durante 4 horas. Después, las células se deshidrataron en varias series con etanol (30, 50, 70, 90 y 100% v/v) a temperatura ambiente, durante 20 minutos cada deshidratación. A continuación, las muestras se secaron hasta un punto crítico y se cubrieron con oro. Por último, las microfotografías electrónicas se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM950.

11.3. Obtención de mutantes deficientes en la síntesis de EPS

Con el objetivo de obtener mutantes deficientes en la síntesis de polisacárido y a fin de investigar la participación de los EPS en la estructura de los biofilms, se llevaron a cabo experiencias de mutagénesis insercional al azar y dirigida.

a) Protocolo de mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5 Km2

a.1) Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001): Se utilizó como medio de crecimiento para *Escherichia coli*, donadora del transposón. A este medio de cultivo se le adicionaron los antimicrobianos adecuados. Su composición es la siguiente:

Bactotripton (Difco)	10g
Extracto de levadura	5g
Cloruro sódico (Panreac)	10g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medio MM: Este medio se utilizó para disminuir la producción de exopolisacárido y así facilitar el proceso de intercambio genético. Se diseñó a partir de los estudios de producción de EPS de la cepa S30 de *Halomonas maura* realizados en nuestro grupo de investigación. La concentración de sales del medio fue de un 2% (p/v).

Proteosa Peptona nº3 (Cultimed)	2 g
Extracto de Levadura (Cultimed)	0,4 g
Solución de Sales al 30% (p/v) sin MgSO ₄	250ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Medio SWYE: Es un medio complejo que se utilizó en los experimentos de conjugación; se preparó a un 2% (p/v) de sales. Su composición se detalla en el apartado 11.1.

Medio TSA: Se utilizó para reconocer los posibles contaminantes que pudieran aparecer en los medios de selección en los experimentos de mutagénesis. Tiene una concentración muy baja de NaCl y ello impide que puedan crecer los microorganismos halófilos moderados. Se preparó a partir del medio deshidratado comercializado por la casa Difco.

El pH de todos estos medios se ajustó a 7,2 con NaOH ó HCl 1M. Para la preparación de los medios sólidos se añadió Agar Bacteriológico (Panreac) en una concentración del 2% (p/v).

a.2) Antimicrobianos

Las soluciones de antimicrobianos (Sigma) se prepararon en agua destilada, excepto la rifampicina que se disolvió en metanol. Las soluciones acuosas se esterilizaron por filtración a través de un filtro milipore de 0,22 µm y se conservaron a -20°C en alícuotas. Cuando fue necesario se añadieron a los medios de cultivo los correspondientes antimicrobianos a las siguientes concentraciones finales (µg/ml): ampicilina (Ap), 100; kanamicina (km), 50; rifampicina (Rif), 50.

a.3) Conjugación

La transferencia del transposón mini-Tn5 Km2 se hizo vía conjugación biparental, siguiendo la técnica de Herrero y colaboradores (1990), adaptada para trabajar con microorganismos halófilos productores de gran cantidad de polisacárido (Llamas y col., 2000).

Tabla 10. Cepas donadora y receptoras utilizadas en este trabajo.

Cepas bacterianas	Características	Referencia
Cepa donadora		
<i>Escherichia coli</i> S17- λ pir	Tp ^r Sm ^r recA, thi, pro, hsdR ^M RP4: 2-Tc:Mu:Km Tn7, λ pir	Miller y Mekalanos, 1988
Cepas receptoras		
<i>H. eurihalina</i> M4 Rif	Mutante espontáneo (Rif) ^r . Fenotipo colonial liso	Este trabajo
<i>H. maura</i> X2 Rif	"	

La bacteria donadora del transposón fue la cepa S-17-1 λ pir de *Escherichia coli* portadora de un minitransposón con marcador de resistencia a kanamicina (mini-Tn5 Km2), vehiculado en el plásmido suicida pUT (Figura 21). Como cepas receptoras se emplearon mutantes espontáneas resistentes a rifampicina, crecidas en el medio mínimo MM, y en el caso de *H. maura*, adicionado de tioglicolato sódico (5 mM) con el fin de disminuir aun más la producción de EPS y facilitar así el proceso de intercambio genético. Tal y como se muestra en la Figura 22, se partió de cultivos en fase logarítmica del donador y del receptor, crecidos a sus temperaturas óptimas. Se centrifugaron alícuotas de 1,5 ml de los cultivos a 13000 rpm y los sedimentos se lavaron dos veces con el medio de cultivo de conjugación para eliminar restos de sales (procedentes del medio del receptor) y antimicrobianos de ambos medios.

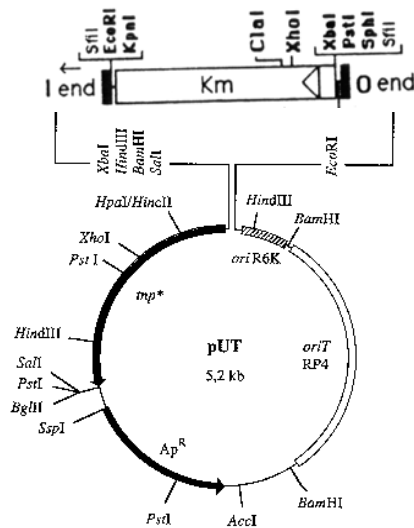


Figura 21. Plásmido pUT portador del transposón mini-Tn5Km2.

A continuación, las células se resuspendieron en 100 μ l de medio SWYE al 2% (p/v) de sales, se mezclaron en proporción donador/receptor 1:2 y se depositaron en un filtro de 0,22 μ m estéril, dispuesto sobre el medio sólido de conjugación SWYE al 2% (p/v) de sales. El resto de la solución se utilizó para

sembrar controles positivos y negativos (en los medios propios del receptor y del donador, y en el medio de selección de transconjugantes). Todas las placas se incubaron a 32° C durante 16-24 horas. Seguidamente el filtro se resuspendió en 0,8ml de solución de sales al 2% (p/v). Se utilizaron 100µl para hacer diluciones seriadas y se sembraron 100µl de cada dilución en las placas de medio de cultivo del receptor y del donador para determinar el número de supervivientes tras la conjugación. El resto se sembró en placas con el medio de selección [SWYE al 2% (p/v) de sales adicionado de rifampicina y kanamicina].

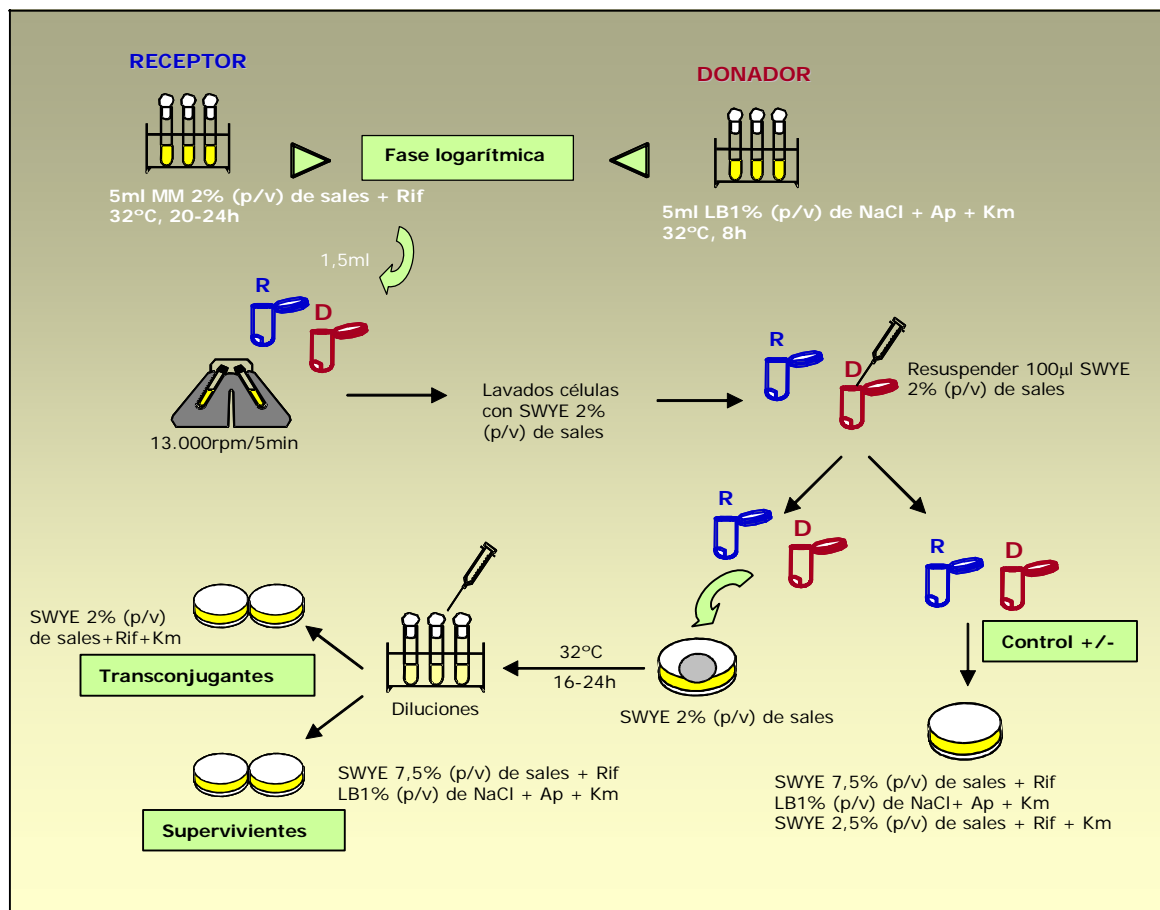


Figura 22. Esquema del protocolo de mutagénesis insercional

Selección de transconjugantes

Se seleccionaron todas las colonias capaces de crecer en las placas de medio de selección. Posteriormente se procedió a realizar pruebas fenotípicas para comprobar la identidad de los transconjugantes obtenidos: incapacidad de crecer en TSA, que demuestra su carácter halófilo;

observación de su morfología mediante la tinción de Gram; y por último, la prueba de la oxidasa, positiva para *H. maura* y negativa para *Halomonas eurihalina*. Mediante sucesivas resiembras en medio sin selección (líquido y sólido), se pudo comprobar la estabilidad del transposón mini-Tn5.

La pérdida del carácter fenotípico positivo para la biosíntesis de EPS, da lugar a transconjugantes con morfología colonial lisa. Dicho carácter es observable tras el crecimiento de los transconjugantes en el medio sólido de selección [SWYE 2% (p/v) de sales adicionado de rifampicina y kanamicina].

a.4) Análisis de los transconjugantes mediante Southern Blot

TAMPONES Y SOLUCIONES

•Extracción de DNA

- **Solución TE.** Tris HCl 1M; EDTA 0,25M.
- **Solución SDS.** SDS AL 10% (p/v).
- **Proteinasa K.** (20 mg/ml)
- **Solución NaCl 5M**
- **Solución CTAB/NaCl.** Bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) 10% (p/v) en NaCl al 0,7 M.
- **Cloroformo.** Fue utilizado en mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
- **Fenol absoluto.** Se empleó en una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- **Isopropanol.**
- **Etanol al 70% (v/v).**

•Electroforesis

- Tampón TAE 10x.** Tris-acetato 0,4M; EDTA 10 mM (pH 8).
- Tampón TBE 10x.** Tris 0,89M; ácido bórico 0,89M; EDTA 20 mM (pH 8).
- Tampón de carga 6x.** Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xileno cianol 0,25% (v/v); glicerol 30% (v/v).
- Bromuro de etidio.** Solución stock de 10 mg/ml.

•Transferencia de DNA e hibridación

- Solución de depurinización.** HCl 250 mM.

- Solución desnaturizante.** NaOH 0,5M; NaCl 1M.
- Solución neutralizante.** Tris-HCl 1M (pH 8); NaCl 1,5M.
- SSC 20x.** NaCl 3M; citrato sódico 0,3M (pH 7).

•**Revelado de la membrana**

- Tampón de ácido maleico.** Ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M (pH 7)
- Tampón de lavado.** Tampón de ácido maleico, Tween 20 30% (v/v)
- Solución de blocking.** (10 % p/v).
- Solución anticuerpo.** (1:10.000).
- Tampón de detección.** Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl₂ (pH 9,5).

Todos los reactivos utilizados son de la casa comercial Sigma.

EXTRACCIÓN DEL DNA TOTAL

La extracción de DNA genómico total se realizó siguiendo la metodología del CTAB (Martínez-Checa, comunicación personal), incorporando algunas variantes con el fin de minimizar la producción de exopolisacárido.

Se partió de 1,5 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio MM al 7,5% (p/v) de sales adicionado de rifampicina y de tioglicolato sódico (5 mM).

Se centrifugaron las células a 12.000 rpm durante 3 minutos, y el sedimento se lavó dos veces con solución de sales al 2% (p/v). A continuación, el sedimento de células se resuspendió en 567 µl de TE, al que se añadieron 30 µl de SDS al 10% (p/v) y 3 µl de solución de Proteinasa K. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se le adicionó 100 µl de solución de NaCl 5M. Una vez bien homogeneizado, se añadió 80 µl de solución de CTAB/NaCl y se volvió a agitar vigorosamente. A continuación se añadió aproximadamente el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló para luego centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.

Seguidamente, al sobrenadante obtenido se le añadió un volumen igual de mezcla fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1); se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm. Cuando se creyó necesario se procedió a realizar un segundo lavado empleando únicamente cloroformo.

El sobrenadante totalmente limpio y transparente fue transferido a un nuevo tubo y se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol para la precipitación del DNA. Se conservó durante toda la noche a -20°C

para facilitar este proceso. El precipitado se recogió tras centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El último paso consistió en lavar el sedimento dos veces con 500 μ l de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente para finalmente resuspenderlo en 30 μ l de agua bidestilada estéril.

DIGESTIÓN DEL DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción fijadas por los fabricantes (Boehringer-Manheim, Pharmacia-Amersham y New-England Biolabs) e incubando durante toda la noche.

HIBRIDACIÓN DNA-DNA

Transferencia de DNA a membrana por el método de Southern Blot e hibridación

Una vez separados los fragmentos de ADN en geles de agarosa, se desnaturalizaron con una solución de NaOH 0,5M y se neutralizaron con una solución de Tris-HCl 1M (pH 8) (Sambrook y col., 1989).

Seguidamente, el ADN se transfirió durante 16 horas a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N, Amersham, 0,45 μ m de diámetro de poro), siguiendo la técnica de Southern (1975) y utilizando $20 \times$ SSC como solución de transferencia. La membrana posteriormente se lavó en $2 \times$ SSC durante 5 minutos y el ADN se fijó colocando la membrana una hora en un horno a 80°C o bien mediante un horno de luz U.V 2×1.200 J (U.V. Cross-linking, Stratagene).

Preparación de la sonda y marcaje

El DNA plasmídico que contiene el transposón mini-Tn5 se extrajo con el kit comercial (Gibco-BRL). Tras digerir el DNA del plásmido pUT-miniTn5 con las enzimas de restricción *EcoRI* + *XbaI*, se purificó el fragmento de 1,85 kb que incluía la resistencia a la kanamicina mediante un kit comercial (Quiaquick gel extraction, Quiagen). Este fragmento constituye la sonda utilizada en los experimentos de hibridación.

El marcaje de la sonda se realizó con digoxigenina utilizando el kit de Boehringer Mannheim y sus recomendaciones. Los ácidos nucleicos se marcaron con digoxigenina-dUTP mediante "random primer" donde el enzima Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli* sintetiza la cadena complementaria

utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos y va añadiendo los distintos nucleótidos trifosfatos marcados previamente con digoxigenina.

Tabla 11. Sonda utilizada en la hibridación.

Nombre	Característica	Tamaño	Referencia
PUTmini-Tn5/EcoRI+XbaI	Resistencia a Km	1,85 kb	De Lorenzo y col., 1990

Prehibridación e hibridación

Las membranas se colocaron en un tubo del horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge) y se dejaron prehibridar durante 4 horas con el líquido de hibridación a 42°C. El líquido de hibridación utilizado fue DIG EASY HIB (Boehringer-Mannheim) en una proporción de 20 ml/100cm².

Tras este tiempo, se retiró la solución y se añadió 100-200ng de sonda marcada y previamente desnaturalizada, a un volumen de 2,5ml/100 cm² del mismo líquido. La hibridación se realizó durante 24 horas con las mismas condiciones que la prehibridación. Los lavados de las membranas se hicieron en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenía SDS al 0,1% (p/v) y 2 × SSC, y un último lavado de 10 minutos a 68°C en 0,1 × SSC.

Revelado de las membranas

Se siguió el protocolo descrito en el kit de la digoxigenina de Boehringer Mannheim. Se basa en una reacción de inmunoensayo altamente específica mediante contacto de la membrana con una solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado). Tras varios lavados para eliminar el anticuerpo que no se encuentra unido, se añadió una solución con sustratos cromogénicos, nitroblue tetrazolium (NBT) y el 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato). Se deja en la oscuridad y se observa un precipitado de color azul sobre el filtro en las bandas donde existe homología DNA-DNA.

b) Mutagénesis dirigida

Reacción en amplificación de ADN en cadena (PCR)

Este método se empleó para comprobar la presencia del gen *epsA* en el cromosoma de *Halomonas maura* X2.

La reacción de ADN contenía: ADN molde: 0,5-1 µg; cebadores: 30 pmoles tampón (con MgCl₂); Taq-ADN polimerasa (1x); dNTPs 0,2 mM de cada uno de ellos; enzima Taq ADN polimerasa: 1-5 unidades; H₂O bidestilada hasta 50 µl.

Los parámetros de la reacción de PCR se eligieron en función del tamaño del fragmento de ADN a amplificar, temperatura de hibridación de los cebadores y tiempo de elongación. Tras una desnaturalización previa a 95°C durante 5 minutos, se aplicaron 30 ciclos constituidos por tres etapas: desnaturalización a 95°C, 30 segundos; hibridación de los cebadores a 55-65°C, 30 segundos; extensión a 74°C, 120 segundos, y un ciclo final de extensión a 74°C durante 10 minutos. Una alícuota de la reacción se sometió a una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 0,7% (p/v), que posteriormente se visualizó a la luz UV tras tefñirse con bromuro de etidio.

Construcción de la fusión *epsA::lacZ*

Para llevar a cabo esta experiencia, realizamos una fusión transcripcional del gen *epsA* y el gen *lacZ* (Figura 23). El gen *epsA* es el primer gen que forma parte del clúster de genes *eps* responsables de la síntesis de maurano en *H. maura* (Arco y col., 2005). Como paso previo a esta mutagénesis, se confirmó mediante PCR que dicho gen *epsA* estaba presente en la cepa X2 de *H. maura*. La técnica seguida para la mutagénesis del gen *epsA*, fue similar a la utilizada previamente en *H. maura* cepa S30 para el mismo fin (Arco y col., 2005): amplificamos por PCR un fragmento de 342pb correspondiente al inicio del gen *epsA*, empleando los cebadores *epsA*-EcoRI y *epsA*342-XbaI. El producto de PCR obtenido fue digerido con las enzimas *EcoRI*-*XbaI* y clonado en el vector pVIKepsA previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido recombinante pVIKepsA obtenido, fue transferido a *H. maura* X2 Rif mediante conjugación, donde actúa como vector suicida, puesto que *H. maura* no posee el gen *pir*. Ello facilita que pVIKepsA se incorpore al cromosoma de la cepa receptora mediante recombinación homóloga simple. De esta forma, el plásmido pVIKepsA se insertó entre las bases 342 y 343 del gen *epsA*, dando lugar a la fusión del promotor del cluster *eps* con el gen *lacZ*. La cepa obtenida la denominamos X2 *epsA::lacZ*, la cual presentaba el gen *epsA* interrumpido en su lectura.

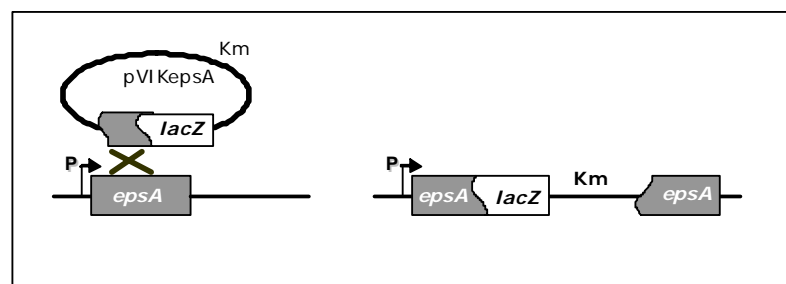


Figura 23. Construcción del mutante X2 *epsA::lacZ*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN I
ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS

CAPÍTULO 1

ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS

RESUMEN

El análisis de la secuencia que codifica para el ADNr 16S de los microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos incluidos en este trabajo y que todavía no han sido válidamente descritos nos ha permitido realizar una aproximación preliminar a su situación taxonómica. Así, las cepas M4 y X8 presentan una elevada semejanza con *Halomonas eurihalina*. En cuanto a las cepas X2, B40, B100, N12 y A16, en principio podrían considerarse como miembros de la especie *Halomonas maura*, aunque entre estos microorganismos es posible que exista variación intraespecífica, por lo que se hacen necesarios ensayos de hibridación ADN-ADN para comprobar dicha variación, y terminar de dilucidar el taxón al que pertenecen estas cepas. Por último, la cepa B35 presenta una elevadísima relación filogenética con *Alteromonas hispanica*, por lo que probablemente nos encontramos ante una nueva cepa de esta especie.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es la caracterización de los exopolisacáridos (EPS) sintetizados por diferentes microorganismos halófilos aislados de diferentes ambientes hipersalinos (véase Tabla 8, apartado 1. Cepas bacterianas, Material y Métodos) gracias al Proyecto de Investigación "Taxonomía polifásica de bacterias halófilas productoras de exopolisacáridos" (BOS2000-1519). Sin embargo, hemos considerado importante comenzar encuadrando taxonómicamente los distintos microorganismos estudiados en este trabajo, para lo cual hemos realizado un breve estudio filogenético.

La mayoría de los microorganismos con cuyos exopolisacáridos hemos trabajado, ya han sido clasificados taxonómicamente y válidamente descritos por nuestro Grupo de Investigación, y constituyen nuevas especies de los géneros *Halomonas*, *Idiomarina* y *Alteromonas*, así como dos nuevos géneros, *Salipiger* y *Palleronia*.

Las cepas **AI12^T**, **AL15** y **AI16** constituyen la especie *Halomonas ventosae* (Martínez-Cánovas y col., 2004c), caracterizada por su elevado contenido en G+C y por ser capaz de crecer en anaerobiosis con nitrato o nitrito como último aceptor de electrones.

Los microorganismos **FP34**, **FP35^T** y **FP36**, aislados de Fuente de Piedra, en la provincia de Málaga, constituyen la especie *Halomonas anticariensis* (Martínez-Cánovas y col., 2004b), y la cepa **M8^T** constituye la especie *Halomonas almeriensis* (Martínez-Checa y col., 2005a), caracterizada por su baja versatilidad nutricional.

Idiomarina fontislapidosi **F23^T** e *Idiomarina ramblicola* **R22^T** son microorganismos móviles por un único flagelo polar descritos por Martínez-Cánovas y colaboradores (2004e). El análisis fenotípico, genotípico y filogenético de la cepa **F32^T** llevó a Martínez-Checa y colaboradores (2005c) a describir una nueva especie bacteriana, *Alteromonas hispanica*, cuya principal característica es el inusual perfil de ácidos grasos que presenta, ya que tiene una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados.

El estudio de estos ambientes hipersalinos también nos ha permitido aislar y caracterizar microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos pertenecientes a la clase α -*Proteobacteria*, como son *Salipiger mucosus* cepa **A3^T** (Martínez-Cánovas y col., 2004d), y *Palleronia marisminoris* cepa **B33^T** (Martínez-Cánovas y col., 2005b), que son bacilos quimioheterótrofos Gram negativos inmóviles, con un metabolismo aerobio estricto y baja versatilidad nutricional.

Sin embargo, las cepas **M4**, **X8**, **X2**, **B40**, **B100**, **N12**, **A16** y **B35**, aisladas de diversos hábitats salinos (véase Tabla 8, apartado 1, Cepas bacterianas, Material y Métodos), y también incluidas en este trabajo por ser productoras de exopolisacáridos, todavía no han sido definitivamente caracterizadas, por lo que en este capítulo hemos querido realizar una aproximación a su situación taxonómica, estudiando la secuencia que codifica para el ADNr 16S, y comparándola con la secuencia del resto de cepas

productoras de exopolisacáridos estudiadas en este trabajo, y con otras cepas de referencia cuya secuencia del gen ADNr 16S se puede obtener de diversas bases de datos (Figuras 24 y 25). El análisis de la secuencia de esta molécula se considera muy útil como parte de un planteamiento polifásico (Stackebrandt y col., 2002) en la descripción de nuevas especies o taxones superiores (Ludwig y col., 1998; Ludwig, 1999), aunque no se aconseja que estas se definan basándose exclusivamente en este tipo de estudios (Goodfellow y col., 1997).

Como se puede observar en el árbol filogenético representado en la Figura 24, y en la Tabla 12, la semejanza en la secuencia del ADNr 16S entre las cepas M4 y X8 es muy elevada, más de un 99%, y la relación con *Halomonas eurihalina* (Quesada y col., 1990; Mellado y col., 1995), también productora de exopolisacáridos, es de 99, 2 y 99% respectivamente, por lo que probablemente estos microorganismos constituyan nuevas cepas de esta especie bacteriana, aunque probablemente será necesario completar los estudios taxonómicos con técnicas de hibridación ADN-ADN para confirmar esta afirmación, ya que el grado de semejanza desde el punto de vista filogenético con *Halomonas elongata* (Vreeland y col., 1980) también es muy elevado.

Tabla 12. Porcentajes de semejanza y divergencia filogenética entre las cepas M4, X8, *Halomonas eurihalina* y *Halomonas elongata*.

		% Semejanza			
		M4	X8	<i>H. eurihalina</i>	<i>H. elongata</i>
% Divergencia	M4	X	99,8	99,2	98
	X8	0,2	X	99,0	98,2
	<i>H. eurihalina</i>	0,8	1	X	97,2
	<i>H. elongata</i>	2	1,8	2,8	X

También en el árbol filogenético representado en la Figura 24, y en la Tabla 13, podemos observar la relación filogenética que existe entre las cepas X2, B40, B100, N12, A16, así como con *Halomonas maura* (Bouchotroch y col., 2001). Excepto las cepas B40, B100 y N12, que guardan una relación filogenética con *H. maura* de 96,4% para las dos primeras y 96,8% para la tercera, el resto de relaciones filogenéticas entre todas estos microorganismos son superiores al 97%, valor establecido para delimitar microorganismos de la misma especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, hoy día está aceptado que para realizar una adecuada clasificación de procariotas, sobre todo si se trabaja con microorganismos estrechamente relacionados, por ejemplo a nivel de especie, como es nuestro caso, es muy importante llevar a cabo el estudio taxonómico desde un planteamiento polifásico (Stackebrandt y col., 2002); por tanto, van a ser necesarios ensayos de hibridación ADN-ADN para terminar de dilucidar de manera definitiva el taxón al que pertenecen estas cepas.

Tabla 13. Porcentajes de semejanza y divergencia filogenética entre las cepas X2, B40, B100, N12, A16 y *Halomonas maura* S31^T.

		% Semejanza					
		B40	B100	N12	A16	X2	S31 ^T
% Divergencia	B40	X	99,0	99,5	98,7	97,6	96,4
	B100	1,0	X	99,4	98,5	97,2	96,4
	N12	0,5	0,6	X	99,1	98	96,8
	A16	1,3	1,5	0,9	X	98,9	97,5
	X2	2,4	2,8	2	1,1	X	98,5
	S31 ^T	3,6	3,6	3,2	2,5	1,5	X

Martínez-Cánovas y colaboradores (2004), rastrearon multitud de ambientes hipersalinos en España y otros países, en busca de nuevos microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos con posibles aplicaciones biotecnológicas, y llegaron a la conclusión de que en este tipo de hábitats, las especies productoras de exopolisacáridos más frecuentemente aisladas son *Halomonas maura* y *Halomonas eurihalina*.

En el árbol filogenético que hemos representado en la Figura 25 se pueden observar las relaciones filogenéticas que existen entre la cepa B35 y otros microorganismos pertenecientes a los géneros *Idiomarina*, *Alteromonas* y otros géneros relacionados de la clase γ -*Proteobacteria*. Como se puede comprobar, la cepa B35 presenta una elevadísima relación filogenética con *Alteromonas hispanica* cepa F32^T (Martínez-Checa y col., 2005c), también productora de exopolisacáridos, casi del 100%, por lo que en principio podemos pensar que la cepa B35 pertenece a este taxón; sin embargo, una vez más, hay que destacar que en base a esa filosofía de enfoque polifásico de la taxonomía de la que ya hemos hablado, habría que realizar otras experiencias para confirmar este resultado.

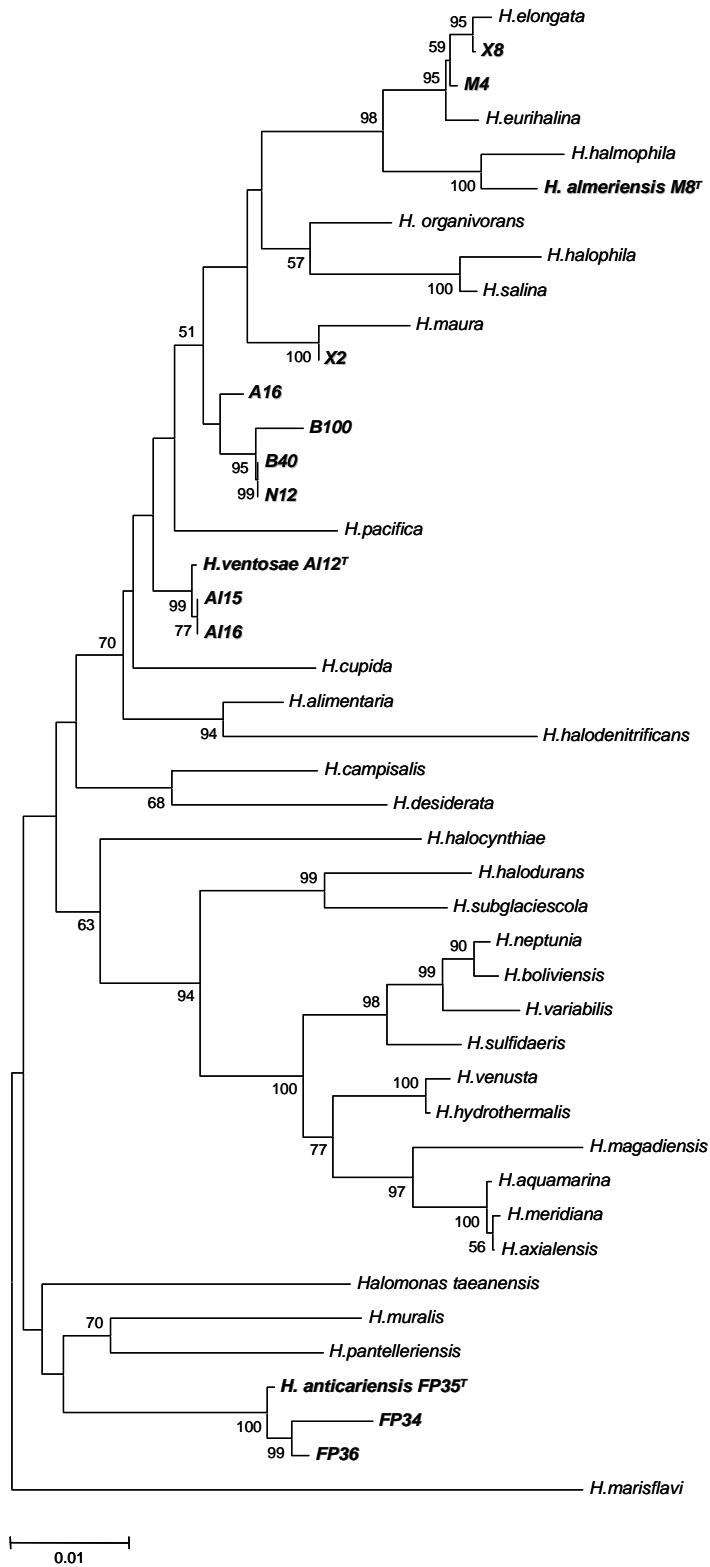


Figura 24. Relaciones filogenéticas entre las cepas M4, X8, X2, B40, B100, N12, A16 y otras cepas pertenecientes al género *Halomonas*. El árbol se ha construido utilizando el algoritmo "neighbour-joining". Sólo se muestran los valores de "bootstrap" superiores al 50% (1000 réplicas). La barra indica un 1% de divergencia en las secuencias.

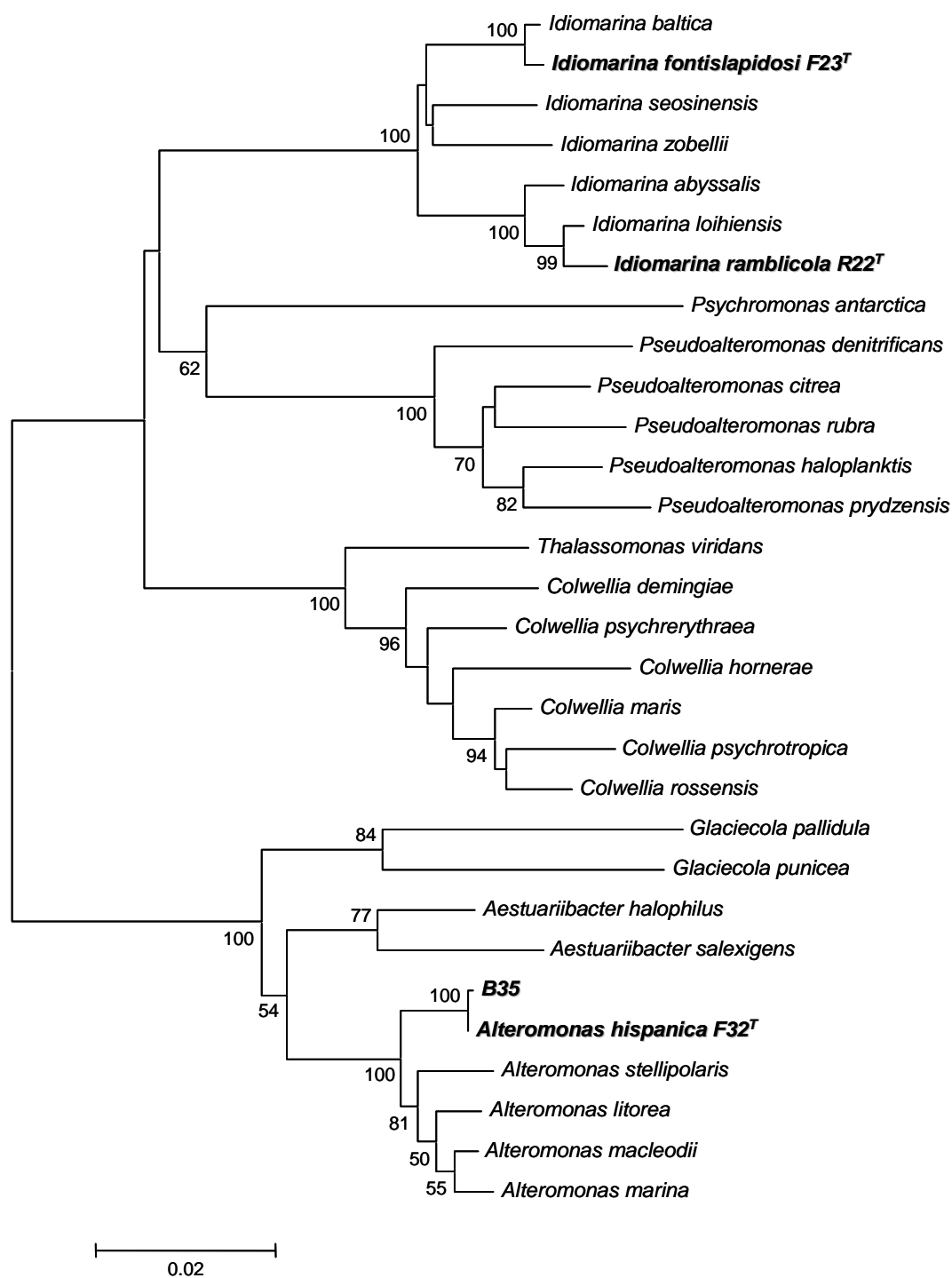


Figura 25. Relaciones filogenéticas entre la cepa B35 y otras cepas pertenecientes a los géneros *Idiomarina*, *Alteromonas* y otros géneros relacionados de la clase γ -*Proteobacteria*. El árbol se ha construido utilizando el algoritmo “neighbour-joining”. Sólo se muestran los valores de “bootstrap” superiores al 50% (1000 réplicas). La barra indica un 2% de divergencia en las secuencias.

SECCIÓN II
CARACTERIZACIÓN DE LOS EPS

CAPÍTULO 1

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

RESUMEN

El objetivo que nos propusimos para con este capítulo fue llegar a conocer las condiciones que nos permitiesen obtener en cada caso una producción óptima y rentable de exopolisacárido. Para ello, hemos evaluado los efectos que sobre el crecimiento bacteriano y sobre la producción de polímero tienen la variación de diversos factores, como el tiempo de incubación, la concentración de sales, la fuente de carbono y nitrógeno, y la concentración inicial de fuente de carbono en el medio de cultivo. Nuestros microorganismos presentan una producción de EPS parcialmente asociada al crecimiento, ya que, aunque comienza en la fase exponencial de crecimiento, alcanza su máximo en la fase estacionaria (a los 3 ó 5 días, según el caso). En general, tras el máximo de producción, se detecta un descenso en la producción de polímero, posiblemente debido a la degradación del mismo. Todas las cepas estudiadas son capaces de crecer y producir exopolisacáridos en todos los sustratos ensayados, siendo en general el sustrato más idóneo la glucosa. La temperatura y la agitación de los cultivos, son otros factores que también afectan al crecimiento y la producción de exopolisacáridos por parte de nuestros microorganismos, de modo que 100 rpm y 32°C son los parámetros ideales.

El estudio de optimización de la producción de exopolisacáridos microbianos para su posterior utilización a nivel industrial es un proceso largo 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.

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; Umanshankar y col., 1996 a y b; Lo y col., 1997; Amanullah y col., 1998 a y b; Azuaje y Sánchez, 1999; Casas y col., 2000; Rao y Sureshkumar, 2001). Otro exopolisacárido con gran interés industrial es el gelano, que se comercializa por sus propiedades espesantes y gelificantes y como agente solidificante en medios de cultivo, sustituyendo al agar (Pszczola, 1993). En este caso, también se han publicado distintos trabajos en los que se busca optimizar la producción y el coste de este biopolímero (Kang y col., 1983; Giavasis y col., 2000; Pollock, 2001). Con respecto a los microorganismos halófilos productores de exopolisacáridos, se han realizado estudios para optimizar la producción de los polímeros producidos por distintas cepas de *Halomonas eurihalina* (Quesada y col., 1993; Béjar y col., 1996; 1998) y *Halomonas maura* (Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003), todos ellos con potenciales aplicaciones en biotecnología.

Dada la importancia de esta etapa previa a una futura producción de los exopolisacáridos a nivel industrial, hemos estandarizado las condiciones óptimas de producción para cada uno de los 20 polímeros objeto de este estudio, teniendo en cuenta básicamente un criterio de selección, el rendimiento en la producción.

- **Tiempo de incubación**

El proceso de optimización de la producción de los distintos polisacáridos sintetizados por las cepas incluidas en este trabajo, se inició estableciendo la fase de crecimiento en la cual tiene lugar dicha producción.

Para ello realizamos una curva de crecimiento de la bacteria durante 8 días en el medio MY con un 7,5 % (p/v) de sales. Este medio complejo ha sido recomendado para la producción de xantano (Moraine y Rogovin, 1966) y a su vez ha sido utilizado con anterioridad para la producción de otros exopolisacáridos estudiados por nuestro grupo de investigación.

El crecimiento celular se evaluó mediante la medida de la densidad óptica de los cultivos a 600 nm y producción de biomasa celular (g PSC/100 ml). Paralelamente se estudió la producción de polímero en g EPS/100 ml y g EPS/g PSC.

En las Figuras 26-45 se muestra el efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento y sobre la producción de exopolisacárido para cada una de las cepas estudiadas en este trabajo.

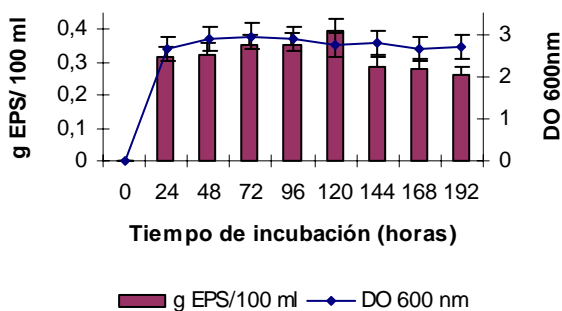


Figura 26. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. maura* X2 y sobre la producción de EPS.

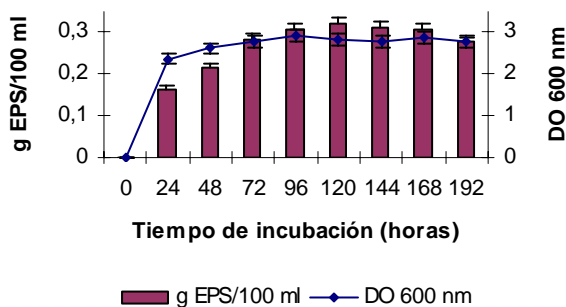


Figura 27. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. maura* B40 y sobre la producción de EPS.

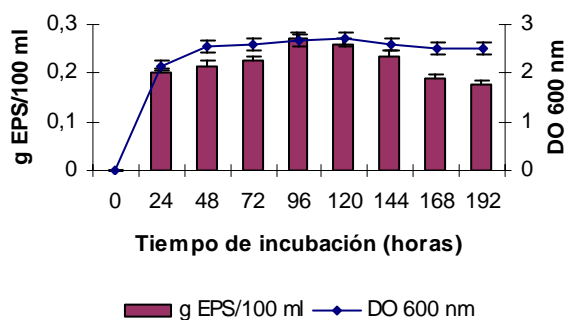


Figura 28. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. maura* B100 y sobre la producción de EPS.

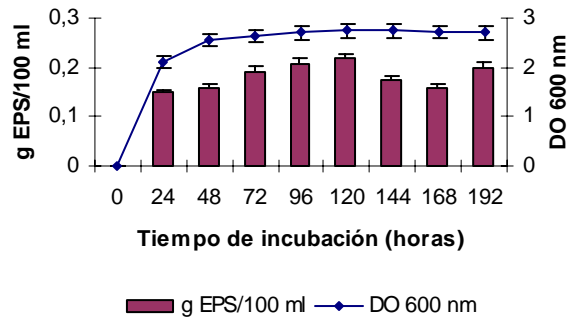


Figura 29. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. maura* N12 y sobre la producción de EPS.

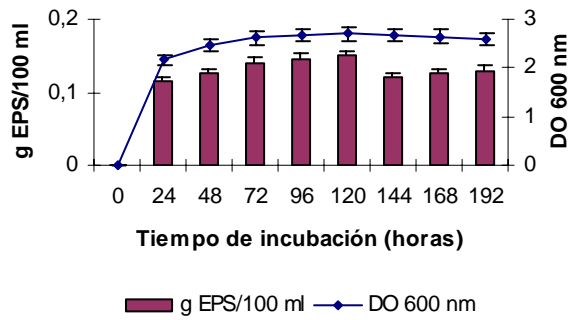


Figura 30. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. maura* A16 y sobre la producción de EPS.

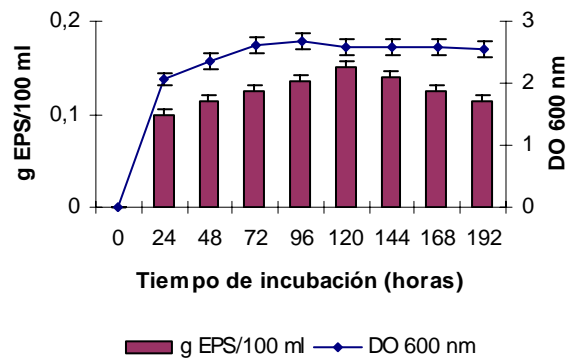


Figura 31. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. eurihalina* M4 y sobre la producción de EPS.

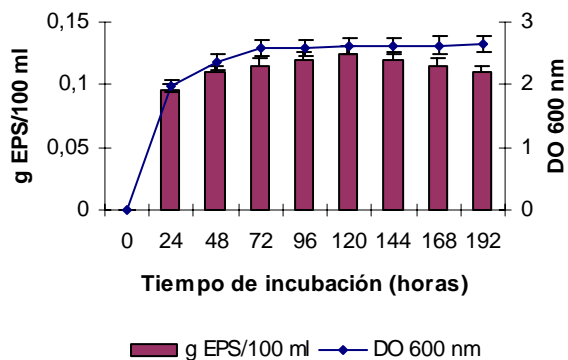


Figura 32. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. eurihalina* X8 y sobre la producción de EPS.

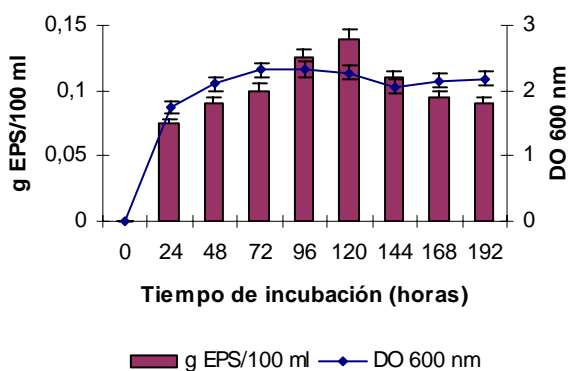


Figura 33. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. ventosae* AI12^T y sobre la producción de EPS.

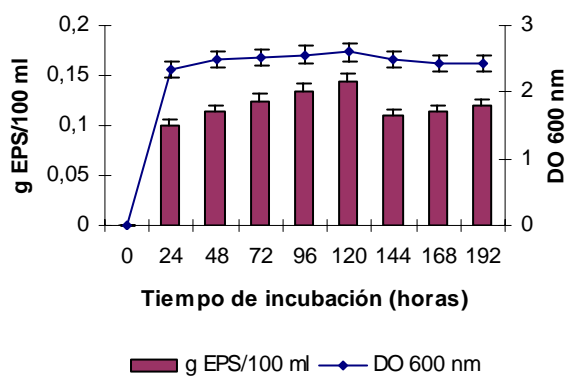


Figura 34. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. ventosae* AI15 y sobre la producción de EPS.

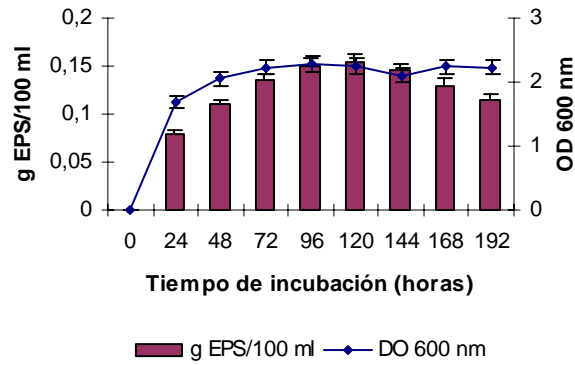


Figura 35. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. ventosae* AI16 y sobre la producción de EPS.

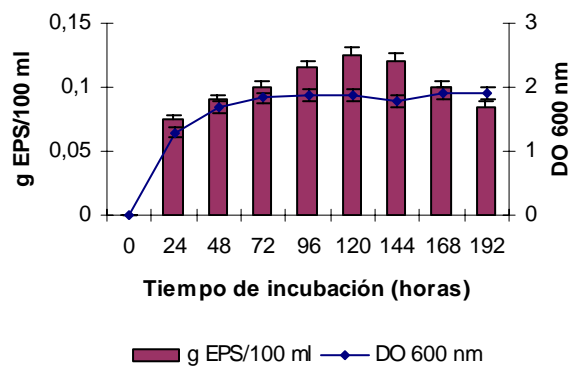


Figura 36. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. anticariensis* FP35^T y sobre la producción de EPS.

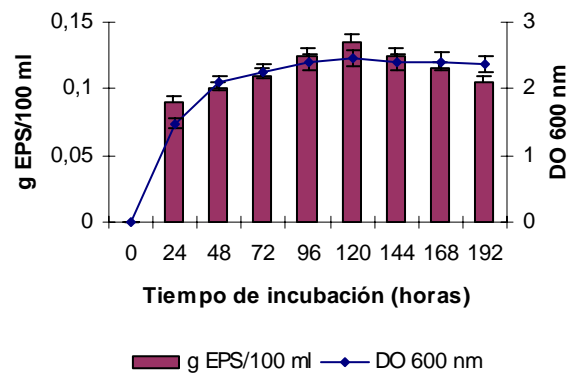


Figura 37. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. anticariensis* FP34 y sobre la producción de EPS.

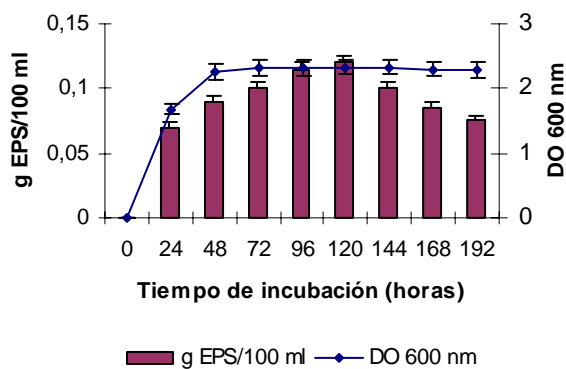


Figura 38. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. anticariensis* FP36 y sobre la producción de EPS.

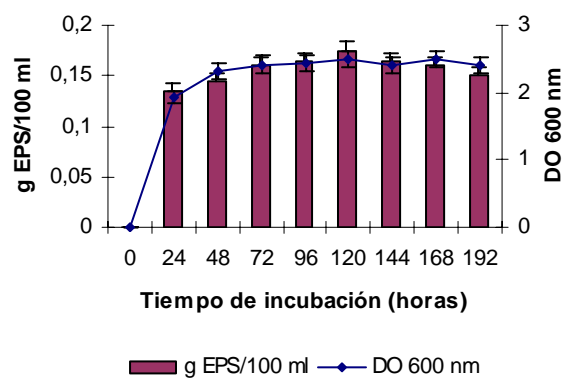


Figura 39. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *H. almeriensis* M8^T y sobre la producción de EPS.

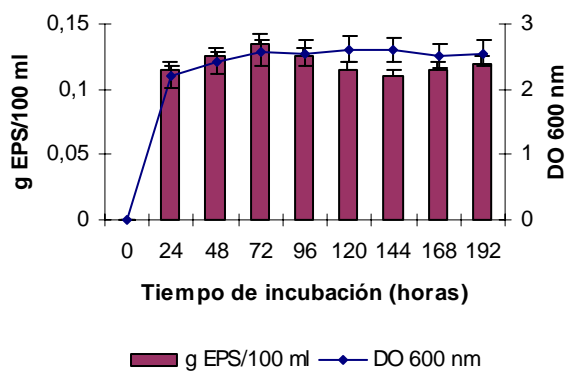


Figura 40. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *S. mucosus* A3^T y sobre la producción de EPS.

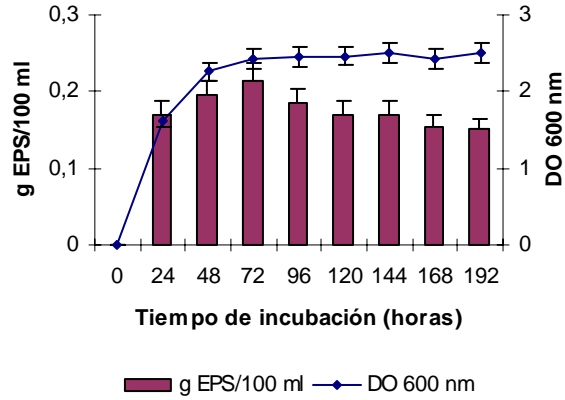


Figura 41. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *P. marismenoris* B33^T y sobre la producción de EPS.

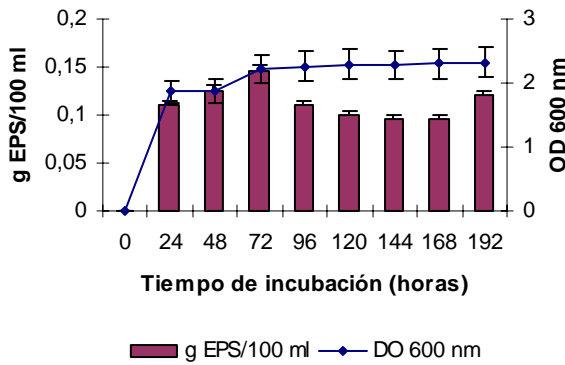


Figura 42. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *I. fontislapidosi* F23^T y sobre la producción de EPS.

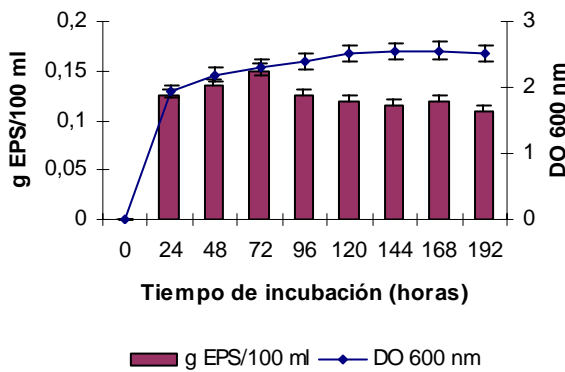


Figura 43. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *I. ramblicola* R22^T y sobre la producción de EPS.

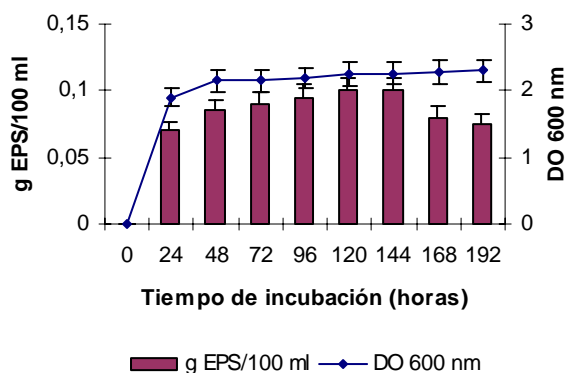


Figura 44. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *A. hispanica* F32^T y sobre la producción de EPS.

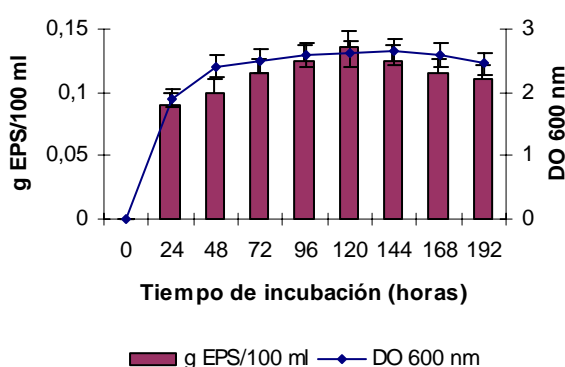


Figura 45. Efecto del tiempo de incubación sobre el crecimiento de *A. hispanica* B35 y sobre la producción de EPS.

Como se muestra en las Figuras 26-45, nuestras bacterias tienen una larga fase de crecimiento estacionario que se prolonga al menos durante los ocho días que ha durado el ensayo, sin que se aprecie lisis de la bacteria.

La producción de los biopolímeros aumenta progresivamente durante la fase logarítmica y alcanza un máximo en la fase estacionaria, alrededor de las 96-120 horas de incubación de los cultivos para las cepas de *Halomonas maura*, *Halomonas eurihalina*, *Halomonas ventosae*, *Halomonas anticariensis*, *Halomonas almeriensis* y *Alteromonas hispanica*, y de 72 horas de incubación para las cepas de *Salipiger mucosus*, *Palleronia marisminoris*, *Idiomarina fontislapidosi* e *Idiomarina ramblicola*. Este hecho es indicativo de que la producción de EPS por parte de las bacterias halófilas 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., 2001). Por tanto, la producción de exopolisacáridos por parte de nuestras bacterias halófilas, podría considerarse una “fuga” o “escape” metabólico, tal y como lo definió Pham y colaboradores (2000) para la síntesis de exopolisacáridos por parte de *Lactobacillus rhamnosus* R.

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). La producción de exopolisacárido por *Halomonas maura* S30 también se ha demostrado que está parcialmente asociada al crecimiento bacteriano, ya que comienza al final de la fase exponencial de crecimiento, aunque alcanza su máximo en la fase estacionaria, tras 120 horas de incubación (Arias y col., 2003).

Para todos los microorganismos estudiados en este trabajo, el máximo de producción de exopolímero (que suele coincidir con la máxima cantidad de EPS por gramo de peso seco celular) está seguido por una disminución de los niveles de exopolisacárido en tiempos prolongados de incubación, lo que puede ser debido a una degradación enzimática del mismo (Dierksen y col., 1995; De Vuyst y col., 1998; Degeest y De Vuyst., 1999) o a cambios en los parámetros físicos del cultivo (Gancel y Novel., 1994 a y b). 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; Hashimoto y col., 1996) 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 β -glucuronidasa (mayoritariamente en la fracción externa) y asociadas a ellas otras enzimas como β -D-glucosidasa, α -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).

- **Concentración de sales**

La presencia de sales en el medio de cultivo, indispensable para el crecimiento y desarrollo de bacterias halófilas, constituye otro factor relevante en la producción de exopolisacárido. De ahí que la optimización de la naturaleza de las mismas así como la concentración en la que han de ser incorporadas al medio sea también decisiva en este estudio.

Hemos estudiado la influencia sobre el crecimiento de nuestras bacterias, así como sobre la producción de exopolisacárido, de distintas concentraciones de una solución de sales (Rodríguez-Valera y col., 1981), cuya composición se detalla en el apartado 2. Mantenimiento de las cepas, Material y Métodos, tras cinco días de incubación. En la Figuras 46-65 se encuentran recogidos los resultados obtenidos.

El crecimiento de los microorganismos estudiados se evaluó mediante la medida de la producción de biomasa celular (g PSC/100 ml). Paralelamente se estudió la producción de exopolisacárido en g EPS/100 ml y g EPS/g PSC.

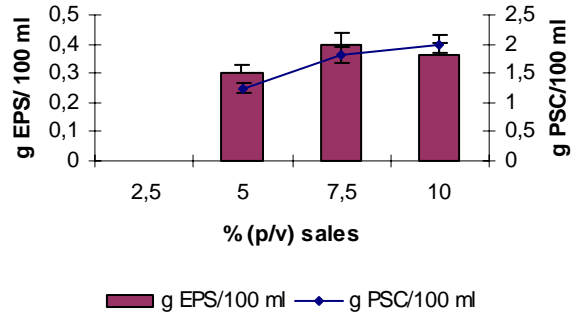


Figura 46. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* X2.

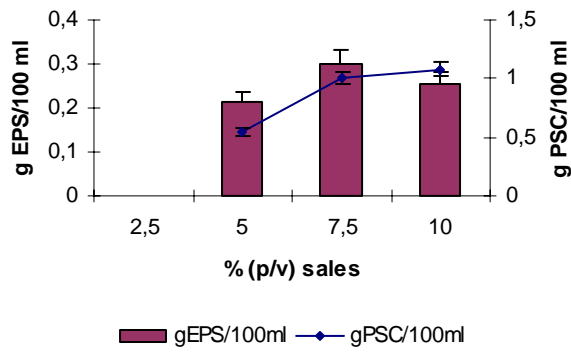


Figura 47. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* B40.

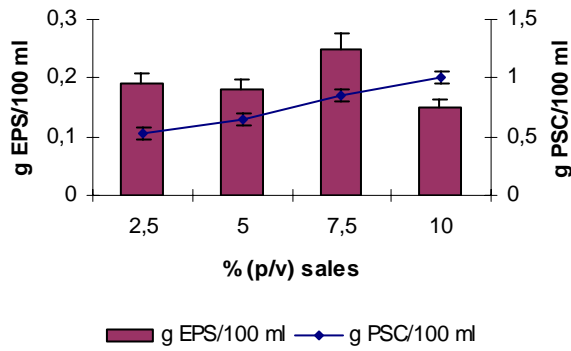


Figura 48. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* B100.

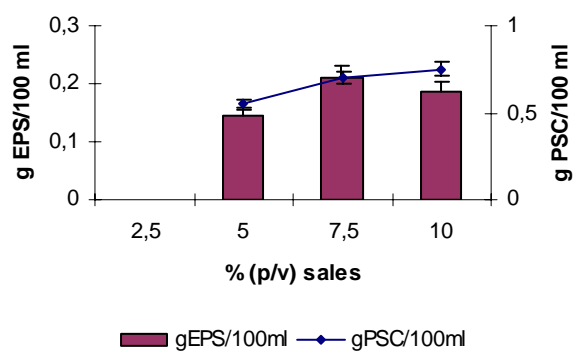


Figura 49. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* N12.

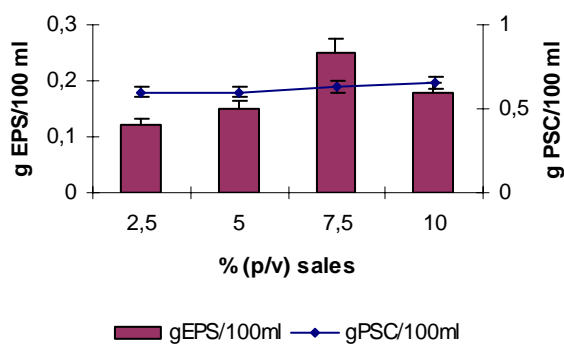


Figura 50. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* A16.

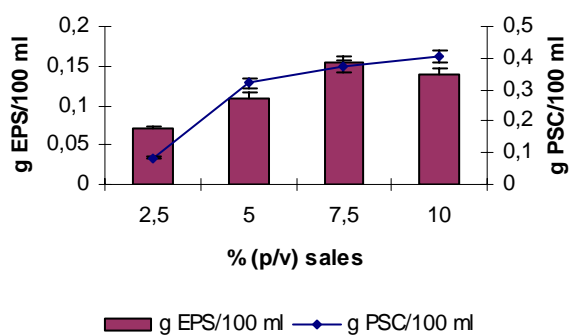


Figura 51. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. eurihalina* M4.

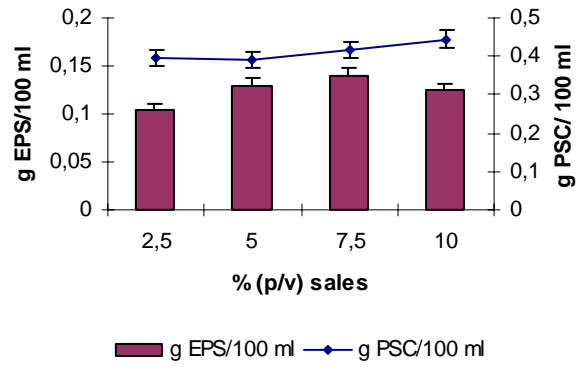


Figura 52. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. eurihalina* X8.

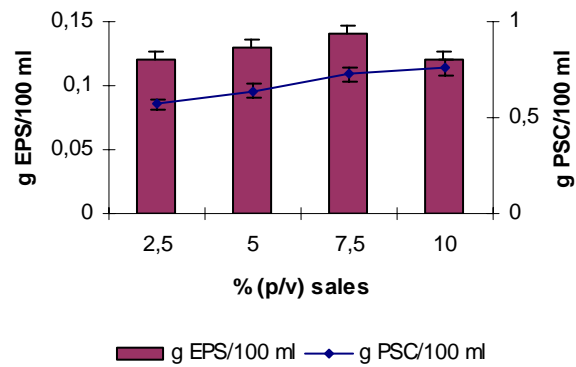


Figura 53. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI12^T.

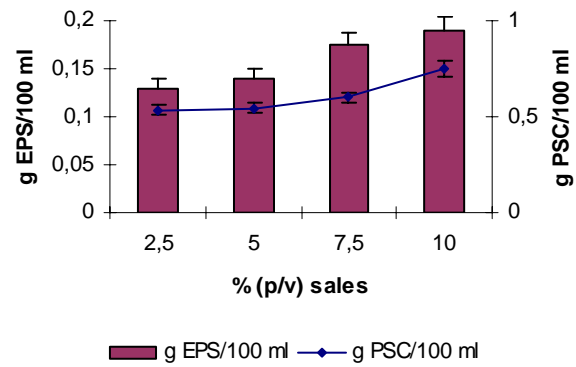


Figura 54. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI15.

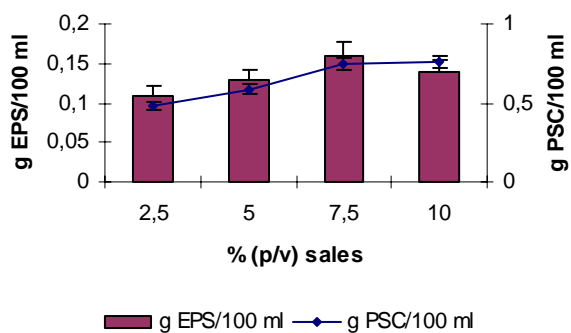


Figura 55. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI16.

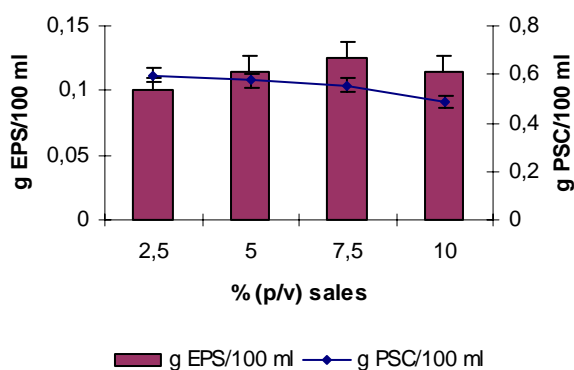


Figura 56. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP35^T.

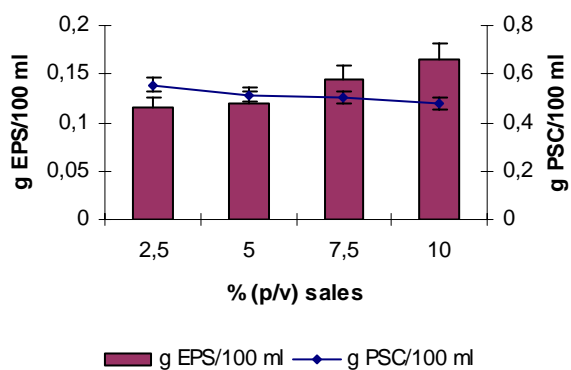


Figura 57. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP34.

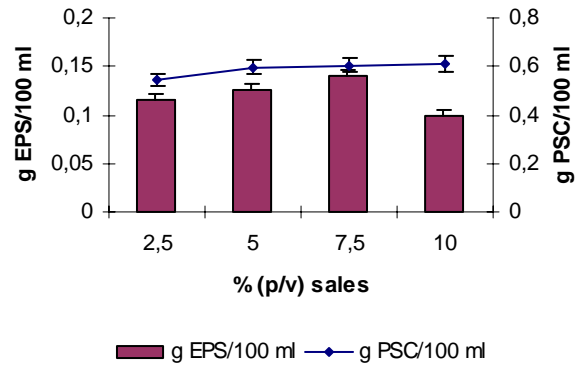


Figura 58. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP36.

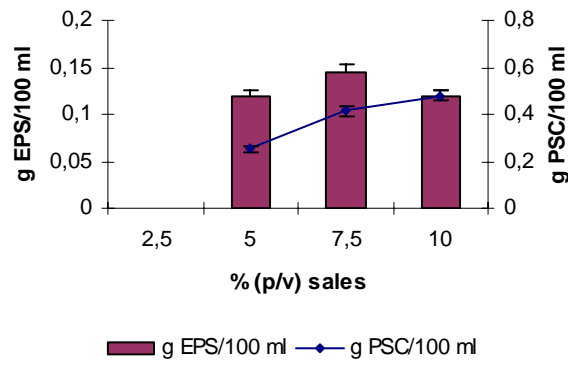


Figura 59. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. almeriensis* M8^T.

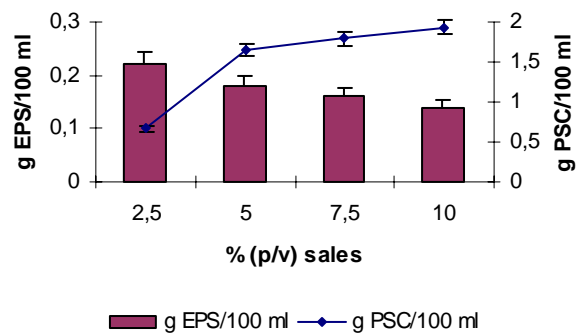


Figura 60. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *S. mucosus* A3^T.

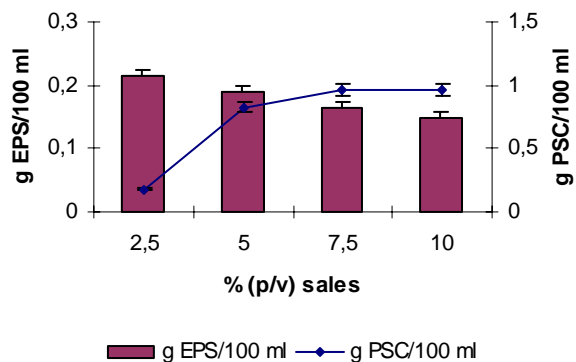


Figura 61. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *P. marismenoris* B33^T.

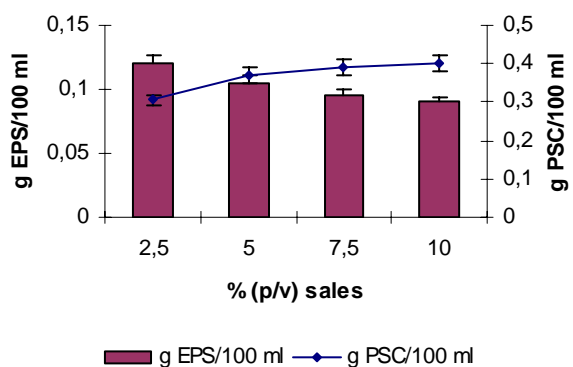


Figura 62. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *I. fontislapidosi* F23^T.

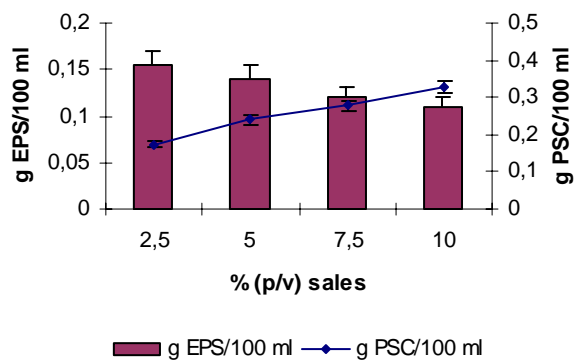


Figura 63. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *I. ramblicola* R22^T.

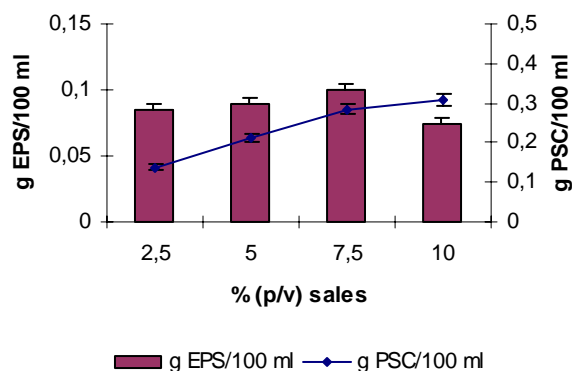


Figura 64. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *A. hispanica* F32^T.

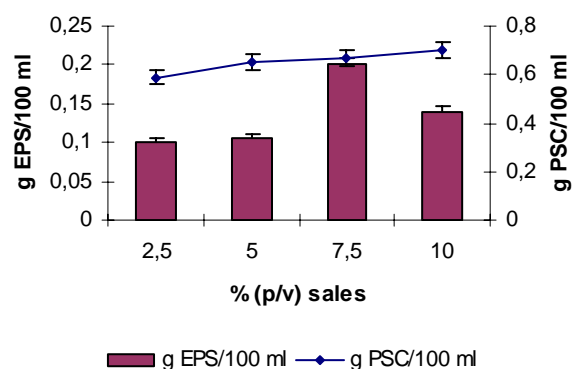


Figura 65. Efecto de la concentración de sales sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *A. hispanica* B35.

La mayor producción de EPS se obtuvo en el medio de cultivo con una concentración salina final del 7,5% (p/v) para las cepas X2, B40, B100, N12 y A16 de *H. maura*, M4 y X8 de *H. eurihalina*, A112^T y A116 de *H. ventosae*, FP35^T y FP36 de *H. anticariensis*, M8^T de *H. almeriensis* y F32^T y B35 de *Alteromonas hispanica*, como podemos apreciar en las Figuras 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 64 y 65. En estos casos, al aumentar la concentración de sales hasta el 10% (p/v), se produce una disminución en la producción de exopolisacárido. El comportamiento observado en cuanto a la producción de exopolisacárido por parte de estas cepas en función de la concentración de sales ha sido descrito en otros casos. A pesar de que en principio se ha considerado que la producción de exopolisacárido tiene lugar en respuesta a condiciones de estrés osmótico en los ambientes hipersalinos (supuesto que quizás podría aplicarse a las cepas A115 de *H. ventosae* y FP34 de *H. anticariensis*, ya que a mayor concentración salina, mayor producción de EPS, como se puede observar en la Figuras 54 y 57), este proceso puede verse afectado en presencia de elevadas concentraciones salinas. En *Shinorizobium meliloti*, 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 comportamiento frente al estrés salino de las cepas A3^T de *Salipiger mucosus*, B33^T de *Palleronia marisminoris*, F23^T de *Idiomarina fontislapidosi*, y R22^T de *I. ramblicola*, es diferente, y es que como podemos observar en las correspondientes gráficas de las Figuras 60, 61, 62 y 63, el crecimiento bacteriano y la producción de exopolisacárido están totalmente desacoplados, son fenómenos no asociados; a mayor concentración de la solución salina, más y mejor crecimiento, ya que podemos observar que los valores de biomasa celular obtenidos son cada vez más elevados, y peor producción de EPS; quizá, y como ya hemos comentado anteriormente en este mismo capítulo, las condiciones que favorecen el crecimiento celular hacen que los precursores activados no se encuentren disponibles para la síntesis de exopolisacárido, ya que se utilizan en gran medida para la síntesis de componentes de la pared celular, para una multiplicación eficiente de las células, para la producción de biomasa celular. Estos resultados coinciden con los de otros autores, que mantienen que el crecimiento y la producción de EPS tienen requerimientos nutricionales diferentes (Cheirslip y col., 2001; Gorret y col., 2001; Petronella y Hugenholtz, 1999).

- **Fuente de carbono y nitrógeno**

La producción de exopolisacáridos microbianos puede verse enormemente influenciada por la fuente de carbono y nitrógeno que incorporemos al medio de cultivo, así como la relación que exista entre dichos componentes.

A partir de la composición del medio complejo MY, se ha sustituido la glucosa (Glu) como fuente de carbono por sacarosa (Sac), sustrato empleado comúnmente por los microorganismos para la síntesis de exopolisacáridos, manosa (Man) y galactosa (Gal), azúcares que se encuentran habitualmente formando parte de la composición química de los EPS. Además, hemos estudiado el efecto de sustituir en el medio complejo MY, la proteosa peptona, y los extractos de levadura y malta, fuentes de nitrógeno, por bacto peptona (BP), a fin de intentar disminuir el coste del medio de cultivo.

El crecimiento celular se evaluó mediante la medida de la producción de biomasa celular (g PSC/100 ml). Paralelamente se estudió la producción de polímero en g EPS/100 ml y g EPS/g PSC.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las Figuras 66-85.

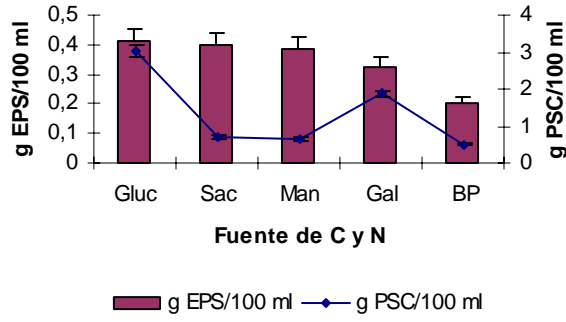


Figura 66. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* X2. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

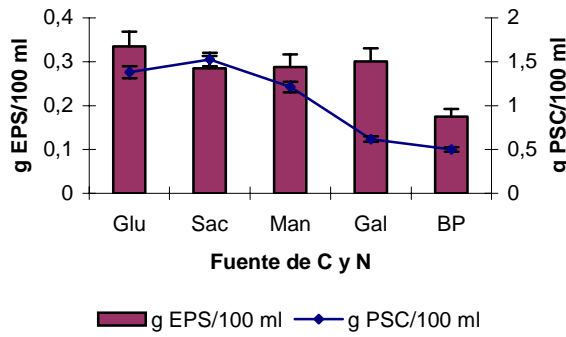


Figura 67. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* B40. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

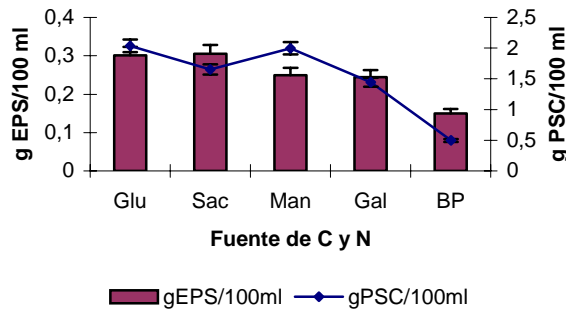


Figura 68. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* B100. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

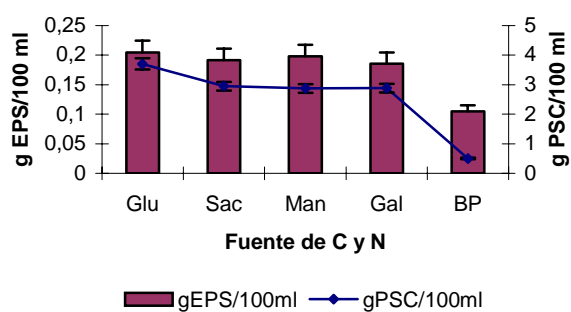


Figura 69. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* N12. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

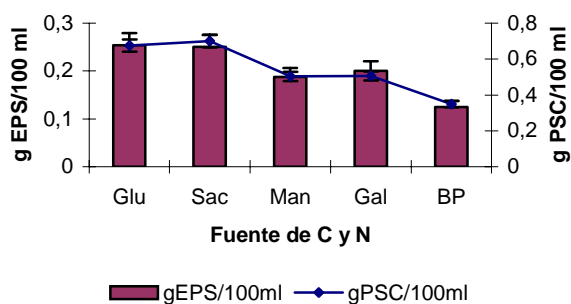


Figura 70. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* A16. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

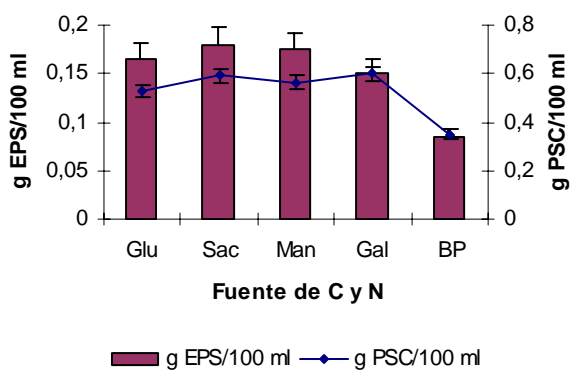


Figura 71. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas eurihalina* M4. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

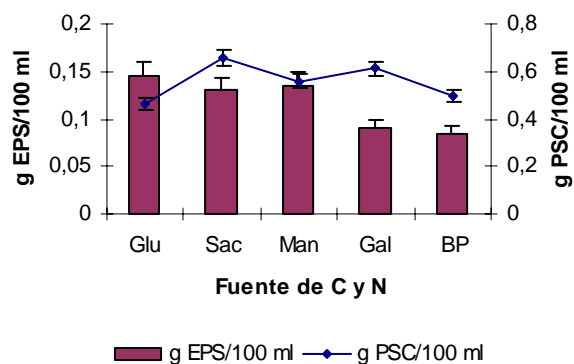


Figura 72. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas eurihalina* X8. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

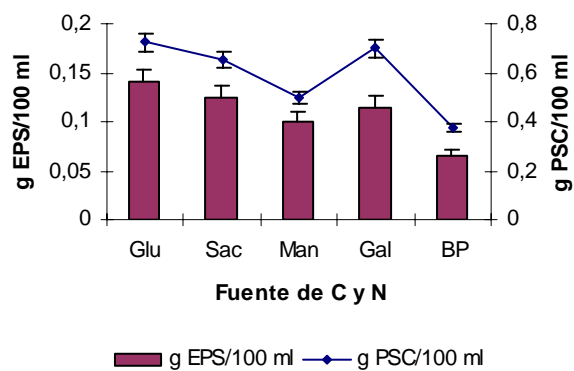


Figura 73. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas ventosae* Al12^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

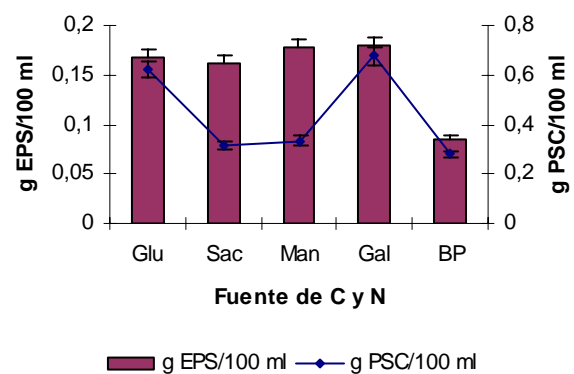


Figura 74. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas ventosae* Al15. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

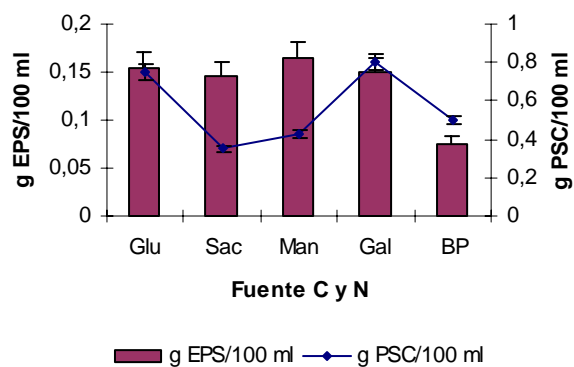


Figura 75. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas ventosae* A116. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

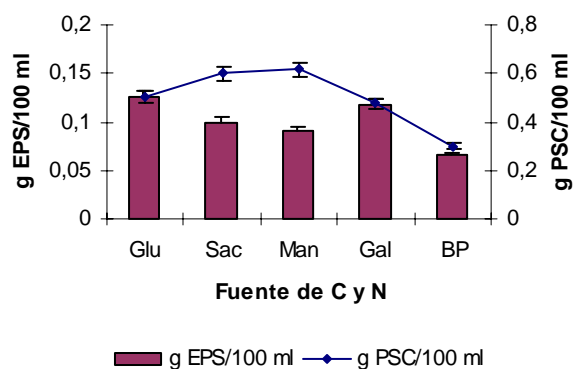


Figura 76. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas anticariensis* FP35^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

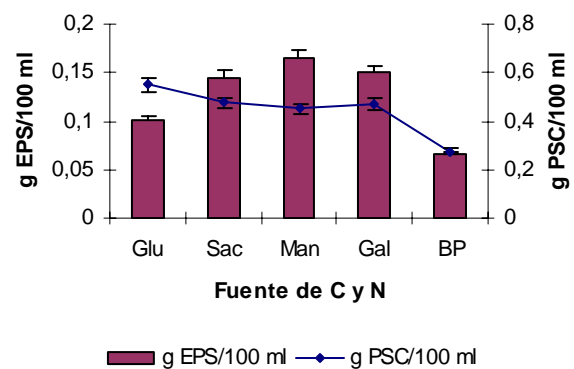


Figura 77. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas anticariensis* FP34. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

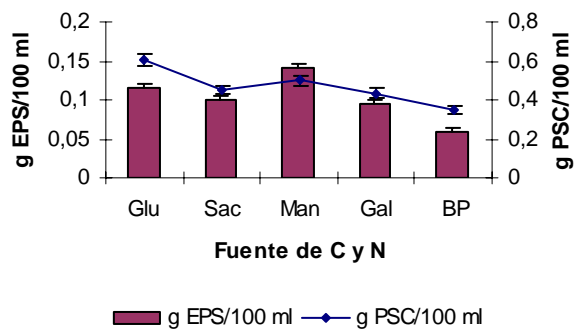


Figura 78. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas anticariensis* FP36. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

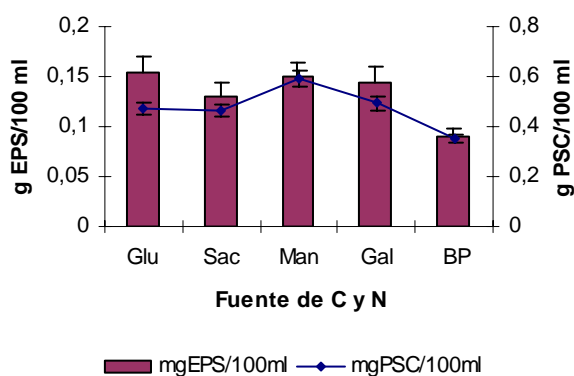


Figura 79. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas almeriensis* M8^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

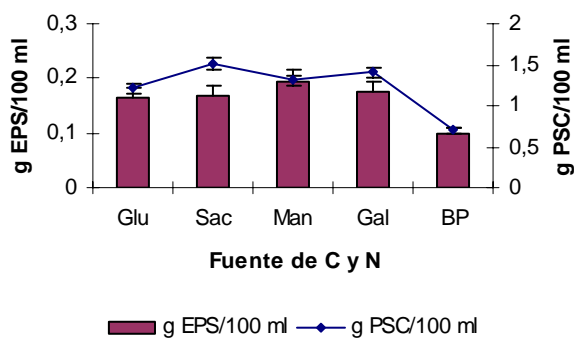


Figura 80. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Salipiger mucosus* A3^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

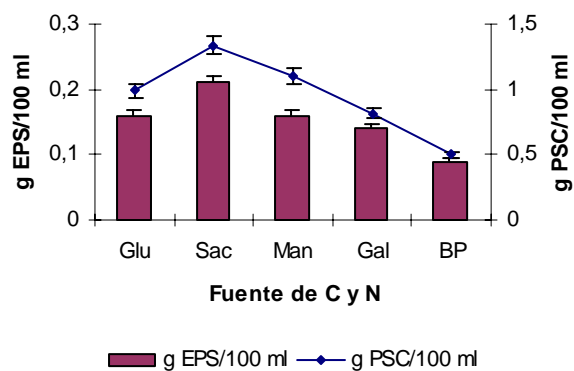


Figura 81. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Palleronia marisminoris* B33^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

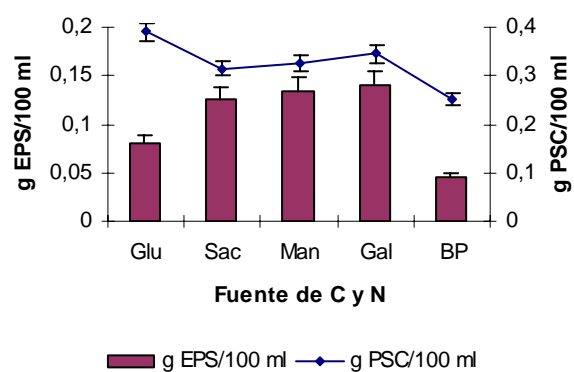


Figura 82. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Idiomarina fontislapidosi* F23^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

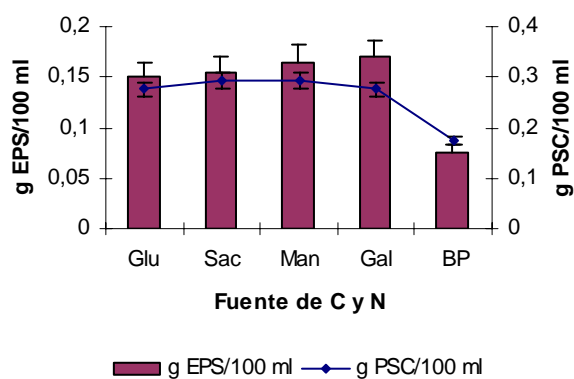


Figura 83. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Idiomarina ramblicola* R22^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

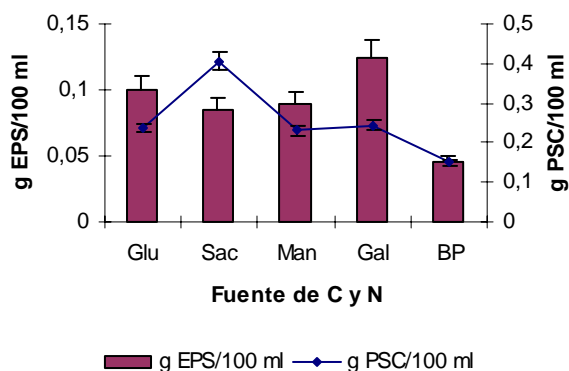


Figura 84. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Alteromonas hispanica* F32^T. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

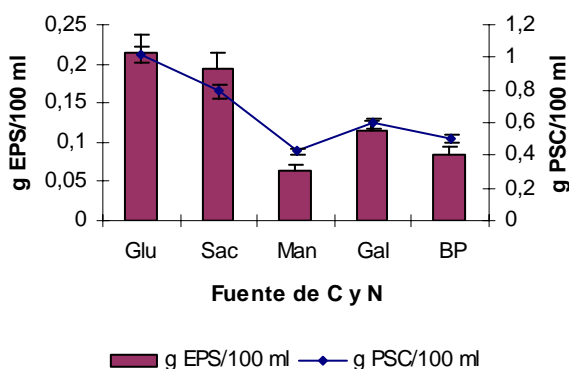


Figura 85. Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Alteromonas hispanica* B35. Gluc: glucosa; Sac: sacarosa; Man: manosa; Gal: galactosa; BP: bacto peptona.

En líneas generales, la mayor producción de exopolisacárido, tal y como se muestra en las Figuras 66-85, se produjo cuando empleamos el medio de cultivo indefinido MY tal y como fue descrito por Moraine y Rogovin en 1966, es decir, adicionando glucosa como fuente de carbono. La productividad en los medios de cultivo en los que la fuente de carbono había sido sustituida por sacarosa, manosa o galactosa en general fue menor. En algunas ocasiones, si bien se aprecia un ligero aumento en la producción de polímero a partir de otro sustrato (por ejemplo, con sacarosa para la cepa B100 de *Halomonas maura*, con manosa para *Halomonas ventosae* A116 o con galactosa para *Idiomarina ramblicola* R22^T), creemos que este aumento no fue lo suficientemente significativo como para sustituir la glucosa por alguno de los demás azúcares, que tienen un coste económico superior. Sin embargo, en algunos casos, la glucosa sí que se vio claramente superada como sustrato carbonado a partir del cual sintetizar exopolisacáridos; así, las cepas FP34 y FP36 de *Halomonas anticariensis*, aunque crecen casi por igual en todos los azúcares ensayados, producen una mayor cantidad de polímero cuando

empleamos manosa como fuente de carbono, *Palleronia marisminoris* sintetiza una mayor cantidad de EPS en presencia de sacarosa, e *Idiomarina fontislapidosi* F23^T y *Alteromonas hispanica* F32^T producen más biopolímero cuando en el medio indefinido MY la glucosa es sustituida por galactosa.

Por otra parte, el crecimiento celular detectado si que presenta en muchos casos una gran variabilidad en función de las distintas fuentes de carbono empleadas, tal y como indican los resultados de biomasa celular obtenidos en cada caso. Este comportamiento ha sido descrito para distintos microorganismos, como por ejemplo *Lactobacillus plantarum* EP56 (Tallon y col., 2003), *Lactobacillus rhamnosus* C83 (Gamar y col., 1997), *Lactobacillus sakei* 0-1 (Deggest y col., 2001) o *Pediococcus damnosus* IOEB8801 (Walling y col., 2005). Sin embargo, el crecimiento de *Halomonas maura* S30 empleando diferentes fuentes de carbono fue muy similar (Arias y col., 2003).

A diferencia del laboratorio, donde únicamente se busca emplear sustratos que permitan una producción adecuada de EPS, en la industria 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, la glucosa ha sido la fuente de carbono seleccionada por nosotros para la producción de nuestros EPS y para realizar posteriores estudios.

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 de 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. 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).

Por otra parte, y a diferencia de lo observado con las distintas fuentes de carbono, la sustitución del extracto de levadura, extracto de malta y proteosa peptona, presentes en el medio MY como fuentes de nitrógeno, por una fuente de nitrógeno de menor coste económico, bacto-peptona, condujo a una disminución importante en la producción de exopolisacárido así como en el crecimiento bacteriano.

- **Concentración de la fuente de carbono**

La optimización del porcentaje de la fuente de carbono en el medio de cultivo se llevó a cabo de igual forma que en la experiencia anterior, en base a la producción de EPS (g EPS/100 ml y g EPS/g PSC) y crecimiento bacteriano (g PSC/100 ml) en un amplio rango de concentraciones de glucosa (0, 1, 2, 5, 7 y 10% p/v). Los resultados se muestran a continuación en las Figuras 86-105.

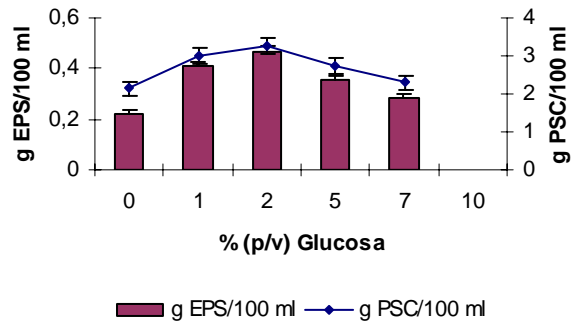


Figura 86. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Halomonas maura* X2.

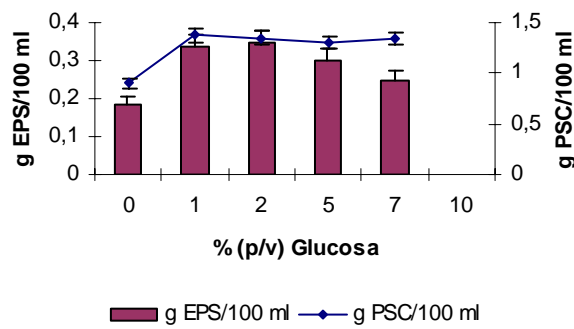


Figura 87. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* B40.

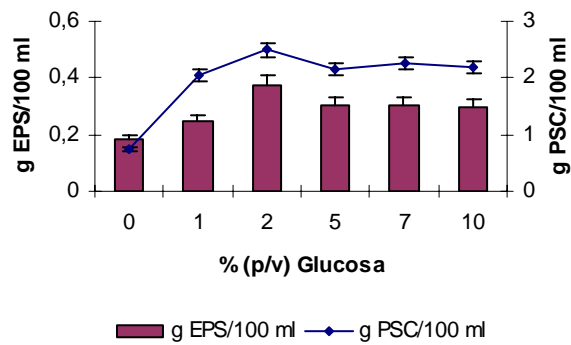


Figura 88. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* B100.

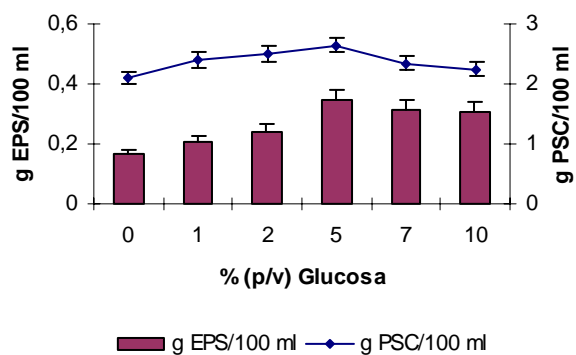


Figura 89. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* N12.

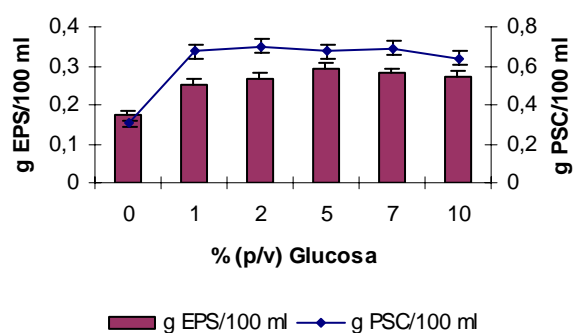


Figura 90. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. maura* A16.

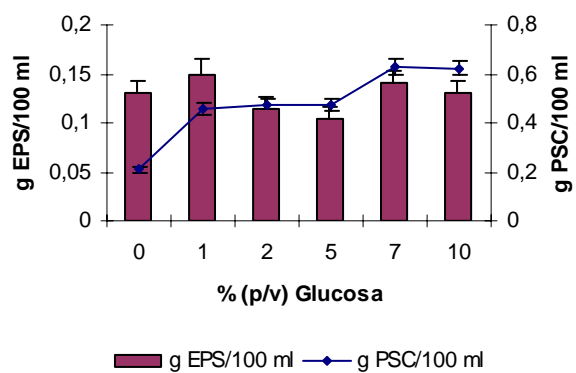


Figura 91. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. eurihalina* M4.

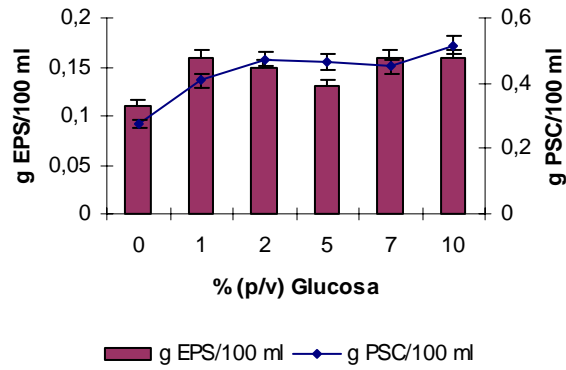


Figura 92. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. eurihalina* X8.

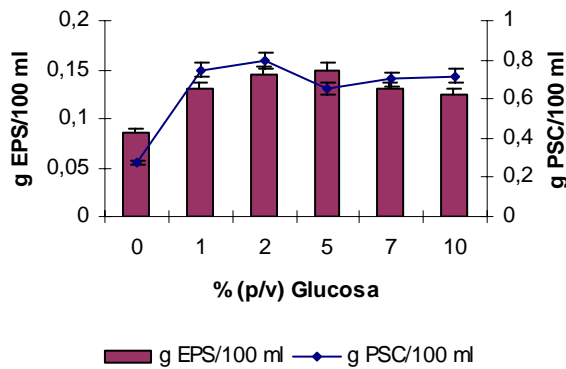


Figura 93. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI12^T.

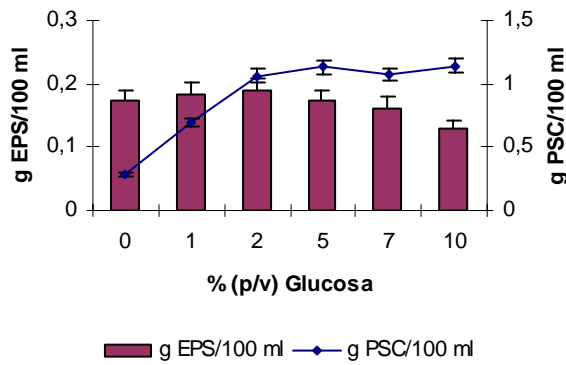


Figura 94. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI15.

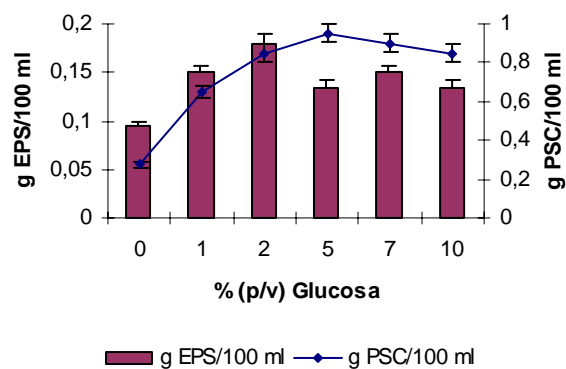


Figura 95. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. ventosae* AI16.

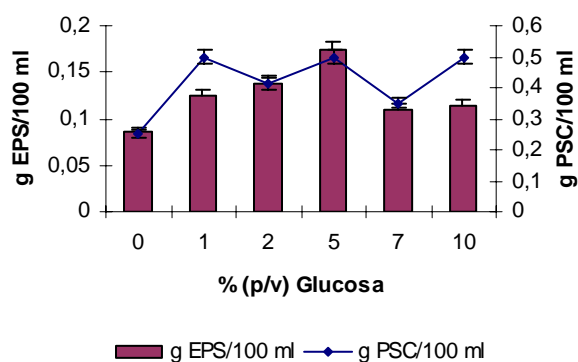


Figura 96. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP35^T.

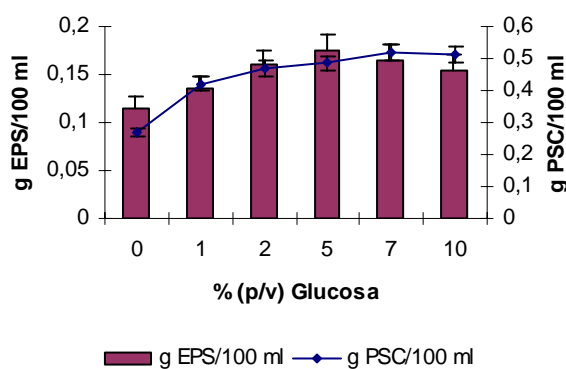


Figura 97. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP34.

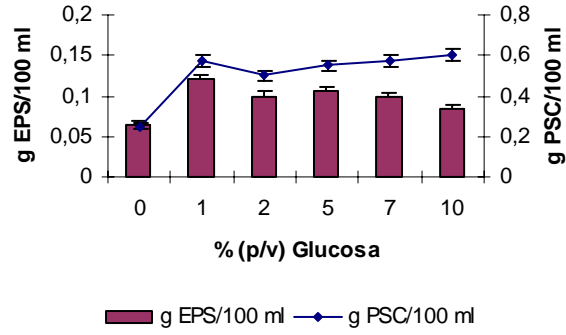


Figura 98. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. anticariensis* FP36.

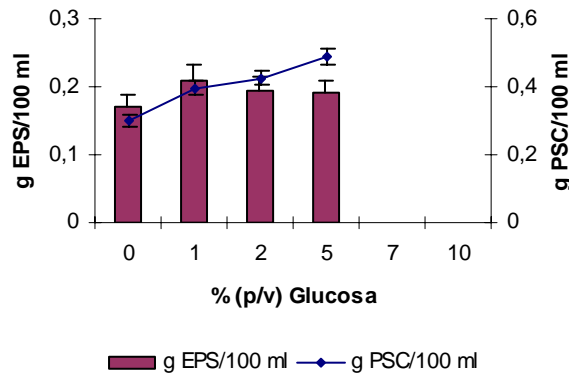


Figura 99. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *H. almeriensis* M8^T.

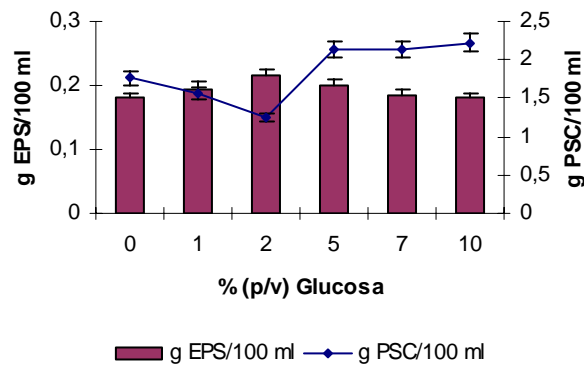


Figura 100. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Salipiger mucosus* A3^T.

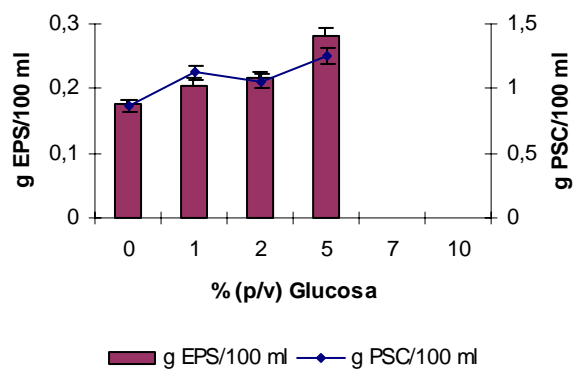


Figura 101. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Palleronia marisminoris* B33^T.

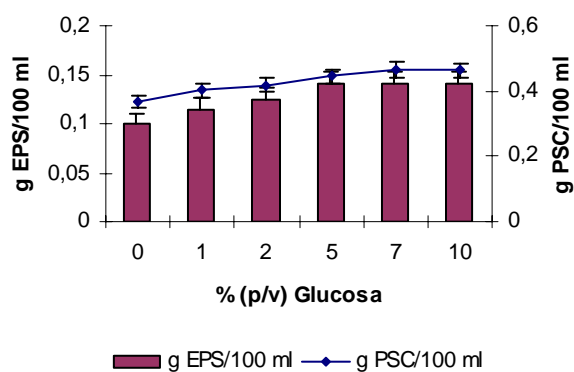


Figura 102. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Idiomarina fontislapidosi* F23^T.

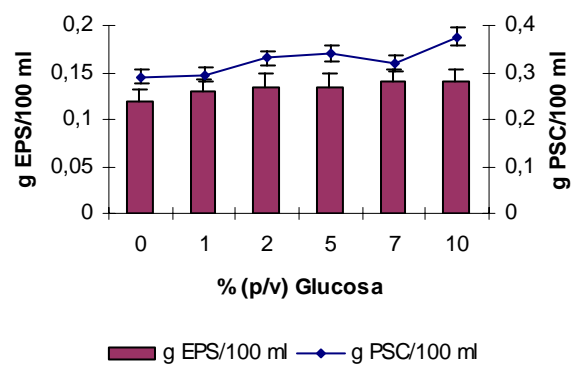


Figura 103. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *I. ramblicola* R22^T.

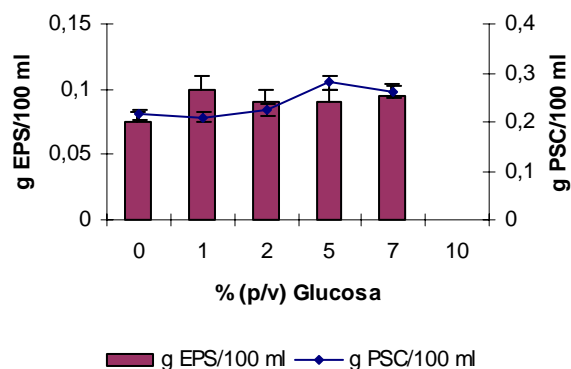


Figura 104. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *Alteromonas hispanica* F32^T.

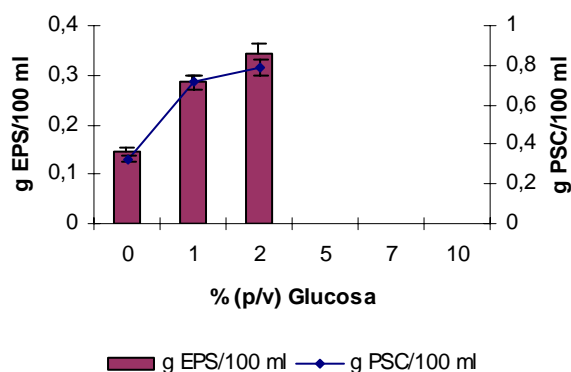


Figura 105. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de EPS y la biomasa celular en *A. hispanica* B35.

En la gran mayoría de los casos, como se puede apreciar en las Figuras 86-105, la mayor producción de exopolisacárido tiene lugar a un porcentaje no muy elevado de glucosa, concretamente entre el 1 y el 5% (p/v), a partir del cual y conforme se incrementa la concentración de este azúcar en el medio (hasta un máximo del 10% p/v), dicha producción se va haciendo progresivamente menor. En algunas ocasiones, en las fermentaciones realizadas con las mayores cantidades de glucosa formando parte de la composición del medio de cultivo, el crecimiento bacteriano se veía total y absolutamente inhibido, como se aprecia en las Figuras 86, 87, 99, 101, 104 y 105.

El comportamiento que presentan en general nuestros microorganismos frente a la concentración de glucosa presente 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 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 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 (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 nuestras 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).

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, uno de nuestros microorganismos supone una excepción a este comportamiento general descrito anteriormente frente a la concentración de glucosa; es *Idiomarina fontislapidosi* F23^T. 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 de glucosa en el medio elevada 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.

Un acontecimiento que es importante resaltar, es que al igual que como ocurre con *Halomonas maura* S30 (Arias y col., 2003), todos nuestros microorganismos halófilos son capaces de producir exopolisacáridos en medios de cultivo que no presentan un aporte directo de glucosa, como se observa en las Figuras 87-106, algo que podría tener importantes implicaciones en lo que se refiere a disminuir costes en la producción a nivel industrial de los exopolisacáridos. *Aeromonas salmonicida* es capaz de crecer en ausencia de glucosa, pero en este caso no produce su exopolisacárido (Bonet y col., 1993).

• **Temperatura de incubación y agitación de los cultivos**

Para finalizar con la selección de las condiciones óptimas de producción de los EPS, fijamos la temperatura de incubación y la agitación de los cultivos.

Tabla 14. Efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de EPS y la biomasa celular.

CEPA	Temperatura (°C)								
	22			32			42		
	EPS*	Biomasa*	Rendimiento*	EPS	Biomasa	Rendimiento	EPS	Biomasa	Rendimiento
X2	0,035	0,6	0,058	0,410	3,015	0,135	0,045	0,2	0,225
B40	0,025	0,3	0,083	0,335	1,38	0,242	0,035	0,1	0,35
B100	0,025	0,45	0,055	0,275	2,05	0,134	0,03	0,145	0,206
N12	0,015	0,6	0,025	0,205	2,75	0,074	0,02	0,2	0,1
A16	0,018	0,15	0,12	0,215	0,65	0,330	0,025	0,05	0,5
M4	0,012	0,1	0,125	0,15	0,45	0,333	0,015	0,035	0,428
X8	0,01	0,085	0,117	0,14	0,4	0,35	0,015	0,03	0,5
AI12^T	0,01	0,15	0,066	0,14	0,75	0,186	0,015	0,06	0,25
AI15	0,015	0,125	0,12	0,165	0,6	0,275	0,017	0,045	0,38
AI16	0,01	0,13	0,076	0,15	0,6	0,25	0,015	0,045	0,333
FP35^T	0,01	0,125	0,08	0,125	0,5	0,25	0,015	0,04	0,375
FP34	0,011	0,09	0,122	0,135	0,425	0,317	0,015	0,032	0,468
FP36	0,01	0,115	0,086	0,12	0,55	0,218	0,0125	0,04	0,3125
M8^T	0,015	0,075	0,2	0,17	0,3	0,566	0,02	0,025	0,8
A3^T	0,015	0,4	0,0375	0,165	1,75	0,094	0,02	0,115	0,173
B33^T	0,015	0,175	0,085	0,17	0,85	0,2	0,021	0,065	0,323
F23^T	0,008	0,095	0,089	0,1	0,4	0,25	0,01	0,035	0,285
R22^T	0,01	0,065	0,153	0,125	0,3	0,416	0,013	0,025	0,52
F32^T	0,008	0,055	0,154	0,1	0,25	0,4	0,015	0,02	0,75
B35	0,015	0,15	0,1	0,2	0,75	0,266	0,025	0,06	0,416

* EPS: g EPS/100 ml; PSC: g PSC/100 ml; Rendimiento: g EPS/g PSC

A 32°C tiene lugar la máxima producción de biopolímero para todas las cepas (Tabla 14), temperatura a la cual se presenta también su óptimo de crecimiento, de ahí que se obtenga el máximo de producción de biomasa celular. Estos resultados no concuerdan con los de muchos autores, que mantienen que la máxima producción de exopolisacárido se produce a temperaturas por debajo del óptimo para el crecimiento celular, como ocurre con muchas bacterias del ácido láctico o con diversos microorganismos aislados del Antártico. A temperaturas subóptimas para el crecimiento, la división celular está menos favorecida, y hay más precursores activados disponibles para la síntesis de exopolisacárido (Kimmel y col., 1998; Mancuso-Nichols y col., 2005a).

En cuanto a la agitación, se ha detectado una mayor producción de EPS en agitación que en reposo (Tabla 15), ya que nuestras bacterias son aerobias; el óptimo lo encontramos a 100 rpm; a 200 rpm, aunque se produce más EPS que sin agitación, la producción disminuye, igual que se ha descrito para, por ejemplo, el gelano (Dreveton y col., 1994).

Tabla 15. Efecto de la agitación de los cultivos sobre la producción de exopolisacárido y la biomasa celular.

CEPA	Agitación (rpm)								
	Reposo			100			200		
	EPS*	Biomasa*	Rendimiento*	EPS	Biomasa	Rendimiento	EPS	Biomasa	Rendimiento
X2	0,085	2	0,0425	0,4095	3,015	0,135	0,2	3	0,066
B40	0,065	0,95	0,068	0,335	1,38	0,242	0,165	1,3	0,126
B100	0,055	1,45	0,0375	0,275	2,05	0,134	0,14	2	0,07
N12	0,045	2,05	0,021	0,205	3	0,068	0,1	2,75	0,036
A16	0,045	0,45	0,1	0,215	0,65	0,330	0,105	0,7	0,150
M4	0,03	0,3	0,1	0,15	0,45	0,333	0,075	0,425	0,176
X8	0,025	0,275	0,09	0,14	0,4	0,35	0,07	0,385	0,181
AI12^T	0,03	0,6	0,05	0,14	0,75	0,186	0,07	0,7	0,1
AI15	0,035	0,4	0,0875	0,165	0,6	0,275	0,085	0,625	0,136
AI16	0,035	0,425	0,082	0,15	0,6	0,25	0,075	0,555	0,135
FP35^T	0,025	0,345	0,072	0,125	0,5	0,25	0,065	0,49	0,132
FP34	0,03	0,285	0,105	0,135	0,425	0,317	0,07	0,4	0,175
FP36	0,025	0,385	0,065	0,12	0,57	0,210	0,055	0,555	0,099
M8^T	0,035	0,2	0,175	0,17	0,3	0,566	0,085	0,285	0,298
A3^T	0,035	1,15	0,030	0,175	1,75	0,1	0,09	1,6	0,056
B33^T	0,035	0,55	0,063	0,17	0,85	0,2	0,082	0,8	0,1025
F23^T	0,025	0,275	0,090	0,1	0,4	0,25	0,052	0,35	0,148
R22^T	0,025	0,2	0,125	0,125	0,3	0,416	0,07	0,275	0,254
F32^T	0,02	0,17	0,117	0,1	0,25	0,4	0,048	0,225	0,213
B35	0,045	0,425	0,105	0,2	0,7	0,285	0,105	0,6	0,175

* EPS: g EPS/100 ml; PSC: g PSC/100 ml; Rendimiento: g EPS/g PSC

Como conclusión de este apartado, podemos decir que a pesar de la diversidad de los microorganismos estudiados en este trabajo, el comportamiento que presentan a la hora de sintetizar exopolisacáridos bajo diversas condiciones es muy similar, lo que podría estar relacionado con un metabolismo y fisiología comunes; así, por ejemplo, todas las cepas muestran una producción de exopolisacárido parcialmente asociada al crecimiento celular, pues como ya hemos comentado, si bien la síntesis comienza en la fase exponencial de crecimiento, alcanza su máximo durante la fase de crecimiento estacionario. De la misma manera, todos los microorganismos estudiados son capaces de

crecer y producir su exopolisacárido sobre todas los sustratos ensayados, e incluso sin un aporte directo de azúcar, lo que podría tener interesantes implicaciones a la hora de la obtención industrial de los EPS. Además, en todos los casos los máximos de producción se alcanzaron a 32°C y a 100 rpm. En general, hay que destacar que las condiciones que condujeron a una mayor producción de biopolímero fueron las mismas que permitieron el mejor crecimiento de los microorganismos, aunque hemos detectado algunas excepciones; como ya hemos comentado, alguno autores mantienen que la síntesis de EPS es un proceso que tiene requerimientos nutricionales distintos (Petronella y Hugenholtz, 1999; Davey y Amos, 2001; Cheirslip y col., 2001), aunque en otros muchos casos, la máxima producción de polímero coincide con las condiciones óptimas de crecimiento, como ocurre por ejemplo con algunas bacterias del ácido láctico (De Vuyst y col., 1998).

CAPÍTULO 2

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y MASA MOLECULAR DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

RESUMEN

Todos los polímeros estudiados son heteropolisacáridos, constituidos fundamentalmente por carbohidratos, aunque con diversos sustituyentes orgánicos en su composición, como restos acetilo, restos piruvato, hexosaminas y proteínas, además de 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. Todos los EPS presentan un marcado carácter aniónico, y están constituidos por una sola fracción, a excepción de los polisacáridos A115 de *Halomonas ventosae*, M8 de *Halomonas almeriensis*, F23 de *Idiomarina fontislapidosi* y R22 de *Idiomarina ramblicola*, que presentan dos fracciones polisacáridicas de distinta composición en monosacáridos y masa molecular. El análisis por GLC y GC-MS de los exopolisacáridos purificados reveló la presencia de nueve azúcares: glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico, siendo la glucosa y la manosa los monosacáridos más frecuentes y que se detectaron en mayor proporción. Los exopolisacáridos N12 y A16 de *Halomonas maura* y A3 de *Salipiger mucosus*, presentan en su composición importantes cantidades de fucosa, un azúcar muy interesante desde el punto de vista biotecnológico, y el polímero F32 de *Alteromonas hispanica* presenta una importante proporción de xilosa, un monómero muy inusual entre los EPS microbianos. Los resultados obtenidos en la determinación de la masa molecular se encuentran en concordancia con la masa molecular de otros polímeros descritos.

2.1. Análisis colorimétricos. Determinación de cenizas

El contenido en carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos, restos acetilo, pirúvico, hexosaminas y cenizas de los exopolisacáridos se recoge en la Tabla 16. Los resultados son la media de tres determinaciones, y están expresados en porcentaje en función del peso seco total de polímero.

Tabla 16. Composición química de los exopolisacáridos obtenidos en condiciones óptimas. Los carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos, restos acetilo, restos piruvato y hexosaminas fueron determinados por análisis colorimétricos. Las cenizas fueron determinadas por gravimetría tras calentamiento a 550°C durante 6 horas. Los fosfatos y sulfatos se determinaron por cromatografía iónica en los polímeros purificados.

EPS	Composición química (% p/p)								
	CH*	Prot	Uro	Acet	Pir	Hex	Cenizas	Sulfatos	Fosfatos
<i>H. maura</i> X2	30,4	3,3	7,85	3,6	2,1	2,4	20	1,45	0,25
<i>H. maura</i> B40	30,05	1,7	4,95	2,7	2,2	2,2	19	0,9	0,15
<i>H. maura</i> B100	33,2	1,65	4,1	0,25	2,7	2,4	16,5	7,9	0,25
<i>H. maura</i> N12	30,4	1,05	1,65	1,95	2,15	2,8	18,5	2,45	0,35
<i>H. maura</i> A16	38,95	0,75	4,95	1,65	2,4	2,8	20	1,35	0,3
<i>H. eurihalina</i> M4	38,05	0,75	3,9	1,95	2,5	2,4	17,5	0,95	0,25
<i>H. eurihalina</i> X8	44,85	0,95	6,4	2,6	2,3	2,6	18	0,9	0,2
<i>H. ventosae</i> A12	30	3,05	2,85	1,4	1	2,8	16,25	1,1	ND
<i>H. ventosae</i> A15	37,5	4,65	4,85	2,4	2,1	2,6	24,5	1,2	ND
<i>H. ventosae</i> A16	30,8	3,95	4,4	1,5	2,3	2,8	14,5	0,7	ND
<i>H. anticariensis</i> FP35	35,5	0,3	2,85	1,55	2,7	2,9	16,4	0,75	0,2
<i>H. anticariensis</i> FP34	30	3,5	2,4	0,75	2,3	2,4	24,5	2,25	0,4
<i>H. anticariensis</i> FP36	33,7	0,4	2,7	2,05	2	2,4	14,5	1,5	0,15
<i>H. almeriensis</i> M8	30,55	1,1	2,85	0,8	2	2,4	19,5	1,45	0,15
<i>S. mucosus</i> A3	53,15	1,65	2,85	0,9	5,95	1,9	15,5	0,95	0,15
<i>P. marisminoris</i> B33	55	1,5	4,5	1,2	2,95	2,8	20	0,35	ND
<i>I. fontislapidosi</i> F23	50,85	0,8	4,3	1,85	1,5	2	18	0,65	ND
<i>I. ramblicola</i> R22	56,5	0,8	3,95	1,15	1,8	1,9	19,5	0,5	ND
<i>A. hipanica</i> F32	76,5	0,25	4,3	3,3	2,15	2,2	16,5	0,25	ND
<i>Alteromonas</i> spp. B35	53,1	2,75	3,95	2,2	2,2	1,8	14,5	1,1	ND

*, CH: Carbohidratos, Prot: Proteínas, Uro: Ácidos urónicos; Acet: Restos acetilo; Pir: Pirúvico; Hex: Hexosaminas; ND: No detectado.

Todos los EPS estudiados son heteropolisacáridos (Tabla 17) compuestos mayoritariamente por **carbohidratos**, aunque en su composición química también nos encontramos diferentes sustituyentes orgánicos como restos acetilo, pirúvico, hexosaminas y proteínas, así como una fracción inorgánica constituida por los restos sulfato y fosfato, sobre la que profundizaremos en el apartado 2.3 de este mismo capítulo de Resultados y Discusión.

En cuanto al contenido en **proteínas**, se han detectado porcentajes que oscilan entre un 0,25 y un 4,65% (p/p). El método de extracción de los exopolisacáridos empleado en este trabajo (Quesada y col., 1993), incluye en sus últimas etapas la purificación de los EPS por ultracentrifugación y diálisis. Este

último paso permite obtener un producto más purificado ya que las proteínas presentes en el polímero generalmente 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 el proceso de ultracentrifugación. Por tanto, en principio tenemos que pensar que el contenido en proteínas detectado por el método de Bradford (1976) en los exopolisacáridos representa en su mayor parte proteínas que forman parte del exopolisacárido, que están unidas al mismo, aunque para realizar esta afirmación con rotundidad, habría que realizar estudios estructurales más profundos. 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; Toren y col., 2001; 2002a; 2002b). Este aspecto ha sido estudiado con mayor profundidad en el Capítulo 2 de la Sección III (Estudio de las propiedades emulgentes de los exopolisacáridos) de Resultados y Discusión, concretamente para los exopolisacáridos AI12 y AI16 producidos por *Halomonas ventosae*, polímeros que presentaron altos valores de proteínas en su composición química comparados con el resto de EPS estudiados, y cuyas soluciones acuosas presentaron una baja viscosidad (Sección III, Capítulo 1, apartado 1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos), por lo que su papel como bioemulgentes podría atribuirse a su fracción proteica, más a que a la estabilización de la mezclas agua-aceite por un aumento de la viscosidad.

Con respecto a los **ácidos urónicos**, hemos detectado en los EPS porcentajes que oscilan entre 1,65 y 7,85% (p/p); estos grupos confieren un carácter aniónico a los polímeros, lo cual es una propiedad deseable, y es que los hace interesantes desde el punto de vista biotecnológico al ser potencialmente aplicables en procesos de detoxificación de medios ambientes contaminados con metales pesados o en el tratamiento de aguas residuales (Geddie y Sutherland, 1993; de Philippis and Vicenzini 1998; Sutherland, 1994). Este aspecto se tratará con mayor detalle en el capítulo 3 de la Sección III (Estudio de la captación de metales pesados) de Resultados y Discusión. La presencia de ácidos urónicos puede ser responsable de que no se hayan obtenido para la mayoría de los polímeros porcentajes de carbohidratos muy elevados, tal y como se ha descrito para otros exopolisacáridos, pues los ácidos urónicos confieren al EPS una mayor resistencia a la hidrólisis ácida con H_2SO_4 y se impide en ocasiones que la determinación de carbohidratos se lleve a cabo de forma correcta (Pfiffner y col., 1983).

El contenido en **restos acetilo** fue en general bajo, detectamos porcentajes comprendidos entre 0,25 y 3,6% (p/p), como ya se había comprobado para otros polímeros producidos por *Halomonas maura* (Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003) y otras especies de *Halomonas* (Béjar y col., 1996; 1998). 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).

En general, los polisacáridos presentaron un bajo porcentaje en **restos piruvato** (entre 1 y 5,95% p/p), 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 del xantano. Concretamente, parece ser que un elevado grado de piruvatación origina soluciones de mayor viscosidad y de mayor termoestabilidad (Capron y col., 1998). Sin embargo, también se ha descrito que los grupos piruvato inestabilizan el estado ordenado de las cadenas de xantano, debido a las repulsiones electrostáticas existentes entre ellos (Gamini y col., 1991).

Un considerable porcentaje de los polímeros fue cuantificado como **cenizas**. Posiblemente esto se debe a la presencia de compuestos inorgánicos unidos al EPS, tal y como ocurre con algunos exopolisacáridos de *Halomonas eurihalina* y el maurano, producido por *Halomonas maura* cepa S30 (Béjar y col., 1998; Arias y col., 2003) u otras bacterias (Raguenes y col., 1996). En cualquier caso, descartamos la contaminación por parte de las sales que presenta el medio de cultivo, pues el polímero fue adecuadamente dializado en agua destilada durante tres días, cambiándose el agua cada 12 horas.

2.2. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico

La purificación de los exopolisacáridos mediante cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo para obtener la fracción de carbohidratos purificada, con un contenido mínimo de proteínas (sólo aquellas realmente unidas al EPS) y de otras impurezas (restos celulares) que pudieran interferir en el posterior análisis de los azúcares constituyentes del exopolisacárido y en la determinación del contenido en sulfatos y fosfatos.

Además, mediante purificación de los exopolisacáridos por cromatografía, pudimos determinar si nos encontrábamos en cada caso ante un único polímero o por el contrario se trataba de una mezcla de varios EPS.

Dada la presencia de constituyentes del exopolisacárido con carga negativa, se seleccionó como método de purificación la cromatografía de intercambio iónico. Para ello se utilizó como soporte sólido una columna de sefarosa de intercambio aniónico con una matriz cargada positivamente, por la presencia de moléculas de dietilaminoetil (DEAE⁺). La atracción electrostática permite la adhesión de las moléculas de polímero a la matriz, siendo más tarde desplazadas mediante un incremento de la fuerza iónica en la fase móvil empleada.

La selección de los tampones que constituirían la fase móvil se realizó en función del tipo de columna que utilizamos, la carga de la matriz sólida así como el pH idóneo para el proceso. El pH al que trabajamos fue 7,5, puesto que en estudios llevados a cabo con anterioridad se había comprobado que este pH origina una mayor ionización de los polímeros anteriormente descritos por nuestro Grupo de Investigación, lo que permitía su mayor adhesión a la matriz sólida (Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003).

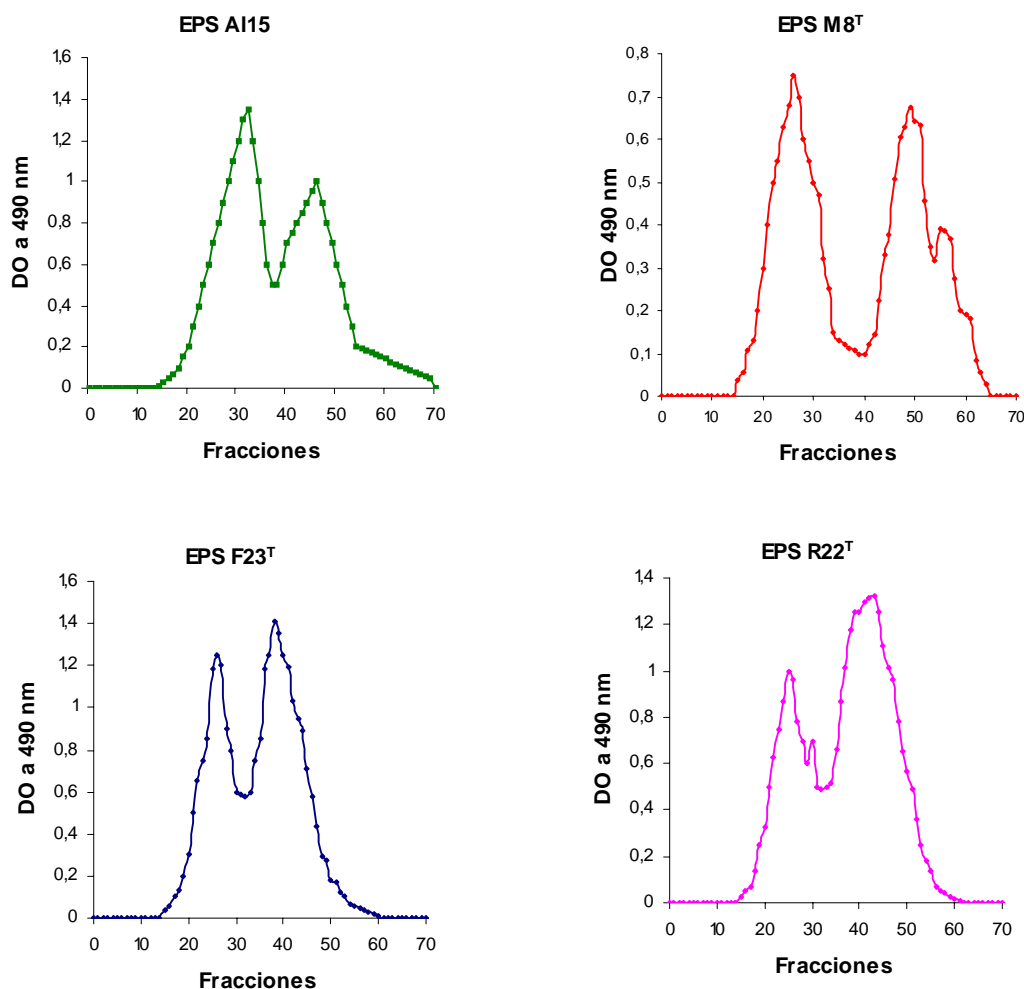


Figura 106. Cromatogramas obtenidos en la purificación de los exopolisacáridos A115 de *Halomonas ventosae*, M8 de *Halomonas almeriensis*, F23 de *Idiomarina fontislapidosi* y R22 de *Idiomarina ramblicola*, a un gradiente de elución de 0-1,5 M de NaCl.

Tras varias experiencias, podemos afirmar que todos los exopolisacáridos ensayados, a excepción de los EPS A115 de *Halomonas ventosae*, M8 de *Halomonas almeriensis*, F23 de *Idiomarina*

fontislapidosi y R22 de *Idiomarina ramblicola*, son un único polímero de naturaleza ácida que eluyen a una concentración de NaCl en torno a 1 M. Tal y como puede comprobarse en los cromatogramas representados en la Figura 106, para los exopolisacáridos mencionados como excepciones, obtuvimos dos picos correspondientes a las fracciones con mayor contenido en carbohidratos y con ello mayor concentración de exopolisacárido, resultado que se repitió en todos los ensayos que realizamos. *Lactobacillus plantarum* EP56 produce dos tipos de EPS, uno que está unido a la célula y otro que es liberado al medio de cultivo; este último también está constituido por dos fracciones (Tallon y col., 2003).

En la purificación por cromatografía de intercambio iónico de los polímeros producidos por *Halomonas eurihalina*, la mayor parte de los EPS eluyen a una fuerza iónica mucho menor (0,1M de NaCl); por tanto la elución a 1 M de NaCl es indicativa del marcado carácter ácido de nuestros exopolisacáridos, al igual que ocurre con el maurano, exopolisacárido sintetizado por *Halomonas maura* S30 (Arias y col., 2003).

La mayor parte de los exopolisacáridos de naturaleza ácida descritos y que han sido purificados mediante esta técnica cromatográfica, eluyen a una fuerza iónica comprendida entre 0,2 y 0,6 M de NaCl. Entre ellos podemos citar a los EPS producidos por distintas especies de *Pseudomonas* de origen marino (Christensen y col., 1985), o los polímeros sintetizados por especies fitopatógenas como *Pseudomonas marginalis* (Osman y Fett, 1989) o *Burkholderia cepacia* (Cérantola y col., 1996; Linker y col., 2001).

2.3. Sulfatos y fosfatos

Todos los exopolisacáridos analizados en este trabajo presentaron en su composición cantidades mayores o menores de **grupos sulfato**, como puede apreciarse en la Tabla 16.

En general, los sulfatos son componentes inusuales de los EPS microbianos, y este hecho convierte a estos exopolisacáridos en compuestos muy singulares desde el punto de vista químico.

La presencia de grupos sulfato en nuestros exopolisacáridos es una característica compartida con la mayoría de polisacáridos producidos por distintas cepas de *Halomonas eurihalina*. Los polímeros V2-7 y H96, de mayor interés biotecnológico por sus propiedades físicas, presentaron un porcentaje de sulfatos del 11,5 y 12% (p/p), respectivamente, en medio complejo MY. Hay que destacar el EPS producido por la cepa H28 de esta especie, en el que se detectó el mayor contenido de sulfatos (24,7% p/p) (Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998). De igual manera, el maurano, sintetizado por *Halomonas maura* cepa S30, presenta en su composición química un 6,5% (p/v) de grupos sulfato.

Los polímeros producidos por distintas especies del género *Halomonas* y por otros géneros relacionados no representan la única excepción en cuanto a la detección de sulfatos. Se han descrito otros polisacáridos producidos por algunas bacterias marinas, arqueas, o microorganismos aislados de

ambientes hipersalinos que presentan esta propiedad (de Philippis y Vincenzini, 1998). Entre ellos podemos citar el EPS producido por *Haloferax mediterranei* (Antón y col., 1988), los polímeros de distintas especies de *Arthrobacter* (Inoue y col., 1988), los producidos por diversas bacterias marinas (Guezennec y col., 1994; Rougeaux y col., 1998; 1999) o los sintetizados por bacterias pertenecientes a distintos grupos taxonómicos aisladas del Antártico (Mancuso-Nichols y col., 2005b).

En algunos polisacáridos de cianobacterias también se han detectado cantidades significativas de residuos sulfato (Bar-Or y Shilo, 1987; Tease y Walker, 1987). El porcentaje descrito, concretamente para la cianobacteria halófila *Aphanocapsa halophytia* es del 12% (p/p) (Sudo y col., 1995), muy similar a los porcentajes descritos para los EPS producidos por las cepas F2-7 y H96 de *H. eurihalina*.

Los exopolisacáridos sulfatados presentan propiedades biológicas muy interesantes. La similitud de estos EPS con la heparina debido su carácter sulfatado puede convertirlos en potenciales agentes anticoagulantes y antitrombóticos, teniendo en cuenta que los grupos sulfato desempeñan un papel crítico en la actividad antitrombótica de la heparina (Lindahl, 1999). A este nivel, y debido a que la heparina presenta algunas limitaciones farmacocinéticas y biofísicas, se han intentado desarrollar nuevos anticoagulantes y antitrombóticos entre los que han encontrado aplicación los polímeros microbianos sulfatados. Existen varios estudios al respecto que han demostrado la actividad de diversos exopolímeros (Collic-Jouault y col., 2001) e incluso otros en los que se realiza una sulfatación de los EPS para mejorar sus propiedades (Guezennec y col., 1998).

Por otra parte, los polímeros sulfatados pueden interferir en la adsorción y penetración de determinados retrovirus. Es por ello que pueden ser empleados como antivirales (Nakashima y col., 1987; Bagasa y Lischner, 1988; Hasui y col., 1995; Hayashi y Hayashi, 1996; Hayashi y col., 1996; Witvrouw y de Clercq, 1997; Cáceres y col., 2000; Yim y col., 2004). En estos polímeros se ha puesto de manifiesto, de igual forma, una acción antitumoral (Itoh y col., 1993; Riou y col., 1996; Haroun-Bouhedja y col., 2000; Sogawa y col., 2000; Patel y col., 2002; Koyanagi y col., 2003; Matou y col., 2005). Otras actividades descritas para los exopolisacáridos sulfatados son: antiadhesiva (Ley y col., 1991), antiinflamatoria (Afors y Ley., 1993), de inhibición del sistema del complemento (Boisson-Vidal y col., 1995) y contra la malaria (Xiao y col., 1996; Andrews y col., 2005; Adams y col., 2005).

En el capítulo 4 de la Sección III (Actividad antiproliferativa sobre células tumorales de EPS sulfatados) de Resultados y Discusión, en base a estos antecedentes, hemos estudiado la actividad antitumoral de los exopolisacáridos con mayor contenido en grupos sulfato (véase Tabla 16): B100 y N12 de *Halomonas maura* y FP34 de *Halomonas anticariensis*, en los que se detectó por cromatografía iónica un 7,9, 2,45 y 2,25% (p/p) de grupos sulfato.

En muchos de los exopolisacáridos estudiados observamos la presencia de **fosfatos** en porcentajes diversos, como puede apreciarse en la Tabla 16. No es muy común la existencia de estos

sustituyentes inorgánicos en los exopolisacáridos producidos por bacterias Gram negativas (Sutherland, 1990), aunque se han encontrado en otros polímeros microbianos (Kitazawa y col., 1998; 2000; Robjin y col., 1995; 1996), y por ello ésta puede ser otra característica peculiar desde el punto de vista químico para estos exopolisacáridos. Estos sustituyentes inorgánicos contribuyen a la naturaleza ácida de los polímeros junto con los ácidos urónicos, restos piruvato y los restos sulfato. Además, estos grupos funcionales pueden conferir a los exopolisacáridos que los contienen importantes e interesantes propiedades, y es que se ha demostrado que la activación de los linfocitos (Kitazawa y col., 2000; Nishimura y col., 2003) y algunos procesos antitumorales requieren de la presencia de restos fosfato (Ebina y col., 1995).

2.4. Monosacáridos constituyentes de los EPS

En la Tabla 17 se muestran los monosacáridos detectados en los distintos exopolisacáridos obtenidos en condiciones de cultivo óptimas (véase Sección II, Capítulo 1. Optimización de la producción de los exopolisacáridos), así como los porcentajes de cada uno de ellos.

Tabla 17. Masa molecular (Da) y monosacáridos constituyentes (% p/p) de los exopolisacáridos.

EPS	Masa Molecular (Da)	Monosacáridos (% p/p)									
		Glu ^a	Man	Gal	Ram	Fuc	Ara	Xil	AGal	AGlc	
X2	1,75 x 10 ⁵	45,1	17,65	ND ^b	ND	ND	ND	ND	19,6	17,65	
B40	3 x 10 ⁵	82,8	17,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
B100	3,75 x 10 ⁵	44,5	15	40,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
N12	2,1 x 10 ⁵	48,82	25,47	ND	ND	25,69	ND	ND	ND	ND	
A16	3,1 x 10 ⁵	38,87	19,8	25,3	ND	16	ND	ND	ND	ND	
M4	1,5 x 10 ⁶	50	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
X8	4,5 x 10 ⁵	62,5	35,65	ND	1,85	ND	ND	ND	ND	ND	
AI12	5,3 x 10 ⁴	23,8	55,9	13,8	ND	ND	2,4	4	ND	ND	
AI15	A ^c	6,5 x 10 ⁵	37	35,7	17,4	ND	9,8	ND	ND	ND	
	B	2 x 10 ⁴	40	45	15	ND	ND	ND	ND	ND	
AI16	5,25 x 10 ⁴	23,65	56,65	12,6	ND	ND	2,75	4,3	ND	ND	
FP35	2 x 10 ⁴	15	45	ND	1,5	ND	ND	1,5	37	ND	
FP34	5,3 x 10 ⁴	14,6	59,95	ND	1,15	ND	ND	1,35	22,95	ND	
FP36	4,6 x 10 ⁴	17	42,9	ND	1,15	ND	ND	1,5	37,5	ND	
M8	A	6,3 x 10 ⁶	27,5	72	ND	0,5	ND	ND	ND	ND	
	B	1,5 x 10 ⁴	30	70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
A3	2,5 x 10 ⁵	19,7	34	32,85	ND	13,4	ND	ND	ND	ND	
B33	7,2 x 10 ⁶	60	26,5	ND	ND	ND	ND	ND	13,5	ND	
F23	A	1,5 x 10 ⁶	28,25	46,35	14,85	ND	2,5	3	5	ND	ND
	B	1,5 x 10 ⁴	40	60	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R22	A	5,5 x 10 ⁵	25	68,2	ND	6,8	ND	ND	ND	ND	
	B	2 x 10 ⁴	18,9	53,6	ND	0,65	ND	ND	0,85	25,95	ND
F32	1,9 x 10 ⁷	18,15	62,75	ND	6,85	ND	ND	12,25	ND	ND	
B35	1,9 x 10 ⁶	60	26,5	ND	13,5	ND	ND	ND	ND	ND	

^a, Glu: Glucosa, Man: Manosa, Gal: Galactosa, Ram: Ramnosa, Fuc: Fucosa, Ara: Arabinosa, Xil: Xilosa, AGal: Ácido galacturónico, AGlc: Ácido glucurónico.

^b, ND: No detectado.

^c, A: Alto peso molecular, B: Bajo peso molecular.

El análisis por GLC y GC-MS de los exopolisacáridos purificados reveló la presencia de nueve azúcares: glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico. Estos mismos monosacáridos fueron detectados en los polisacáridos producidos en condiciones no óptimas de cultivo, aunque en proporciones diferentes. En los polímeros producidos por *Halomonas eurihalina* y *Halomonas maura* tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la composición de monosacáridos en función del medio de cultivo empleado, aunque sí se produjo una modificación en cuanto a la cantidad relativa de los monosacáridos (Béjar y col., 1996; 1998; Bouchotroch y col., 2000; Arias y col., 2003).

Además de en los polímeros producidos por *Halomonas*, se ha comprobado que las proporciones de los distintos monómeros azucarados varían con las condiciones de cultivo en otros EPS producidos por distintas cepas de *Lactobacillus* (Van Geel-Schutten y col., 1998, 1999). Tallon y colaboradores (2003) comprobaron también que los monosacáridos constituyentes de los exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus plantarum* EP56 no variaban al modificar las condiciones de producción.

Así, generalmente, 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).

La **glucosa** fue el monómero más abundante en los exopolisacáridos X2, B40, B100, N12, A16, M4, X8, B33 y B35, como puede apreciarse en la Tabla 17, mientras que para el resto de polímeros el monosacárido que detectamos en mayor cantidad fue la **manosa**. La xilosa (las pentosas en general) y la arabinosa son azúcares poco frecuentes en los exopolisacáridos microbianos (Kenne y Lindberg, 1983; Sutherland, 1994), aunque nosotros los hemos encontrado en muchos de nuestros EPS, normalmente como trazas, excepto en el exopolisacárido F32 sintetizado por *Alteromonas hispanica*, que presenta un 12,25% (p/p) de **xilosa** en su composición, y por ello ésta puede ser una característica peculiar desde el punto de vista químico para este biopolímero. Sin embargo, el polímero sintetizado por la cepa B35 de *Alteromonas* spp., muy íntimamente relacionada taxonómicamente con *Alteromonas hispanica* cepa F32^T, no presenta este monosacárido formando parte del polímero. Este hecho también fue descrito por Mancuso-Nichols y colaboradores (2005) para un grupo de cepas marinas aisladas del Antártico. El **ácido glucurónico** es relativamente frecuente en los exopolisacáridos microbianos, mientras que el **ácido galacturónico** se detecta en muchas menos ocasiones (Sutherland, 1994). Sin embargo, en nuestros exopolisacáridos el análisis de los monosacáridos por cromatografía gaseosa ha relevado una mayor presencia de ácido galacturónico, mientras que el ácido glucurónico sólo lo hemos encontrado formando parte del EPS X2 sintetizado por *Halomonas maura*.

En el apartado 3.12 de la Introducción de este trabajo (Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos), ya hemos hablado de las potenciales aplicaciones de los polímeros extraídos de algunos microorganismos como fuente de **fucosa**, un azúcar poco habitual, de difícil y cara obtención, y con múltiples aplicaciones. El análisis por GLC y GC-MS de los EPS reveló la presencia de este monosacárido en proporciones importantes en la composición de los polímeros N12 y A16 de *Halomonas maura* (25,69 y 16% p/p, respectivamente) y A3 de *Salipiger mucosus* (13,4% p/p), y en menores cantidades en las fracciones de elevado peso molecular de los polisacáridos A15 de *Halomonas ventosae* y F23 de *Idiomarina fontislapidosi*. Más adelante, en el Capítulo 5 de la Sección III, profundizaremos en las posibilidades de nuestros EPS microbianos como fuente de fucosa.

Como ya hemos mencionado en el apartado 2.2. (Purificación por cromatografía de intercambio aniónico) de este capítulo de Resultados y Discusión, los exopolisacáridos A15 de *Halomonas ventosae*, M8 de *Halomonas almeriensis*, F23 de *Idiomarina fontislapidosi* y R22 de *Idiomarina ramblicola*, están constituidos por dos fracciones polisacáridicas, cada una de las cuales presenta distinta composición en monosacáridos (Tabla 17), fenómeno que también ha sido descrito para otros microorganismos (Tallon y col., 2003; Degeest y De Vuyst, 1999; Grobber y col., 1997; Kitazawa y col., 1998; Marshall y col., 1995) que también presentaban una gran heterogeneidad en la síntesis de EPS en cuanto a composición química y masa molecular.

2.5. Masa molecular

La masa molecular para un determinado exopolisacárido puede variar en función de las condiciones de cultivo así como del método de aislamiento y purificación del polímero (De Vuyst y Degeest, 1999). La masa molecular de los exopolisacáridos obtenidos en condiciones óptimas (véase Capítulo II. Optimización de la producción de los exopolisacáridos) y extraídos por el método de Quesada y colaboradores (1993) se detalla en la Tabla 17.

Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con la masa molecular de otros polímeros descritos, y es que los valores de la masa molecular de los biopolímeros de origen microbiano están comprendidos entre 1×10^3 y 5×10^7 Da (Sutherland, 1994; Lapasin y Pricl, 1995).

Por otra parte, en una misma especie bacteriana, los polímeros producidos por las distintas cepas pueden presentar masas moleculares diferentes. Este hecho se ha puesto de manifiesto entre la mayoría de exopolisacáridos ya conocidos como el escleroglucano, pululano, xantano (Sutherland, 1994) o el polímero producido por *Enterobacter cloacae* (Isobe y col., 2001). Este fenómeno también se pone de manifiesto entre nuestros exopolisacáridos, como podemos observar en la Tabla 17. Mancuso-Nichols y colaboradores (2005) también han descrito polímeros con diferente masa molecular producidos en las mismas condiciones por microorganismos marinos muy relacionados taxonómicamente aislados del Antártico.

La masa molecular es determinante de las propiedades físicas de los exopolisacáridos, y sobre todo, de la viscosidad de sus soluciones acuosas. La masa molecular de algunos de nuestros exopolisacáridos podría ser comparable con la de polímeros como el maurano, xantano, gelano, dextrano o curdlano entre otros (Arias y col., 2003; Looijestein, 2000; Tombs y Harding, 1997), lo que podría acarrear propiedades funcionales parecidas; por consiguiente, en el apartado correspondiente al estudio reológico de los exopolisacáridos (Sección III, Capítulo 1), hemos profundizado en las propiedades reológicas de las soluciones acuosas de estos polímeros; fundamentalmente hemos estudiado la reología del exopolisacárido B100, cuyas preparaciones dieron valores de viscosidad comparables a los del maurano o el xantano, posiblemente debido en gran parte a su elevada masa molecular.

El hecho de que un exopolisacárido presente una baja masa molecular (como muchos de los incluidos en este estudio), y que por tanto de soluciones de baja viscosidad, no tiene por qué considerarse una desventaja o un problema a la hora de buscar y encontrar potenciales aplicaciones biotecnológicas para el mismo; de hecho, esta característica es deseada en algunas ocasiones. Así por ejemplo, el exopolisacárido sintetizado por *Alteromonas infernus* presenta una gran analogía estructural con la heparina, por lo que podría utilizarse como sustituto de la misma, debido a las limitaciones que presenta como agente anticoagulante; sin embargo, presenta el problema de ser un exopolisacárido de alta masa molecular, que origina soluciones viscosas, por lo que se ha desarrollado un protocolo de hidrólisis del polímero para obtener fracciones de una menor masa molecular, solventar este inconveniente, y competir con la heparina (Collic-Jouault y col., 2001).

CAPÍTULO 3

ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

RESUMEN

La microscopía electrónica de transmisión nos ha permitido observar a los microorganismos con los que hemos trabajado en esta Tesis Doctoral, así como los exopolisacáridos producidos por los mismos. Cuando los cultivos son jóvenes, los exopolisacáridos forman una estructura bastante organizada y adherida a las células; sin embargo, tras una incubación más prolongada, no se observa EPS adherido a la superficie celular sino disperso en el medio. Para el exopolisacárido B100 hemos observado una morfología en doble hélice, estructura similar a la propuesta para otros exopolisacáridos ya descritos.

La observación de las células, así como de los exopolisacáridos producidos por las especies microbianas estudiadas en este trabajo, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

En las Figuras 107-116 se muestran las fotografías correspondientes a la observación microscópica de las células bacterianas cultivadas en medio líquido MY al 7,5% (p/v) en sales de las cepas B100, M4, AI12^T, FP35^T, M8^T, A3^T, B33^T, F23^T, R22^T y F32^T.

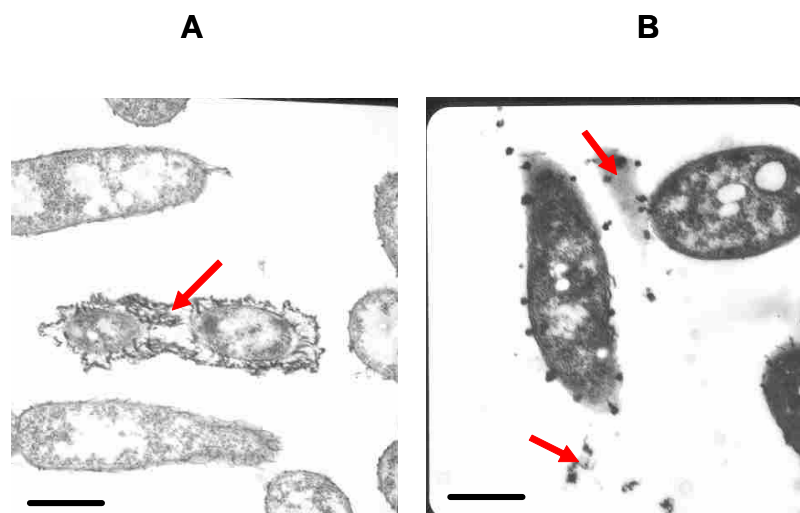


Figura 107. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **B100** de *Halomonas maura* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

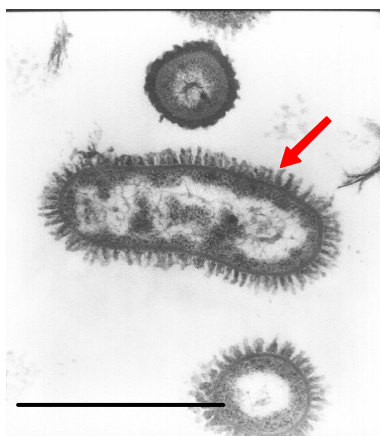


Figura 108. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **M4** de *Halomonas eurihalina* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas. La flecha se encuentra señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

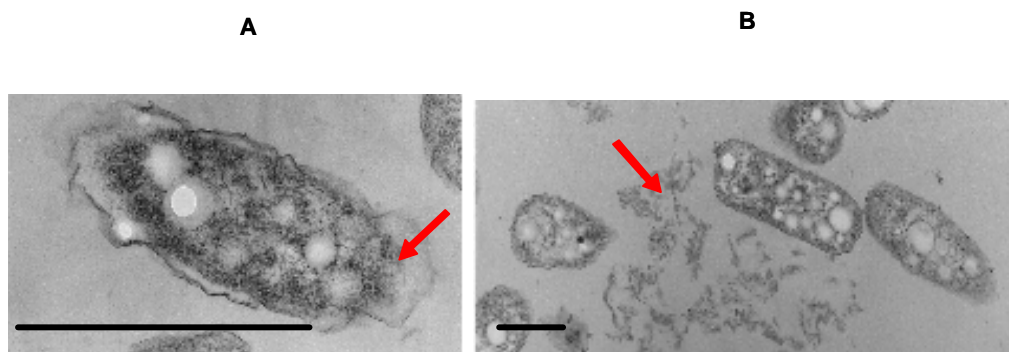


Figura 109. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **AI12^T** de *Halomonas ventosae* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

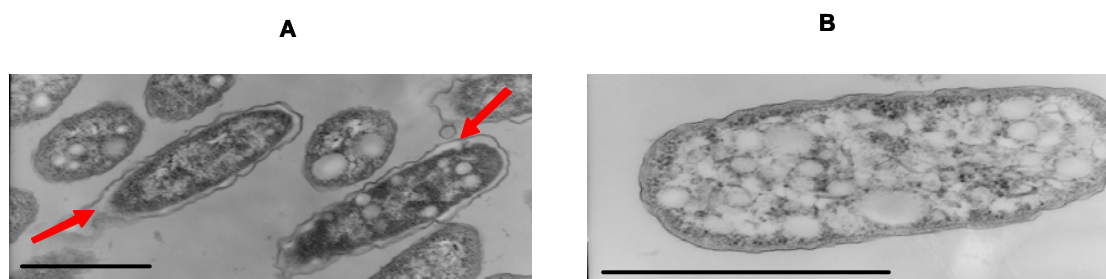


Figura 110. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **FP35^T** de *Halomonas anticariensis* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

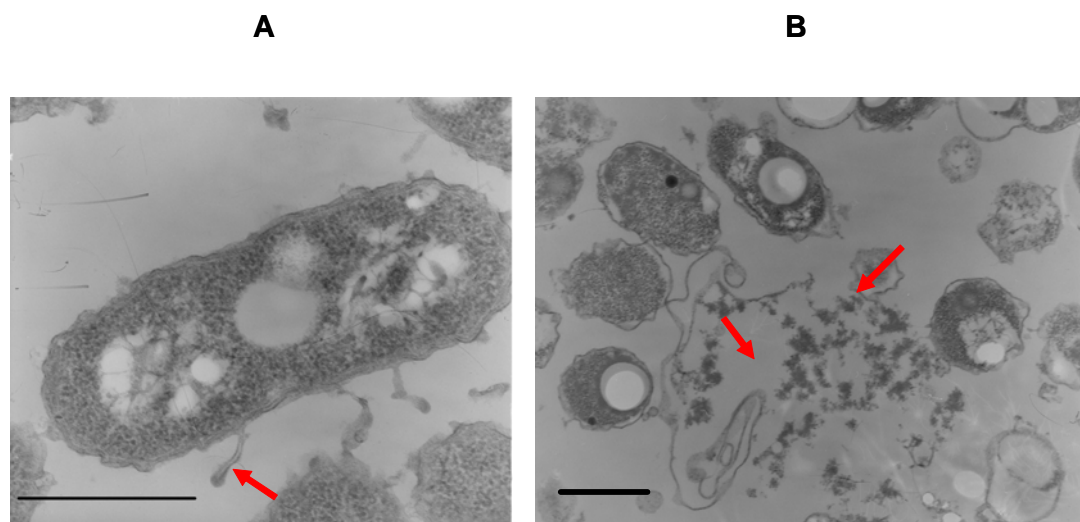


Figura 111. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **M8^T** de *Halomonas almeriensis* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

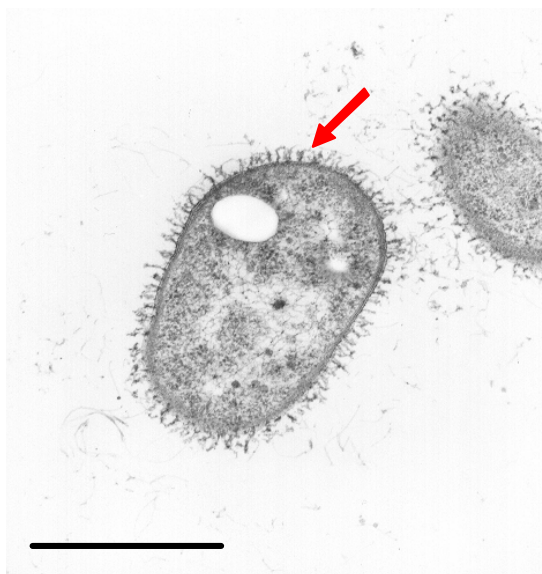


Figura 112. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa A3^T de *Salipiger mucosus* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas. Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

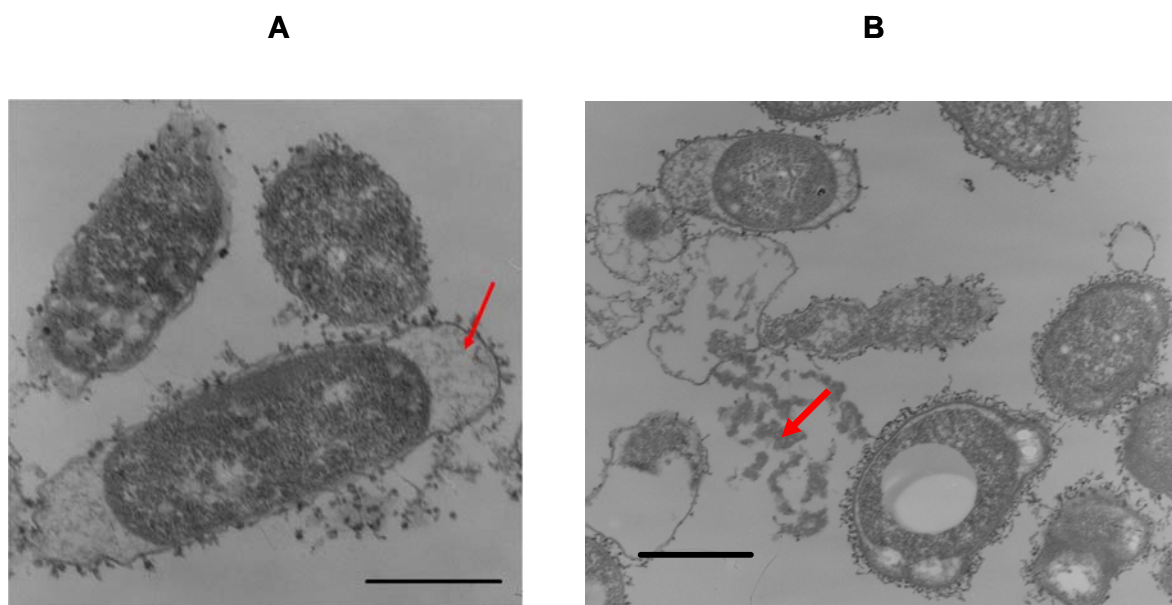


Figura 113. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa B33^T de *Palleronia marisminoris* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

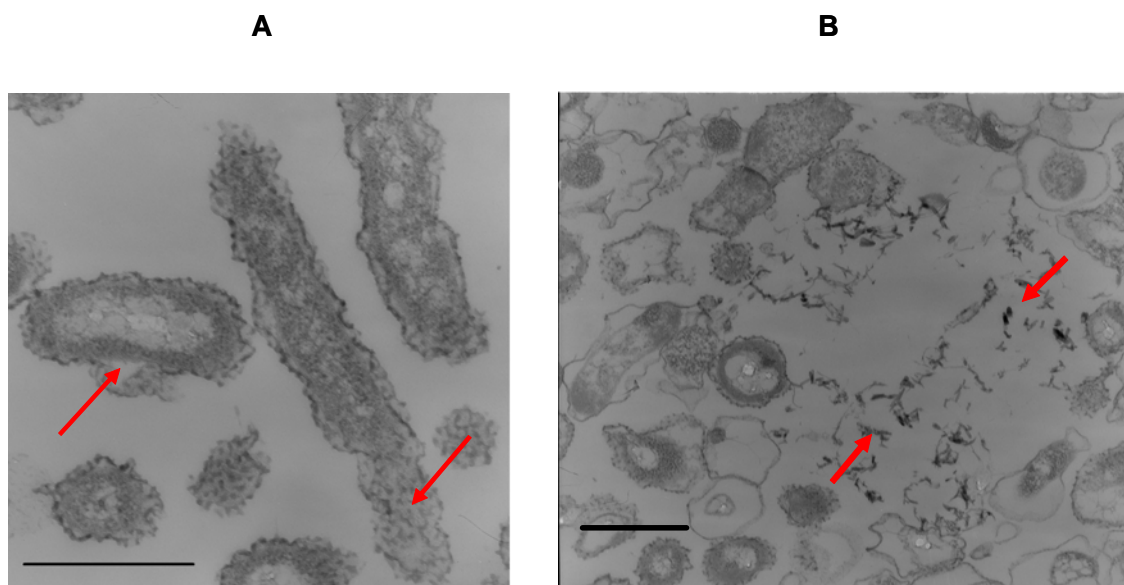


Figura 114. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **F23^T** de *Idiogramma fontislapidosi* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

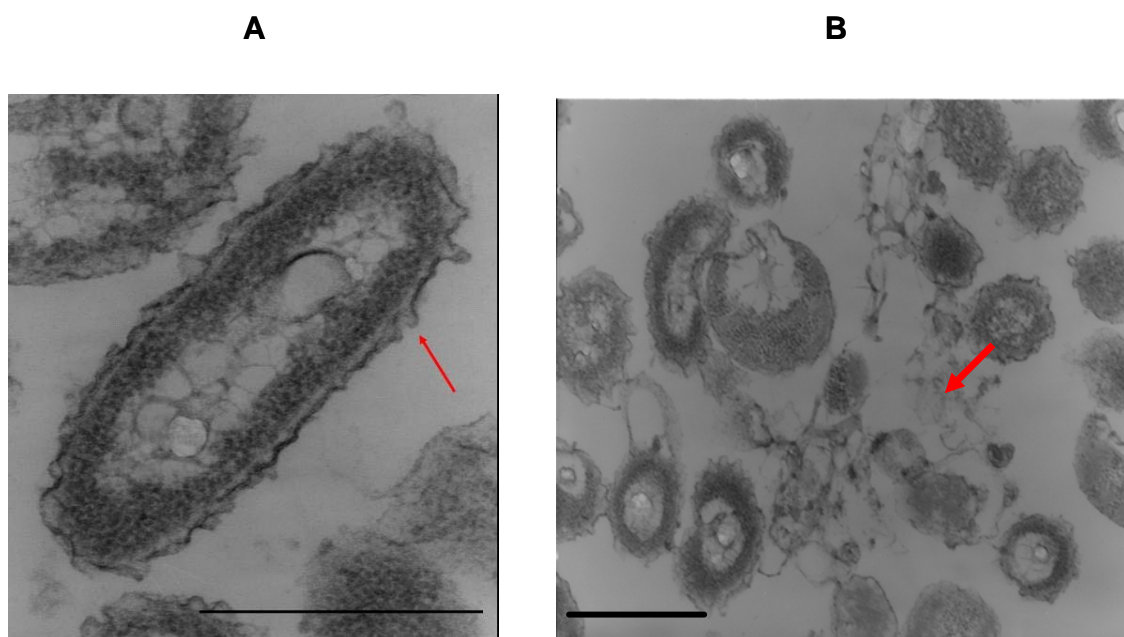


Figura 115. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **R22^T** de *Idiogramma ramblicola* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.



Figura 116. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la cepa **F32^T** de *Alteromonas hispanica* en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales tras una incubación de 18-24 horas. Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μ m.

La diferencia en cuanto a la disposición de los EPS en las células bacterianas es patente entre las fotografías correspondientes a cultivos de 18-24 horas (A) y aquellas que se corresponden con cultivos de 120 horas (B).

En medio líquido y tras incubación más prolongada, no se observa polímero alguno adherido a la superficie celular, sino disperso en el medio. Es por ello que los mayores rendimientos de producción de estos exopolisacáridos se obtengan tras incubación prolongada de los cultivos, ya que el EPS se encuentra liberado y por ello su extracción se ve facilitada.

En la Figura 117 se muestra la morfología del exopolisacárido sintetizado por *Halomonas maura* cepa B100 suspendido al 1% (p/v) en tampón DNAsa I, para evitar cualquier tipo de contaminación por ADN que nos pudiera confundir en este ensayo.

La morfología que pudimos observar en el polímero B100 de *Halomonas maura* fue la de una doble hélice, estructura similar a lo que muchos autores han propuesto para polímeros como el xantano (Gamini y col., 1991; Gamini y Mandel, 1994), gelano (Giavasis y col., 2000), escleroglucano (Stokke y col., 1993) o maurano (Arias y col., 2003).

La base de la conformación molecular y estructura terciaria de los exopolisacáridos microbianos no se ha explicado totalmente, pero sí se ha comenzado a investigar mediante el estudio de las

propiedades viscoelásticas de los EPS (Macosko, 1994; Pelletier y col., 2001) así como mediante la aplicación de diversas técnicas como la difracción de rayos X o dispersión de luz (Sutherland, 1990).

Los resultados que obtuvimos en el estudio de las propiedades viscoelásticas del polímero sintetizado por *H. maura* B100, similares a algunas características descritas para el xantano y el maurano, podían llevarnos a deducir la posible existencia de una estructura o conformación ordenada (véase más adelante Sección III, Capítulo 1, apartado 1.4. Estudio de las propiedades viscoelásticas. Ensayos de oscilación). Este estudio microscópico apoyaría dicha suposición y pone de manifiesto la disposición del exopolisacárido en solución en forma de doble cadena helicoidal.

Por otra parte, la estructura en forma de hélice del polímero B100 de *Halomonas maura* puede explicar muchas de sus propiedades reológicas. A partir de 55°C, la disminución de la viscosidad de sus preparaciones acuosas (Sección III, Capítulo 1, apartado 1.4, Factores que influyen en la viscosidad del polímero B100), podría deberse a una desnaturalización térmica que implica la desorganización de la doble hélice en dos cadenas simples, fenómeno que ya ha sido descrito para otros polímeros como el xantano (Villain-Simmonet y col., 2000) o el maurano, exopolisacárido producido por *Halomonas maura* cepa S30 (Arias y col., 2003).

Para el resto de exopolisacáridos cuya estructura también quisimos estudiar por microscopía electrónica de transición, uno por especie bacteriana (M4 de *Halomonas eurihalina*, A112 de *Halomonas ventosae*, FP35 de *Halomonas anticariensis*, M8 de *Halomonas almeriensis*, A3 de *Salipiger mucosus*, B33 de *Palleronia marisminoris*, F23 de *Idiomarina fontislapidosi*, R22 de *Idiomarina ramblicola* y F32 de *Alteromonas hispanica*) no fuimos capaces de detectar con claridad este tipo de estructuras en doble hélice, y quizás por ello sus propiedades reológicas no son comparables a las del exopolisacárido B100 (apartado V.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas).

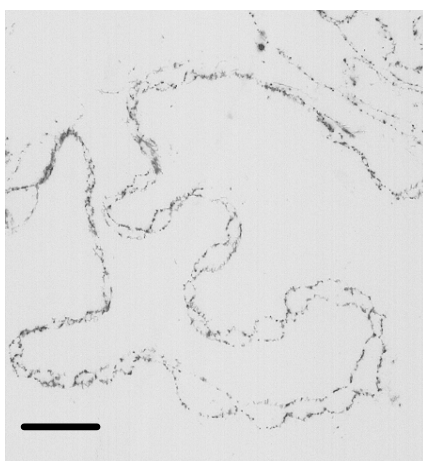


Figura 117. Fotografía de microscopía electrónica de una solución acuosa al 1% (p/v) de polímero B100 de *Halomonas maura*. Barra: 1 μm .

SECCIÓN III

POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LOS EPS

CAPÍTULO 1

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

RESUMEN

Los EPS estudiados presentan una gran heterogeneidad desde el punto de vista reológico; los polímeros sintetizados por las cepas de *Halomonas maura* originan soluciones de una mayor viscosidad, mientras que el resto de EPS dan soluciones de una viscosidad sensiblemente inferior, excepto el polímero AL15 de *Halomonas ventosae*. El polisacárido producido por la cepa B100 de *Halomonas maura* presenta un comportamiento comparable al del xantano y el maurano, y por ello hemos profundizado en sus propiedades reológicas. La viscosidad que origina este polímero en solución aumenta con la concentración de polímero y disminuye con la temperatura, aunque esta disminución es termorreversible. La viscosidad de las soluciones se mantiene estable a pH entre 4 y 8, produciéndose tanto a pH básico como ácido una ligera caída de la misma. La adición de NaCl a las soluciones de polímero provocó un incremento de la viscosidad. Del mismo modo, la viscosidad de las soluciones acuosas permanece prácticamente inalterada frente a factores como la presencia de azúcares, y procesos de congelación-descongelación y esterilización en autoclave de vapor. El exopolisacárido B100 y la goma guar, presentan un efecto sinérgico, y es que al combinar ambos polímeros se obtienen soluciones de mayor viscosidad que cuando estos polímeros se utilizan por separado.

El interés a nivel comercial de los exopolisacáridos reside en una gran cantidad de casos en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos al ser adicionados a ellos.

De hecho, existe un gran número de polisacáridos microbianos interesantes debido a que presentan propiedades físicas únicas, por lo que son considerados superiores a otras gomas de origen natural o sintético. Tal es el caso del xantano o el gelano, polímeros que han encontrado diversas aplicaciones en alimentación y otros sectores industriales (Sutherland, 1999; 2001a). Actualmente el xantano se sigue considerando como la referencia entre los biopolímeros de origen microbiano, ya que además de presentar unas excelentes propiedades reológicas, es relativamente económico y rentable en cuanto a su producción debido al alto grado de conversión (en torno al 60-70%) del sustrato en polímero (Sutherland, 1999).

Debido a que el éxito comercial del xantano y otros polímeros microbianos viene determinado por sus propiedades reológicas, el análisis de las mismas en nuevos polímeros es un estudio de gran importancia que puede conducir al descubrimiento de características realmente novedosas con utilidad en algunos de los múltiples sectores industriales.

Además, la reología proporciona información de gran valor previa a la comercialización de un determinado producto, en cuanto al conocimiento de la relación existente entre su estructura y sus propiedades físicas, su comportamiento en un determinado proceso industrial o su textura una vez integrado en el producto final (Moreno y col., 2000).

El estudio reológico llevado a cabo en la presente Tesis doctoral se ha desarrollado en dos partes; en primer lugar hemos determinado la viscosidad de las preparaciones acuosas de todos los exopolisacáridos incluidos en este trabajo, para después profundizar en las propiedades reológicas del exopolisacárido B100, por presentar las mejores características, algo que hemos desarrollado en diversos apartados.

Así, se ha estudiado el efecto de diversos factores sobre la viscosidad del exopolisacárido B100 en solución con objeto de conocer los parámetros que determinan el poder viscosizante de este biopolímero. También ha sido objeto de estudio el comportamiento reológico de las soluciones del polímero B100, en cuanto a las variaciones que se producen en la viscosidad en función del gradiente de deformación (pseudoplasticidad) y el tiempo (tixotropía); se ha realizado un estudio completo de las propiedades viscoelásticas de dicho exopolisacárido, mediante ensayos de oscilación, lo cual nos ha permitido obtener información sobre su estructura y conformación molecular. Por último, hemos estudiado el posible efecto sinérgico de nuestro exopolisacárido con otros viscosizantes habitualmente empleados en la industria alimentaria.

1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas

En la Figura 118 se representa la viscosidad de las preparaciones acuosas al 0,5% (p/v) de los EPS producidos por los microorganismos halófilos incluidos en este trabajo a un gradiente de deformación de $59,5 \text{ s}^{-1}$.

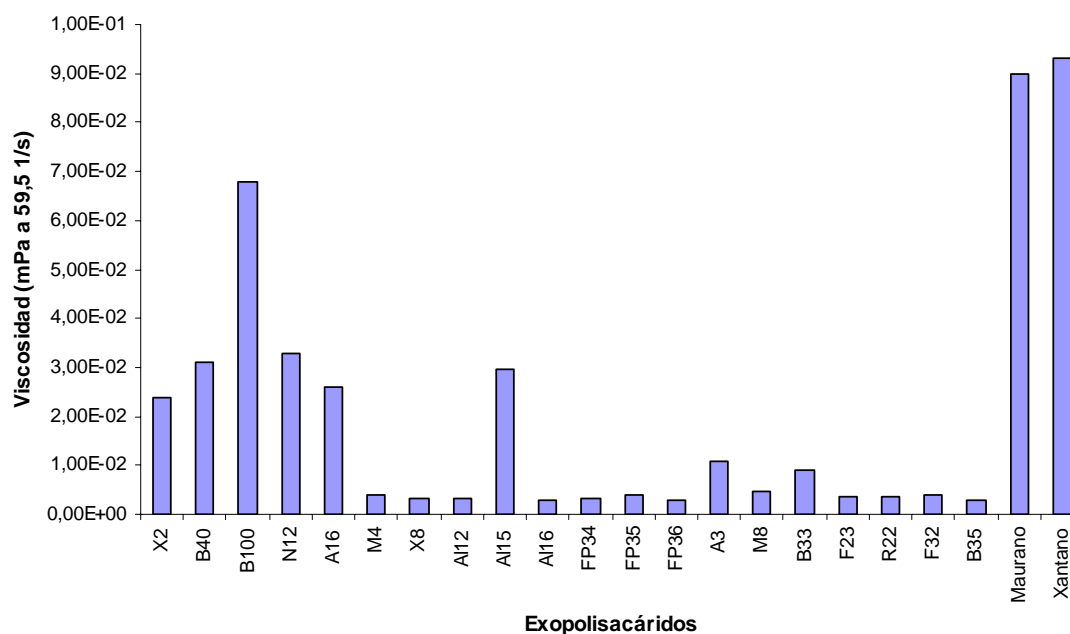


Figura 118. Viscosidad de las preparaciones acuosas al 0,5% (p/v) de los polímeros objeto de estudio a un gradiente de deformación de $59,5 \text{ s}^{-1}$.

Como se aprecia en el gráfico, el comportamiento más viscoso de todos los exopolisacáridos ensayados, se corresponde con el producido por la cepa B100 de *Halomonas maura*, polímero con viscosidad comparable a la del maurano o el xantano. Es destacable que exopolisacáridos con una elevada masa molecular, como es el caso de los polímeros M4 y X8 de *Halomonas eurihalina*, F32 de *Alteromonas hispanica* y B35 de *Alteromonas* spp. (véase Sección II, Capítulo 2. Composición química y masa molecular de los exopolisacáridos), a cuyas soluciones acuosas en principio se les podría atribuir unas buenas propiedades reológicas, dan soluciones de una baja viscosidad, como se aprecia en la Figura 119. Este hecho podría deberse a la mayor proporción de restos acetilo que presentan estos EPS (Tabla 16, Sección II, Capítulo 2. Composición química y masa molecular de los exopolisacáridos), tal y como han descrito con anterioridad otros autores para exopolisacáridos de diversa procedencia (Sutherland, 1994; Sutherland, 1997; Rinaudo, 2004), en los que la presencia o ausencia de estos grupos, modifica la conformación molecular, y por tanto, sus propiedades físicas.

1.2. Factores que influyen en la viscosidad del polímero B100

- **Concentración de polímero**

La **concentración** de polímero es el primer factor que hemos estudiado determinando la viscosidad de las preparaciones acuosas del polímero B100 a una concentración de 0,5; 0,6; 0,8 y 1% (p/v).

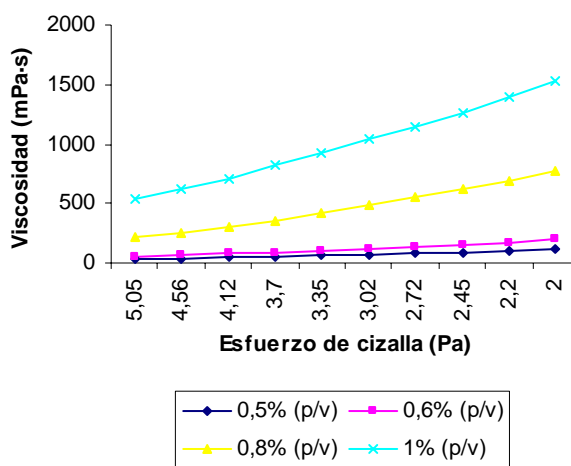


Figura 119. Efecto de la concentración del EPS B100 de *H. maura* sobre la viscosidad de sus preparaciones acuosas.

En la Figura 119 se han representado los reogramas correspondientes a las distintas concentraciones de EPS. Como era de esperar, la viscosidad aumenta con la concentración de biopolímero en solución, encontrándose prácticamente solapados los gráficos para las preparaciones al 0,5 y 0,6% (p/v) de EPS. El aumento de viscosidad es más notable para las soluciones al 0,8 y 1% (p/v) de polímero.

Concretamente, las soluciones al 1% (p/v) de EPS presentan una viscosidad unas 5 veces superior a la de las preparaciones al 0,5% (p/v) de exopolisacárido; por tanto, no existe una relación directamente proporcional entre la concentración de exopolisacárido y la viscosidad de sus soluciones, puesto que el incremento de la viscosidad es mucho mayor que el correspondiente aumento del porcentaje de polisacárido en la muestra.

La dependencia entre la viscosidad y el gradiente de deformación o esfuerzo de cizalla es indicativa del comportamiento pseudoplástico del EPS B100 de *Halomonas maura* en solución (la viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de deformación o el esfuerzo de cizalla) (Figura 119). Dicho comportamiento constituye una propiedad compartida por la mayor parte de los biopolímeros de

reconocido uso industrial, tales como xantano (Becker y col., 1998) o gelano (Miyoshi y Nishinari, 1999) y ha sido evaluada en otro ensayo del que nos vamos a ocupar más adelante.

- **Temperatura**

La **temperatura** es uno de los factores más interesantes de estudiar en cuanto a su influencia sobre la viscosidad del polímero producido por *H. maura* cepa B100 en solución, puesto que el comportamiento de dicho biopolímero en función de este parámetro es determinante para su posterior aplicación en procesos industriales que requieren operar bajo diferentes temperaturas.

En líneas generales, la viscosidad de las preparaciones acuosas de EPS disminuye al aumentar la temperatura. No obstante, podemos considerar que en un rango de temperaturas entre 25 y 55°C existe una considerable estabilidad, con leve pérdida de viscosidad en comparación con calentamientos más acusados. De hecho, los reogramas de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero para este rango de temperaturas se encuentran muy cercanos, siendo la diferencia de viscosidad únicamente apreciable a bajos valores de gradientes de deformación.

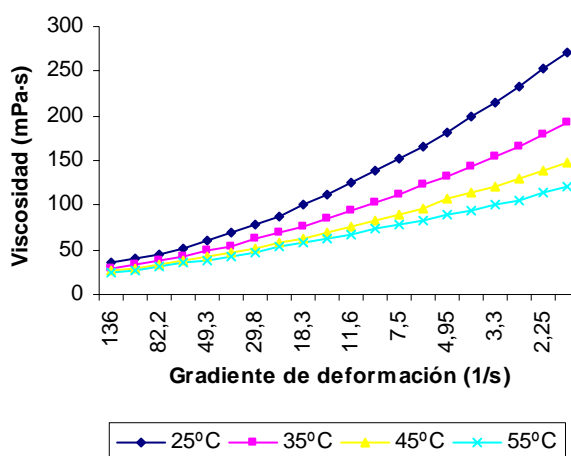


Figura 120. Efecto de la temperatura (25, 35, 45 y 55°C) sobre la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de *H. maura*.

La evolución de la viscosidad de las preparaciones acuosas del exopolisacárido B100 de *H. maura* sometidas a un rango más amplio de temperaturas (25-90°C) se ha representado en la Figura 121, y se ha comprobado que a temperaturas superiores (70 y 90°C), la pérdida de viscosidad de dichas muestras es mayor y especialmente se produce un descenso brusco a 90°C. Hasta 55°C, el poder viscosizante del polímero sintetizado por *H. maura* cepa B100 permanece prácticamente inalterable.

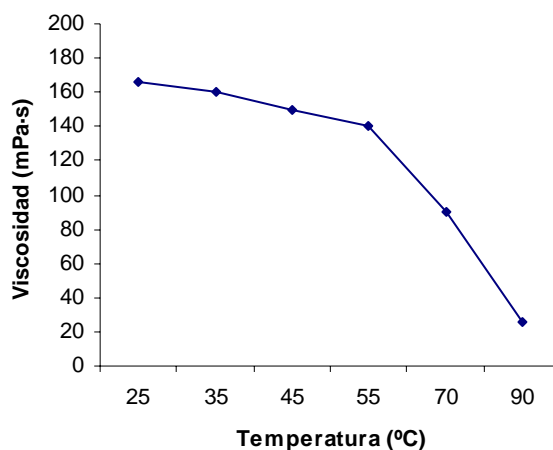


Figura 121. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de las soluciones al 0,5% (p/v) del EPS B100.

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).

El efecto de estos calentamientos se ha estudiado más detenidamente con objeto de comprobar si a pesar de disminuir la capacidad viscosizante de este biopolímero, tras el enfriamiento de las muestras se produce una recuperación de la viscosidad de las mismas. Para ello, tras someter a soluciones al 0,5% (p/v) de polímero a temperaturas de 70 y 90 °C, se dejaron enfriar dichas preparaciones a temperatura ambiente (25°C) o bien en una cámara fría a 4°C determinándose en cada caso la viscosidad de las mismas (Figura 122).

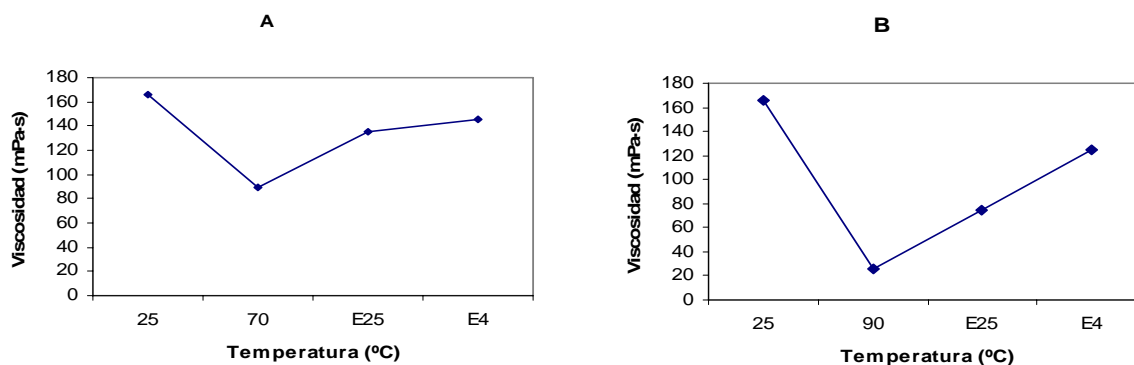


Figura 122. Recuperación que experimenta la viscosidad de las soluciones al 0,5% (p/v) del EPS B100 de *H. maura* tras enfriamiento a 25°C (E25) y 4°C (E4), a un gradiente de deformación de 59,5 s⁻¹.

El comportamiento del biopolímero en solución tras un calentamiento a 70 y 90°C se ha representado gráficamente en las Figuras 122 A y B, respectivamente. Las consecuencias en cuanto a la pérdida de viscosidad son más drásticas en el segundo caso, llegándose a producir una pérdida casi total de la misma tras someter las soluciones a una temperatura de 90°C, mientras que a 70°C la pérdida está en torno al 50%. Sin embargo, hay que destacar que en ambos casos se produce una recuperación de la viscosidad tras enfriamiento de las muestras a 25 ó 4°C. En las muestras en las que se produce la mayor pérdida de viscosidad (calentamiento a 90°C), se llega a recuperar hasta un 50% de la viscosidad inicial tras enfriar a 25°C o un 75%, si el enfriamiento de la muestra se realiza en cámara fría (4°C).

Por tanto, si bien tras procesos de calentamiento bruscos (>70°C), las propiedades viscosizantes del exopolisacárido B100 de *H. maura* se ven afectadas de forma considerable, la pérdida de viscosidad no es irreversible ya que cuando el calentamiento cesa, las soluciones recuperan progresivamente su carácter viscoso.

Al igual que obtuvimos para el polímero producido por *H. maura* cepa B100, la inestabilidad térmica del EPS producido por *Vibrio alginolyticus* a temperaturas superiores a 40-50°C se trata de una pérdida de viscosidad que resultó ser reversible tras enfriamiento de las muestras hasta 30°C. Tras el tratamiento térmico únicamente se produce una pérdida de viscosidad del 10% si se considera un posterior enfriamiento (Muralidharan y Jayachandran, 2003). A diferencia de estos exopolisacáridos, en otras ocasiones la pérdida de viscosidad tras calentamiento es irreversible, tal y como describieron Isobe y colaboradores (1992) para un polímero producido por una cepa de *Bacillus*.

Como adelantábamos anteriormente, se ha descrito para otros exopolisacáridos como el succinoglicano, la pérdida de viscosidad a partir de 70°C en el caso de nuestro exopolisacárido puede deberse a una transición conformacional del polímero a un estado de menor orden, y concretamente puede estar relacionada con una desnaturalización de la estructura en doble hélice que pudimos observar mediante microscopía electrónica (Sección II, Capítulo 3).

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 ven afectadas 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).

• pH

El efecto del pH sobre las propiedades reológicas del exopolisacárido producido por la cepa B100 de *Halomonas maura* en solución se ha estudiado en un amplio intervalo de valores (3-9). Las determinaciones realizadas han puesto de manifiesto que la viscosidad de las soluciones se mantiene

estable a pH entre 4 y 8, produciéndose tanto a pH ácido como a pH básico una ligera caída de la misma (Figura 123).

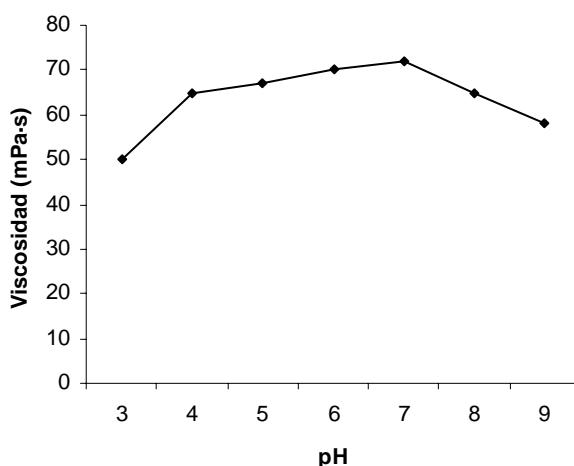


Figura 123. Efecto del pH sobre la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de *H. maura* a un esfuerzo de cizalla de 3 Pa.

Esta tendencia se ha observado en algunos polímeros de reciente descripción, como el producido por *Paenibacillus* sp., estable en un intervalo de pH entre 2 y 14, aunque con cierta disminución de su viscosidad al pH de mayor acidez o basicidad (Weon-Taek y col., 1999). Junto a éste, la viscosidad de preparaciones acuosas de una sustancia exopolisacáridica procedente del mucílago producido por una especie de *Klebsiella*, se comporta de igual forma y únicamente es estable a pH entre 4 y 9 (Wang y col., 1999), al igual que el EPS sintetizado por *Vibrio alginolyticus*; con disminución de su viscosidad a pH 2 y 11 (Muralidharan y Jayachandran, 2002). Por último, el succinoglicano mantiene su poder viscosizante en el intervalo de pH 3-10 (Harada y col., 1993).

En cualquier caso, la viscosidad se ve afectada de distinta forma en función del pH, dependiendo de la alteración de la carga iónica que se provoque en la molécula de polisacárido.

La viscosidad de las soluciones de xantano es estable a pH entre 2 y 12, y a pesar del carácter inalterable de este polímero, en condiciones de extrema acidez (pH < 2) y basicidad (pH > 12), ésta tiende a disminuir, tal y como lo indica la ficha técnica del xantano comercializado por Vanderbilt Company Inc. (Vanzan y Veegum, Vanderbilt Company, Inc.)

- **Presencia de sales en solución**

La presencia de sales es otro de los factores que afecta a la viscosidad de los polímeros microbianos en solución.

En el caso del exopolisacárido sintetizado por *H. maura* cepa B100, este es un parámetro interesante dado el carácter halófilo de la bacteria productora de este biopolímero y el efecto que sobre el proceso de producción del mismo tiene el porcentaje de sales incorporado al medio de producción, (véase el apartado de optimización de la producción en medio complejo MY). Por ello en el estudio reológico de este polímero se ha incluido el análisis de la influencia de la presencia de electrolitos sobre sus propiedades reológicas.

Así, se ha estudiado el efecto de adicionar a las preparaciones acuosas del exopolisacárido B100 distintas cantidades de cloruro sódico hasta porcentajes del 2,5, 5 y 7,5 %. En la Figura 124 se representa el reograma obtenido en cada caso.

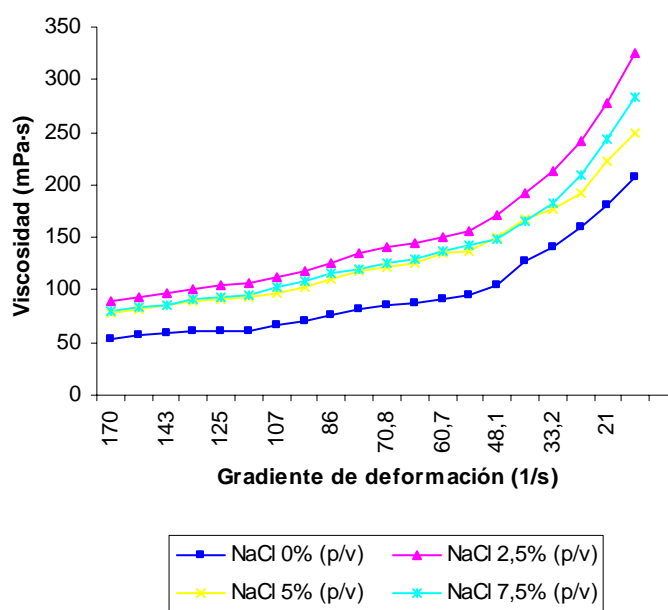


Figura 124. Viscosidad de preparaciones al 0,5% (p/v) del polímero B100 en agua destilada adicionadas con distintas cantidades de NaCl.

La adición de cloruro sódico a las soluciones de polímero provocó un incremento de la viscosidad; se obtuvo, como se puede observar en la Figura 124, la mayor viscosidad en las preparaciones al 2,5% (p/v) de NaCl.

Estas condiciones, en las que las propiedades de nuestro polímero como agente viscosizante se ven potenciadas determinarán posibles aplicaciones del biopolímero en algunos sectores industriales.

En alimentación, esta propiedad lo puede hacer apto para ser incorporado a aderezos de ensaladas, salsas o preparados instantáneos en los que la sal es un ingrediente común. En cosmética, la presencia de electrolitos en determinadas formulaciones, como es el caso de algunos geles, determina la necesidad de disponer de agentes viscosizantes estables en tales condiciones.

Otras aplicaciones en las que resulta interesante la compatibilidad de los biopolímeros o hidrocoloides en general, en cuanto a su poder viscosizante, con elevadas concentraciones salinas están relacionadas con la industria del petróleo. El interés de este sector por los exopolisacáridos microbianos se centra en su poder para incrementar la viscosidad de los lodos inyectados en los tanques para la extracción del petróleo, para lo cual se requiere que estos polímeros presenten elevada viscosidad y pseudoplasticidad en solución así como resistencia frente a las sales (Margesin y Schinner, 2001). Es por ello que éste sea un aspecto bastante importante a estudiar en la caracterización reológica de nuevos EPS. Así, además del xantano, estable incluso a salinidades superiores al 20% (p/v) (Amro y col., 2002), la estabilidad en presencia de sales se ha descrito para otros EPS microbianos, pudiendo citar al heteropolisacárido producido por *Paenibacillus* sp. (Weon-Taek y col., 1999).

- **Efecto del proceso de congelación-descongelación**

En lo que se refiere a los procesos de congelación-descongelación, podemos afirmar que la viscosidad del exopolisacárido B100 de *H. maura* en solución permanece prácticamente inalterada tras dicho tratamiento. Esta propiedad es muy importante para las potenciales aplicaciones de nuestro polímero en la elaboración de productos congelados, ya que los mantiene estables durante ciclos sucesivos de congelación y descongelación. Además, reduce la formación de cristales de hielo en estos productos, proporciona una textura suave y una vida de almacenamiento prolongada, al igual que el xantano (Vafiadis, 1999).

- **Efecto del proceso de esterilización en autoclave de vapor**

Para comprobar la resistencia a la esterilización de nuestro EPS sometimos una solución del mismo al 0,5% (p/v) a un proceso de esterilización en autoclave de vapor a 112°C durante 30 minutos. Según pudimos comprobar, la viscosidad de las soluciones es bastante resistente a la esterilización, al igual que se ha descrito para el xantano (Born y col., 2002), y es que como hemos comentado anteriormente, la pérdida de viscosidad del este EPS por efecto del calor parece ser termorreversible. Esta propiedad es muy interesante, de modo que el polímero B100 de *H. maura* podría encontrar

potenciales aplicaciones en la industria alimentaria, pues se podría utilizar como aditivo en aquellos alimentos que sufren una esterilización durante su procesamiento, como por ejemplo las conservas.

- **Presencia de azúcares**

Por último, también hemos puesto de manifiesto la estabilidad del exopolisacárido B100 en presencia de azúcares en solución, como es el caso de la sacarosa, que no afecta a la viscosidad del mismo. Ello nos indica a su vez la compatibilidad de nuestro biopolímero con los azúcares, lo cual puede tener interés cuando se precise incorporar este viscosizante a determinados alimentos.

1.3. Características reológicas de las preparaciones acuosas del polímero B100

- **Pseudoplasticidad**

En todas las determinaciones realizadas, los reogramas pusieron de manifiesto el carácter pseudoplástico de las soluciones del exopolisacárido sintetizado por *Halomonas maura* B100 (disminución de la viscosidad con el progresivo aumento del gradiente de deformación o esfuerzo de cizalla).

Este comportamiento es característico de la mayoría de los exopolisacáridos microbianos, entre ellos el xantano, y a su vez, responsable de muchas de sus propiedades funcionales. Al tratarse de un polímero de naturaleza semirígida se caracteriza por una marcada pseudoplasticidad que se pone de manifiesto por su elevado índice de pseudoplasticidad (n) (Andrews y col., 1998).

En el sector industrial este comportamiento puede determinar la utilidad de muchos de estos polímeros. Así, la pseudoplasticidad de algunos ingredientes es una propiedad esencial y de gran utilidad en la industria alimentaria. Al añadirse a un determinado alimento, contribuyen a mejorar algunas propiedades del mismo, como la textura, palatabilidad o propiedades reológicas en general (Enriquez y col., 1989).

La pseudoplasticidad permite que a elevados gradientes de deformación, la viscosidad de las preparaciones de EPS sea baja y con ello se vean facilitados procesos de mezcla o bombeo del producto; mientras que cuando la deformación se hace menor y las muestras se llevan al reposo, la viscosidad se incrementa y el biopolímero puede actuar como agente viscosizante o espesante en tales condiciones (Moreno y col., 2000).

Si bien habíamos puesto de manifiesto el comportamiento pseudoplástico del polímero B100 en solución, resulta de gran interés conocer el mayor o menor grado de pseudoplasticidad de sus soluciones en función de diversos parámetros.

El grado de pseudoplasticidad de las soluciones de polímero B100 de *H. maura* se ha evaluado mediante el ajuste de los reogramas obtenidos a un modelo empírico, concretamente a la ecuación de Ostwald-de Waele o ley de la potencia, que establece la siguiente relación entre el esfuerzo de cizalla (σ) y el gradiente de deformación ($\dot{\gamma}^0$): $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^0{}^n$; siendo K el índice de consistencia y n el índice de pseudoplasticidad (que tiende a 0 para los fluidos pseudoplásticos y se iguala a la unidad para aquellos newtonianos). Los reogramas obtenidos a diferentes concentraciones de EPS B100 (0,5, 0,6, 0,8 y 1% p/v) y a diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55, 70 y 90°C) se han ajustado a dicho modelo. En las Tablas 18 y 19 se recogen los valores de los parámetros del modelo de Power-Law (K y n).

Tabla 18. Parámetros reológicos (K, índice de consistencia; n, índice de pseudoplasticidad) del ajuste al modelo de Ostwald-de-Waele de los reogramas a las diferentes concentraciones de polímero B100.

% (p/v)	K	n	r ^{2a}
0,5	0,3877	0,5204	0,99875
0,6	0,5130	0,5198	0,99819
0,8	1,165	0,4371	0,99691
1	1,965	0,3974	0,99756

^a, índice de correlación al ajuste del modelo empírico.

Tabla 19. Parámetros reológicos (K, índice de consistencia; n, índice de pseudoplasticidad) del ajuste al modelo de Ostwald-de-Waele de los reogramas de soluciones de polímero B100 al 0,5% (p/v) a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	K	n	r ^{2a}
25	0,3877	0,5204	0,99875
35	0,3186	0,5311	0,99884
45	0,2726	0,5406	0,99884
55	0,2419	0,5476	0,99836
70	0,2238	0,5845	0,99867
90	0,09123	0,6874	0,99978

^a, índice de correlación al ajuste del modelo empírico.

En todos los casos, las soluciones de exopolisacárido B100 exhiben un marcado comportamiento pseudoplástico al presentar valores para el índice de pseudoplasticidad menores de 0,7. La evolución de este parámetro en función de la concentración de polímero es clara; se produce una disminución del índice de pseudoplasticidad a medida que la concentración de exopolisacárido es mayor, de ahí que las soluciones más concentradas con un porcentaje del 1% (p/v) de EPS sean las que presenten el mayor grado de pseudoplasticidad (n= 0,3974). Consecuentemente y tal y como se ha descrito en otros muchos

casos, cuanto menos concentradas son las soluciones, más próximo es su comportamiento al típico fluido newtoniano. En cuanto al índice de consistencia (K), representativo de la viscosidad de las soluciones, este parámetro se hace mayor a medida que aumenta la concentración de EPS, como consecuencia de la existencia de una estructura molecular más fuerte y consolidada (Moreno y col., 2000).

Al incrementarse la temperatura se produce una disminución del carácter pseudoplástico, lo cual se traduce en un aumento del índice de pseudoplasticidad desde 0,5204 a 0,6874 y disminución del índice de consistencia.

Resultados similares se han descrito en el caso del xantano, en el que de igual forma se ha comprobado una aproximación al comportamiento newtoniano para las soluciones más diluidas o a mayor temperatura (Dolz y col., 2002). En el xantano comercial (Kelco), el índice de consistencia (K) estimado es de 35 y el índice de flujo (n) presenta valores de 0,23-0,25.

- **Tixotropía**

Las soluciones del exopolisacárido B100 mostraron ser tixotrópicas ya que se produce un descenso de su viscosidad tras aplicar un gradiente de deformación elevado y la subsiguiente recuperación cuando cesa el flujo (deformación), lo cual se ha determinado aplicando ciclos sucesivos de mayor y menor deformación en un periodo total de 40 minutos (Figura 125).

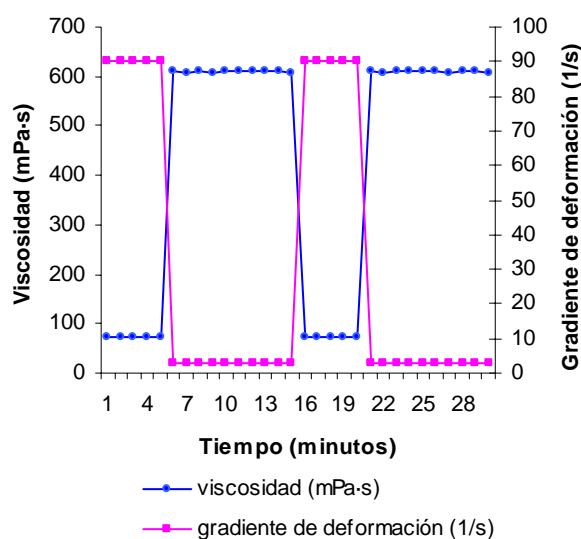


Figura 125. Evolución de la viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) del exopolisacárido B100 de *H. maura* en un ciclo de gradiente de deformación creciente (90 s^{-1}) y decreciente (3 s^{-1}).

1.4. Estudio de las propiedades viscoelásticas del polímero B100. Ensayos de oscilación

El estudio del comportamiento viscoelástico de un polímero en solución constituye un apartado importante en su caracterización desde el punto de vista reológico.

Para llevar a cabo tales estudios se recurre a los ensayos de oscilación dinámicos, los cuales constituyen una de las herramientas fundamentales para la caracterización de las propiedades viscoelásticas de un amplio abanico de productos de interés tanto para la industria alimentaria como químico-farmacéutica.

La información que aportan estos ensayos es de gran aplicación en cuanto al control de calidad, investigación y desarrollo de nuevos productos y optimización de formulaciones y procesos a nivel industrial, de ahí que este estudio sea importante para la caracterización de nuevos polímeros como es el caso del exopolisacárido B100, cuya proyección industrial se pretende evaluar en este trabajo.

Los ensayos de oscilación consisten en aplicar un esfuerzo de cizalla o deformación que se hace variar sinusoidalmente a lo largo del tiempo en que se realiza el ensayo, para así determinar las funciones viscoelásticas G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso), ambas función de la frecuencia del movimiento oscilatorio, estando la primera de ellas relacionada con la respuesta elástica del material (comportamiento próximo al de un sólido) y la segunda con la respuesta viscosa (característica de un fluido) (Macosko, 1994).

Los resultados obtenidos se pueden relacionar con la estructura de la muestra siempre que tales ensayos se lleven a cabo dentro de la región viscoelástica lineal. Ello implica que las deformaciones por cizalla a que se somete el material objeto de estudio no produzcan una destrucción irreversible de su estructura. Así por tanto, la naturaleza no destructiva del ensayo permite obtener información acerca de los aspectos estructurales de la muestra examinada, de modo que cualquier cambio en su estructura en función de las condiciones que ensayemos, quedará reflejado en los valores de las funciones viscoelásticas y su dependencia respecto de la frecuencia.

Por lo tanto, un paso previo para la determinación de las propiedades viscoelásticas del EPS B100 de *H. maura* ha sido seleccionar un esfuerzo de cizalla que garantice la no destrucción irreversible de la estructura de la muestra en el intervalo de frecuencias en que realizaremos los posteriores ensayos, y con ello trabajar dentro del dominio viscoelástico lineal. Para ello realizamos un ensayo de "stress sweep" en el que se sometió a la solución de exopolisacárido (al 1% p/v) a un barrido creciente de esfuerzos de cizalla entre 0,1 y 20 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz. Tal y como puede comprobarse en la Figura 126, a medida que se incrementa el esfuerzo de cizalla, la respuesta obtenida del material se caracteriza por la constancia de las funciones viscoelásticas hasta que se alcanza un punto crítico (esfuerzo de cizalla de 8,95 Pa) a partir del cual se produce una caída importante del módulo

elástico (G') lo que determina una alteración de la estructura del polímero y la salida del dominio viscoelástico lineal. Así por tanto trabajaremos en condiciones lineales siempre que el esfuerzo de cizalla aplicado sea inferior a 8,95 Pa.

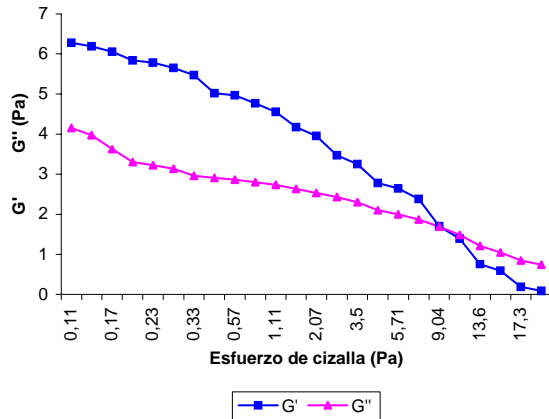


Figura 126. Ensayo de “stress sweep”. Evolución del módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') de una solución al 1% (p/v) de polisacárido B100 de *H. maura* en un intervalo de esfuerzo de cizalla de 0,1-20 Pa a una frecuencia de 1 Hz.

Seleccionada la región viscoelástica lineal, la determinación de los parámetros viscoelásticos se llevó a cabo a partir de soluciones de polímero B100 de *H. maura* con diferente concentración del exopolisacárido en ausencia o presencia de sales, aplicando a dichas muestras un esfuerzo de cizalla de 6 Pa en un rango de frecuencias comprendido entre 0,007 y 20 Hz (Figuras 127 y 128). La representación del módulo elástico y viscoso en función de la frecuencia, conocido como espectro mecánico, nos ha permitido conocer la respuesta elástica y viscosa del polímero B100 de *Halomonas maura* en solución.

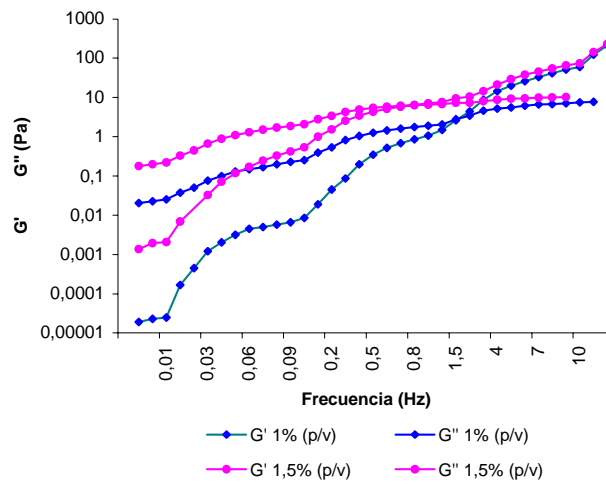


Figura 127. Espectro mecánico de soluciones al 1 y 1,5 % (p/v) del polímero B100 de *H. maura* en un intervalo de frecuencia 0,01 -20 Hz y a un esfuerzo de cizalla de 6 Pa.

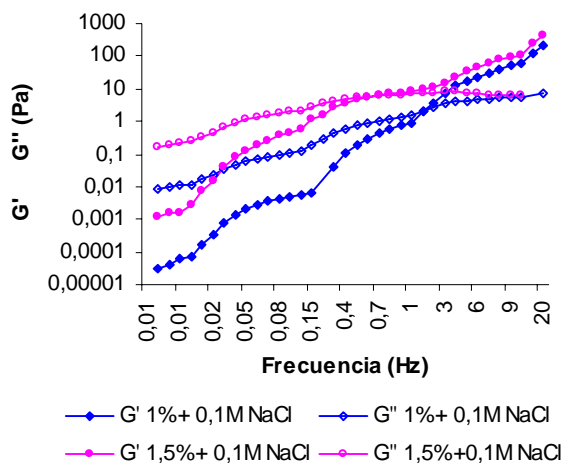


Figura 128. Espectro mecánico de soluciones al 1 y 1,5% (p/v) del polímero B100 adicionadas con 0,1M NaCl en un intervalo de frecuencia 0,007-20 Hz a una esfuerzo de cizalla de 6 Pa.

Para las soluciones al 1 y 1,5% (p/v) de EPS en ausencia de sales (Figura 127), a elevadas frecuencias existe un dominio elástico donde G' domina sobre G'' , lo cual está en concordancia con el comportamiento típico de polímeros rígidos (Morse, 1998) y es reflejo de una conformación ordenada. A frecuencias de oscilación bajas, los ciclos de deformación son largos y se producen múltiples reorganizaciones moleculares que alteran la estructura rígida del polímero ($G'' > G'$). A medida que la frecuencia se incrementa, los ciclos de deformación son cada vez más cortos y no hay tiempo para que se den cambios internos considerables, manteniéndose la estructura sólida y estable de la molécula ($G' > G''$) (Lapasin y Pricl, 1995).

El punto correspondiente a la frecuencia en que se cruzan los gráficos del módulo elástico y viscoso determina la transición de un estado o conformación molecular a otro, y puede ser indicativo de la estructura y del carácter más o menos sólido de un polímero (Oba y col., 1999).

Tabla 20. Frecuencia de transición (Hz) de las preparaciones acuosas del exopolisacárido B100 en función de la concentración de polímero, la presencia de sales y la temperatura.

% (p/v) EPS	Frecuencia de transición (Hz)	Temperatura (°C)	Frecuencia de transición (Hz)
1	1,5	25	1,5
1,5	0,8	45	1,5
1+NaCl 0,1M	1	70	3
1,5 +NaCl 0,1M	0,7		

La concentración de EPS afecta al punto en el que se produce la transición de un estado menos ordenado al de mayor estabilidad. En el caso del exopolisacárido B100 de *H. maura*, al 1% (p/v) de polímero el punto de cruce tiene lugar a una frecuencia de 1,5 Hz, disminuyendo hasta 0,8 Hz para las soluciones al 1,5 % (p/v) de EPS (Tabla 20). Por tanto, al aumentar la concentración de polímero, se obtiene un dominio elástico más amplio, reflejo de una estructura molecular más ordenada y de mayor rigidez. A su vez, G' y G'' aumentan con la concentración de polisacárido, siendo más marcado el aumento del módulo elástico. Este comportamiento es característico de polímeros con grupos cargados, tal es el caso de nuestro polisacárido, con restos de ácidos urónicos, grupos sulfato y fosfato. Se debe a que a bajas concentraciones existen repulsiones intramoleculares que obligan a las cadenas polisacáridicas a expandirse y con ello generar una estructura más débil mientras que al aumentar la concentración de EPS este efecto se contrarresta por las repulsiones intermoleculares y las cadenas se compactan, lo cual se traduce en un aumento del módulo elástico (G') (Oba y col., 1999).

El xantano no forma geles o únicamente geles débiles a concentración elevada (superior al 2% p/v en solución acuosa) (Oviatt y Brant., 1993; Rodd y col., 2000). Sin embargo, experimenta en muchas ocasiones una transición desde una conformación ordenada a una desordenada. La mayor parte de los autores coinciden en afirmar que la forma ordenada es una doble hélice (Gamini y Mandel, 1994, Capron y col., 1998). La forma ordenada existe a elevadas concentraciones del xantano (1% p/v), lo cual se ha puesto de manifiesto entre otras técnicas mediante el estudio viscoelástico de este polímero en solución al obtenerse espectros mecánicos caracterizados por la existencia de un módulo elástico (Pelletier y col., 2001). A este porcentaje, existe un dominio del módulo elástico tal y como obtuvimos para el polímero B100, lo cual puede llevarnos a hablar de una forma o estado de mayor orden en el caso de nuestro polímero al presentar un comportamiento similar al xantano.

A su vez, las propiedades reológicas del xantano son extremadamente dependientes de la concentración de polímero y presencia de sales (Pelletier y col., 2001). Puesto que la influencia del primer factor ha resultado evidente también para el polímero B100 de *H. maura*, 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 (Figura 128). 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. Este mismo efecto se ha descrito para el xantano (Pelletier y col., 2001), polímero de naturaleza ácida al igual que el EPS producido por *Halomonas maura* cepa B100.

Por último, se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre los parámetros viscoelásticos de las preparaciones acuosas del polímero B100 de *H. maura*. En la Figura 129 se han representado los

módulos elástico y viscoso de soluciones al 1% (p/v) de exopolisacárido en función de la frecuencia a una temperatura de 25, 45 y 70°C.

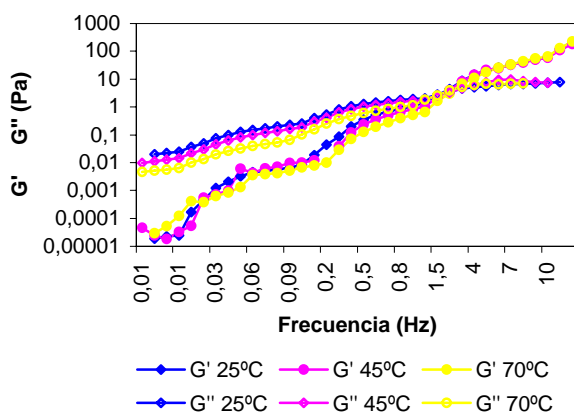


Figura 129. Espectro mecánico de soluciones al 1% (p/v) de maurano a temperaturas de 25, 45 y 70°C en un intervalo de frecuencia 0,007-20 Hz a un esfuerzo de cizalla de 6 Pa.

Puede comprobarse que a bajas frecuencias, los parámetros viscoelásticos sufren una disminución con el aumento progresivo de la temperatura, apreciándose especialmente en el caso de G' . La frecuencia de transición ($G'=G''$) tiende a aumentar con la temperatura (Tabla 20), reduciéndose la región de dominio del módulo elástico (especialmente a temperaturas superiores a 70°C, lo cual podría ser reflejo de una estabilidad conformacional entre 25 y 70°C). De igual forma, resulta obvia la superposición de los gráficos de G' y G'' a las distintas temperaturas (Figura 129), indicativo de que la estructura global de la red formada por las moléculas de polímero no se ve modificada por el calentamiento. Puede sospecharse un cierto cambio estructural dado que sobre todo a frecuencias bajas el solapamiento de las gráficas es menor. Un ensayo de este tipo permitió llegar a una conclusión similar para el EPS producido por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Oba y col., 1999), desde el punto de vista estructural considerado como un polímero con estructura helicoidal.

La superposición de los parámetros viscoelásticos frente a la frecuencia, a distintas temperaturas, ha sido un estudio de utilidad para conocer la transición de la conformación ordenada-desordenada del xantano (Born y col., 2002; Pelletier y col., 2001). En este caso se observa una superposición de dichos parámetros en un rango de temperatura entre 30 y 80°C, (para las soluciones del polímero en presencia de sales), lo cual indica que la forma ordenada presenta una gran estabilidad y apoya la suposición de que se trate de un estructura de doble hélice. De hecho, en ambas conformaciones el xantano parece estar constituido por una doble hebra (Viebbe y Williams, 2000) lo que determina su gran estabilidad frente a multitud de factores.

Por otra parte, la presencia de determinados grupos tiende a estabilizar la forma ordenada del xantano, como los grupos acetilo (Gamini y col., 1991), también presentes en el exopolisacárido B100 de *Halomonas maura*.

En el caso del gelano, preparaciones acuosas al 5% (p/v) presentan valores prácticamente constantes para G' y G'' a temperaturas inferiores a 40°C, por encima de la cual se produce una caída de los valores de dichos parámetros viscoelásticos como consecuencia de que esta temperatura induce una transición conformacional de las moléculas de gelano desde su forma ordenada a un estado de desorden (Takigawa y col., 1999). No obstante, la temperatura a la que se produce este cambio es dependiente de la concentración de gelano y presencia de sales (Ogawa, 1999).

Estos resultados nos pueden llevar a concluir que el polímero B100 a porcentajes elevados (1-1,5% p/v) podría presentar una estructura de mayor orden al igual que el xantano y el maurano al presentar espectros mecánicos similares. 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.

1.5. Efecto sinérgico con otros agentes viscosizantes

En este apartado hemos estudiado efecto sinérgico de nuestro EPS con alguno de los espesantes empleados en la industria alimentaria. La viscosidad de las soluciones del exopolisacárido B100 y cada uno de los viscosizantes industriales así como las mezclas obtenidas con cada uno de ellos a distintas proporciones se representa en las Figuras 130-134.

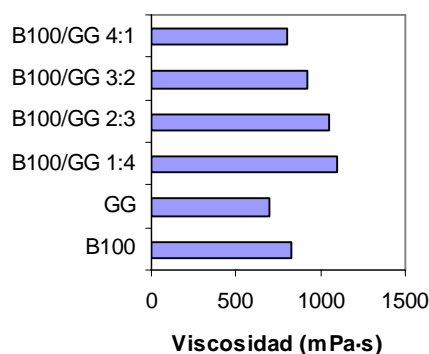


Figura 130. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), goma guar (GG) y las mezclas B100/GG a un gradiente de deformación de 2 s⁻¹.

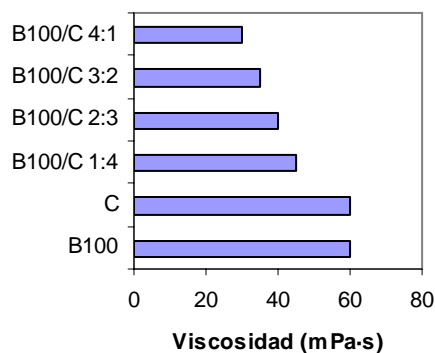


Figura 131. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), carragenato (C) y las mezclas B100/C a un gradiente de deformación de 85 s^{-1} .

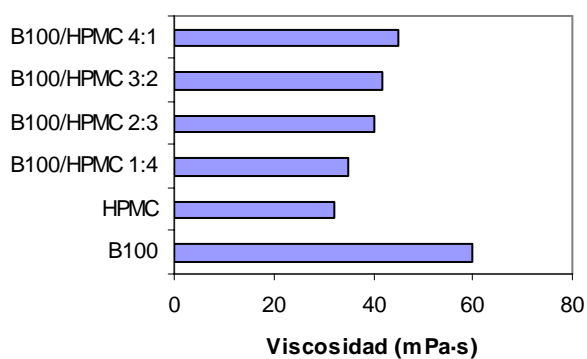


Figura 132. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y las mezclas B100/HPMC a un gradiente de deformación de 85 s^{-1} .

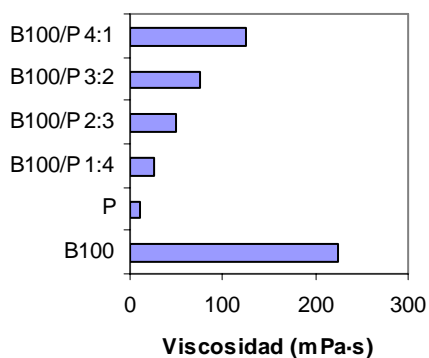


Figura 133. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), pectina (P) y las mezclas B100/P a un gradiente de deformación de 10 s^{-1} .

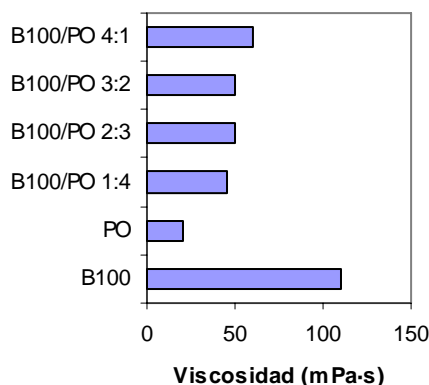


Figura 134. Viscosidad de soluciones al 0,5% (p/v) de polímero B100 (B100), goma de *Plantago Ovata* (PO) y las mezclas B100/PO a un gradiente de deformación de 30 s^{-1} .

Nuestros resultados indican que únicamente existe efecto sinérgico entre nuestro exopolisacárido (B100) y la goma guar (GG), y es que al combinar ambos polímeros (en proporciones B100:GG 1:4, 2:3 y 3:2) se obtienen soluciones de mayor viscosidad que cuando estos polímeros se utilizan por separado. La viscosidad en el primer caso (1:4) es un 25% superior respecto a la viscosidad respecto de la viscosidad de polímero B100 o goma guar por separado.

La sinergia existente en la asociación xantano-galactomananos y xantano-glucomananos ha sido descrita por varios autores (Goycoolea y col., 2001; Annable y col., 1994; Paradossi y col., 2002), concretamente en cuanto a la formación de geles. Casas y colaboradores (2000) han estudiado la asociación xantano-goma guar, en la cual el efecto sinérgico depende de la proporción de cada una de las gomas en la mezcla, de modo que se obtiene la mayor viscosidad para la proporción 3:3. En cuanto al mecanismo de esta sinergia, juega un papel fundamental la fuerza de las interacciones entre las cadenas polisacáridicas. Parece ser que entre el xantano y la goma guar (un galactomanano), dichas interacciones se producen a nivel de los lugares no sustituidos de la cadena de manosa. Por lo tanto, aquellos galactomananos con un menor contenido en galactosa, entre ellos la goma guar, permiten las interacciones de mayor fuerza (Bresolin y col., 1997; 1999; Sutherland, 1990).

La compatibilidad y la sinergia del exopolisacárido sintetizado por la cepa B100 de *Halomonas maura* y la goma guar representa una característica atractiva para este polímero, que en este aspecto se asemeja una vez más al maurano y al xantano, el cual, gracias a su efecto sinérgico con diversas gomas, ha permitido disponer de agentes viscosizantes y estabilizantes con propiedades modificadas (Kelco, 1994; Craig y col., 1997).

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES EMULGENTES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS

RESUMEN

En este capítulo hemos estudiado las propiedades emulgentes de los exopolisacáridos. Todos los polímeros ensayados fueron capaces de estabilizar, en mayor o menor medida, mezclas oleoacuosas en las que la fase oleosa era un hidrocarburo o un aceite vegetal o mineral. Destacan los exopolisacáridos B100 de *Halomonas maura* y B33 de *Palleronia marisminoris*, mucho más eficientes que los surfactantes químicos utilizados como control. Por tanto, nuestros EPS podrían encontrar aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética o en biorremediación, entre otros campos. Además, en la mayoría de los casos, las emulsiones presentan un tamaño de gotícula pequeño y uniforme lo que determina que sean estables y homogéneas. Con respecto al mecanismo por el que nuestros EPS actúan como emulgentes, podemos decir que se comportan estabilizando emulsiones, no son biosurfactantes, ya que no disminuyen la tensión superficial. Los exopolisacáridos A112 y A116 producidos por *Halomonas ventosae*, con una considerable actividad emulgente, y que originan soluciones de baja viscosidad, deben su actividad al contenido en proteínas que presentan en su composición química, como hemos demostrado por eliminación química y enzimática del contenido proteico de los mismos.

En la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y del petróleo se utilizan con frecuencia diversos agentes emulgentes, de origen químico o vegetal; entre las propiedades funcionales de los exopolisacáridos microbianos, se encuentra su capacidad para actuar como agentes emulgentes, por lo que este tipo de macromoléculas podrían constituir una alternativa a los productos empleados tradicionalmente, ya que tienen numerosas ventajas frente a los surfactantes de origen químico; así, por ejemplo, son compuestos biodegradables y de menor toxicidad, presentan una gran diversidad, son eficaces en condiciones extremas (pH, temperatura, salinidad), y se obtienen a partir de fuentes renovables (Desai y Banat, 1997; Banat y col., 2000). Además, el crecimiento de los microorganismos no está sujeto a variaciones estacionales, como ocurre con las plantas, lo que supone un problema a la hora de asegurar el suministro de las gomas de origen vegetal. De hecho, los emulgentes microbianos ya han comenzado a hacerse un hueco en el mercado (O'Connor, 2002), y se espera que para el año 2010 los bioemulgentes acaparen hasta el 10% del mercado de los surfactantes, con unas ventas que rondarán los 200 millones de dólares (Hester, 2001).

Con objeto de evaluar la utilidad de nuestros EPS como agentes emulgentes, en este capítulo se ha determinado su capacidad para emulsionar fases oleosas de diversa naturaleza. Igualmente, se ha estudiado la estabilidad en el tiempo y las características de estas emulsiones. Por último, también hemos tratado de analizar el mecanismo de acción por el que dos de nuestros exopolisacáridos, AI12 y AI16, sintetizados por *Halomonas ventosae*, que mostraron una considerable actividad emulgente (cuantitativa y cualitativamente), pero que dan soluciones acuosas de baja viscosidad (Sección III, Capítulo 1, apartado 1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos), son capaces de actuar como agentes emulgentes.

Este estudio se ha llevado a cabo con los exopolisacáridos producidos en el medio de cultivo complejo MY (Moraine y Rogovin, 1966), en condiciones óptimas de cultivo.

2.1. Actividad emulgente

En las Tablas 21-26 se recoge la actividad emulgente de nuestros exopolisacáridos, en comparación con la del xantano y los surfactantes químicos utilizados como control (Tritón X-100, Tween 20, Sugin 472, Polisorbato 60), a una concentración del 0,5% (p/v), sobre las distintas fases oleosas ensayadas (aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral, keroseno, miristato de isopropilo, tetradecano y octano).

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 21. Actividad emulgente de los controles sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno.

EMULGENTE		FASE OLEOSA			
		Aceite oliva	Aceite girasol	Aceite mineral	Keroseno
Tritón X-100	1 hora	70,1*	69,25	61,8	92,6
	24 horas	61,85	67,1	64,75	60,35
Tween 20	1 hora	61,75	62,8	61,25	62
	24 horas	60,7	62,5	58,15	62
Sugin 472	1 hora	56,8	54,05	54,45	55,45
	24 horas	53,75	52,9	52,55	49,6
Polisorbato 60	1 hora	62,55	64,7	61,95	62,8
	24 horas	61,5	62,8	60,2	62,3
Xantano	1 hora	100	92,45	100	90,5
	24 horas	100	88,95	90,35	89

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

Tabla 22. Actividad emulgente de los controles sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano.

EMULGENTE		FASE OLEOSA		
		Miristato de Isopropilo	Tetradecano	Octano
Tritón X-100	1 hora	68,75*	70,25	67,55
	24 horas	65,5	65,85	62,4
Tween 20	1 hora	67,4	59,75	60,15
	24 horas	61,7	63,85	61,85
Sugin 472	1 hora	53,5	54,45	57,45
	24 horas	49,95	53,35	50
Polisorbato 60	1 hora	63,5	61,95	60,7
	24 horas	62,5	61,3	61,05
Xantano	1 hora	100	93,05	95,1
	24 horas	100	90,25	93,25

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

Tabla 23. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas X2, B40, B100, N12, A16, M4, X8, AI12, AI15 y AI16 sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno.

EMULGENTE		FASE OLEOSA			
		Aceite oliva	Aceite girasol	Aceite mineral	Keroseno
<i>H. maura</i> X2	1 hora	66,6*	65	67,5	75
	24 horas	60	60	62,5	72,5
<i>H. maura</i> B40	1 hora	90	95	92,5	72,5
	24 horas	67,5	75	70	60
<i>H.maura</i> B100	1 hora	85	100	100	100
	24 horas	82,5	100	92,5	75
<i>H. maura</i> N12	1 horas	60	67,5	62,5	62,5
	24 horas	52,5	62,5	57,5	60
<i>H. maura</i> A16	1 hora	55	90	85	65
	24 horas	50	50	60	42,5
<i>H. eurihalina</i> M4	1 hora	77,5	80	82,5	82,5
	24 horas	67,5	75	70	70
<i>H. eurihalina</i> X8	1 hora	55	67,5	85	85
	24 horas	50	50	60	60
<i>H. ventosae</i> AI12	1 hora	55	57,15	57,8	62,5
	24 horas	42,8	51	35,5	55
<i>H. ventosae</i> AI15	1 hora	55	62,5	62,5	62,5
	24 horas	45	50	50	50
<i>H. ventosae</i> AI16	1 hora	66,6	65	67,5	67,5
	24 horas	55	60	62,5	62,5

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

Tabla 24. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas X2, B40, B100, N12, A16, M4, X8, AI12, AI15 y AI16 sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano.

EMULGENTE		FASE OLEOSA		
		Miristato de Isopropilo	Tetradecano	Octano
<i>H. maura</i> X2	1 hora	62,5*	75	75
	24 horas	60	70	70
<i>H. maura</i> B40	1 hora	80	90	77,5
	24 horas	67,5	72,5	65
<i>H.maura</i> B100	1 hora	100	100	100
	24 horas	75	62,5	70
<i>H. maura</i> N12	1 horas	50	60	60
	24 horas	45	55	55
<i>H. maura</i> A16	1 hora	75	57,15	37,5
	24 horas	50	34,5	30
<i>H. eurihalina</i> M4	1 hora	100	75	80
	24 horas	70	67,5	72,5
<i>H. eurihalina</i> X8	1 hora	92,5	67,5	88,9
	24 horas	62,5	57,5	55,5
<i>H. ventosae</i> AI12	1 hora	50	62,5	67,5
	24 horas	25	57,5	57,5
<i>H. ventosae</i> AI15	1 hora	50	57,5	62,5
	24 horas	30	47,5	50
<i>H. ventosae</i> AI16	1 hora	60	62,5	62,5
	24 horas	55	60	60

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

Tabla 25. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas FP35, FP34, FP36, M8, A3, B33, F23, R22, F32 y B35 sobre el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite mineral y keroseno.

EMULGENTE		FASE OLEOSA			
		Aceite oliva	Aceite girasol	Aceite mineral	Keroseno
<i>H. anticariensis</i> FP35	1 hora	50*	54,5	54,75	54,75
	24 horas	40	47,5	47,5	40,5
<i>H. anticariensis</i> FP34	1 hora	62,5	65	65	67,5
	24 horas	55	62,5	62,5	65,1
<i>H. anticariensis</i> FP36	1 hora	55	55	55	53,5
	24 horas	42,5	46,5	50	42,8
<i>H. almeriensis</i> M8	1 hora	92,5	90	92,5	90
	24 horas	67,5	65	67,5	65
<i>S. mucosus</i> A3	1 horas	65	71,5	87,5	90
	24 horas	60	68,5	70	70
<i>P. marisminoris</i> B33	1 hora	100	100	100	100
	24 horas	70	67,5	67,5	70
<i>I. fontislapidosi</i> F23	1 hora	65	67,5	65	65
	24 horas	60	65	62,5	55
<i>I. ramblicola</i> R22	1 hora	82,5	77,15	80	85
	24 horas	65	60	62,5	62,5
<i>A. hispanica</i> F32	1 hora	52,6	67,5	50	73,35
	24 horas	40	55	50	66,65
<i>A. hispanica</i> B35	1 hora	52,5	62,5	65	66,65
	24 horas	37,5	57,5	55	60

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

Tabla 26. Actividad emulgente de los exopolisacáridos producidos por las bacterias halófilas FP35, FP34, FP36, M8, A3, B33, F23, R22, F32 y B35 sobre el miristato de isopropilo, tetradecano y octano.

EMULGENTE		FASE OLEOSA		
		Miristato de Isopropilo	Tetradecano	Octano
<i>H. anticariensis</i> FP35	1 hora	42,5*	55	55
	24 horas	32,5	45	50
<i>H. anticariensis</i> FP34	1 hora	62,5	62,5	62,5
	24 horas	50	60	51,5
<i>H. anticariensis</i> FP36	1 hora	50	55	54,5
	24 horas	32,5	42,5	42,5
<i>H. almeriensis</i> M8	1 hora	92,5	87,5	90
	24 horas	70	62,5	65
<i>S. mucosus</i> A3	1 horas	84,25	90	80
	24 horas	67,5	75	70
<i>P. marisminoris</i> B33	1 hora	100	100	100
	24 horas	72,5	65	70
<i>I. fontislapidosi</i> F23	1 hora	67,5	62,5	75
	24 horas	50	45	60
<i>I. ramblicola</i> R22	1 hora	85	77,5	76,6
	24 horas	62,5	55	60
<i>A. hispanica</i> F32	1 hora	75	75	70
	24 horas	72,5	50	55
<i>A. hispanica</i> B35	1 hora	67,5	65	75
	24 horas	57,5	60	67,5

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

El porcentaje de fase emulsionada que originan nuestros exopolisacáridos es prácticamente en todos los casos superior al 50% (Tablas 23-26). Destaca el poder emulgente de los exopolisacáridos sintetizados por *Halomonas maura* cepa B100 y *Palleronia marismenoris* cepa B33, sobre todos los sustratos oleosos ensayados; estos EPS consiguen porcentajes de emulsión del 100% en todos los casos, excepto cuando la fase oleosa es el aceite de oliva y el emulgente el polímero B100, donde la emulsión es del 85%.

La posibilidad de emulsionar el aceite de oliva y el aceite de girasol por parte de nuestros 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 nuestros exopolisacáridos 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.

Tradicionalmente, en la industria alimentaria se utilizan como emulgentes de origen vegetal la lecitina y sus derivados, así como la goma arábiga (Bloomberg, 1991), los cuales presentan ciertos inconvenientes, como el ser inestable en determinados procesos industriales, en el primer caso, o el que su producción se ve afectada por las condiciones climáticas, en el segundo (Whistler, 1993). A este nivel, y con objeto de suplir estos problemas, algunos autores ya han descrito la utilidad de sustancias poliméricas de elevada masa molecular con actividad emulgente (Klekner y Kosaric, 1993; Shepherd y col., 1995), como sería el caso de nuestros polímeros. Estos emulgentes recubren las gotículas de aceite dando lugar a emulsiones muy estables. Concretamente, ya se ha utilizado a nivel experimental para la elaboración de aliños de ensaladas un bioemulgente producido por *Candida utilis* (Shepherd y col., 1995).

Los bioemulgentes también se han hecho un hueco en la industria cosmética (Brown, 1991). Por ejemplo, Kao Chemical Corporation comercializa una formulación que contiene soforolípidos obtenidos de *Candida* spp., para su uso como hidratante de la piel (Yamame, 1987).

Al margen de su posible aplicación en alimentación y cosmética, resulta interesante la capacidad emulsionante de nuestros biopolímeros sobre hidrocarburos, en concreto hidrocarburos alifáticos lineales como el keroseno, el tetradecano y el octano, lo que les proporciona potenciales aplicaciones en el sector de la biorremediación del medio ambiente y procesos de recuperación y limpieza del petróleo y/o sus derivados, ya que anualmente se producen en todo el mundo más de dos millones de toneladas métricas de petróleo, y se considera que entre el 0,08 y el 0,4% de esta producción anual acaba contaminando diversos hábitats oceánicos y terrestres (Bartha, 1986).

Los bioemulgentes han encontrado la mayor parte de sus aplicaciones precisamente en estos sectores. La biorremediación de hábitats contaminados con petróleo y sus derivados se encuentra limitada en muchas ocasiones por la escasa disponibilidad de estos agentes hidrofóbicos para los microorganismos. Así, la capacidad de estos agentes para emulsionar hidrocarburos favorece en muchas ocasiones la degradación de estos compuestos altamente tóxicos presentes en medios acuáticos y terrestres (Banat y col., 2000) al aumentar la solubilidad y con ello la biodisponibilidad de estos compuestos para su utilización por otros microorganismos (Déziel y col., 1996; Lin, 1996). Este hecho se ha puesto de manifiesto tanto para hidrocarburos alifáticos como policíclicos aromáticos (Begley y col., 1996), y concretamente se han obtenido excelentes resultados con el alasano, un bioemulgente producido por *Acinetobacter radioresistens* (Navon-Venezia y col., 1995; Barkay y col., 1999). Sin embargo, el emulsano, un potente bioemulgente muy eficaz a bajas concentraciones, no es capaz de emulsionar hidrocarburos alifáticos, aromáticos o cíclicos puros, sino únicamente mezclas de hidrocarburos en las proporciones adecuadas (Rosemberg y Ron, 1999); por tanto, nuestros EPS, al igual que el alasano, presentan la ventaja de emulsionar los hidrocarburos en solitario. La concentración de biosurfactante se ha comprobado que no deber superar su concentración micelar crítica (CMC), ya que en algunos casos puede llegar a inhibir el proceso al interferir en la adhesión bacteriana a las gotículas de hidrocarburo (Stelmack y col., 1999).

En la industria del petróleo, de igual forma, la presencia de surfactantes acelera la degradación del petróleo y sus derivados lo cual facilita el proceso de limpieza de los conductos y tanques petrolíferos (Volkering y col., 1997; Banat y col., 2000).

Además de sus aplicaciones como bioemulgentes en alimentación, cosmética y especialmente en procesos de biorremediación, podemos citar entre otros campos donde los bioemulgentes han encontrado utilidad, su incorporación a detergentes o la elaboración de herbicidas y pesticidas (Rosenberg y Ron, 1999). De igual modo, en los últimos años también se han descrito las potenciales aplicaciones de biosurfactantes en diversos campos de la Medicina (Singh y Cameotra, 2004; Cameotra y Makkar, 2004), como antimicrobianos, como antiadhesivos evitando la formación de biofilms en catéteres y prótesis, o formando parte de formulaciones prebióticas para evitar infecciones del tracto urinario.

Al tratarse de bioemulgentes producidos por bacterias halófilas, nuestros EPS presentan posibilidades únicas para su aplicación en condiciones extremas de salinidad, lo cual puede ampliar el abanico de aplicaciones (Trebbau-de y McInerney, 1996, Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998).

Por último, hemos de comentar que la producción de biopolímeros con poder emulgente también se ha descrito en otras cepas del género *Halomonas*, concretamente *Halomonas maura* y *Halomonas eurihalina*. En el primer caso se ha descrito la capacidad del EPS producido por al menos 6 cepas bacterianas de esta especie para emulsionar varios hidrocarburos (Bouchotroch y col., 2000). Además, el maurano (Arias y col., 2003), exopolisacárido producido por *Halomonas maura* cepa S30, es un

bioemulgente de naturaleza polisacáridica con elevada masa molecular que presenta una importante actividad emulgente a destacar además de sobre el aceite de oliva o girasol sobre diversos hidrocarburos y en especial el crudo de petróleo, y que además potencia el poder emulgente de surfactantes químicos como el Tween 20 o Polisorbato 60. En cuanto a *Halomonas eurihalina*, se ha estudiado la actividad emulgente de los polímeros producidos por las cepas F2-7, H28, H96, H212 y H214 (Calvo y col., 1998, Martínez-Checa y col., 1996; 2002), siendo el sustrato más eficazmente emulsionado el crudo de petróleo. Por otra parte, se ha comprobado que estas bacterias son capaces de crecer y producir estos bioemulgentes en medios con hidrocarburos y petróleo como fuente de carbono (Calvo y col., 2002; Martínez-Checa y col., 2002).

La estabilidad de las emulsiones originadas por nuestros exopolisacáridos se ha comprobado determinando el porcentaje de mezcla emulsionado tras 24 horas (Tablas 23-26). Tal y como puede comprobarse, se produce una disminución en dicho porcentaje en casi todos los casos, probablemente debido a una degradación del exopolisacárido, presentando mayor estabilidad las emulsiones preparadas con los surfactantes químicos o el xantano. No obstante, el porcentaje de fase oleosa emulsionada por nuestros polímeros tras 24 horas, en general, fue comparable al obtenido con el resto de los agentes emulgentes empleados como control. A pesar de esta disminución se ha comprobado que estas emulsiones permanecen estables para períodos de tiempo mayores sin mostrar signos de floculación, coalescencia o sedimentación.

El tamaño y diámetro de las gotículas de la emulsión, determinado por procedimiento microfotográfico, acoplado una cámara fotográfica a un microscopio, también resulta indicativo de su estabilidad (Figuras 135 y 136). Las emulsiones de los EPS B100 de *Halomonas maura* y M4 de *Halomonas eurihalina* con aceite de oliva o keroseno nos pueden servir como ejemplo; presentan un tamaño de gotícula pequeño y uniforme lo que determina que dichas emulsiones sean estables y homogéneas. El diámetro de las gotículas de estas emulsiones estuvo en todos los casos dentro de los límites establecidos para las emulsiones en general (0,1-100 μm) (Swarbrick, 1998).

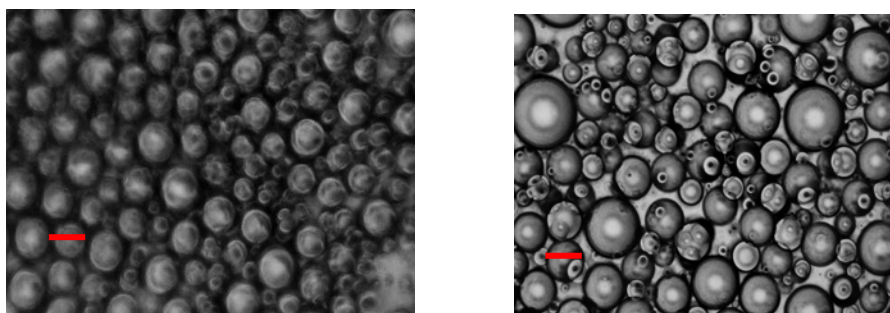


Figura 135. Emulsión aceite de oliva-agua (A) y keroseno-agua (B) estabilizada por el EPS B100 de *Halomonas maura*. La barra mide 6 μm .

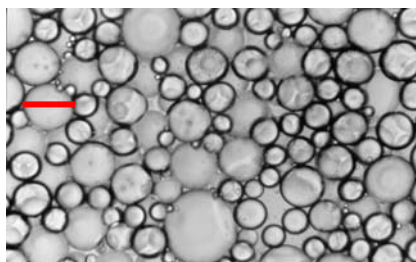


Figura 136. Emulsión estabilizada por el EPS M4 utilizando keroseno. La barra mide 10 μm .

2.2. Poder tensioactivo

Hemos finalizado este estudio tratando de clasificar los exopolisacáridos en base al mecanismo por el que son capaces de actuar como agentes emulgentes. Existen diversos mecanismos de acción mediante los cuales un emulgente permite la interposición de dos fases inmiscibles entre sí. Uno de ellos consiste en la disminución de la tensión superficial o interfacial de las distintas fases, en cuyo caso hablamos de agentes surfactantes o tensioactivos. En otros casos el emulgente actúa estabilizando las emulsiones, por un aumento de la viscosidad. Generalmente las moléculas de menor peso molecular actúan como surfactantes y aquellas de peso molecular más elevado actúan estabilizando la emulsión mediante un mecanismo diferente, sea el aumento de viscosidad u otro (Rosenberg y Ron, 1999).

Mediante la determinación de la tensión superficial de preparaciones acuosas a distintas concentraciones de exopolisacárido determinamos si algunos de los EPS que presentaron buenas propiedades emulgentes (X2, B40, B100, M4, AI12, B33 y F23) eran agentes tensioactivos o por el contrario deben su poder emulgente a su elevada viscosidad en solución o a otro mecanismo de acción. Como control se ha empleado el Polisorbato 60, un surfactante con poder tensioactivo, ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. Los resultados se han recogido en la Tabla 27.

Tabla 27. Tensión superficial (mN/m) de las preparaciones acuosas de los EPS X2, B40, B100, M4 AI12 y F23, y del surfactante químico utilizado como control Polisorbato 60.

Emulgente	Concentración (% p/v)								
	0,25	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
X2	54,5	52,5	50,7	<u>46,6</u>	ND ^a	ND	45,3	ND	44,8
B40	53,2	53	52,7	<u>48,6</u>	47,3	ND	48,4	ND	46,4
B100	53,3	53,8	53,3	<u>49,4</u>	ND	48,3	ND	ND	47,5
M4	ND	ND	ND	54	54,1	53,6	53,4	<u>49,3</u>	49
AI12	50,4	49,3	<u>45,8</u>	46	ND	ND	46	ND	46,1
B33	55,4	<u>52,2</u>	52,4	53	52,8	52,6	ND	ND	ND
F23	ND	<u>53,2</u>	ND	52	ND	52,6	<u>49,2</u>	47,8	47,4
Polisorbato 60	32,4	<u>26,9</u>	28,4	28,7	28,65	29,1	ND	ND	ND

^a, No determinado. En negrita y subrayado, la concentración de emulgente que se corresponde a la CMC. La medida de la tensión superficial del agua fue 70,4 mN/m.

Nuestros exopolisacáridos no presentaron una actividad surfactante significativa, siendo la disminución de la tensión superficial mucho que la obtenida utilizando Polisorbato 60, surfactante químico empleado como control. A la concentración micelar crítica (CMC, mínima concentración de polímero a partir de la cual no se origina una disminución considerable de la tensión superficial) únicamente se consigue reducir la tensión superficial del agua hasta valores de aproximadamente 50 mN/m. Se considera que un compuesto presenta actividad surfactante cuando, siendo la tensión superficial del agua de 72 mN/m, la reduce aproximadamente hasta al menos 30 mN/m (Desai y Banat, 1997). Por tanto, los polímeros ensayados se comportan como agentes emulgentes estabilizadores de las emulsiones, no como surfactantes, aunque la disminución de la tensión superficial que hemos detectado podría contribuir a la formación de las emulsiones.

2.3. Desproteínización de los exopolisacáridos AI12 y AI16. Electroforesis de proteínas

Como acabamos de comentar, nuestros EPS no deben su poder emulgente a una disminución de la tensión superficial, es decir, no son surfactantes, más bien tienen esta propiedad por su capacidad para estabilizar las emulsiones, como otros bioemulgentes de elevada masa molecular (Rosenberg y Ron, 1999). El EPS sintetizado por *H. maura* cepa B100, por ejemplo, al igual que el maurano producido por *H. maura* S30 o el xantano, se comporta como un agente emulgente estabilizador de las emulsiones gracias a su poder viscosizante. Sin embargo, la mayoría de los EPS aquí estudiados, originan soluciones de baja viscosidad (Figura 118, Sección III, Capítulo 1, apartado 1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos), por lo que su capacidad para estabilizar diversas mezclas oleoacuosas no se debe a sus propiedades reológicas. Un hecho que hay que tener en cuenta es que nuestros exopolisacáridos presentan en su composición química restos acetilo (Tabla 16, Sección II, Capítulo 2, apartado 2.1. Análisis colorimétricos. Determinación de cenizas), los cuales imparten hidrofobicidad a la molécula polisacáridica, algo que podría influir en la actividad emulgente de los polímeros, como ya ha sido descrito para los EPS sintetizados por *Arthrobacter viscosus* (Novak y col., 1992) y *Sphingomonas paucimobilis* (Ashtaputre y Shah, 1995). De igual modo, no podemos olvidar la presencia de una fracción proteica en la composición química de los EPS (Tabla 16, Sección II, Capítulo 2, apartado 2.1. Análisis colorimétricos. Determinación de cenizas), fracción que podría jugar un papel importante en el poder emulgente de los biopolímeros. En otros EPS, parece ser que las proteínas (de carecer hidrófobo) se unen a la fase lipídica de forma reversible y la cadena polisacáridica estabiliza la emulsión (Rosenberg y Ron, 1999).

Los exopolisacáridos AI12 y AI16, producidos por *Halomonas ventosae*, presentan una considerable actividad emulgente (Tablas 23 y 24), tanto cuantitativa como cualitativamente, comparable con los resultados obtenidos para algunos de los surfactantes químicos utilizados como control. Sin embargo, sus soluciones acuosas son de muy baja viscosidad (Figura 118, Sección III, Capítulo 1, apartado 1.1. Viscosidad de las preparaciones acuosas de los exopolisacáridos), por lo que no podemos relacionar en absoluto este parámetro, la viscosidad de las soluciones acuosas, con su capacidad para estabilizar emulsiones. Este hecho puede ser muy beneficioso para algunas de las potenciales

aplicaciones biotecnológicas de los bioemulgentes, en las que un aumento considerable de la viscosidad no es ni mucho menos deseable (Desai y Banat, 1997). Por tanto, nos propusimos determinar si las proteínas detectadas en estos polisacáridos durante el estudio de su composición química, un 3,05 y un 3,95% p/p respectivamente, desempeñan un papel importante en las propiedades emulgentes de los mismos.

Para ello eliminamos las proteínas de los polímeros por el método del fenol caliente (Westphal y Jann, 1965); como pudimos comprobar por SDS-PAGE (Figura 137) y también gracias a la determinación colorimétrica del contenido en proteínas de los EPS por el método de Bradford (1976), los EPS AI12 y AI16 producidos por *H. ventosae*, perdieron por completo su porción proteica tras este tratamiento; una vez conseguidos los correspondientes Apo-EPS (exopolisacáridos desproteinizados), procedimos a determinar nuevamente su capacidad para estabilizar emulsiones; como puede apreciarse en la Tabla 28, la actividad emulgente de los polímeros Apo-AI12 y Apo-AI16, fue menor a la mostrada por los exopolisacáridos en estado nativo, lo que sugiere que las proteínas desempeñan un papel muy importante en la actividad emulgente de estos biopolímeros, tal y como se ha descrito para otros polisacáridos (Shepherd y col., 1995). Como la desproteización por el método del fenol caliente es un proceso muy agresivo, que podría haber causado modificaciones químicas adicionales a los EPS, además de la pérdida de las proteínas, examinamos también el efecto de enzimas proteasas sobre los mismos, y constatamos que tanto el tratamiento con tripsina como proteinasa K, provocaban también una pérdida significativa de la actividad emulgente de los exopolisacáridos AI12 y AI16, como se observa en la Tabla 28.

Tabla 28. Actividad emulgente de los exopolisacáridos AI12 y AI16 de *Halomonas ventosae* en estado nativo y tras ser sometidos a desproteización química y enzimática sobre diversos sustratos.

EMULGENTE	FASE OLEOSA						
	Aceite de oliva	Aceite de girasol	Aceite mineral	Keroseno	Miristato de isopropilo	Tetradecano	Octano
AI12	42,8	51	35,5	55	25	57,5	57,5
Apo-AI12	33,5	37,5	25	37,5	17,5	33,5	50
AI12 + Tr*	37,5	37,5	27,5	35	10	42,8	50
AI12 + Pk*	35	33,5	22,5	33,5	12,5	37,5	35
AI16	55	60	62,5	62,5	55	60	60
Apo-AI16	33,5	37,5	37,5	33,5	33,5	25	42,8
AI16 + Tr	33,5	10	33,5	27,5	33,5	25	37,5
AI16 + Pk	25	35	37,5	37,5	27,5	33,5	37,5

* Tr: Tripsina; Pk: Proteinasa K. Los resultados son la media de tres determinaciones e indican el porcentaje emulsionado de la mezcla agua-fase oleosa después de 24 horas.

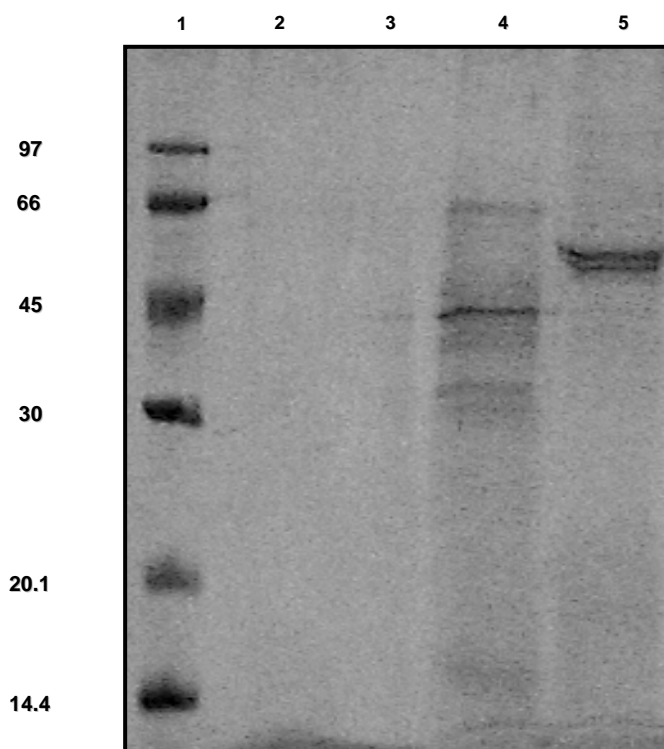


Figura 137. SDS-PAGE de los exopolisacáridos en estado nativo y tras ser sometidos a desproteización por el método del fenol caliente (Apo-EPS) producidos por las cepas AI12^T y AI16 de *Halomonas ventosae*. Los números de la izquierda indican la masa molecular de los patrones en kilodaltons. Carril 2: Apo-AI12; Carril 3: Apo-AI16; Carril 4: EPS AI12; Carril 5: EPS AI16.

El alasano, un bioemulgente producido por *Acinetobacter radioresistens* KA53 (Navon-Venezia y col., 1995), es un complejo entre un polisacárido aniónico y una proteína de una masa molecular aproximada de 1 MDa. La fracción polisacáridica del alasano es peculiar, ya que tiene alanina unida de forma covalente. Como para los exopolisacáridos AI12 y AI16 sintetizados por *Halomonas ventosae*, la fracción proteica del alasano parece desempeñar un papel crítico en su actividad emulgente (Navon-Venezia y col., 1998). Esta fracción proteica a la que nos referimos, está constituida por tres elementos; una de esas tres proteínas, denominada AlnA (identificada como una proteína OmpA, Toren y col., 2002a), y que presenta un tamaño de unos 45 kDa, comparable a la principal fracción proteica del exopolisacárido AI12 de *Halomonas ventosae* (Figura 137), tiene mayor actividad emulgente que el alasano al completo (Toren y col., 2001), y es capaz de aumentar la solubilidad de diversos hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) (Toren y col., 2002b). Hay muy pocos trabajos en los que se haya descrito la solubilización de PAHs por bioemulgentes de elevada masa molecular; además del alasano, Burd y Ward (1996) demostraron que el bioemulgente producido por *Pseudomonas marginalis* PD-14D, un complejo formado por el LPS y una proteína, es capaz de solubilizar PAHs. Por tanto, sería interesante estudiar la acción de los EPS AI12 y AI16 de *H. ventosae* o de sus proteínas sobre este tipo de compuestos.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN DE METALES PESADOS

RESUMEN

La contaminación por metales pesados es un problema creciente en las últimas décadas. Los metales pesados pueden llegar a ser muy tóxicos, lo que ha promovido la búsqueda de soluciones al problema, y una de esas soluciones podría venir dada por la captación por exopolisacáridos microbianos, debido en la mayoría de los casos a su carácter ácido. En base a estos precedentes, hemos ensayado la capacidad para captar iones metálicos por parte de los EPS que forman parte de este trabajo. Todos los EPS sintetizados por nuestras bacterias halófilas fueron capaces de captar considerables cantidades de plomo, cobre y cobalto, destacando el EPS X2 de *Halomonas maura*, capaz de captar más de 53,5 mg Pb²⁺/g EPS. El cobalto fue el metal captado con menor eficiencia por todos los exopolisacáridos. Por tanto, nuestros EPS podrían utilizarse en el tratamiento de ecosistemas contaminados con metales pesados.

Tras determinar las propiedades viscosizantes y emulgentes de nuestros polímeros, procedimos a evaluar sus propiedades como agentes secuestrante de metales pesados, partiendo de la base de que se trata de polímeros de naturaleza ácida debido a la presencia de ácidos urónicos, así como otros grupos inorgánicos tales como sulfatos y fosfatos.

El problema creciente de la contaminación por metales pesados de suelos, aguas y diversos medioambientes, ha estimulado la búsqueda de nuevos mecanismos para retirar estos agentes polucionantes. Entre ellos se ha propuesto el uso de biomasa bacteriana (López y col., 2000; 2002; Ozdemir y col., 2003), así como la captación de metales por distintos componentes y productos bacterianos, tales como los polisacáridos extracelulares y componentes de la pared celular (Tolley y Macaskie, 1993; Volesky y Holan, 1995; Wilhelmi y Duncan, 1995; Dhami y col., 1998; Geddie y Sutherland, 1993). También se ha propuesto la eliminación de metales pesados de efluentes con células vivas, metabólicamente activas (Malik, 2004), lo que parece presentar numerosas ventajas frente al uso de biomasa bacteriana, aunque hoy día el desarrollo de esta tecnología presenta límites que todavía no han podido ser superados (Donmez y Asku, 2001).

Entre los mecanismos propuestos para la utilización de los microorganismos en la retirada de metales pesados de áreas contaminadas, la interacción de los cationes metálicos con polisacáridos extracelulares es uno de los procesos más rentables y eficaces. Otros mecanismos son: 1) acumulación intracelular de los metales; 2) asociación de los metales a la pared celular; 3) interacción con los sideróforos; 4) inmovilización de los metales en productos metabólicos bacterianos y 5) transformación y volatilización de los metales (Ford y Mitchell, 1992). Para muchos de ellos se requiere la presencia de células bacterianas "in situ", mientras que en el caso de los EPS, su producción puede ser "in situ" o bien pueden ser adicionados sin necesidad de disponer de la cepa productora, lo cual facilita el modo de operación y tratamiento de la zona (Kilbane, 1991).

Se ha apuntado que los exopolisacáridos microbianos reúnen los principales requisitos exigidos para un transportador en la movilización de metales pesados. Los principales son su gran afinidad por el contaminante (fundamentalmente gracias a su carácter ácido), y el hecho de que parecen ser relativamente poco degradables por microorganismos del suelo, con lo que son aptos para ser incorporados a ellos con la garantía de que pueden permanecer estables durante mayor tiempo. Ventajas adicionales de estos productos son su aceptación pública y la posibilidad de poder ser producidos con alto rendimiento bajo condiciones de producción óptimas y controladas (Chen y col., 1995a).

Siguiendo la metodología descrita por Geddie y Sutherland en 1993, hemos ensayado la capacidad de los EPS para retener diversos cationes metálicos: Pb^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} . El plomo ha sido utilizado por el ser humano desde hace miles de años, y sus efectos tóxicos se conocen desde hace años (Johnson, 1998). El cobre puede llegar a ser muy tóxico por su capacidad para formar radicales libres (Rodríguez-Montelongo y col., 1993) y por sus interacciones con la membrana celular; todos estamos hoy

día expuestos al contacto con cobre, y es que todos los días tocamos monedas; sin embargo, deberíamos ingerir 275 monedas para que la dosis de cobre fuera tóxica (Yelin y col., 1987). El cobalto es un metal de toxicidad media (Nies, 1999), pero el polvo de cobalto podría causar enfermedades pulmonares (Nemery y col., 1994). Los miligramos de metal captado por gramo de exopolisacárido tras contacto durante 24 horas se muestran en la Tabla 29. Los resultados mostrados se obtuvieron tras realizar tres experiencias en las que se incrementó progresivamente la concentración de EPS, con objeto de asegurarnos de que la cantidad de metal que quedaba remanente en solución, tras el ensayo, no podía ser retenida por el exopolisacárido.

Tabla 29. Captación de metales pesados por los exopolisacáridos. Los resultados indican los miligramos de metal captados por gramo de EPS.

EPS	Cation		
	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Co ²⁺
<i>H. maura</i> X2	14,25	>53,5*	>10
<i>H. maura</i> B40	11,05	50,72	>10
<i>H. maura</i> B100	12,25	50,15	>10
<i>H. maura</i> N12	12,35	48,1	7,45
<i>H. maura</i> A16	12	51,25	8,65
<i>H. eurihalina</i> M4	18	24	>10
<i>H. eurihalina</i> X8	20,5	23,5	>10
<i>H. ventosae</i> A112	12	24,8	2,5
<i>H. ventosae</i> A115	18,15	24,8	2
<i>H. ventosae</i> A116	27,6	25,7	10
<i>H. anticariensis</i> FP35	26,6	26,3	>10
<i>H. anticariensis</i> FP34	17,85	25	>10
<i>H. anticariensis</i> FP36	28,1	25,15	>10
<i>H. almeriensis</i> M8	19,2	24,5	>10
<i>S. mucosus</i> A3	15,75	43,5	8,75
<i>P. marisminoris</i> B33	24,8	44,5	>10
<i>I. fontislapidosi</i> F23	16,3	40	8
<i>I. ramblicola</i> R22	26,25	44,65	>10
<i>A. hispanica</i> F32	6,95	30	4
<i>A. hispanica</i> B35	16,75	43,5	8,65

* >, Supera la sensibilidad del aparato de espectrometría de adsorción atómica.

Pudimos comprobar que no se produce secuestro de ninguno de los metales pesados en ausencia de exopolisacárido mediante el uso en estos ensayos de tripas de diálisis conteniendo únicamente agua destilada. En estos casos la cantidad de metal retirada de la solución fue nula.

Por otra parte, parece obvio que las interacciones que se producen entre los polímeros y el metal se basan en atracciones electrostáticas con los grupos químicos del EPS cargados negativamente, ya que cuando se pusieron en contacto los exopolisacáridos con soluciones de arsenato sódico y cromato potásico, no se detectó retención alguna de arsénico ni cromo, puesto que se encuentran en forma aniónica en estas sales.

El **plomo** es el metal para el que todos los exopolisacáridos presentaron mayores niveles de retención, destacando el polímero sintetizado por la cepa X2 de *Halomonas maura*, que es capaz de captar más de 53,5 mg Pb²⁺/g EPS, cantidad algo superior a la capturada por el maurano tras 24 horas de incubación (Arias y col., 2003). Incluso el exopolisacárido F32 de *Alteromonas hispanica*, con poca capacidad para captar cobre y cobalto, es capaz de captar hasta 30 mg Pb²⁺/g EPS. La utilización de un exopolisacárido microbiano de este tipo en procesos de biorremediación ofrece mejores resultados que otros componentes de la pared celular, ya que por ejemplo el peptidoglicano de *E. coli* K-12 es capaz de unir una cantidad mucho menor de plomo (10,3 mg Pb²⁺/g peptidoglicano) (Hoyle y Beveridge, 1984). No obstante, nuestros resultados están lejos de los 316 mg Pb²⁺/g EPS que capta el exopolisacárido sintetizado por *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* (Loaëc y col., 1998), o los 1103 mg Pb²⁺/g EPS retenidos por el polisacárido de *Bacillus firmus* MS-102 (Salehizadeh y Shojaosadati, 2003). Un posible camino a seguir para aumentar la capacidad de nuestros exopolisacáridos de captar metales pesados es exponer progresivamente a los microorganismos que los sintetizan a concentraciones cada vez mayores de iones metálicos (Guibaud y col., 2005). Esta exposición probablemente haría a los microorganismos más resistentes a la polución por metales pesados; Kazy y colaboradores (2002) demostraron que la cepa BU2 de *Pseudomonas aeruginosa*, mucho más resistente al cobre que la cepa BU1 de la misma especie, producía una mayor cantidad de EPS, y además, este polímero poseía una mayor capacidad para quelar cobre. Otra posibilidad es aplicar técnicas de biología molecular para modificar la estructura de los exopolisacáridos, introduciendo en los microorganismos genes que puedan alterar el esqueleto polisacárido o las cadenas laterales, o modificar la composición en monosacáridos (Gutnick y Bach, 2000).

La capacidad para retener **cobre** por parte de los exopolisacáridos AI16 de *Halomonas ventosae*, FP35 y FP36 de *Halomonas anticariensis*, B33 de *Palleronia marismínoris* y R22 de *Idiomarina ramblicola* (Tabla 29) es comparable a la mostrada por la biomasa de la bacteria productora de exopolisacáridos *Ochrobactrum anthropi* (Ozdemir y col., 2003), y muy superior a la captación de este metal demostradas por el EPS de *Enterobacter cloacae* (Iyer y col., 2005), que solo puede captar entre 3,1 y 6,6 mg Cu²⁺/g EPS o *Halomonas marina* (Ford y col., 1987), que sólo capta 16,8 mg Cu²⁺/g EPS.

Para todos y cada uno de nuestros EPS, el **cobalto** es el metal secuestrado con menor eficacia (Tabla 29); este hecho ha sido descrito para otros polisacáridos. Mientras que el exopolisacárido de *Enterobacter cloacae* presenta excelentes propiedades para la captación de cadmio, sólo puede captar cantidades residuales de cobalto (Iyer y col., 2005). De igual manera, el EPS producido por *Chryseomonas luteola* TEM05 se muestra también mucho más eficiente en la captación de cadmio que en la de cobalto (Ozdemir y col., 2005).

Hay que tener en cuenta que la eliminación de las aguas del plomo y otros cationes metálicos es de especial interés a causa de su gran toxicidad y a la frecuencia con la que se encuentran presentes en los medios acuáticos tras ser liberados fruto de múltiples actividades antropogénicas en el medio ambiente (Chen y col., 1995a). Se han detectado hasta 250 ppm de plomo en efluentes industriales, valor que habría que reducir hasta 0,5 mg/l, cantidad permitida en las aguas de consumo (Crine, 1993). Además, el plomo y otros cationes metálicos son especialmente contaminantes debido a su fuerte adsorción fundamentalmente en suelos contaminados, lo que dificulta su eliminación (Jensen-Spaulding y col., 2004).

Algunos factores que pueden afectar al proceso de captación son el tiempo, la temperatura y el pH (Veglio y Beorchini, 1997). Es frecuente encontrar en la bibliografía que la captación de metales pesados por parte de los exopolisacáridos microbianos es un proceso que comienza casi inmediatamente, y que luego se incrementa con el tiempo, para finalmente estabilizarse, como se ha descrito por ejemplo para la captación de metales por el maurano (Arias y col., 2003). Un incremento de la temperatura puede ocasionar una disminución de los niveles de unión del exopolisacárido con los metales, como consecuencia de un cambio en la estructura conformacional del polímero. En cuanto al pH, en condiciones ácidas, puede dificultarse el proceso al existir mayor concentración de protones que compiten por las cargas negativas del EPS (Geddie y Sutherland, 1993; 1994). Es por ello que estos ensayos de captación los realizamos tras 24 horas de incubación, para estar seguros que se ha alcanzado el equilibrio, a pH 7 y la temperatura seleccionada fue de 30°C, siendo perfectamente estables nuestros exopolisacáridos en estas condiciones.

En resumen, los exopolisacáridos sintetizados por nuestras bacterias seguramente desempeñan un papel determinante en la ecología de los metales pesados de ambientes hipersalinos, al igual que se ha descrito para EPS sintetizados por bacterias marinas (Bhaskar y Bhosle, 2006); además podrían ser utilizados en procesos de biorremediación, por su capacidad para captar metales pesados, probablemente debido a su carácter ácido (Wingender y col., 1999), fundamentalmente plomo, aunque se hacen necesarios más estudios para terminar de conocer el mecanismo de acción por el que se produce este fenómeno, ya que probablemente otros mecanismos además de las interacciones electrostáticas juegan su papel en la captación de metales pesados por exopolisacáridos (Guibaud y col., 2005). Así mismo tendríamos que determinar el efecto que sobre la captación tienen factores como el pH, la concentración inicial de polisacárido, la concentración inicial de metal, la presencia de otros iones en el

medio, etc., ya que modificando estos factores seguramente variarían las cantidades de iones metálicos retenidas.

Otro aspecto que podría estudiarse es la influencia de los grupos acetilo sobre la capacidad de los exopolisacáridos de unirse a iones metálicos, como ha sido descrito para otros polímeros como los alginatos bacterianos (Geddie, 1992). Fundamentalmente, la presencia o no de estos grupos, afecta a la selectividad de interacción con cationes metálicos. La desacetilación de los exopolisacáridos determina una mayor afinidad de unión con cationes monovalentes, tal y como describieron Geddie y Sutherland (1993) para los polímeros producidos por *Zoogloea ramigera* o *Rhizobium meliloti*. Parece ser que en los polímeros no desacetilados, los grupos acetilo originan una densidad de carga negativa mayor en la proximidad de los sitios de unión favoreciendo la unión de cationes divalentes y a su vez de mayor tamaño. Además, los sustituyentes acetilo originan una geometría irregular en la cadena polisacáridica, lo cual condiciona el tipo de catión que puede incorporarse. De ahí que además de la valencia y carga de los iones metálicos también sea determinante en el proceso de unión, su tamaño, radio iónico y geometría. La desacetilación del mauro permite una mayor retención para la mayor parte de los cationes metálicos ensayados (Arias y col., 2003), aunque para la captación de plomo esta modificación química del polímero no resulta satisfactoria.

CAPÍTULO 4

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS TUMORALES DE EPS SULFATADOS

RESUMEN

Los exopolisacáridos sulfatados son poco frecuentes entre los de origen microbiano. Sin embargo, el grupo de microorganismos halófilos estudiados en este trabajo sintetizan en todos los casos polímeros en cuya composición se han detectado grupos sulfato. Se ha descrito previamente que determinados exopolisacáridos sulfatados tienen actividad moduladora de la proliferación sobre distintos tipos celulares. En este trabajo hemos puesto de manifiesto la actividad moduladora sobre la proliferación de células tumorales humanas de los heteropolisacáridos FP34 de *Halomonas anticariensis* y B100 y N12 de *Halomonas maura*, y hemos demostrado la importancia de los grupos sulfato en dicha actividad biológica, comparando la acción de dichos polímeros con sus análogos sulfatados y desulfatados químicamente. Entre los EPS ensayados destaca el producido por *Halomonas maura* B100; en estado nativo, es capaz de inhibir en un 50,35% la proliferación de las células Jurkat, en un 47,75% la proliferación de las células CEM, y en un 35,65% la proliferación de las células HEL. Este mismo polímero, tras ser sometido a un proceso de sulfatación química disminuye dramáticamente la proliferación de estas tres líneas celulares ensayadas, de manera que los porcentajes de inhibición de la proliferación celular llegan a ser del 98,3%, 93,5% y 80%, respectivamente.

Aunque hasta hace unos años se pensaba que la presencia de grupos sulfato era exclusiva de los polisacáridos de organismos eucariotas, se ha demostrado la existencia de estos grupos en algunos exopolisacáridos microbianos. Así, además de estar presentes en polímeros de ciertas especies de cianobacterias (Bar-Or y Shilo, 1987; Tease y Walker, 1987; Sudo y col., 1995), también se han encontrado en el polisacárido producido por la arquea halófila *Haloferax mediterranei*, que se caracteriza por una elevada masa molecular, además de por originar soluciones viscosas, presentando un 6% (p/p) de sulfatos (Antón y col., 1988; Rodríguez-Valera y col., 1991), así como en un EPS de *Staphylococcus epidermis* (Arvaniti y col., 1994). Algunas bacterias marinas (Matsuda y col., 1993; Guezennec y col., 1994; Rougeaux y col., 1998; 1999) también se caracterizan por la detección de sulfatos en sus exopolisacáridos; los polímeros de distintas especies de *Arthrobacter* (Inoue y col., 1988) o los sintetizados por bacterias pertenecientes a distintos grupos taxonómicos aisladas del Antártico (Mancuso-Nichols y col., 2005) presentan igualmente cantidades significativas de restos sulfato en su composición.

Todos los exopolisacáridos analizados en este trabajo presentaron en cantidades mayores o menores grupos sulfato, como puede apreciarse en la Tabla X del Capítulo III. Composición química y masa molecular de los exopolisacáridos. La presencia de grupos sulfato en nuestros exopolisacáridos es una característica compartida con la mayoría de polisacáridos producidos por distintas cepas de *Halomonas eurihalina* (Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998). De igual manera, el maurano, sintetizado por *Halomonas maura* cepa S30, presenta en su composición química un 6,5% (p/p) de grupos sulfato (Arias y col., 2003).

Los exopolisacáridos sulfatados presentan propiedades biológicas muy interesantes. La similitud de estos EPS con la heparina debido su carácter sulfatado puede convertirlos en potenciales agentes **anticoagulantes y antitrombóticos**, teniendo en cuenta que los grupos sulfato desempeñan un papel crítico en la actividad antitrombótica de la heparina (Lindahl, 1999). Por otra parte, los polímeros sulfatados pueden interferir en la adsorción y penetración de determinados retrovirus. Es por ello que pueden ser empleados como **antivirales** (Nakashima y col., 1987; Bagasa y Lischner, 1988; Hasui y col., 1995; Hayashi y Hayashi, 1996; Hayashi y col., 1996; Witvrouw y de Clercq, 1997; Cáceres y col., 2000; Yim y col., 2004). En estos polímeros se ha puesto de manifiesto, de igual forma, una **acción antitumoral** (Itoh y col., 1993; Riou y col., 1996; Haroun-Bouhedja y col., 2000; Sogawa y col., 2000; Patel y col., 2002; Koyanagi y col., 2003; Matou y col., 2005). El cáncer es, a pesar de que a menudo se descubren nuevas herramientas para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Por ello, la comunidad científica continúa a la búsqueda de nuevos medicamentos con una mayor actividad y una menor toxicidad, entre los que parece que se pueden encontrar los polisacáridos extraídos de plantas, algas, hongos, levaduras, setas, líquenes y bacterias (Lin y col., 2003; Ooi y Liu, 2000; Franz y Alban, 1995).

Basándonos en la naturaleza sulfatada de los exopolisacáridos sintetizados por nuestras bacterias, y de acuerdo a los antecedentes existentes, en este trabajo hemos estudiado la acción

moduladora sobre la proliferación de células cancerosas de los EPS producidos por *Halomonas maura* B100 y N12 y por *Halomonas anticariensis* FP34, es decir, aquellos que presentaron una mayor cantidad de restos sulfato en su composición, utilizando como controles estos mismos polímeros desulfatados e hipersulfatados químicamente, para intentar poner de manifiesto la importancia de estos sustituyentes en la actividad biológica de nuestros biopolímeros.

4.1. Desulfatación e hipersulfatación de los exopolisacáridos

La eliminación de los grupos sulfato de los exopolisacáridos sintetizados por *Halomonas anticariensis* FP34 y *Halomonas maura* B100 y N12 se realizó por solvolisis a 100°C. La sal pirimidínica de cada uno de los exopolisacáridos se trató con metanol en dimetilsulfóxido durante 60 minutos, tiempo tras el cual la reacción se detuvo por adición de agua. La desulfatación de los exopolisacáridos es un proceso que comienza casi inmediatamente, y que aumenta progresivamente con el tiempo (Inoue y Nagasawa, 1976; Haroun-Bouhedja y col., 2000). Tras este tratamiento la cromatografía de intercambio iónico reveló que los tres exopolisacáridos objeto de estudio habían perdido por completo los grupos sulfato presentes en la composición de los polímeros en estado nativo. La integridad de los exopolisacáridos desulfatados se comprobó determinando por cromatografía de exclusión de alta resolución la masa molecular de los mismos. Tal y como ha sido descrito para los fucanos sintetizados por algas marrones (Haroun-Bouhedja y col., 2000), la desulfatación es un tratamiento que no llevó a la degradación de los EPS, ya que su masa molecular se mantuvo del todo inalterada.

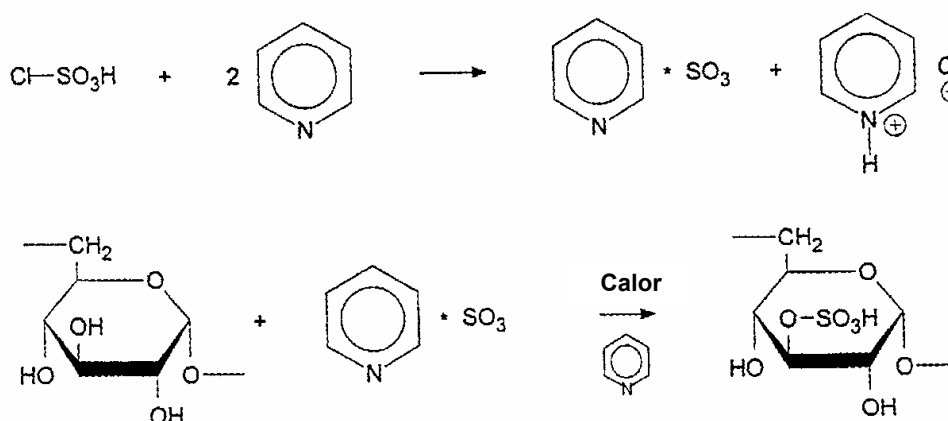


Figura 138. Sulfatación de polisacáridos con el complejo piridina-SO₃ (Mähner y col., 2001)

La adición de restos sulfato a los exopolisacáridos FP34, B100 y N12 se realizó por el protocolo de sulfatación directa de fucanos (Nishino y Nagumo, 1992) con el complejo piridina-SO₃ (Figura 138). Este tratamiento nos permitió obtener el polímero FP34 sulfatado, con un 7% (p/p) de sulfatos, el polímero B100 sulfatado, con un 12,5% (p/p) de sulfatos, y el polímero N12 sulfatado, con un contenido del 17%

(p/p) en grupos sulfatos. Además del grado de sulfatación, otro parámetro a tener en cuenta a la hora de evaluar un proceso de sulfatación es la masa molecular del polímero resultante, y es que la degradación de los polisacáridos es un problema común durante la sulfatación (Engelskirchen, 1987; Whistler y Spencer, 1961). Como para el proceso de desulfatación de los EPS, comprobamos por cromatografía líquida de alta resolución que nuestros polímeros no habían sufrido ningún tipo de degradación tras el tratamiento con el complejo piridina-SO₃, ya que la masa molecular permaneció inalterada en todos los casos. Posiblemente, hemos evitado la degradación de los exopolisacáridos gracias a la utilización de bajas temperaturas en el protocolo de sulfatación (45°C), y es que se ha comprobado que temperaturas más elevadas y mayores cantidades del complejo piridina-SO₃ pueden aumentar el grado de sulfatación obtenido, aunque se produce una considerable disminución de la masa molecular de los productos así conseguidos (Lu y col., 2000; Yang y col., 2002).

4.2. Actividad antiproliferativa sobre células hematopoyéticas de los exopolisacáridos con distinto grado de sulfatación

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con tres estirpes de células humanas tumorales hematopoyéticas, Jurkat, CEM y HEL. A partir de una concentración inicial de 12500 y 25000 células/pocillo, se ensayó la adición a cada uno de los cultivos de dosis crecientes de exopolisacárido. Tras la incubación a 37° C en atmósfera de CO₂, durante 24, 48 y 72 horas, procedimos a evaluar la proliferación celular en cada caso, empleando para ello el compuesto MTT, el cual una vez incorporado por las células vivas, y reducido a nivel mitocondrial, se transforma en el compuesto formazan, que da una coloración violeta medida como absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (Figura 139).

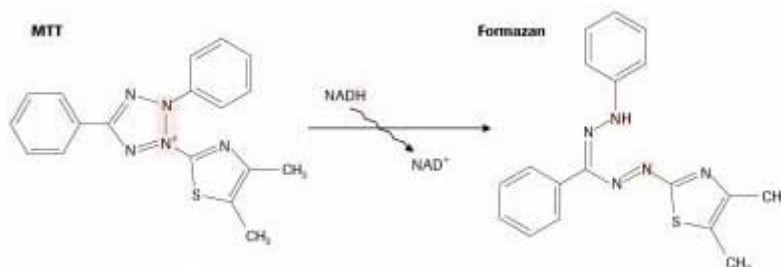


Figura 139. Test de proliferación celular empleando MTT (Mosman, 1983).

Las Figuras 140-148 muestran el efecto de los exopolisacáridos FP34 de *Halomonas anticariensis* y B100 y N12 de *Halomonas maura*, en estado nativo y tras ser sometidos a los procesos de sulfatación y desulfatación, sobre la proliferación de las células Jurkat, CEM y HEL (25000 células/pocillo). Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular tras tres días de incubación, y representan la media de al menos tres experimentos.

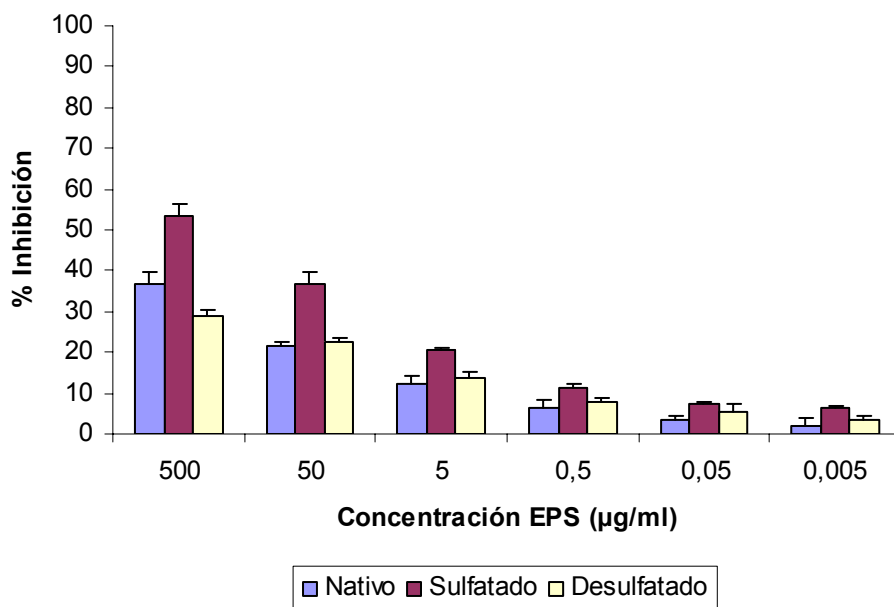


Figura 140. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de *Halomonas anticariensis* FP34.

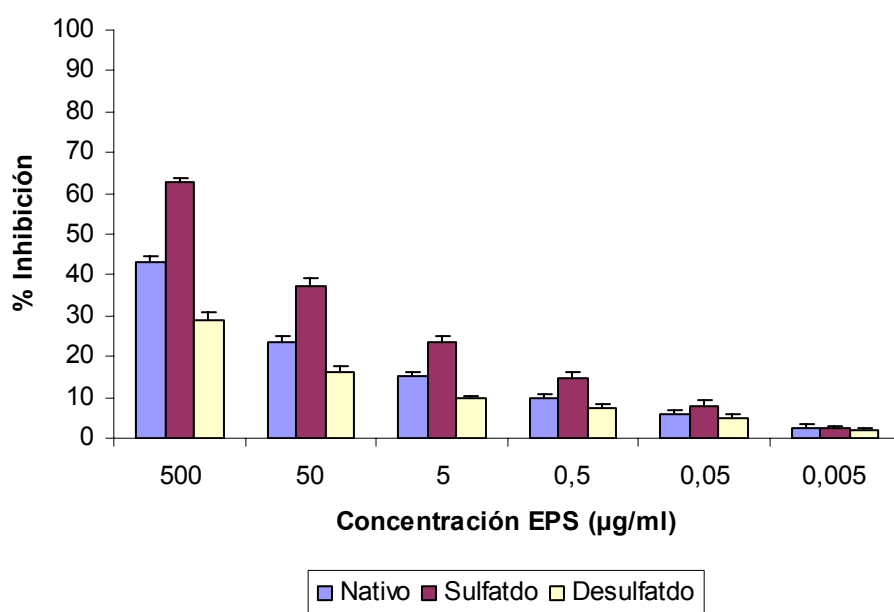


Figura 141. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de *Halomonas anticariensis* FP34.

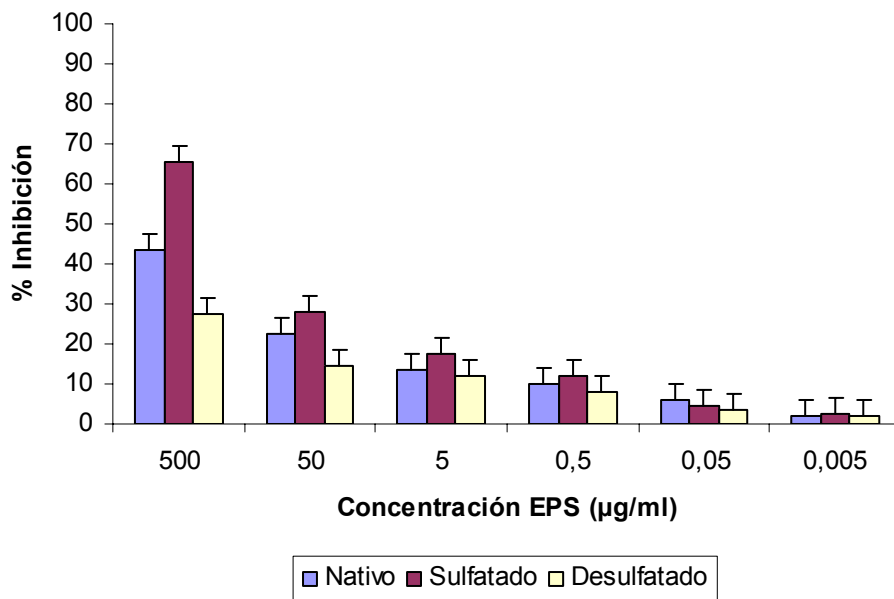


Figura 142. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de *Halomonas anticariensis* FP34.

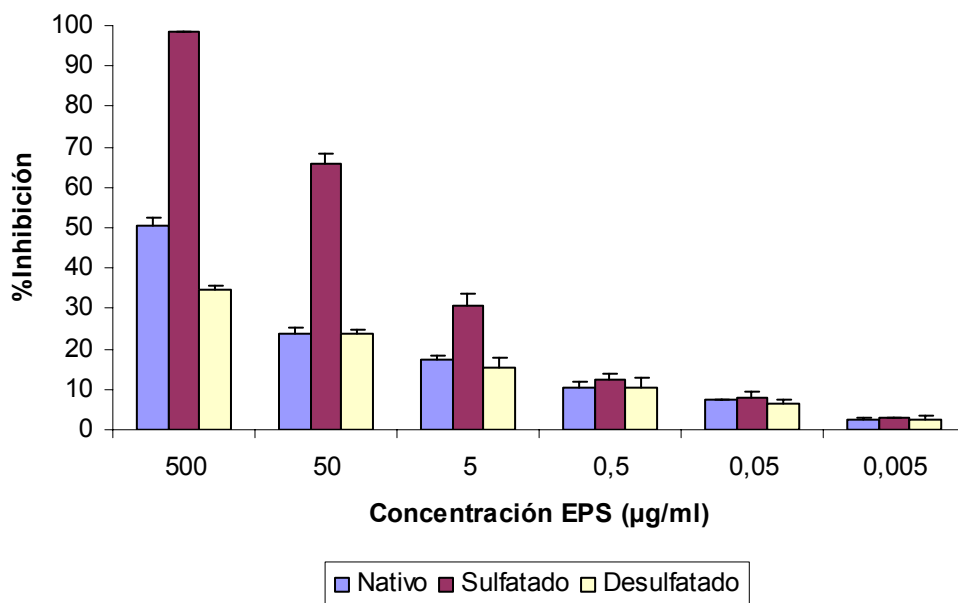


Figura 143. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de *Halomonas maura* B100.

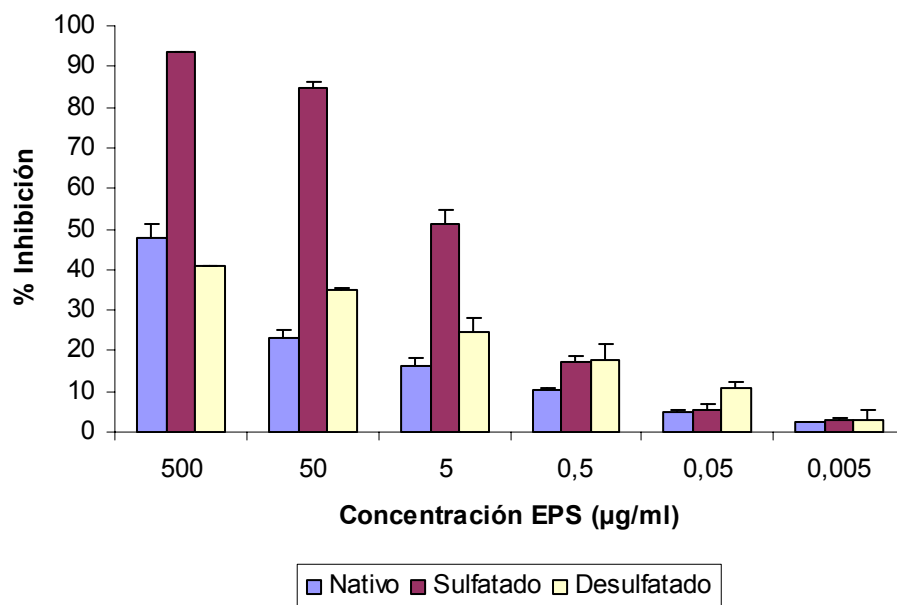


Figura 144. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de *Halomonas maura* B100.

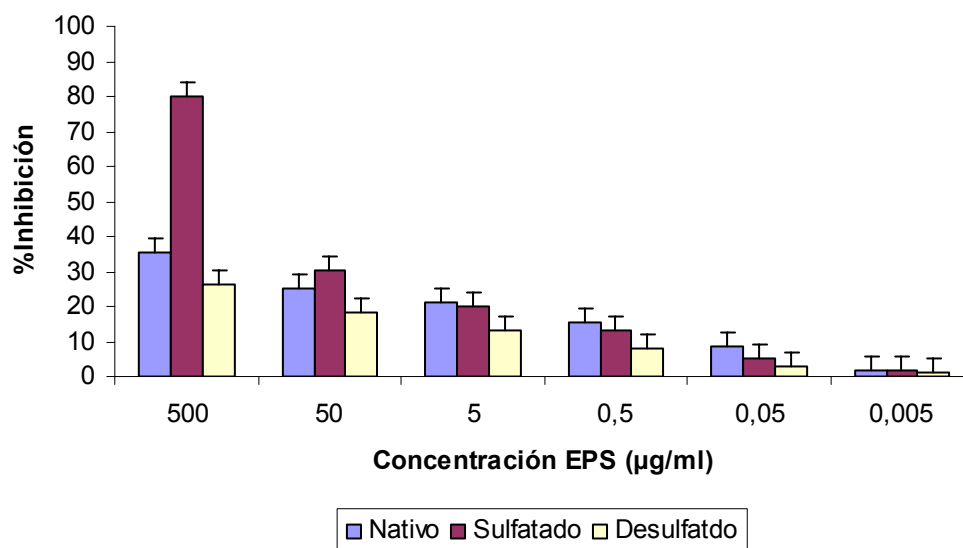


Figura 145. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de *Halomonas maura* B100.

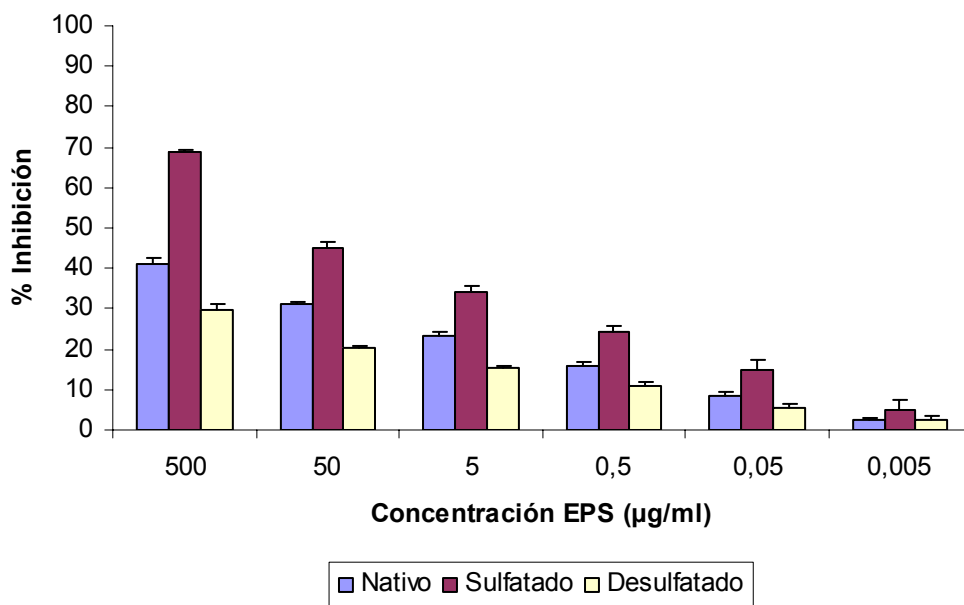


Figura 146. Efecto sobre la proliferación de células Jurkat de los EPS de *Halomonas maura* N12.

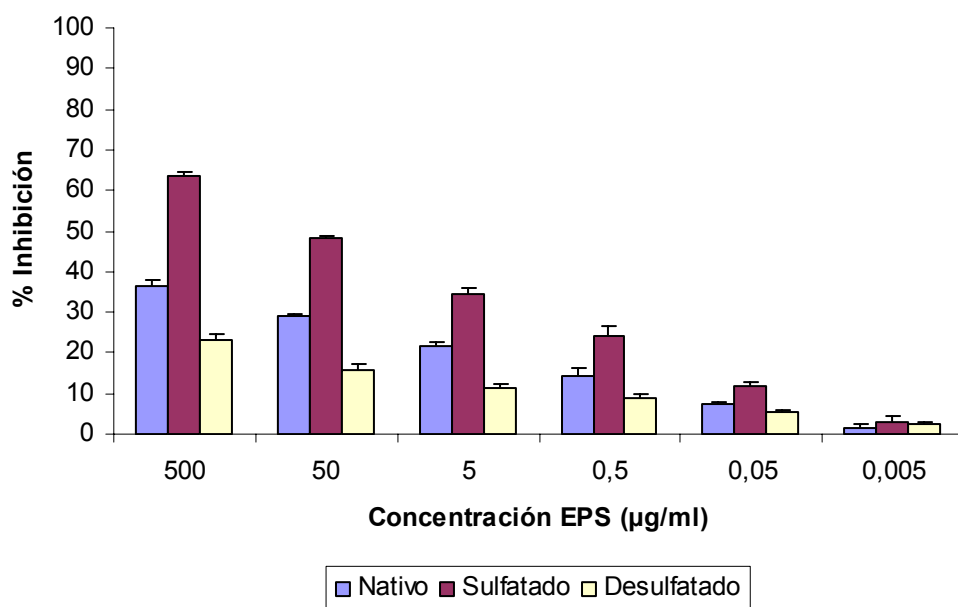


Figura 147. Efecto sobre la proliferación de células CEM de los EPS de *Halomonas maura* N12.

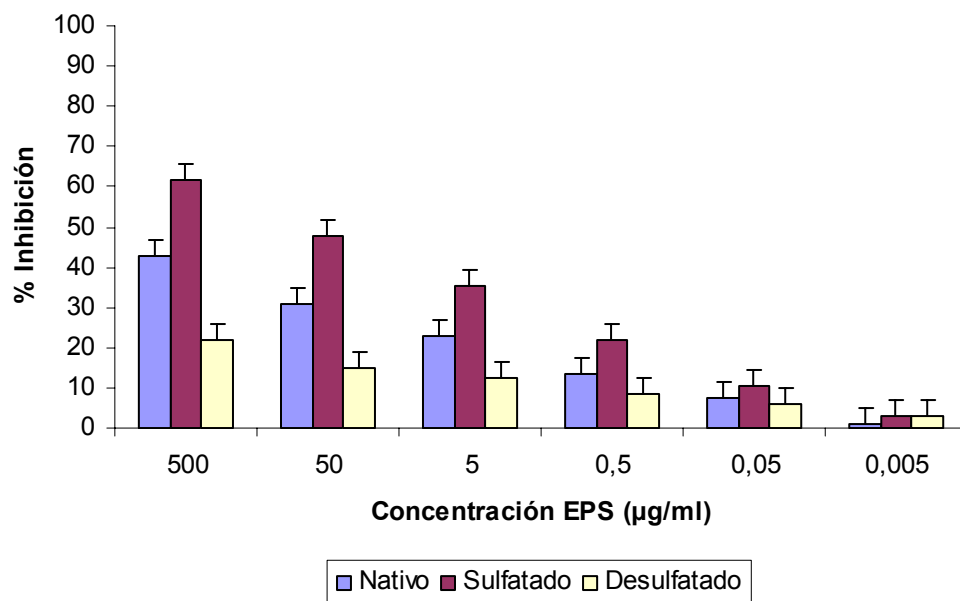


Figura 148. Efecto sobre la proliferación de células HEL de los EPS de *Halomonas maura* N12.

Los exopolisacáridos FP34, B100 y N12, así como sus análogos sulfatados y desulfatados químicamente, redujeron la proliferación de las células Jurkat, CEM y HEL de una manera dosis-dependiente. Este efecto es detectable incluso a bajas concentraciones de exopolisacárido (0,005 µg/ml) y aumenta con el contenido en grupos sulfato (Figuras 149-151) y la dosis de EPS empleada, alcanzando máximos de inhibición de la proliferación celular comprendidos entre 53,5 y 98,3% para los exopolisacáridos sulfatados químicamente a una concentración de 500 µg/ml.

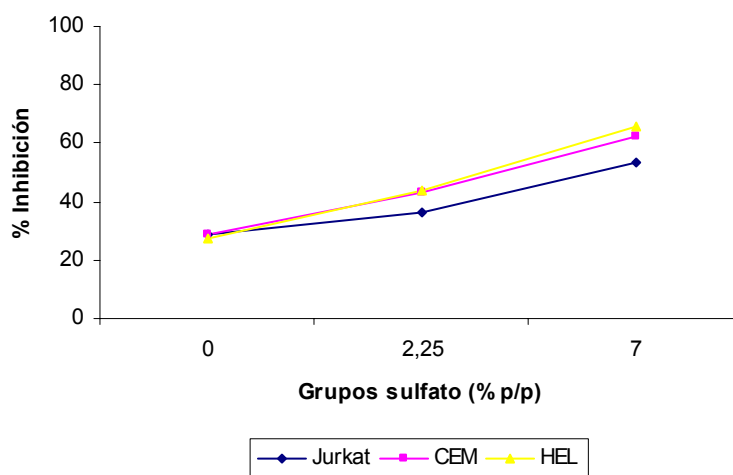


Figura 149. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS FP34 de *Halomonas anticariensis*, tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml.

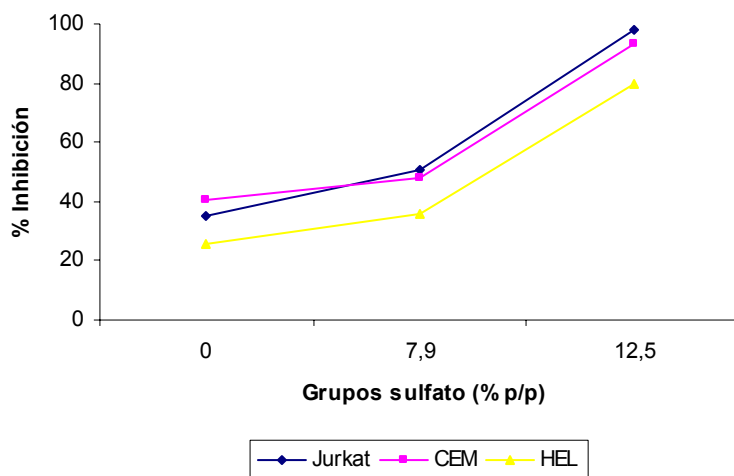


Figura 150. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS B100 de *Halomonas maura*, tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml.

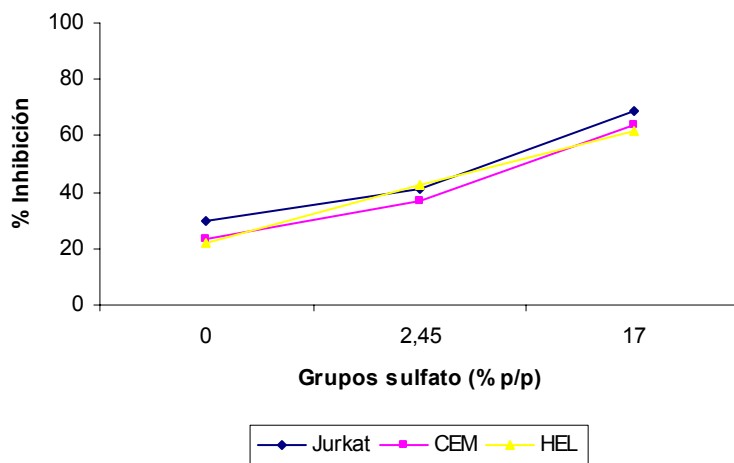


Figura 151. Influencia de los grupos sulfato en la actividad antiproliferativa del EPS N12 de *Halomonas maura*, tras 72 horas de incubación, a una concentración de 500 µg/ml.

Hay que destacar que, como bien puede apreciarse en las Figuras 140-148, los exopolisacáridos FP34, B100 y N12 desulfatados por solvolisis en dimetilsulfóxido, también presentan actividad inhibitoria de la proliferación celular en mayor o menor medida, lo que nos lleva a pensar que el contenido en grupos sulfato no es el único parámetro determinante de la actividad biológica de nuestros exopolisacáridos; sin embargo, como muestran las experiencias que hemos realizado, la actividad antiproliferativa de los polímeros hipersulfatados es considerablemente mayor a la de los EPS en estado nativo y desulfatados, lo que nos lleva a pensar que esta acción biológica está específicamente relacionada con la presencia de

estos grupos sulfato. Haroun-Bouhedja y colaboradores (2000) pusieron de manifiesto que la actividad antiproliferativa sobre células malignas de fucanos sulfatados obtenidos a partir de algas marrones, depende no sólo del contenido en restos sulfato de los mismos, sino que hay otros factores implicados en la acción biológica de estos EPS, como la masa molecular, otras cargas negativas distintas a las aportadas por los sulfatos, y la distribución de las cargas negativas, distribución que puede constituir un patrón determinante para el reconocimiento de señales biológicas envueltas en los procesos de proliferación celular, y con ello interferir en tales procesos. Por tanto, y en definitiva, la acción antiproliferativa de nuestros exopolisacáridos depende, aunque no exclusivamente, del contenido en sulfatos de los mismos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en muchos estudios con otros exopolisacáridos sulfatados y otras líneas celulares (Koyanagi y col., 2003; Ellouali y col., 1994; Tiozzo y col., 1991; 1993; Vischer y Buddecke, 1991).

Todos los exopolisacáridos ensayados presentan actividad antiproliferativa, y esta acción está directamente relacionada, como hemos visto, con su contenido en grupos sulfatos, y también con la dosis de exopolisacárido empleada, es decir, es un efecto dosis-dependiente. Esta relación entre la cantidad de exopolisacárido presente en el medio de cultivo empleado para el desarrollo de las células y el porcentaje de inhibición de la proliferación celular ha sido descrita para una gran cantidad de polisacáridos de distinto origen (Cao y Lin, 2006; Bae y col., 2005; 2006). Sin embargo, un dato importante que debemos destacar es que la actividad moduladora de la proliferación celular de nuestros exopolisacáridos es independiente del tiempo de incubación; así, los porcentajes de inhibición del crecimiento de las distintas líneas celulares empleadas en este trabajo son máximos tras 72 horas de incubación a 37°C con un 5% de CO₂ (Figuras X), pero prácticamente iguales a los obtenidos tras 24 y 48 horas de incubación (datos no mostrados). Estos resultados discrepan con los de otros autores, que han encontrado que para otros polisacáridos de origen diverso y distintas líneas celulares, la acción antitumoral está estrechamente relacionada con el tiempo de incubación, de manera que cuanto más tiempo dejamos transcurrir, mayor es el porcentaje de inhibición de la proliferación celular (Zhang y Huang, 2005; 2006; Lin y col., 2003).

Como ya hemos comentado al comenzar este capítulo, hasta hace pocos años se pensaba que la presencia de grupos sulfato era una característica química exclusiva de los polisacáridos de origen eucariota; sin embargo, hoy día sabemos que esto no es cierto, y es que como hemos comentado, cada vez se describen más exopolisacáridos microbianos sulfatados (Bar-Or y Shilo, 1987; Tease y Walker, 1987; Sudo y col., 1995; Antón y col., 1988; Rodríguez-Valera y col., 1991; Arvaniti y col., 1994; Matsuda y col., 1993; Guezennec y col., 1994; Rougeaux y col., 1998; 1999; Inoue y col., 1988; Mancuso-Nichols y col., 2005; Béjar y col., 1998; Calvo y col., 1998; Arias y col., 2003). A pesar de todo, son muy pocos los trabajos publicados acerca de la actividad biológica de exopolisacáridos sulfatados extraídos de bacterias, todo lo contrario a lo que ocurre con los polímeros obtenidos a partir de eucariotas, como plantas, hongos, setas, algas, etc. Así, el exopolisacárido V2-7, sintetizado por *Halomonas eurihalina*, estimula el sistema inmune (Pérez y col., 2000). *Alteromonas infernus*, produce un EPS ácido constituido por glucosa, galactosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico, con un 10% (p/v) de restos sulfato, y que ha

demostrado poseer una considerable actividad anticoagulante (Colliec-Jouault y col., 2001), sobre todo tras ser sometido a un proceso de hipersulfatación con el complejo piridina-SO₃. Así mismo, el polisacárido sintetizado por *Escherichia coli* K5, tras ser sulfatado químicamente, ha demostrado que podría utilizarse en una terapia anti-VIH, virus causante del SIDA, o al menos, servir como base para el desarrollo de nuevos medicamentos contra esta enfermedad (Urbinati y col., 2004).

Por tanto, los estudios de actividad antitumoral realizados con nuestros exopolisacáridos, sintetizados por bacterias halófilas, podrían ser pioneros en este campo, y podrían constituir la base para la selección de nuevos agentes anticancerosos, y es que cada vez es mayor el interés en buscar productos de origen natural con esta actividad biológica, y efectos secundarios menores a los que presentan los quimioterápicos utilizados en la actualidad (Deshpande y col., 1997; Lee, 2004). De los tres exopolisacáridos estudiados (FP34, B100 y N12), el que presenta las mejores perspectivas de ser utilizado algún día en la terapia anticancerosa, es el polímero B100 sintetizado por *Halomonas maura*. En estado nativo, tal y como es excretado por la bacteria al medio de cultivo, es capaz de inhibir en un 50,35% la proliferación de las células Jurkat, en un 47,75% la proliferación de las células CEM, y en un 35,65% la proliferación de las células HEL (Figuras X), cuando es administrado a una población de 25000 células a una dosis de 500 µg/ml, tras tres días de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂. Estos resultados son de por sí prometedores, pero es que este mismo polímero, tras ser sometido a un proceso de sulfatación química con el complejo piridina-SO₃, disminuye dramáticamente la proliferación de estas tres líneas celulares ensayadas, en las mismas condiciones antes expuestas, de manera que los porcentajes de inhibición de la proliferación celular llegan a ser del 98,3%, 93,5% y 80%, respectivamente.

Por ejemplo, el exopolisacárido extraído de *Lycium barbarum*, una planta utilizada desde hace miles de años por la medicina tradicional china, es capaz de inhibir un 30% la proliferación de las células malignas QGY7703, tras 4 días de incubación, y además a una concentración mucho más elevada, 100 mg/ml (Zhang y col., 2005). El alga marrón *Ascophyllum nodosum* es capaz de sintetizar un fucano de baja masa molecular con un contenido del 27% (p/v) en grupos sulfato; este polímero inhibe la proliferación de las células CCL39 hasta en un 100%, tras 4 días de incubación, aunque también a dosis mayores a la máxima empleada en nuestro estudio, 1000 µg/ml (Haroun-Bouhedja y col., 2000). *Cladonia furcata* es un líquen que crece con frecuencia en muchos bosques del mundo, también es España, y a partir del cual se puede obtener un polisacárido denominado CFP-2, el cual, administrado a una concentración de 800 mg/l, y tras 6 días de incubación, inhibe en un 70% la proliferación de las células HL-60 y en un 60% la proliferación de las células K562 (Lin y col., 2003). Los polisacáridos extraídos a partir de las setas, también poseen una considerable actividad antitumoral (Cheung y col., 2002; Wasser, 2002). Por ejemplo, el polímero obtenido a partir de *Phellinus gilvus*, es capaz, a una concentración de 300 µg/ml, y tras 48 horas de incubación, inhibir aproximadamente en un 90% la proliferación de las células cancerosas TMK-1 y B16F10 (Bae y col., 2005; 2006). El problema de la utilización de estos polisacáridos extraídos de hongos y setas en terapia anticancerosa, es que para obtener la seta en las condiciones apropiadas para la extracción del polímero, hay que cultivarla durante unos 90 días (Jo y col.,

2002), mientras que nuestros polisacáridos, extraídos igualmente de una fuente inagotable y renovable, como son los microorganismos, son obtenidos por un proceso mucho más rápido y mucho menos laborioso (Quesada y col., 1993). Algunos polímeros procedentes de hongos y setas, y después de numerosos estudios, como los extraídos de *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* y *Coriolus versicolor*, (Chiara y col., 1970; Tsukagoshi y Ophashi, 1974), se utilizan hoy día como adyuvantes en la terapia anticancerosa (Bae y col., 2005), lo que nos invita a pensar que los exopolisacáridos sulfatados producidos por nuestras bacterias halófilas podrían seguir el mismo camino y convertirse en agentes antitumorales empleados por los oncólogos en la lucha contra el cáncer.

Sin embargo, muchos son los pasos que aún debemos dar para que nuestra investigación llegue a buen puerto; por ejemplo deberíamos ampliar el abanico de células malignas sobre las cuales nuestros exopolisacáridos son efectivos, disminuyendo la proliferación celular; de igual manera, deberíamos comprobar la toxicidad de los polímeros sobre células no cancerosas; Bae y colaboradores (2003; 2006) han demostrado *in vivo* la nula toxicidad del exopolisacárido extraído a partir de una seta, *Phellinus gilvus*, a las dosis administradas por vía oral a animales de experimentación; este hecho es fundamental, porque como ya hemos comentado, es creciente en nuestros días el interés por los productos de origen natural, con actividad antitumoral, y con una menor toxicidad que los compuestos normalmente empleados en quimioterapia, muy agresivos (Deshpande y col., 1997; Lee, 2004).

Igualmente se hace imprescindible conocer el mecanismo por el cual los exopolisacáridos sintetizados por nuestros microorganismos halófilos presentan esta acción antitumoral; el elevado peso molecular de los mismos, nos hace pensar que estas macromoléculas no son capaces de interactuar directamente con enzimas y orgánulos intracelulares; más bien, nos inclinamos a pensar en la posibilidad de que los exopolisacáridos FP34 de *Halomonas anticariensis* y B100 y N12 de *Halomonas maura* son capaces de inhibir la proliferación de las células malignas ensayadas por una inducción de la apoptosis, y en esa dirección se dirigirán nuestros esfuerzos más inminentes, y es que la muerte celular en los procesos tumorales, ya sea inducida o natural, se da más por apoptosis que por necrosis (Wyllie y col., 1980; Arend y col., 1990).

La apoptosis o “muerte celular programada” es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario (Oppenheim, 1991; Barres y col., 1992). Determinados hechos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumorales. Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores (Korsmeyer, 1992).

Las características de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. En este último fenómeno la muerte es un proceso “pasivo” que no requiere síntesis de

proteínas, y es causado por la pérdida de la homeostasis. Se caracteriza por daño mitocondrial, rotura de la membrana, lisis celular y liberación de su contenido al medio extracelular (Wyllie y col., 1980; Raff, 1992). Por el contrario, la apoptosis, es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Durante el proceso final se produce la fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN, y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de inflamación (Cohen, 1993; Wyllie y col., 1984). Muchas de las proteínas sintetizadas durante el proceso de apoptosis (por ejemplo, NUC-18, DNAsa I, DNAsa II; Peitsch, 1994) son enzimas calcio dependientes, por lo que la concentración de iones Ca^{2+} en la célula es un parámetro muy importante en la apoptosis. Los genes de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental en el fenómeno apoptótico. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de las proteínas sintetizadas por los genes de esta familia, actuando unas como promotoras, y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise y col., 1993; 1995).

Gymnodinium A3 cepa OKU-1 (Hasui y col., 1995) es un microalga capaz de sintetizar un exopolisacárido sulfatado que ha mostrado una gran capacidad citotóxica hacia diversas líneas de células tumorales humanas, como son las células MT-4, CEM y K562; parece ser que el mecanismo por el cual actúa este polisacárido es una inducción de la apoptosis, y concreto en el caso de las células K562, esa apoptosis parece estar inducida por la inhibición del enzima ADN Topoisomerasa I (Sogawa y col., 1998; 2000). Ya hemos hablado del polisacárido sintetizado por la seta *Phellinus gilvus*, que es capaz de inhibir aproximadamente en un 90% la proliferación de las células cancerosas TMK-1 y B16F10 (Bae y col., 2005; 2006); en este caso también se ha demostrado que el efecto citotóxico se debe a la inducción de la apoptosis en estas células malignas. El exopolisacárido obtenido a partir de una seta de la misma familia, *Phellinus linteus* ha mostrado a su vez una acción antiproliferativa en células SW480, y esta propiedad se ha atribuido a su capacidad de promover el fenómeno de apoptosis, y es que la expresión del gen anti-apoptosis Bcl-2 se encuentra muy disminuida tras el tratamiento de las células cancerosas con el polímero (Li y col., 2004). Un mecanismo similar ha sido descrito para el polisacárido producido por *Misgurnus anguillicaudatus*, otra seta, que induce apoptosis en las células tumorales SMMC-7721, por represión del gen Bcl-2, y una expresión aumentada del gen Bax, pro-apoptosis (Zhang y Huang, 2006). De igual modo, el extracto acuoso del exopolisacárido producido por *Pleurotus ostreatus* induce apoptosis en las células HT-29, en las que se ha encontrado, tras el tratamiento con el polímero, una expresión aumentada del gen Bax.

Por tanto, nuestros esfuerzos en un futuro cercano se van a centrar en intentar dilucidar el mecanismo por el cual nuestros EPS, fundamentalmente el polímero B100 de *Halomonas maura* y su análogo hipersulfatado, presentan esta marcada acción sobre células cancerosas. De igual modo vamos a evaluar su seguridad ante la posibilidad de ser utilizados en el futuro como agentes antitumorales, ensayando su toxicidad sobre células no malignas, y vamos a comprobar su actividad *in vivo*, en animales de experimentación.

CAPÍTULO 5

EXOPOLISACÁRIDOS MICROBIANOS COMO FUENTE DE L-FUCOSA

RESUMEN

La síntesis química de fucosa es un proceso largo, laborioso, de bajo rendimiento y caro. Por tanto, la hidrólisis química o enzimática de EPS microbianos ricos en este azúcar abre nuevas líneas de investigación para una obtención eficaz y rentable de este monosacárido. El análisis por GLC y GC-MS de los EPS reveló la presencia de fucosa en proporciones importantes en la composición de los polímeros N12 y A16 de *Halomonas maura* (25,69 y 16% p/p, respectivamente) y A3 de *Salipiger mucosus* (13,4% p/p). Independientemente del interés que puede tener la obtención de fucosa en sí, por su alto coste económico, este azúcar y los oligo/polisacáridos ricos en fucosa presentan un interés especial por sus aplicaciones en medicina y cosmética.

En los últimos años, algunos homo y (especialmente) heteropolisacáridos microbianos, se están teniendo en cuenta como potenciales fuentes de inusuales pero muy valiosos azúcares, como por ejemplo es el caso de la fucosa. La síntesis química de la fucosa es un proceso largo, muy laborioso, de bajo rendimiento y caro (Tanimura, 1961; Chiba y Tejima, 1979; Defaye y col., 1984; Gesson y col., 1992; Dejter-Juszynski y Flowers, 1973; Kristen y col., 1988; Sarbajna y col., 1995). Por tanto, la hidrólisis química o enzimática de exopolisacáridos microbianos ricos en este azúcar abre nuevas líneas de investigación para una obtención eficaz y rentable de este monosacárido. Se han descrito distintas bacterias, hongos y algas productores de exopolisacáridos en cuya composición podemos encontrar fucosa en mayor o menor medida (Vanhooren y Vandamme, 1999), destacando *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 12657 y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa LMG 5604 (Vanhooren, 1997).

Klebsiella pneumoniae cepa ATCC 12657 produce, utilizando glucosa como fuente de carbono y controlando el pH a 6,5, un exopolisacárido que contiene un 18,9% p/p de fucosa; teniendo en cuenta que este microorganismo es capaz de sintetizar 2,5 g/l de EPS, la hidrólisis eficaz de este polímero permitiría obtener unos 0,5 g/l de fucosa libre. Vanhooren y colaboradores (1997) han aislado diversas enzimas (denominadas genéricamente EPSasas) de microorganismos que son capaces de crecer utilizando como única fuente de carbono y energía el exopolisacárido producido por *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 12657, y en la actualidad están estudiando el uso de las mismas para conseguir liberar fucosa de este biopolímero.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* cepa LMG 5604 produce en condiciones óptimas de cultivo 20 g/l de un exopolisacárido, denominado clavano, el cual contiene un 37,5% p/p de fucosa; por tanto, una hidrólisis eficiente de este polímero podría suponer la obtención de 7,5 g/l de fucosa. Vanhooren y colaboradores (1997) ensayaron la adición de un 2% de pectinasa TLQ a los cultivos de este microorganismo, con la intención de, por un lado, disminuir la viscosidad de los mismos, y por otro, obtener fucosa libre. En estos ensayos, se consiguió disminuir un 85% la viscosidad de los cultivos, pero en ningún caso se consiguió obtener fucosa libre. Por tanto, este Grupo de Investigación ha seguido la misma táctica que para el caso de *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 12657, aislando del suelo microorganismos capaces de crecer con clavano como única fuente de carbono y energía; *Streptomyces* sp. YSDL-20 ha sido la cepa seleccionada para la despolimerización de este exopolisacárido (Yemmas y Vandamme, 2001; 2002; Yemmas y col., 2003).

Independientemente del interés que puede tener la obtención de fucosa en sí, por su alto coste económico, este azúcar y los oligo/polisacáridos ricos en fucosa presentan un interés especial por sus aplicaciones en medicina y cosmética. En 2003, Peterszegi y colaboradores consiguieron preparar por hidrólisis enzimática de un exopolisacárido bacteriano de alto peso molecular rico en fucosa, oligosacáridos (**FROPs**) que presentaron diversas propiedades biológicas, como la estimulación de la proliferación de fibroblastos y protección contra la citotoxicidad mediada por ascorbato debido a la liberación de agentes oxidantes (ROS). Los FROPs, administrados junto a las vitaminas A, C y E, han

mostrado también un efecto favorable en la actividad biosintética de los fibroblastos (Robert y col., 2004a), y se han mostrado altamente eficaces en el control de las modificaciones que se producen en la piel a causa del envejecimiento (Robert y col., 2004b). En 2005, Robert y colaboradores prepararon una formulación cosmética a base de FROPs, y la probaron en un grupo de 20 mujeres voluntarias, en un tratamiento de 4 semanas contra las arrugas que se forman con la edad cerca de los ojos, las llamadas “patas de gallo”, y obtuvieron resultados realmente prometedores, aunque detectaron que cada “pata de gallo” es prácticamente única e inconfundible, ya que el tratamiento, aunque eficaz en la mayoría de los casos (todos excepto en dos mujeres), variaba entre mujeres, e incluso en la misma voluntaria de un ojo a otro.

En otro orden de cosas, y ya en el campo de la medicina, Isnard y colaboradores (2005) han demostrado que una dosis de 0,5 mg/ml de fucosa es capaz de regenerar en apenas 24 horas las heridas causadas en corneas de conejo, por lo que otra posible aplicación de la fucosa y los FROPs podría ser el tratamiento local de las heridas que se pudieran producir en la cornea.

Otra aplicación de los FROPs es su utilización en la prevención de la diarrea infantil, una de las causas más frecuentes de mortalidad infantil. Se ha demostrado (Ruiz-Palacios y col., 2003) que el primer paso en la patogenia de *Campylobacter jejuni*, el principal causante de este mal, es la unión del mismo a la mucosa intestinal, y que esta unión está fuertemente inhibida por los fucosiloligosacáridos que se encuentran formando parte de la composición de la leche materna. La utilización de estos oligosacáridos como ingredientes activos en alimentos infantiles está limitada en la actualidad por la capacidad de la comunidad científica de producirlos en cantidad suficiente para evaluar su eficacia y su seguridad. La síntesis química o enzimática de los mismos es muy cara, por lo que la producción de oligo/polisacáridos ricos en fucosa a partir de microorganismos es una nueva línea de investigación que puede cumplir las expectativas creadas a este respecto (Newburg y col., 2005).

Como vimos en el Capítulo 2 de la Sección II de este trabajo, el análisis por GLC y GC-MS de los EPS reveló la presencia de fucosa en proporciones importantes en la composición de los polímeros N12 y A16 de *Halomonas maura* (25,69 y 16% p/p, respectivamente) y A3 de *Salipiger mucosus* (13,4% p/p), y en menores cantidades en las fracciones de elevado peso molecular de los polisacáridos A15 de *Halomonas ventosae* y F23 de *Idiomarina fontislapidosi*. Por tanto, en la actualidad, nuestro Grupo de Investigación se encuentra poniendo a punto la tecnología necesaria para la obtención de fucosa libre y oligosacáridos ricos en fucosa a partir de los exopolisacáridos N12 y A16 de *Halomonas maura* y A3 de *Salipiger mucosus*. Concretamente, en estos momentos estamos ensayando la hidrólisis enzimática de los exopolisacáridos.

Una vez conseguido este objetivo, buscaremos aplicaciones de nuestros productos en el campo cosmetológico junto a la empresa granadina GLEY de BRECH S.A., con la cual ya hemos colaborado en otras ocasiones. Al mismo tiempo, iniciaremos una colaboración con el Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, para determinar si nuestros exopolisacáridos o sus derivados tienen carácter prebiótico y podrían utilizarse como ingredientes en formulaciones especialmente ideadas para la alimentación infantil.

SECCIÓN IV
FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS EPS

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS EPS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

RESUMEN

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Para determinar si las cepas objeto de estudio en este trabajo daban lugar a la formación de biofilms, empleamos la técnica de adhesión sobre superficies de PVC y posterior tinción con cristal violeta. A continuación, estudiamos la participación de los exopolisacáridos en la estructura de los biofilms. Para ello elegimos las cepas X2 de *Halomonas maura* y M4 de *Halomonas eurihalina*, es decir, aquellas que daban lugar a una mayor formación de biofilms en todas las condiciones ensayadas, comparando su capacidad para formar estas biopelículas con la de mutantes de ambas cepas deficientes en la síntesis de exopolisacárido, demostrando que la presencia de exopolisacáridos en el medio es fundamental para la formación de biofilms por parte de nuestros microorganismos.

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton y col., 1995). El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilms no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente fundamental del biofilm es el agua, que puede representar hasta el 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001a). En menor cantidad se encuentran otras moléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda y col., 2005).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zona más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrar distintos ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Costerton y col., 1995; Davey y O'Toole, 2000; Stoodley y col., 2002).

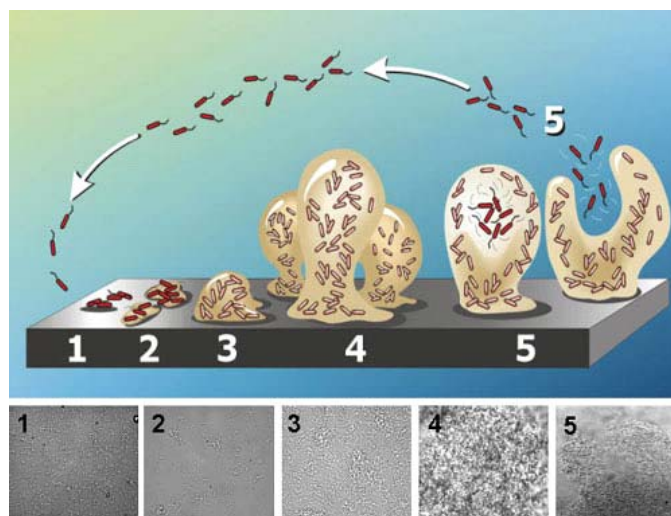


Figura 152. Esquema mostrando las etapas en el proceso de formación del biofilm (Lasa y col., 2005)

El proceso de formación del biofilm se desarrolla en diversas etapas (Figura 152); la etapa inicial es la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram negativas se ha visto que los flagelos, las fimbrias y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria (O'Toole y col., 2000), así como, en

algunos casos, la síntesis de EPS (Hammer y Bassler, 2003). En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie en esta primera etapa (Cucarella y col., 2001; Toledo-Arana y col., 2001). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido, la matriz del biofilm, y forma unas estructuras similares a setas en las cuales se aprecia la presencia de canales. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar otras superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm.

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Un trabajo pionero con *Pseudomonas aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción (Davies y col., 1998). El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. Cuando en el medio extracelular se acumula una cantidad suficiente de autoinductor éste activa un receptor específico (receptor transcripcional) que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos (González y Marketon, 2003). Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm (Bomchil y col., 2003; Kirillina y col., 2004). Finalmente, parece lógico pensar que la formación de biofilms se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia que transmitan la señal al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental (Toledo-Arana y col., 2005).

Independientemente de su abundancia y de la importancia que tienen en la naturaleza, los biofilms también han despertado interés en el mundo civilizado; así, pueden aparecer biofilms en prótesis y catéteres, provocando infecciones crónicas de difícil tratamiento por la resistencia de los microorganismos que forman parte del biofilm a los antibióticos, que no pueden acceder a las células (Costerton y col., 1999; Goto y col., 1999; Mah y O'Toole, 2001; Donlan y Costerton, 2002); de igual modo, los biofilms pueden obturar tuberías (Carr y col., 1996) y contaminar productos alimentarios durante su preparación industrial (Wong, 1998). Sin embargo, los biofilms también pueden presentar algunos efectos beneficiosos, como por ejemplo al actuar como biocontroladores en la prevención de infecciones fúngicas en ciertas plantas (Geels y Schippers, 1983). Dada la importancia de los biofilms en la naturaleza, así como sus implicaciones médicas y en la industria alimentaria, es importante llegar a conocer el mecanismo que gobierna la formación y la disolución de estas comunidades microbianas (Danese y col., 2000), así como las estrategias a seguir para la eliminación de las mismas (Meyer, 2003).

Diversos trabajos con *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* han mostrado que la síntesis de exopolisacáridos se induce una vez que el microorganismo se ha adherido a la superficie en la cual se va a formar el biofilm (Davies y col., 1993; 1995; Prigent-Combaret y col., 1999). Estos resultados no

desvelaron por completo el rol que desempeñan los EPS en la formación de biofilms. Sin embargo, otros estudios con distintos microorganismos Gram negativos y Gram positivos (McKenney y col., 1998; Watnick y Colter, 1999) han revelado que los exopolisacáridos son esenciales en la etapa de adhesión, inicio de la formación del biofilm, para los microorganismos que los producen.

Considerando todos estos precedentes, en este capítulo hemos estudiado la capacidad de nuestros microorganismos halófilos productores de polisacáridos de formar biofilms bajo diversas condiciones ambientales, así como la implicación de dichos exopolisacáridos en la estructura de los biofilms.

1.1. Tinción con cristal violeta

Empíricamente habíamos observado que nuestros microorganismos halófilos daban lugar a la formación de un velo de crecimiento adherido al cristal del tubo de ensayo cuando se cultivaban en medio líquido y se dejaban reposar durante un tiempo prolongado. Para determinar si las cepas estudiadas en este trabajo daban lugar a la formación de biofilms, empleamos la técnica de adhesión sobre superficies de PVC (placas microtiter) y posterior tinción con cristal violeta, según se ha descrito en Material y Métodos (apartado 11.1). Así mismo, variamos diversos parámetros (tiempo de incubación, concentración de sales en el medio de cultivo, riqueza del medio de cultivo) para determinar si la formación de biofilms estaba influenciada por las condiciones ambientales, y en ese caso, ver qué parámetros determinaban una mayor formación de estas biopelículas. En las Figuras 153-155 se muestran los resultados obtenidos tras incubar nuestros microorganismos en agitación bajo las distintas condiciones antes mencionadas.

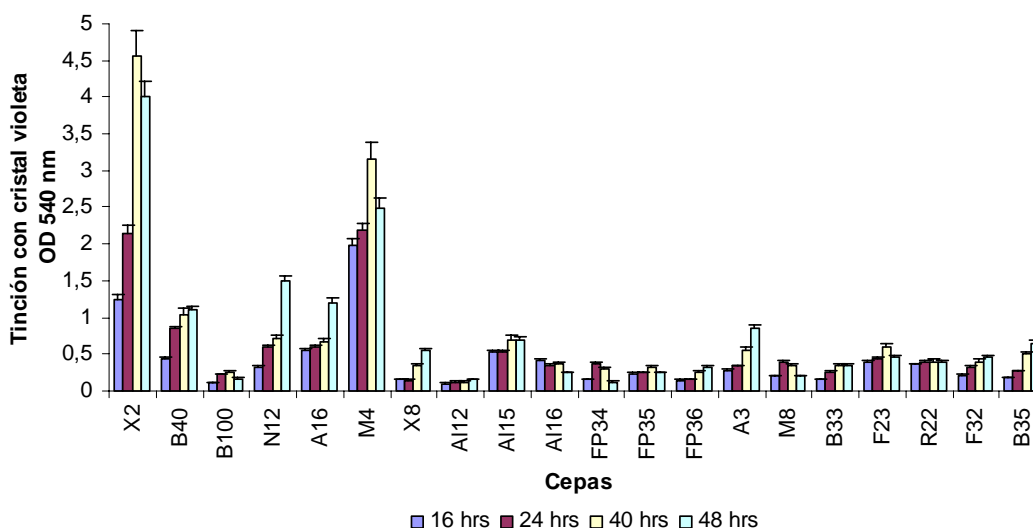


Figura 153. Formación de biofilms a las 16, 24, 40 y 48 horas de incubación en medio MY al 5% (p/v) de sales.

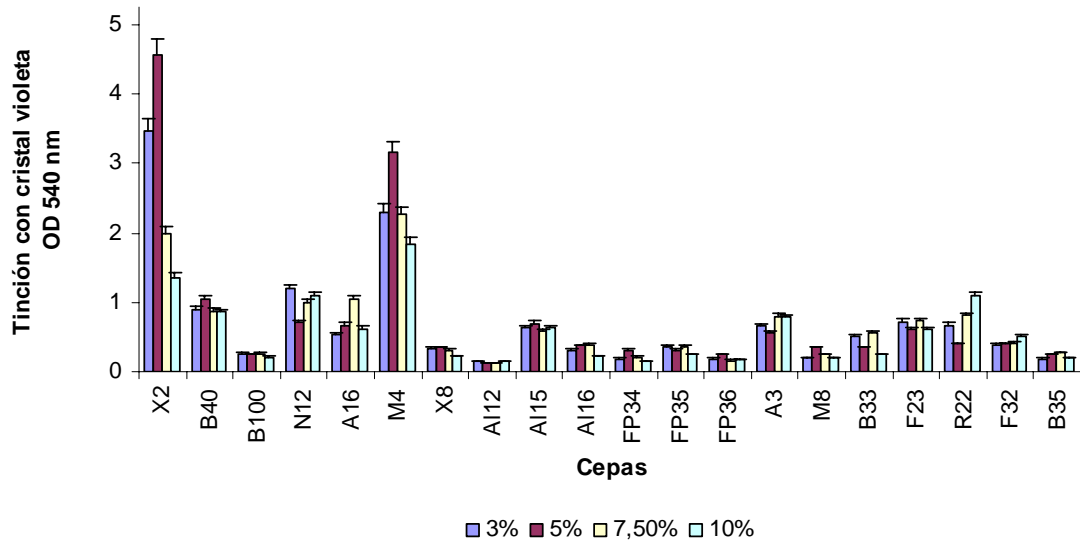


Figura 154. Formación de biofilms en medio MY al 3, 5, 7,5 y 10% (p/v) de sales tras 40 horas de incubación.

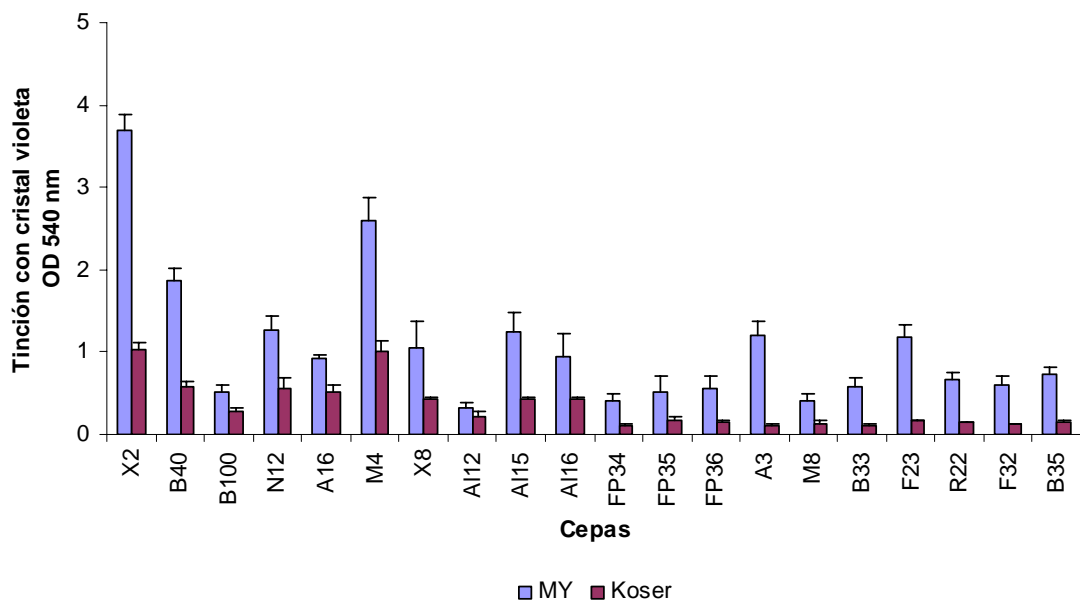


Figura 155. Formación de biofilms en medio MY al 5% (p/v) de sales y medio Koser al 5% (p/v) de NaCl tras 40 horas de incubación.

En las Figuras 153-155 puede observarse como todas las cepas ensayadas fueron capaces de formar biofilms. Como ya hemos comentado, las condiciones ambientales pueden afectar la formación de biofilms; en efecto, para nuestras cepas, el tiempo de incubación, la concentración de sales en el medio

de cultivo, y la riqueza del medio en el que se desarrollan los microorganismos, son factores que influyen en la capacidad de nuestros microorganismos para formar biofilms. Con respecto al tiempo de incubación, podemos comentar que, en general, nuestras cepas presentan una mayor capacidad para la formación de biofilms a las 40-48 horas de incubación, como se ha descrito para la mayoría de los microorganismos (O'Toole y Kolter, 1998 a y b; Jackson y col., 2002); en lo que se refiere a la concentración de sales en el medio de cultivo, en general, los mejores resultados se obtuvieron a un 5-7,5% (p/v) de sales, aunque en algunos casos, como por ejemplo la cepa R22^T de *Idiomarina ramblicola* esta característica fenotípica se ve aumentada a un 10% (p/v) de sales; es de resaltar la marcada diferencia en la formación de biofilms para todas las cepas en función del medio de cultivo empleado; así, todos nuestros microorganismos producen biofilms tanto en medio complejo como en medio definido, aunque esa capacidad es mucho mayor en el medio MY, más rico que el medio Koser. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Stoodley y colaboradores en 1999, quienes demostraron que las condiciones nutricionales influían de manera definitiva en la estructura de los biofilms, de manera que al aumentar la concentración de glucosa presente en el medio de 40 a 400 mg/l, la formación de biopelículas se veía enormemente incrementada.

Como se aprecia en las Figuras 154-156, los microorganismos que presentaron en todos los casos una mayor propensión para la formación de biofilms fueron las cepas X2 de *Halomonas maura* y M4 de *Halomonas eurihalina*. Por tanto, para realizar un estudio preliminar de la participación de los exopolisacáridos en la estructura de los biofilms, seleccionamos estos dos microorganismos; así, como veremos a continuación, obtuvimos mutantes de ambas cepas deficientes en la síntesis de exopolisacárido, y comparamos su comportamiento con el de las cepas salvajes en cuanto a la formación de biopelículas.

1.2. Obtención de mutantes deficientes en la síntesis de EPS: participación de los exopolisacáridos en la estructura de los biofilms

Para la obtención de mutantes de la **cepa M4 de *Halomonas eurihalina*** deficientes en la síntesis de exopolisacárido, se llevaron a cabo experiencias de mutagénesis insercional vía conjugación biparenteral, según el protocolo de Herrero y colaboradores (1990), adaptado por nuestro grupo de investigación para trabajar con bacterias halófilas productoras de cantidades considerables de exopolisacárido. Para ello la cepa receptora se cultivó en medio mínimo para evitar en lo posible la producción de EPS, y posteriormente las células fueron lavadas con solución de sales al 2% (p/v) con el fin de minimizar la presencia de sales y antibióticos en el proceso de conjugación. En estas experiencias se utilizó el transposón mini-Tn5 Km2 por dar lugar a inserciones estables, únicas y al azar (Llamas y col., 2000). Todos los clones que aparecieron en las placas de selección de transconjugantes se sometieron a distintas pruebas fenotípicas que permitieran descartar la presencia de contaminantes. Además, de los transconjugantes seleccionados, se descartaron aquellos que eran resistentes a ampicilina (100µg/ml), ya que eran consecuencia de la cointegración del plásmido completo en el cromosoma de la célula huésped,

por lo que no eran el resultado de un verdadero proceso de transposición. Tras el chequeo de varios miles de colonias, seleccionamos el **mutante TK95** (Transconjugante resistente a Kanamicina) por presentar fenotipo colonial liso (Figura 156), es decir, por ser deficiente en la síntesis de maurano. La frecuencia de transposición fue de 2×10^{-5} ; esta se determinó teniendo en cuenta el número de transconjugantes (colonias que aparecieron en el medio de selección) y el número de supervivientes (colonias del medio propio del receptor) (de Lorenzo y col., 1990). El análisis del transconjugante TK95 mediante Southern Blot nos permitió comprobar que la inserción del transposón era única ya que las preparaciones del DNA procedente del mutante TK95 digeridas con diferentes enzimas de restricción (*Bam*HI, *Bgl*II, *Nco*I, *Sal*I y *Sma*I, que no tenían sitio de corte en el transposón), originaban bandas únicas.



Figura 156. Fotografía del crecimiento de *Halomonas eurihalina* TK95 (A), mostrando su fenotipo colonial liso, y *Halomonas eurihalina* M4 (B) en medio sólido MY 7,5% (p/v) de sales tras 3 días de incubación a 32°C.

Mediante la utilización de transposones, se puede insertar en los genes objeto de estudio una secuencia de DNA que contiene un marcador de resistencia a algún antibiótico y debido a que dicho marcador está físicamente unido al gen mutado, se logra seleccionar fácilmente los clones recombinantes, así como realizar el mapa de la región génica donde se ha producido la mutación. Por ello, la mutagénesis con transposones es una estrategia habitual en Biología Molecular, y ha sido empleada con gran éxito para conocer los distintos genes que intervienen en la síntesis de exopolisacáridos tales como el xantano (Barreré y col., 1986; Harding y col., 1987; Wei y col., 1996) y succinoglicano (Leigh y col., 1987). Por otra parte, en microorganismos halófilos moderados, este tipo de mutaciones ha permitido esclarecer algunos de los mecanismos fisiológicos relacionados con la adaptación a la salinidad. Concretamente, mediante la utilización de transposones se ha establecido una relación entre la síntesis del soluto compatible ectoína y la tolerancia a la sal que presentan dichas

bacterias (Cánovas y col., 1997; Göller y col., 1998; Min-Yu y col., 1993). Esta estrategia también ha permitido obtener información relacionada con el gen responsable de la síntesis de la α -amilasa en *Halomonas meridiana* (Coronado y col., 2000), la caracterización del operón que codifica para la enzima carbamilfosfato sintetasa relacionada con la producción de EPS en *Halomonas eurihalina* (Llamas y col., 2003), los genes responsables de la síntesis de una nitrato reductasa anaerobia ligada a membrana y una citocromo c oxidasa tipo cbb3 en la cepa S31^T de *Halomonas maura* (Argandoña y col., 2006; Argandoña, 2003), así como los genes de transporte y ensamblaje del EPS sintetizado por *Halomonas maura* (Arco y col., 2005).

La frecuencia de transferencia del transposón mini-Tn5 Km2 ha sido inferior a la encontrada para otros microorganismos halófilos; así, en *Chromohalobacter salixigens* ATCC 37173, se estableció que la relación entre el número de transconjugantes y el número de supervivientes del receptor es de 10^{-2} cuando la proporción donador:receptor es de 1:2; y 5×10^{-3} cuando la relación es 1:8,5 (Kunte y Galinski, 1995). Esta elevada frecuencia puede ser explicable por el hecho de que esta especie microbiana no es productora de exopolisacárido. Sin embargo, en experiencias previas de mutagénesis con agentes biológicos en *Halomonas eurihalina* se estableció que la frecuencia de mutación era también de 2×10^{-5} (Llamas y col., 2000). En *Halomonas maura* S30 la frecuencia de transición es de 8×10^{-7} (Arco y col., 2005b), algo menor que para *Halomonas eurihalina*, debido probablemente a la presencia de una mayor cantidad de EPS (maurano).

Para la obtención de mutantes de la **cepa X2 de *Halomonas maura*** deficientes en la síntesis de exopolisacárido, llevamos a cabo experiencias de mutagénesis dirigida; para ello se construyó una fusión transcripcional del gen *lacZ* al gen *epsA* en una cepa mutante espontánea resistente a la rifampicina de *Halomonas maura* X2. El gen *epsA* es el primer gen que forma parte del clúster de genes *eps* responsables de la síntesis de maurano en *H. maura* (Arco y col., 2005a). Como paso previo a esta mutagénesis, se confirmó mediante PCR que dicho gen *epsA* estaba presente en la cepa X2 de *Halomonas maura*, como se observa en la Figura 157.

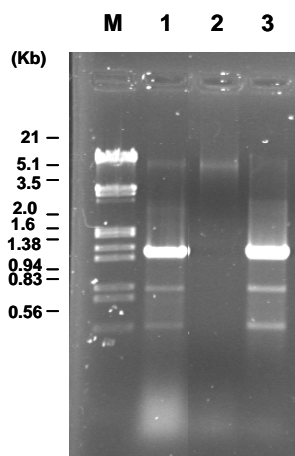


Figura 157. Comprobación de la recombinación del gen *epsA::lacZ*-pVIK112 en *Halomonas maura* X2 por PCR. M: marcador de peso molecular λ HindIII + EcoRI; Carril 1: DNA del clon *Halomonas maura* X2 *epsA::lacZ*; Carril 2: control negativo, DNA de *Halomonas maura* X2 ; Carril 3: control positivo, pVIK112:: *epsA::lacZ*.

El **mutante X2 *epsA::lacZ*** mostró también morfología colonial lisa (Figura 158), debido a la interrupción del gen *epsA* por la fusión transcripcional del gen *lacZ*, como resultado de la recombinación homóloga simple (tipo Campbell) del plásmido pVIKepsA.



Figura 158. Fotografía del crecimiento de *Halomonas maura* X2 (A) y *Halomonas maura* X2 *epsA::lacZ*, mostrando su fenotipo colonial liso, en medio sólido MY 7,5% (p/v) de sales tras 3 días de incubación a 32°C.

La morfología colonial lisa del mutante X2 *epsA::lacZ* indicaba una disminución muy acusada en la biosíntesis de exopolisacárido, tanto era así, que pudimos comprobar que había perdido casi por completo la capacidad de producir EPS tras realizar el protocolo de extracción del polisacárido después de incubar el mutante en medio MY 7,5% (p/v) de sales durante 5 días.

Una vez obtenidos los mutantes deficientes en la síntesis de exopolisacárido de las cepas M4 de *Halomonas eurihalina* y X2 de *Halomonas maura*, comparamos su comportamiento con el de las cepas salvajes en cuanto a la formación de biofilms, empleando de nuevo la técnica de adhesión a superficies de PVC y posterior tinción con cristal violeta, con el fin de establecer diferencias y atribuir a los exopolisacáridos de estas cepas una función biológica, la participación de sus EPS en la estructura de los biofilms que son capaces de formar.

En la Figura 159 se puede observar una marcada disminución en la capacidad para formar biofilms por parte de las dos cepas deficientes en la síntesis de exopolisacárido, TK95 y X2 *epsA::lacZ*, con respecto a las cepas salvajes, M4 de *Halomonas eurihalina* y X2 de *Halomonas maura*. Esta disminución es más acentuada en la comparación de la formación de biopelículas por parte de la cepa X2 de *Halomonas maura* y el correspondiente mutante deficiente en la síntesis de EPS X2 *epsA::lacZ*.

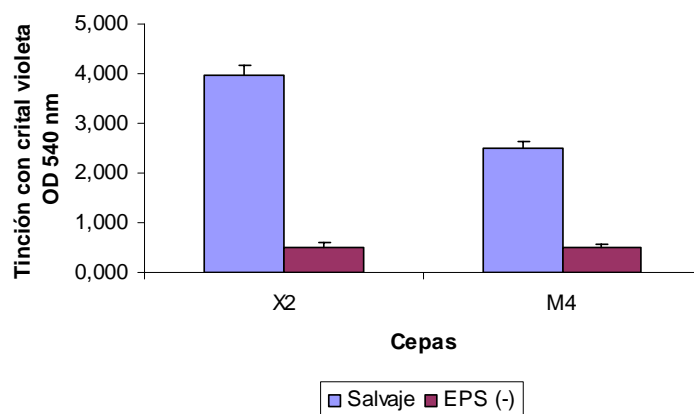


Figura 159. Formación de biofilms por las cepas X2 y X2 *epsA::lacZ* de *Halomonas maura* y M4 y TK95 de *Halomonas eurihalina* en medio MY 5% (p/v) de sales, tras 40 horas de incubación.

La capacidad de formación de biofilms por parte de las cepas salvajes X2 de *Halomonas maura* y M4 de *Halomonas eurihalina* se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido; para ello, las cepas se crecieron durante 40 horas en medio líquido MY al 5% (p/v) en sales, en el cual se introdujo un cubreobjetos para el comprobar la adhesión de estos microorganismos a superficies lisas. En la Figura 160 observamos las microfotografías electrónicas de las cepas X2 y M4, y podemos ver como ambas se encuentran rodeadas por cúmulos de EPS y fibrillas que les permiten la adherencia a superficies lisas.

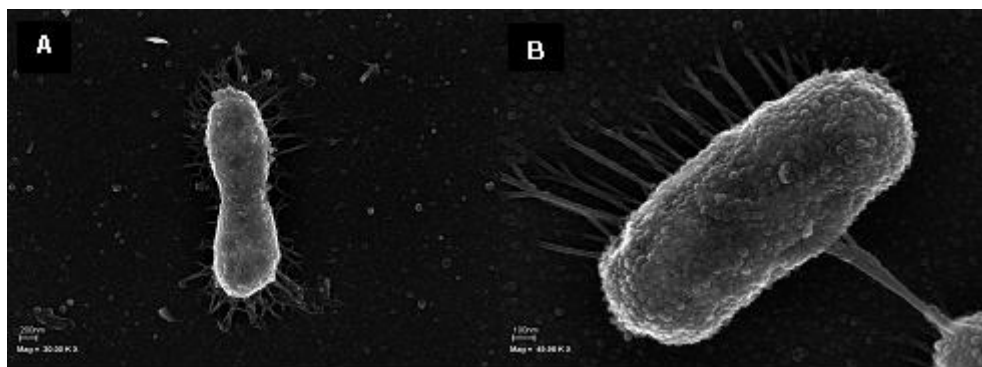


Figura 160. Microfotografías electrónicas de barrido de *Halomonas maura* X2 (A) y *Halomonas eurihalina* M4 (B).

Por otro lado, también pudimos apreciar gracias a la microscopía electrónica de barrido como la cepa X2 presenta una mayor capacidad para la formación de microcolonias que el correspondiente mutante liso (Figura 161), paso previo a la formación de estructuras maduras del biofilm. La formación de microcolonias por parte del mutante con fenotipo colonial liso X2 *epsA::lacZ* está muy reducida.

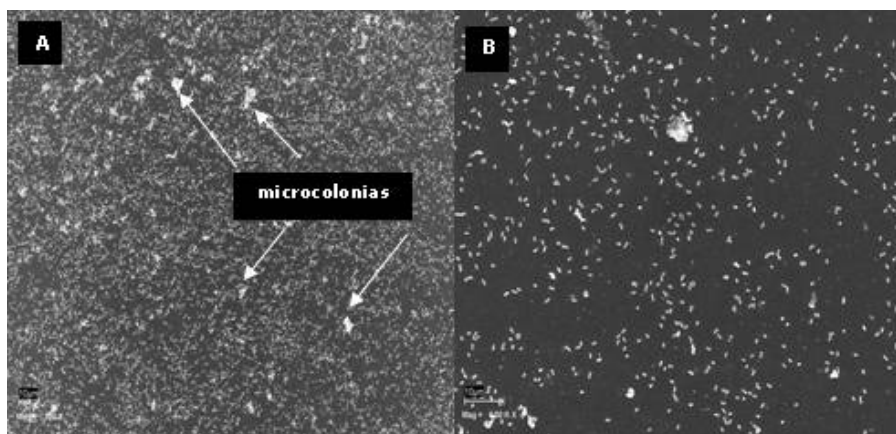


Figura 161. Microfotografías electrónicas de barrido en las que se muestra la formación de microcolonias por *Halomonas maura* cepa X2 (A) y el mutante deficiente en la síntesis de EPS X2 *epsA::lacZ* (B).

Por tanto, nuestros resultados experimentales preliminares nos indican que la presencia de exopolisacáridos en el medio es fundamental para la formación de biofilms por parte de nuestros microorganismos; mediante la técnica de adhesión y posterior tinción con cristal violeta, observamos como las cepas X2 y M4 eran capaces de adherirse a la superficie de los recipientes donde eran cultivadas; de igual modo, los mutantes lisos X2 *epsA::lacZ* y TK95, perdían gran parte de esa capacidad. Además, la microscopía electrónica de barrido nos ha permitido observar la capacidad de adherencia de las cepas X2 y M4 a una superficie inerte así como a otras células, y como emplean para ello su EPS a modo de red. También hemos observado como el mutante X2 *epsA::lacZ*, al perder casi por completo la capacidad para sintetizar EPS, también pierde la facultad de formar biofilms maduros (Figura 161). Este comportamiento ha sido descrito para diferentes bacterias formadoras de biofilms (Allison y Sutherland, 1987; Watnick y Kolter, 1999; Davey y O'Toole., 2000; Danese y col., 2000; Sutherland y col., 2001a; Wang y col., 2004). Sin embargo, algunos autores han descrito para otros microorganismos que aunque el exopolisacárido ayuda y está implicado en la formación de biofilms, éste no es estrictamente necesario; este es el caso, por ejemplo, del alginato producido por *Pseudomonas aeruginosa* (Stapper y col., 2004), o de la celulosa sintetizada por *Salmonella enteritidis* (Solano y col., 2002).

Numerosos trabajos experimentales han puesto de manifiesto, como ya hemos comentado, que el proceso de formación de biofilms está regulado por un sistema de "quorum sensing" o de autoinducción (Davey y O'Toole, 2000; Hammer y Bassler, 2003). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito un sistema de "quorum sensing" entre las especies de *Halomonas*, aunque todavía no se ha podido determinar qué función concreta regula. También hemos identificado algunas de las moléculas señal producidas por las especies productoras de EPS de *Halomonas* (Llamas y col., 2005).

CONCLUSIONES

1. Las bacterias halófilas objeto de este estudio producen EPS en una amplia gama de condiciones ambientales y nutricionales. Dicha producción está parcialmente asociada al crecimiento, ya que comienza en la fase exponencial, pero alcanza su máximo en la fase estacionaria. Las cepas clasificadas preliminarmente como *Halomonas maura* presentan los mayores rendimientos en la producción, aunque la productividad final del cultivo es aceptable en todos los casos, con vías a su potencial uso.

2. Todas las especies halófilas productoras de exopolisacáridos estudiadas hasta el momento sintetizan heteropolisacáridos con un marcado carácter aniónico, no existiendo una composición química específica que caracterice a los EPS de los distintos taxa. Por el contrario todos los polímeros comparten la presencia de grupos sulfato, sustituyente inorgánico poco frecuente entre los polisacáridos bacterianos, destacando el EPS sintetizado por *Halomonas maura* B100, con un 7,9 % p/p de sulfatos. Por otra parte, el carbohidrato más inusual que hemos encontrado formando parte de los EPS ha sido la fucosa, presente fundamentalmente en los EPS N12 y A16 de *Halomonas maura* y A3 de *Salipiger mucosus*.

3. Entre los 20 polímeros investigados hemos seleccionado los siguientes para su futuro desarrollo biotecnológico:

- EPS X2 de *Halomonas maura*, por la capacidad que presenta para la captación de metales pesados.
- EPS B100 de *Halomonas maura*, por sus excelentes propiedades reológicas, su actividad viscosizante y emulgente, y especialmente por su efecto modulador sobre células tumorales humanas.
- EPS N12 de *Halomonas maura*, por su elevado contenido en fucosa, lo que puede convertirlo en una fuente de oligosacáridos ricos en este azúcar, los cuales presentan potenciales aplicaciones en cosmética y medicina.
- EPS B33 de *Palleronia marisminoris*, por sus propiedades emulgentes.

4. Todas las cepas estudiadas presentan la capacidad de formar biofilms, en cuya maduración intervienen los exopolisacáridos que las mismas sintetizan.

BIBLIOGRAFÍA

-
- **Abbad-Andaloussi, S., Talbaoui, H., Marzack, R., Bonaly, R.** 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biot.* **43**: 995-1000.
 - **Adam, O., Vercellone, A., Paul, F., Monsan, P. F., Puzo, G.** 1995. A non degradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides. *Anal. Biochem.* **225**: 321-7.
 - **Adams, Y., Smith, S.L., Schwartz-Albiez, R., Andrews, K.T.** 2005. Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. *Parasitol. Res.* **97**: 290-294.
 - **Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bennasar, A., 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**: 1687-92.
 - **Ahmad, M.H., McLaughlin, W.** 1985. Ecology and genetics of tropical rhizobia species. *Biotechnol. Adv.* **3**: 155-70.
 - **Alasri, A., Roques, C., Cabassud, C., Michel, G., Aptel, P.** 1992. Effects of different biocides on a mixed biofilm produced on a Tygon tube and on ultrafiltration membranes. *Spectra 2000* **168**: 21-24.
 - **Allison, D.G., Matthews, M.J.** 1992. Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 484-8.
 - **Allison, D.G., Sutherland, I.W.** 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1319-27.
 - **Amanullah, A., Serrano, L.C., Galindo, E., Nienow, A.W.** 1996. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol. Progr.* **12**: 466-473.
 - **Amanullah, A., Serrano-Carreón, L., Castro, B., Galindo, E., Nienow, A.W.** 1998b. The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 95-108.
 - **Amanullah, A., Tuttiett, B., Nienow, A.W.** 1997. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 198-210.
 - **Amanullah, A., Tuttiett, B., Nienow, A.W.** 1998a. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 198-210.
 - **Amro, M.M., El-Sayed, A.-A.H., Al-Homahdi, E.S., Al-Saddique, M.A. y Al-Awad, M.N.** 2002. Investigation of polymer adsorption on rock surface of highly saline reservoirs. *Chem. Eng. Technol.* **25**: 1005-1013.
 - **Ananeva, E.P., Vitovskaya, G.A.** 1998. Heteroglycan produced by the yeast *Sporobolomyces alborubescens* Vkm 4-2450. *Microbiol.* **67**: 181-3.
 - **Andrews, K.T., Klatt, N., Adams, Y., Mischnick, P., Schwartz-Albiez, R.** 2005. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect. Immun.* **73**: 4288-94.
 - **Andrews, N.C., McHugh, A., Schieber, J.D.** 1998. Conformational and rheological dynamics of semi-flexible macromolecules undergoing shear flow: a non equilibrium brownian dynamics study. *J. Rheol.* **42**: 281-305.
 - **Annable, P., Williams, P.A., Nishinari, K.** 1994. Interaction in xanthan-glucomannan mixtures and the influence of electrolyte. *Macromolecules.* **27**: 4204-4211.
 - **Antón, J., Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F.** 1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microb.* **54**: 2381-2386.
 - **Antón, J., Oren, A., Benlloc, S., Rodríguez-Valera, F., Amman, R., Roselló-Mora, R.** 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov. sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 485-491.
 - **Appaiah, A.K.A., Karanth, N.G.K.** 1991. Insecticide specific emulsifier production by hexachlorocyclohexane-utilizing *Pseudomonas tralucida* Ptm⁺ strain. *Biotechnol. Lett.* **13**: 371-374.
-

- **Arahal, D.R., Castillo, A.M., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Ventosa, A.** 2002a. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Sist. Appl. Microbiol.* **25**: 207-211.
- **Arahal, D.R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Ventosa, A.** 2002b. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 241-249.
- **Arakawa, T., Timasheff, S.N.** 1985. The stabilization of protein by osmolytes. *Biophys. J.* **47**: 411-414.
- **Arco, Y.** 2005b. Caracterización de genes responsables de la síntesis del maurano. Tesis Doctoral.
- **Arco, Y., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Argandoña, M., Quesada, E., del Moral, A.** 2005a. epsABCJ genes are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide mauran produced by *Halomonas maura*. *Microbiology.* **151**:2841-2851.
- **Arend, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H.** 1990. Apoptosis. The role of the endonucleases. *Am. J. Pathol.* **136**: 593-608.
- **Arfors, K.E., Ley, K.** 1993. Sulfated polysaccharides in inflammation. *J. Lab. Clin. Med.* **121**: 201-202.
- **Argandoña, M.** 2003. Estudio genético del metabolismo respiratorio de *Halomonas maura*, un nuevo microorganismo halófilo moderado. Tesis Doctoral.
- **Argandoña, M., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Arco, Y., Quesada, E., Del Moral, A.** 2006. A membrane-bound nitrate reductase by the narGHJ operon is responsible for anaerobic respiration in *Halomonas maura*. *Extremophiles* (En prensa).
- **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.
- **Arias, S., Llamas, I., Martínez-Checa, F., del Moral, A., Ferrer, M. R., Béjar, V., Quesada, E.** 2002. *Halomonas maura* TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano 26 de interés para la industria y el medio ambiente (P2002202041).
- **Arima, K., Kahinuma, A., Tamura, G.** 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **31**: 488-494.
- **Arvaniti, A., Karamanos, N.K., Dimitracopoulos, G., Anastassiou, E.D.** 1994. Isolation and characterization of a novel 20-kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**: 432-438.
- **Ashtaputre, A.A., Shah, A.K.** 1995. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J. Microb. Biot.* **11**: 219-222.
- **Atkins, E.D.T., Niedusynski, I.A., Mackie, W., Parker, K.D., Smolko, E.E.** 1973. Structural components of alginic acid. II. Crystalline structure of poly-a-L-glucuronic acid. Results of X-ray diffraction and polarized infra-red studies. *Biopolymers.* **12**: 115-7.
- **Azuaje, R.A., Sánchez, J.A.** 1999. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a non-conventional culture medium. *Acta Cient. Venez.* **50**: 201-209.
- **Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R., de Clercq, E.** 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1742-5.
- **Bae, J.S., Jang, K.H., Choi, S.G., Jo, W.S., Rhee, M.H., Kwon, O.D.** 2003. Acute oral toxicity of extract derived fruiting body of *Phellinus gilvus* in rats. *J. Toxicol. Public Health* **19**:211-215.
- **Bae, J.S., Jang, K.H., Jin, H.K.** 2006. Effects of natural polysaccharides on the growth and peritoneal carcinomatosis of human gastric adenocarcinoma in a nude mouse model. *Cancer Lett.* **235**: 60-68.

-
- **Bae, J.S., Jang, K.H., Yim, H., Jin, H.K.** 2005. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. *Cancer Lett.* **218**: 43-52.
 - **Bagasra, O., Lischner, H.W.** 1988. Activity of dextran sulfate and other polysaccharides against human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **158**: 1084-1087.
 - **Baird, J.K., Cleary, J.M.** 1994. PHB-free gellan gum Broth. US Patent 5300429.
 - **Baldwin, W.W., Sheu, M.J.T., Bankston, P.W. y Worldringh, C.L.** 1988. Changes in bouyant density and cell size of *Escherichia coli* in response to osmotic shocks. *J. Bacteriol.* **170**: 452-455.
 - **Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S.** 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biot.* **53**: 495-508.
 - **Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W., Martin, W.T.** 1986. Isolation of protozoa from water associated with legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 422-424.
 - **Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E. y Rosenberg, E.** 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 2697-2702.
 - **Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O.** 1999. Towards the production of salt-tolerant crops. *Adv. Exp. Med. Biol.* **464**: 77-89.
 - **Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walters, K.** 1993. An introduction to rheology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 - **Barnett, C., Smith, A., Scantu, B., Israilides, C.J.** 1999. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolyzed potato starch waste. *Carbohydr. Polym.* **38**: 203-9.
 - **Bar-Or, Y. y Shilo, M.** 1987. Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC6720. *Appl. Environ. Microb.* **53**: 2226-2230.
 - **Barreré, G.C., Barber, C.E. y Daniels, M.J.** 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Int. J. Biol. Macromol.* **8**: 372-374.
 - **Barres, B.A., Hart, I.K., Coles, H.R.S., Burne, J.F., Vyodic, J.T., Richardson, W.D. Raff, M.C.** 1992. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**: 31-46.
 - **Bartha, R.** 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecol.* **12**: 155-172.
 - **Bastias, J., Wei, M.X., Huynh, R., Chaubet, F., Jozefonvicz, J., Crepin, M.** 2002. Anti-proliferative and antitumoral activities of a functionalized dextran (CMDBJ) on the 1205 L-U human tumor melanoma cells. *Anticancer Res.* **22**: 1603-13.
 - **Bauer, C.H., Reutter, W.G.** 1978. Decrease of human serum fucosyltransferase as an indicator of successful tumor therapy. *Science* **201**: 1232-1233.
 - **Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M., Allen, R.D.** 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J. Bacteriol.* **101**: 402-429.
 - **Bayer, E.A., Skutelsky, E., Goldman, S., Rosenberg, E., Gutnick, D.L.** 1983. Immunochemical identification of the major cell surface agglutinin of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-92. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1109-1119.
 - **Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., Ielpi, L.** 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 145-52.
 - **Begley, J., Croft, B. y Swannell, R.P.J.** 1996. Current research into bioremediation of contaminated land. *Land Contam. Reclam.* **4**: 199-208.
 - **Béjar, V., Calvo, C., Moliz, J., Díaz-Martínez, F., Quesada, E.** 1996. Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 77-86.
-

- **Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C., Quesada, E.** 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains included in the species *Halomonas eurihalina*. J. Biotechnol. **61**: 135-141.
- **Benedetti, L.M., Topp, E.M., Stella, V.J.** 1989. En: Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides. Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Paoletti, S., Stivala, S.S., Sutherland, I.W. (Eds), pp. 27-33. Gordon and Breach, New York, USA.
- **Berendes, F., Gottschalk, G., Heine-Dobbernack, E., Moore, E.R.B., Tindall, B.J.** 1996. *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkalophilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works. Syst. Appl. Microbiol. **19**: 158-167.
- **Betlach, M.R., Capage, M.A., Doherty, D.H., Hassler, R.A. Henderson, N.M., Vanderslice, R.W., Marrelli, J.D., Ward, M.B.** 1987. Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis. En: Progress in biotechnology. 3. Industrial polysaccharides. Yalpani, M. (Ed.), pp. 35-50. Elsevier, Amsterdam.
- **Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B.** 2006. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. Environ. Int. **32**: 191-198.
- **Bielecki, E.S., Krystynowicz, E.A., Turkiewicz, M., Kalinowska, E.H.** 2002. Bacterial cellulose. En: Biopolymers. Vol. 5. Steinbüchel, A., Vandamme, E. J., de Baets, S. (Eds.), pp. 40-85. Wiley-VCH, Weinheim.
- **Bitton, G., Marshall, K.C.** 1980. Adsorption of microorganisms to surfaces. John Wiley and Sons 439, New York.
- **Black, W.A.P., Dewar, E.T., Woodward, F.N.** 1952. Manufacture of algal chemicals. IV. Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. J. Sci. Food Agric. **3**: 122-129.
- **Bloomberg, G.** 1991. Designing proteins as emulsifiers. Lebensmitteltechnologie. **24**: 130-131.
- **Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. **54**: 484-489.
- **Boise, L.H., Gonzalez-García, M., Postema, C.E.** 1993. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell **74**: 597-608.
- **Boise, L.H., Gottschalk, A.R., Quintns, J., Thompson, C.B.** 1995. Bcl-2 and Bcl-2 related proteins in apoptosis regulation. Curr. Top Microbiol. Immunol. **200**: 107-121.
- **Boisson-Vidal, C., Haroun, F., Elloualli, M., Blondin, C., Fischer, A.M., de Agostini, A., Jozefonviev, J.** 1995. Biological activities of polysaccharides from marine algae. Drugs Future **20**: 1237-1249.
- **Bomchil, N., Watnick, P., Kolter, R.** 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. J. Bacteriol. **185**: 1384-1390.
- **Bonet, R., Simon-Pujol, M.D., Congregado, F.** 1993. Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2437-2441.
- **Born, K., Langendorff, V., Boulenguer, P.** 2002. Xanthan. En: Biopolymers. Vol.5. Steinbüchel, A., Vandamme, E.J., De Baets, S. (Eds), pp.261-291. Wiley-VCH, Weinheim.
- **Bouchotroch, S., Quesada, E., Del Moral, A., Llamas, I., Béjar, V.** 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a new moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1625-1632.
- **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.
- **Bozzi, L., Milas, M., Rinaudo, M.** 1996b. Solution and gel rheology of a new polysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. strain 1644. Int. J. Biol. Macromol. **18**: 83-91.
- **Bozzi, L., Milas, M., Rinaudo, M.** 1996a. Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. strain 1644. Int. J. Biol. Macromol. **18**: 9-17.

-
- **Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
 - **Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**:20-26.
 - **Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., Zehnder, A.J.B.** 1990. Osmotically induced oligo- and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **136**: 2511-9.
 - **Bresolin, T.M.B., Milas, M., Rinaudo, M., Keicher, F., Ganter, J.L.M.S.** 1999. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 225-231.
 - **Bresolin, T.M.B., Sander, P.C., Reicher, F., Sierakowski, M.R., Rinaudo, M., Ganter, J.L.M.S.** 1997. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. *Carbohydr. Polym.* **33**: 131-138.
 - **Brivonese, A.C., Sutherland, I.W.** 1989. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biot.* **30**: 97-102.
 - **Brock, T.D.** 1969. Microbial growth under extreme conditions. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **19**: 15-42.
 - **Brown, A.D.** 1990. Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, UK
 - **Brown, M.J.** 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* **13**:61-64.
 - **Burd, G., Ward, O.P.** 1996. Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on agar plates: the role of biosurfactants. *Biotechnol. Tech.* **10**: 371-374.
 - **Burns, P.J., Yeo, P., Keshavarz, T., Roller, S., Evans, C.S.** 1994. Physiological studies of exopolysaccharide production from the Basidiomycete *Pleurotus* sp. *florida*. *Enzyme Microb. Tech.* **16**: 566-72.
 - **Cáceres, P.J., Carlucci, M.J., Damonte, E.B., Matsuhira, B., Zuñiga, E.A.** 2000. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry* **53**: 81-86.
 - **Calderon, M.I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J.** 2004. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T.
 - **Calvo, C., Ferrer, M.R., Martínez-Checa, F., Béjar, V., Quesada, E.** 1995. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina*. *Appl. Biochem. Biotech.* **55**: 45-54.
 - **Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Béjar, V., 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.
 - **Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J., 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. Biot.* **60**: 347-351.
 - **Cameotra, S.S., Makkar, R.S.** 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 520-529.
 - **Cameotra, S.S., Makkar, R.S.** 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 262-266.
 - **Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rodes, D., Ventosa, A., Nieto, J.J.** 1997. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J. Biol. Chem.* **272**: 25794-25801.
 - **Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M.I., Ventosa, A., Nieto, J.J.** 1998a. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 487-497.
-

- Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J. 1996. Osmoprotectans in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J. Bacteriol.* **178**: 7221-7226.
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J. 1998b. Synthesis of the glycine betaine from exogenous choline in moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4095-4097.
- Cánovas, D., Vargas, C., Knip, S., Morón, M.J., Ventosa, A., Bremer, E., Nieto, J.J. 2000. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Microbiol.* **146**: 455-463.
- Cao, Q.Z., Lin, Z.B. 2006. *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sci.* **78**: 1457-1463.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* **50**: 131-149.
- Capron, I., Brigand, G., Muller, G. 1998. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 215-225.
- Carlucci, M.J., Sclaro, L.A., Damonte, E.B. 2002. Herpes simples virus type 1 variants arising alter selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. *J. Med. Virol.* **68**: 92-8.
- Carpentier, B., Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Microbiol.* **75**: 499-511.
- Carr, J.H., Anderson, R.L., Favero, M.S. 1996. Comparison of chemical dehydration and critical point drying for the stabilization and visualization of aging biofilm present on interior surfaces of PVC distribution pipe. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 225-232.
- Casas, J.A., García-Ochoa, F. 1999. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. *J. Sci. Food Agr.* **79**: 25-31.
- Casas, J.A., Mohedano, A.F., García-Ochoa, F. 2000. Viscosity of guar gum and xanthan/guar gum mixture solutions. *J. Sci. Food. Agr.* **80**: 1722-1727.
- Caumette, P., Baulaigue, R., Matheron, R. 1988. Characterization of *Chromatium salexigens* sp. nov., a halophilic *Chromatiaceae* isolated from Mediterranean Salinas. *Syst. Appl. Microbiol.* **10**: 284-292.
- Caumette, P., Baulaigue, R., Matheron, R. 1991b. *Thiocaspa halophila* sp. nov., a new halophilic phototrophic purple sulfur bacterium. *Arch. Microbiol.* **155**: 170-176.
- Caumette, P., Cohen, Y., Matheron, R. 1991a. Isolation and characterization of *Desulfovibrio halophilus* sp. nov., a halophilic sulphate-reducing bacterium isolated from Solar Lake (Sinai). *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 33-38.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Record, M.T. Jr. 1992. Origin of osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 1586-1595.
- Cérantola, S., Marty, N., Montrozier, H. 1996. Structural studies of the acidic exopolysaccharide produced by a mucoid strain of *Burkholderia cepacia*, isolated from cystic fibrosis. *Carbohydr. Res.* **285**: 59-67.
- Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 113-130.
- Cerning, J., Bonillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotech. Lett.* **10**: 255-60.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M.J. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **75**: 692-99.

-
- **Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouuillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Toposirovic, L.** 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3914-9.
 - **Cescutti, P., Pupulin, R., Delben, F., Abbate, M., Dentini, M., Sparapano, L., Rizzo, R., Crescenzi, V.** 2002. New exopolysaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* grown on glucosamine. *Carbohydr. Res.* **337**: 1203-1209.
 - **Chand, S., Singh, S.H.** 2004. Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Dalbergia sissoo* Roxb., a timber-yielding leguminous tree species. *J. Plant. Physiol.* **161**: 237-243.
 - **Chandrasekaran, R., Rhada, A.** 1995. Molecular architectures and functional-properties of gellan gum and related polysaccharides. *Trends Food Sci. Tech.* **6**: 143-148.
 - **Chandrasekaran, R., Rhada, A., Thailambal, V.G.** 1992. Roles of potassium ions, acetyl and L-glycerol groups in native gellan double helix: an X-ray study. *Carbohydr. Res.* **224**: 1-17.
 - **Chandrasekaran, R., Thailambal, V.G.** 1990. The influence of calcium ions, acetate and L-glycerate groups on the gellan double helix. *Carbohydr. Polym.* **12**: 431-442.
 - **Chaplin, M.F.** 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **123**: 336-341.
 - **Cheirsilp, B., Shimizu, H., Shioya, S.** 2001. Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Appl. Microbiol. Biot.* **57**: 639-46.
 - **Chen, J.H., Czajka, D.R., Lion, L.W., Shuler, M.L., Ghiorse, W.C.** 1995a. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environ. Health Persp.* **103**: 53-58.
 - **Chen, J.H., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L.** 1995b. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res.* **29**: 421-430.
 - **Chiara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka, F.** 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
 - **Chiba, T., Tejima, S.** 1979. A new synthesis of α -L-fucose. *Chem. Pharm. Bull.* **27**: 2838-2840.
 - **Christensen, B.E., Kjosbakken, J., Smidsrod, O.** 1985. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microb.* **50**: 837-845.
 - **Cirigliano, M.C., Carman, G.M.** 1984. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microb.* **50**: 846-850.
 - **Cirillo, S.L.G., Yan, L., Littman, J., Samrakandi, M.M., Cirillo, J.D.** 2002. Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* **148**: 1667-1677.
 - **Clare, K.** 1993. Algin. En: *Industrial Gums* 3rd ed. Whistler, R.L. (Ed.), pp. 105-143. Academic Press, New York.
 - **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.
 - **Clementi, F., Fantozzi, P., Mancini, F., Moresi, M.** 1995. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb. Tech.* **17**: 983-988.
 - **Clementi, F., Mancini, F., Mancini, M., Moresi, M.** 1997. Rheological behaviour of aqueous dispersions of bacterial sodium alginate. En: *Proceedings 7th Intern. Congr. On Engineering and Food.* (Brighton, England). Part I. Jowitt, R. (Ed), E25-E28. Academic Press, Sheffield.
 - **Cohen, J.** 1993. Apoptosis. *Inmunol Today* **14**: 126-130.
-

- **Colliec-Jouault, S., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Sinquin, C., Roger, O., Fischer, A.-M.** 2001. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochem. Bioph. Acta.* **1528**: 141-151.
- **Colquhoun, I.J., Defernez, M., Morris, V.J.** 1995. NMR studies of acetan and the related bacterial polysaccharide, CR1/4, produced by a mutant strain of *Acetobacter xylinum*. *Carbohydr. Res.* **269**: 319-331.
- **Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M., Sutherland, I.W.** 1994. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. *Microbiology.* **140**: 1125-32.
- **Cooper, D.G., Goldenberg, B.G.** 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microb.* **54**: 224-229.
- **Coplin, D.L., Cook, D.** 1990. Molecular genetics of extracellular biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant. Microbe In.* **3**: 271-279.
- **Coronado, M.J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J.J., Ventosa, A.** 2000. The α -amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and the molecular characterization. *Microbiology.* **146**: 861-868.
- **Corpe, W.A.** 1970. An acid polysaccharide produced by primary film-forming bacteria. *Development in Industrial Microbiology.* **2**: 402-412.
- **Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J.** 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 299-324.
- **Costerton, J.W., Lambe, D.W. Jr, Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B.** 1987. Cell wall alterations in staphylococci growing in situ in experimental osteomyelitis. *Can. J. Microbiol.* **33**: 142-50.
- **Costerton, J.W., Lappin-Scott, H.M., Cheng, K.J.** 1992. Glycocalyx bacterial. En: *Encyclopedia of microbiology*, vol. 2. Lederberg, J. (Ed.), pp. 311-317. Academic Press, San Diego.
- **Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- **Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- **Craig, D.Q.M., Kee, A., Tamburic, S., Barnes, D.** 1997. An investigation into the temperature dependence of the rheological synergy between xanthan gum and locust bean gum mixtures. *J. Biomat. Sci. Polymer.* **8**: 377-389.
- **Crescenci, V.** 1995. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol. Progr.* **11**: 251-259.
- **Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Paoletti, S., Stivala, S., Sutherland, I.W.** 1989. Recent developments in industrial polysaccharides: biomedical and biotechnological advances. Gordon y Breach, New York.
- **Crine, M.** 1993. Le tritement des eaux industrielles chargées en métaux lourds. *Tribune de l'eau.* **561** : 3-19.
- **Csonka, L.N., Hanson, A.D.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and fisiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.
- **Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein envolved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**: 2888-2896.
- **Danese, P.N., Pratt, L., Kolter, R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichi coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **182**: 35-93-3596.
- **Dantas, L., Heyraud, A., Courtois, B., Courtois, J., Milas, M.** 1994. Physicochemical properties of exogel exocellular β (1-4) glucuronan from *Rhizobium meliloti* strain. *Carbohydr. Polym.* **24**: 185-192.

-
- **Davey, K.R., Amos, S.A.** 2001. Study on the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 788-796.
 - **Davey, M.E., O'Toole, G.A.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
 - **Davies, D.G., Chakrabaty, A.M., Geesey, G.G.** 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1181-1186.
 - **Davies, D.G., Geesey, C.G.** 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 860-867.
 - **Davies, D.G., Paserk, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
 - **Davila, A.M., Marchel, R., Vandecasteele, J.P.** 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biot.* **47** : 496-501.
 - **de Baets, S., du Laing, S., François, C., Vandamme, E.J.** 2002. Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 181-184.
 - **de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K.N.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
 - **de Philippis, R., Margueri, M.C., Pelosi, E., Ventura, S.** 1993. Exopolysaccharide production by unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.* **5**: 387-394.
 - **de Philippis R., Vincenzini M.** 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible application. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:151-175.
 - **de Souza, A.M., Sutherland, I.W.** 1994. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 463-468.
 - **De Vuyst, L., Degeest, B.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 153-177.
 - **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 medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1059-68.
 - **Defaye, J., Gadelle, A., Angyal, S.J.** 1984. An efficient synthesis of L-fucose and L-(4-²H)fucose. *Carbohydr. Res.* **126**: 165-169.
 - **Degeest, B., De Vuyst, L.** 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 2863-2870.
 - **Degeest, B., Janssens, B., De Vuyst, L.** 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 470-477.
 - **Degeest, B., Van den Ven, S., De Vuyst, L.** 1997. Isolation and production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* and strong evidence for their growth-associated biosynthesis. *Proceedings of the 11th Forum for Applied Biotechnology*, Gent, Belgium, pp. 1199-1206.
 - **Dejter-Juszynski, M., Flowers H.M.** 1973. Synthesis of L-fucose. *Carbohydr. Res.* **28**: 144-146.
 - **del Moral, A., Quesada, E., Ramos-Comenzana, A.** 1987. Distribution and types of bacteria isolated from an inland saltern. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **138**: 59-66.
-

- **Delmer, D.P., Amor, Y.** 1995. Cellulose biosynthesis Plant Cell. **7**: 987-1000.
- **Dennis, P.P., Shimmin, L.C.** 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection y halophilic *Archaea*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 90-104.
- **Desai, J.D., Banat, I.M.** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. Microbiol. Mol. Biol. R. **61**: 47-64.
- **Deshpande, S.S., Ingle, A.D., Maru, G.B.** 1997. Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. Cancer Lett. **118**: 79-85.
- **Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., Bisailon, J.G.** 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microb. **62**: 1908-1912.
- **Dhami, P.S., Kannan, R., Gopalakrishnan, V., Ramanujam, A., Salvi, N., Udupa, S.R.** 1998. Sorption of plutonium, americium and fission products from reprocessing effluents using *Rhizopus arrhizus*. Biotechnol. Lett. **20**: 869-872.
- **Dierksen, K.P., Ebel, W., Marks, J., Sandine, W.E., Trempy, J.E.** 1995. Polysaccharide expression in lactococci. Dev. Biol. **85**: 469-480.
- **Dobson, S.J., Franzmann, P.D.** 1996. Unification of the genera *Deleya* (Bauman et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Parococcus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 550-558.
- **Dobson, S.J., James, S.R., Franzmann, P.D., McMeekin, T.A.** 1990. Emended description of *Halomonas halmophila* (NCMB 1971^T). Int. J. Syst. Bacteriol. **40**: 462-463.
- **Dolz, M., Hernández, M.J., Delegido, J.** 2002. Kinetic interpretation of influence of sodium chloride concentration and temperature on xanthan gum dispersión flow model. J. Appl. Polym. Sci. **83**: 332-339.
- **Donlan, R.M., Costerton, J.W.** 2002. Biofilms: survival mechanism of clinically revelant micoorganism. Clin. Microbiol. Rev. **15**: 167-193.
- **Donmez, G., Aksu, Z.** 2001. Bioaccumulation of cooper(II) and nickel(II) by the non-adapted growing *Candida* spp. Wat. Res. **35**: 1425-1434.
- **Doublier, J.L., Thibault, J.F., Axelos, M.A.V.** 1992. Agents épaississants et gélifiants de nature glucidique. En : Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires. J.L. Multon (Ed.), p. 299-329. Tec Doc.
- **Drevet, E., Monot, F., Ballerini, D., Lecourtier, J., Choplin, L.** 1994. Effect of mixing and mass transfer conditions on gellan production by *Auromonas elodea*. J. Ferment. Bioeng. **77**: 642-649.
- **Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **28**: 350-356.
- **Duckworth, A.W., Grant, W.D., Jones, B.E., Meijer, D., Márquez, M.C., Ventosa, A.** 2000. *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East African Rift Valley. Extremophiles **4**: 53-60.
- **Dudman, W.F.** 1960. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. J. Gen. Microbiol. **22**: 25-39.
- **Duguid, J.P., Wilkinson, J.F.** 1953. The influence of cultural conditions and polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol. **9**: 174-89.
- **Ebina, T., Ogata, N., Murata, K.** 1995. Antitumor effect of *Lactobacillus bulgaricus* 878R. Biotherapy **9**: 65-70.
- **Ellouali, M., Boisson-Vidal, C., Jozefonvicz, J.** 1994. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells. Colloids Surf. B: Biointerfaces **2**: 305-314.
- **el-Naggar, M.Y., Hassan, M.A., Said, W.Y., el-Aassar, S.A.** 2003. Effect of support materials on antibiotic MSW2000 production by immobilized *Streptomyces violatus*. J. Gen. Appl. Microbiol. **49**: 235-43.

-
- **Empey, R.A., Pettit, D.J.** 1978. Cellulase-free xanthan gum and process, for producing. US patent 4070535.
 - **Engelskirchen, K.** 1987. Polysaccharidderivate. Umwandlung von Cellulose. En: Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Band E20: Makromolekulare Stoffe, Teil 3 (4th ed). Bartl, H., Falbe, J. (Eds), pp. 2119-2121. Stuttgart/New York: Georg Thieme.
 - **Enriquez, L.G., Hwang, J.W., Hong, G.P., Bati, N.A., Flick, G.J.** 1989. Food emulsifiers: chemistry, technology, functional properties and applications. En: Charalambous, G., Doxastakis, G. (Eds.), pp. 335-416. Elsevier, Amsterdam.
 - **Espevick, T., Otterlei, M., Skjak-Braek, G., Ryan, L., Wright, S.D., Sundan, A.** 1993. The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers. *Eur. J. Immunol.* **23**: 255-61.
 - **Evans, C.S., Gallagher, I.M., Attrey, P.T., Wood, D.A.** 1991. Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. *Biodegradation.* **2**: 93-106.
 - **Faria, T.Q., Knapp, S., Landerstein, R., Macanita, A.L., Santos, H.** 2003. Protein stabilisation by compatible solutes: effect of mannosylglycerate on unfolding thermodynamics and activity of ribonuclease A. *Chembiochem.* **4**: 734-741.
 - **Farias, W.R., Valente, A.P., Pereira, M.S., Mourao, P.A.** 2000. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulphated galactans from invertebrates. *J. Biol. Chem.* **275**: 299-307.
 - **Farres, J., Caminal, G., López-Santin, J.** 1997. Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Appl. Microbiol. Biot.* **48**: 522-7.
 - **Fath, M.J., Kolter, R.** 1993. ABC transporter: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**: 995-1017.
 - **Fendrich, C.** 1988. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid *Eubacterium* from Great Salt Lake, Utah, USA. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**: 36-43.
 - **Fendrich, C., Hippe, H., Gottschalk, G.** 1990. *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch. Microbiol.* **154**: 127-132.
 - **Ferguson, J., Kemblowski, Z.** 1991. Applied Fluid Rheology. Elsevier Science Publishers. University Press, Cambridge.
 - **Fett, W.F., Osman, S.F., Fishman, M.L., Siebles, T.S.** 1986. Alginate production by plant-pathogenic pseudomonads. *Appl. Environ. Microb.* **52**: 466-473.
 - **Fitter, A.H., Hay, P.K.H.** 1987. Environmental physiology of plants. Pp. 226-259. Academia Press. London.
 - **Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, J.J., Tison, D.L., Pope, D.H.** 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 9-16.
 - **Floodgate, G.D.** 1972. The mechanism of bacterial attachment to detritus in aquatic systems. *Memorie de'Il Istituto italiano di idrobiologica Dolt. Marco di Marchi.* **29**: 309-323.
 - **Flores, F., Torres, L.G., Galindo, E.** 1994. Effect of the dissolved oxygen tension during the cultivation of *X. campestris* on the production and quality of Xanthan gum. *J. Biotechnol.* **34**: 165-173.
 - **Ford, T.E., Maki, J.S., Mitchell, R.** 1987. The role of metal-binding bacterial exopolymers in corrosion processes. Corrosion '87. Paper n° 380. NACE Publications, California.
 - **Ford, T.E., Mitchell, R.** 1992. Microbial transport of toxic metals. En: Environmental Microbiology. Mitchell, R., (Ed.), pp. 83-101. Wiley-Liss, New York.
 - **Franz, G., Alban, S.** 1995. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**: 311-314.
 - **Franzmann, P.D., Burton, H.R., McMeekin, T.A.** 1987. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 27-34.
-

- **Franzmann, P.D., Wehmeyer, U., Stackerbrandt, E.** 1988. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**: 16-19.
- **Freeman, C., Chapman, P.J., Gilman, K., Lock, M.A., Reynolds, B., Wheather, H.S.** 1995. Ion exchange mechanisms and the entrapment of nutrients by river biofilms. *Hydrobiologia.* **297**: 61-65.
- **Fu, J. F., Tseng, Y.H.** 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 919-23.
- **Galinski, E.A.** 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**: 273-328.
- **Galinski, E.A., Lippert, K.** 1991. Novel compatible solutes and their potential as stabilizers in enzyme technology. En: *General and applied aspects of halophilic microorganism*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 351-358. Plenum Press, New York.
- **Galinski, E.A., Oren, A.** 1991. Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* **198**: 593-598.
- **Galinski, E.A., Trüper, H.G.** 1994. Microbial behaviour in salt stresses ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- **Gamar, L., Blondeau, K., Simonet, J.M.** 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 281-7.
- **Gamini, A., de Bleijser, J., Leyte, J.** 1991. Physico-chemical properties of aqueous solutions of xanthan: A NMR study. *Carbohydr. Res.* **220**: 33-47.
- **Gamini, A., Mandel, M.** 1994. Physicochemical properties of aqueous xanthan solutions: static light scattering. *Biopolymers.* **34**: 783-797.
- **Gancel, F., Novel, G.** 1994a. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures: 1. Conditions of production. *J. Dairy Sci.* **77**: 685-688.
- **Gancel, F., Novel, G.** 1994b. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures: 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *J. Dairy Sci.* **77**: 689-695.
- **Gandbhir, M., Rashed, I., Marlière, P., Mutzel, R.** 1995. Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt. *Res. Microbiol.* **14**: 113-120.
- **García, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C., Ventosa, A.** 2004. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1723-1728.
- **García-Esteva, R., Cánovas, D., Iglesias-Guerra, F., Ventosa, A., Csonka, L.N., Nieto, J.J., Vargas, C.** 2006. Osmoprotection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by N(gamma)-acetyldiaminobutyrate, the precursor of the compatible solute ectoine. *Syst. Appl. Microbiol.* En prensa.
- **García-Ochoa, F., Casas, J.A.** 1994. Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentrations. *The Chem. Eng. J.* **53**: 41-46.
- **García-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcón, A.** 1995. Xanthan gum production. An unstructured kinetic model. *Enzyme Microb. Tech.* **17**: 206-217.
- **García-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcón, A.** 1997. Xanthan gum production in a laboratory aerated stirred tank bioreactor. *Chem. Biochem. Eng.* **11**: 69-74.
- **García-Rivera, R.** 2003. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- **Garti, N., Leser, M.E.** 2001. Emulsification properties of hydrocolloids. *Polym. Advan. Technol.* **12**: 123-135.
- **Gassem, M.A., Schmidt, K.A., Frank, J.F.** 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Food Sci.* **32**: 171-173.
- **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. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 467-472.
 - **Geddie, J.L., Sutherland, I.W.** 1994. The effect of acetylation on cation binding by algal and bacterial alginates. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **20**: 117-129.
 - **Geels, F.P., Schippers, B.** 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* **108**: 207-214.
 - **Geesey, G.G., Jang, L.** 1989. Interactions between metal ions and capsular polymers. En: *Metal Ions and Bacteria*. Beveridge, T.J., Doyle, R.J. (Eds), pp. 325-357. Wiley, New York.
 - **Gesson, J.P., Jacquesy, J.C., Mondon, M., Petit, P.** 1992. A short synthesis of L-fucose and analogs from D-mannose. *Tetrahedron. Lett.* **33**: 3637-3640.
 - **Ghai, S.K., Hisamatsu, M., Amekura, A., Harada, T.** 1981. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **122**: 33-40.
 - **Giavasis, I., Harvey, L.M., McNeil, B.** 2000. Gellan gum. *Crit. Rev. Biotechnol.* **20**(3): 177-211.
 - **Gibbons, N.E.**, 1974. Family V. *Halobacteriaceae*. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (Eds), pp. 269-273. Williams & Wilkins, Baltimore.
 - **Gilbert, R.G.** 1995. Molecular weight distributions in free-radical polymerizations: their cause and cure. *Trends Polym. Sci.* **3**: 222-226.
 - **Gilliland, R.G.** 1985. *Bacterial starter cultures for food*. CRC Press, Boca Raton, USA.
 - **Glucksmann, M.A., Reuber, T.L., Walker, G.C.** 1993. Genes needed for modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: A model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 7045-7055.
 - **Gochnauer, M.B., Leppard, G.G., Komaratat, P., Kates, M., Novitsky, T., Kushner, D.J.** 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can. J. Microbiol.* **21**: 1500-1511.
 - **Göller, K., Ofer, A., Galinski, E.A.** 1998. Construction and characterization of a NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 293-300.
 - **González, J.E., Marketon, M.M.** 2003. Quorum-sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 574-592.
 - **González, J.E., Semino, C.E., Wang, L., Castellano-Torres, L.E., Walker, G.C.** 1998. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 13477-13482.
 - **González, J.E., York, G.M., Walker, G.C.** 1996. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene.* **179**: 141-146.
 - **González, M.E., Alarcón, B., Carrasco, L.** 1987. Polysaccharide as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents Ch.* **31**: 1388-1393.
 - **Gorin, P.A.J., Spencer, J.F.T.** 1966. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Chem.* **44**: 993-998.
 - **Gorkovenko, A., Zhang, J., Gross, R.A., Allen, A.L., Kaplan, D.L.** 1997. Bioengineering of emulsifier structure: emulsan analogs. *Can. J. Microbiol.* **43**: 384-390.
 - **Gorret, A.U., Maubois, N., Engasser, J.L., Ghou, J.M.** 2001. Study of the effect of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 788-796.
-

- **Goto, T., Nakame, Y., Matsuyama, T.** 1999. Bacterial biofilms and catheters in experimental urinary tract infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**: 227-231.
- **Gough, C.L., Dow, J.M., Barber, C.E., Daniels, M.J.** 1988. Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 275-281.
- **Gough, C.L., Dow, J.M., Keen, J., Henrissat, B., Daniels, M.J.** 1990. Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Gene*. **89**: 53-59.
- **Goycoolea, F.M., Milas, M., Rinaudo, M.** 2001. Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. *Int. J. Biol. Macromol.* **29**: 181-192.
- **Goycoolea, F.M., Morris, E.R., Gidley, M.J.** 1995. Screening for synergistic interactions in dilute polysaccharide solutions. *Carbohydr. Polym.* **28**: 351-358.
- **Graber, M., Morin, A., Duchiron, F., Monsan, P.F.** 1988. Microbial polysaccharides containing 6-deoxysugars. *Enzyme Microb. Tech.* **10**: 198-205.
- **Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D.** 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model. *FEBS Lett.* **32**: 195-198.
- **Grant, W.D., Kamekura, M., McGenity, T.J., Ventosa, A.** 2001. Class III. Halobacteria. Order *Halobacteriales*. Family *Halobacteriaceae*. Reproduced from *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition. Garrity, G.M. Editor in chief, vol 1 (Eds), pp. 294-333 (2001) by copyright permission of the Springer-Verlag. Noda Institute for Scientific Research **45**: 17-30.
- **Grant, W.D., Larsen, H.** 1989. Group III. Extremely halophilic archaeobacteria. Order *Halobacteriales*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. y Holt, J.G. (Eds), pp. 2216-2233. Williams & Wilkins, Baltimore.
- **Griffin, A.M., Edwards, K.J., Morris, V.J., Gasson, M.J.** 1997a. Genetic analysis of acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: DNA sequence analysis of the *aceM* gene encoding an UDP-glucose dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.* **19**: 469-474.
- **Griffin, A.M., Morris, V.J., Gasson, M.J.** 1996a. Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**: 115-121.
- **Griffin, A.M., Morris, V.J., Gasson, M.J.** 1996b. Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequence analysis of the *aceB*, *aceC*, *aceD* and *aceE* genes. *DNA Seq.: J. DNA. Seq. Map.* **6**: 275-284.
- **Griffin, A.M., Poelwijk, E.S., Morris, V.J., Gasson, M.J.** 1997b. Cloning of the *aceF* gene encoding the phosphomannose isomerase and GDP-mannose pyrophosphorylase activities involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 389-396.
- **Grigorova, D., Pavlova, K., Panchev, I.** 1999. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Appl. Biochem. Biotech.* **3**: 181-191.
- **Grobben, G.J., Van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M.R., Sikkema, J., de Bont, J.A.M.** 1997. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 516-521.
- **Guezennec, J., Pignet, P., Lijour, Y., Gentric, E., Ratiskol, J., Colliec-Jouault, S.** 1998. Sulfation and depolymerization of a bacterial exopolysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydr. Polym.* **37**: 19-24.
- **Guezennec, J., Pignet, P., Raguenes, G., Deslandes, E., Lijour, Y., Gentric, E.** 1994. Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin. *Carbohydr. Polym.* **24**: 287-294.

-
- **Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Bauru, M.** 2005. Comparison of the complexation potencial of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* **59**: 629-638.
 - **Guillouet, S., Choi, J.H., Rha, C.K., Sinskey, A.J.** 1999. Effects of yeast extract on the production and the quality of the exopolysaccharide zooglan, produced by *Zooglea ramigera* 115SLR. *Appl. Microbiol. Biot.* **51**: 235-240.
 - **Gutnick, D.L., Bach, H.** 2000. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 541-460.
 - **Hammer, B.K., Bassler, B.L.** 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 101-114.
 - **Hanna, K., Bengis-Garber, C., Kushner, D.J., Kogut, M., Kates, M.** 1984. The effect of salt concentration on the phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Can. J. Microbiol.* **30** :669-675.
 - **Hannote, M., Flores, F., Torres, L., Galindo, E.** 1991. Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low cost viscosimeter. *Chem. Eng. J.* **45**: 49-56.
 - **Harada, T., Masada, M., Fujimon, K.** 1966. Production of a firm resilient gel-forming polysaccharide by a mutant of *Alcaligenes var. myxogenes* 10CO3. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 196-202.
 - **Harada, T., Okuyama, K., Konno, A., Koreeda, A., Harada, A.** 1994. Effect of heating on formation of curdlan gels. *Carbohyd. Polym.* **24**: 101-106.
 - **Harada, T., Terasaki, M., Harada, A.** 1993. Microbial polysaccharides. En: *Industrial Gums*. Whistler, R.L., de Miller, J.N. (Eds.), pp. 427-445. Academic Press, New York.
 - **Harb, O.S., Venkatamaran, C., Haack, B.J., Gao, L.Y., Kwaik, Y.A.** 1998. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 126-132.
 - **Harding, N.E., Cleary, J.M., Cabañas, D.K., Rosen, I.G., Kang, K.K.** 1987. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* **169**: 2854-2861.
 - **Harding, N.E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M., Ielpi, L.** 1993. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **139**: 447-457.
 - **Haroun-Bouhedja, F., Ellouali, M., Sinquin, C., Biosson-Vidal, C.** 2000. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* **100**: 453-459.
 - **Harvey, L.M., Mc Neil, B.** 1998. Thickeners of Microbial Origin. En: *Microbiology of fermented foods*. 2nd ed. Vol. 1. Wood, B.J.B. (Ed.), pp. 150-171. Blackie Academic & Professional, London.
 - **Hashimoto, W., Inose, T., Nakajima, H., Sato, N., Kimura, S., Murata, K.** 1996. Purification and characterization of microbial gellan lyase. *Appl. Environ. Microb.* **62**: 1475-1477.
 - **Hashimoto, W., Murata, K.** 1998. α -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingon. *Biosci. Biotech. Bioch.* **62**: 1068-1074.
 - **Hasimoto, W., Momma, K., Mishima, Y., Kobayashi, E., Miyake, O., Kawai, S., Nankai, H., Mikami, B., Murata, K.** 1999. Enzymatic and genetic bases on assimilation, depolymerization and transport of heteropolysaccharides in bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 123-136.
 - **Hassler, R.A., Doherty, D.H.** 1990. Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Progr.* **6**: 182-187.
 - **Hasui, M., Matsuda, M., Okutani, K., Shigeta, S.** 1995. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *J. Biol. Macromol.* **17**: 293-297.
-

- **Hasui, M., Matsuda, M., Yoshimatsu, S., Okutani, K.** 1995. Production of a lactate-associated galactan sulfate by a dinoflagellate *Gymnodinium* A3. *Fish Sci.* **61**: 321-326.
- **Hayashi, K., Hayashi, T., Kojima, I.** 1996. A natural sulfated polysaccharide calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and anti-human immunodeficiency virus activities. *Aids Res. Hum. Retrov.* **12**: 463-471.
- **Hayashi, T., Hayashi, K.** 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *J. Nat. Prod.* **59**:83-87.
- **Hebert, A.M., Vreeland, R.H.** 1987. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev. comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 347-350.
- **Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- **Hester, A.** 2001. IB market forecast. *Ind. Bioprocess.* **23**: 3.
- **Heyraud, A., Dantas, L., Courtois, J., Courtois, B., Helbert, W., Chanzy, H.** 1994. Crystallographic data on bacterial (1-4)- β -D-glucuronan. *Carbohydr. Res.* **258**: 275-279.
- **Heyrman, J., Balcaen, A., De Vos, P., Swings, J.** 2002. *Halomonas muralis* sp. nov., a new species isolated from microbial biofilms colonising the walls and murals of the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 2049-2054.
- **Hisamatsu, M., Nomura, S., Shutsrirung, A., Obata, H., Teranishi, K., Yamada, T., Nuswantara, S., Yamashita, M., Murooka, Y.** 1997. Structural characterization of a new acidic exopolysaccharide and cyclic (1 \rightarrow 2) β -glucan produced by *Rhizobium huakuii* forming nodules on *Astragalus sinicus*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**: 315-320.
- **Hisamatsu, M., Sanko, K., Amekura, A., Harada, T.** 1978. Acidic polysaccharides containing succinic acid in various strains of *Agrobacterium*. *Carbohydr. Res.* **61**: 89.
- **Ho, N.J., Koziol, J.A., Parsons, C.L., Barlow, W., Weiss, N.S.** 1999. Natural history of interstitial cystitis in 274 patients receiving sulphated polysaccharide therapy. *Urology.* **53**: 1133-1139.
- **Hochstein, L.I., Bogomolni, R.** 1999. What do extreme halophiles tell us about the evolution of the proton-translocating ATPases? En: *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. Oren, A. (Ed), pp. 273-280. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- **Hommel, R.K., Weber, L., Weiss, A., Himelrich, U., Rilke, O., Kleber, H.P.** 1994. Production of sophorose lipid by *Candida apicola* grown on glucose. *J. Biotechnol.* **33**: 147-155.
- **Hood, S.K., Zottola, E.A.** 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.* **37**: 145-153.
- **Horikoshi, K.** 1997. A new microbial world-Extremophiles. *Extremophiles* **1**: 1
- **Hoshino, T., Hayashi, T., Hayashi, K., Hamada, J., Lee, J.B., Sankawa, U.** 1998. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum homeri* (TURNER) C. AGARDH. *Biol. Pharm. Bull.* **21**: 730-734.
- **Hoyle, B.D. y Beveridge, T.J.** 1984. Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *Can J. Microbiol.* **30**: 204-211.
- **Huleihel, M., Talyshinsky, M., Souprun, Y., Eurukhimovitch, V.** 2003. Spectroscopic evaluation of the effect of a red microalgal polysaccharide on herpes-infected Vero cells. *Appl. Spectrosc.* **57**: 390-395.
- **Ichimiya, T., Yamasaki, T., Nasu, M.** 1994. In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 331-341.
- **Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A.** 1981. Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **12**: 1400-1408.

-
- **Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A.** 1983. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho sugar stage. *Biochem. Int.* **6**: 323-333.
 - **Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A.** 1993. Sequential assembly and polymerization of the prenyl-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*, *J. Bacteriol.* **175**: 2490-2500.
 - **Imhoff, J.F.** 1993. Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganism. En: *The biology of halophilic bacteria*. Vreeland, R.H. Y Hochstein, L.I. (Eds), pp. 211-253. CRC Press, Inc, Boca Raton, Fla.
 - **Imhoff, J.F., Süling, J.** 1996. The phylogenetic relationship among *Ectothiorhodospiraceae*: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Arch. Microbiol.* **156**: 106-113.
 - **Imhoff, J.F., Thiemman, B.** 1991. Influence of salt concentration and temperature on the fatty acid composition of *Ectothiorhodospira* and other halophilic phototrophic purple bacteria. *Arch. Microbiol.* **156**: 370-375.
 - **Inoue, K., Korenaga, H., Tanaka, N.G., Sakamoto, N., Kadoya, S.** 1988. The sulfated polysaccharide-peptidoglycan complex potently inhibits embryonic angiogenesis and tumor growth in the presence of cortisone acetate. *Carbohydr. Res.* **81**: 135-142.
 - **Inoue, S., Itoh, S.** 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. *Biotechnol. Lett.* **4**: 308-312.
 - **Inoue, Y., Nagasawa, K.** 1976. Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydr. Res.* **46**: 87-95.
 - **Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tamaka, I., Yoshida, S.** 2001. Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. *Ann. Occup. Hyg.* **45**: 421-427.
 - **Isnard, N., Bourles-Dagonet, F., Robert, L., Renard, G.** 2005. Studies on corneal wound healing. Effect of fucose on iodine vapor-burnt rabbit corneas. *Ophthalmologica* **219**: 324-333.
 - **Isobe, Y., Endo, K., Kawai, H.** 1992. Properties of a highly viscous polysaccharide produced by a *Bacillus* strain isolated from soil. *Biosci. Biotech. Bioch.* **56**: 636-639.
 - **Isobe, Y., Matsumoto, Y., Yokoigawa, K., Hawaii, H.** 2001. Properties of an extracellular polysaccharide produced by a strain of *Enterobacter* isolated from pond water. *Biosci. Biotech. Bioch.* **65**: 1399-1401.
 - **Itoh, H., Noda, H., Amano, H., Zhuang, C., Mizuno, T.** 1993. Antitumoral activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res.* **13**: 2045-2052.
 - **Iyer, A., Kalpana, M., Bhavanath, J.** 2004. Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Mar. Pollut. Bull.* **49**: 974-977.
 - **Iyer, A., Mody, K., Jha, B.** 2005. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 340-343.
 - **Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T.** 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 290-301.
 - **James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D., McMeekin, T.A.** 1990. *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 270-277.
 - **Janhaz, U., Schubert, M., Baars-Hibbe, H., Vorlop, K.D.** 2003. Process for producing the potential food ingredient DFA III from inulin: screening, genetic engineering, fermentation and immobilisation of inulase II. *Int. J. Pharm.* **256**: 199-206.
 - **Jansson, P.E., Kenne, L., Lindberg, B.** 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **45**: 275-282.
-

- **Javan, C.M., Gooderham, N.J., Edwards, R.J., Davies, D.S., Shaunak, S.** 1997. Anti-HIV type 1 activity of sulfated derivatives of dextrin against primary viral isolates of HIV type 1 in lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **13:** 875-80.
- **Javor, B.** 1989. *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry.* Springer-Verlag KG, Berlin.
- **Jay, A.J., Colquhoun, I.J., Ridout, M.J., Brownsey, G.J., Morris, V.J., Fialho, A.M., Leitao, J.H., Sá-Correia, I.** 1998. Analysis of structure and function of gellans with different substitution patterns. *Carbohydr. Polym.* **35:** 179-188.
- **Jeanes, A.** 1974. Extracellular microbial polysaccharides. *Food. Technol.* **28:** 34-40.
- **Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T., Blanco, C.** 1992. Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine : uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* **174:**5027-5035.
- **Jensen-Spaudling, A., Shuler, M.L., Lion, L.W.** 2004. Mobilization of adsorbed copper and lead from naturally aged soil by bacterial extracellular polymers. *Wat. Res.* **38:** 1121-1128.
- **Jo, W.S., Rew, Y.H., Kim, C.B., Choi, S.G.** 2002. Development of fruit body in the artificial oak sawdust cultures of *Phellinus gilvus* mushroom. *Korean J. Mycol.* **30:** 109-112.
- **Johnson, A.R.** 1971. Improved method of hexosamine determination. *Anal. Biochem.* **44:** 628-635.
- **Johnson, F.M.** 1998. The genetic effects of environmental lead. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **410:** 123-140.
- **Johri, A.K., Blank, W., Kaplan, D.L.** 2002. Bioengineered emulsans from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 transposon mutants. *Appl. Microbiol. Biot.* **59:** 217-223.
- **Juni, E.** 1978. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **32:** 349-371.
- **Juni, E., Janick, A.** 1969. Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **98:** 281-288.
- **Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., Ghiorse, W.C.** 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* **3:** 774-784.
- **Kaeppli, O., Finnerty, W.R.** 1980. Characteristics of hexadecane partition by the growth medium of *Acinetobacter* sp. *Biotechnol. Bioeng.* **22:** 495-501.
- **Kamel, M., Serafi, T.** 1995. Fucose concentrations in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **13:** 243-246.
- **Kang, K.S., Veeder, G.T., Cottrell, I.W.** 1983. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. *Prog. Ind. Microbiol.* **18:** 231-53.
- **Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T., Cottrell, I.W.** 1982. Agar-like polysaccharides produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **43:** 1086-1091.
- **Kannenberg, E.L., Brewin, N.J.** 1994. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol.* **2:** 277-283.
- **Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S.** 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharide from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microb.* **53:** 2953-2956.
- **Kaplan, N., Rosenberg, E.** 1982. Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microb.* **44:** 1335-1341.
- **Kaplan, N., Rosenberg, E., Jann, B., Jann, K.** 1985. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur. J. Biochem.* **152:** 453-458.
- **Katz, E., Demain, A.L.** 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41:** 449.

-
- **Katzen, F., Becker, A., Zorreguieta, A., Pühler, A., Ielpi, L.** 1996. Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *gum* operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J. Bacteriol.* **178**: 4313-4318.
 - **Katzen, F., Ferreira, D.U., Oddo, C.G., Ielmini, M.V., Becker, A., Pühler, A., Ielpi, L.** 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriol.* **180**: 1607-1617.
 - **Kawahara, K., Dejsirilent, S., Ezaki, T.** 1998. Characterization of 3 capsular polysaccharides produced by *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol.* **169**:283-287.
 - **Kaye, J.Z., Márquez, M.C., Ventosa, A., Baross, J.A.** 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 499-511.
 - **Kazy, S.K., Sar, P., Singh, S.P., Sen, A.K., D'Souza, S.F.** 2002. Extracellular polysaccharides of a cooper-sensitive and a cooper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and cooper binding. *World J. Microb. Biot.* **18**: 583-588.
 - **Keith, J., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., Kaplan, D.** 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 557-560.
 - **Keller, M., Müller, P., Simon, R., Pühler, A.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes for exopolysaccharide synthesis and nodule infection located on megaplasmid 2 are actively transcribed during symbiosis. *Mol. Plant Microbe In.* **1**: 267-274.
 - **Kempf, B., Bremer, E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.
 - **Kendall, F.S., Herdelberger, B., Dawson, M.H.** 1937. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A haemolytic streptococci. *J. Biol. Chem.* **118**: 61-69.
 - **Kenne, L., Lindberg, B.** 1983. Bacterial polysaccharides. En: *The Polysaccharides*. Aspinall, G.O. (Ed), pp. 287-363. Academic Press, New York.
 - **Kennedy, J.F., Bradshaw, I.J.** 1984. Production properties and applications of xanthan. *Prog. Ind. Microbiol.* **19**: 319-71.
 - **Kennedy, J.F., Jones, P., Barker, S.A.** 1982. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enz. Microb. Technol.* **4**: 39-43.
 - **Kennedy, L., Sutherland, I.W.** 1994. Gellan lyases-novel polysaccharide lyase. *Microbiology.* **140**: 3007-3013.
 - **Kieda, C., Monsigny, M.** 1986. Involvement of membrane sugar receptors and membrane glycoconjugates in the adhesion of 3 LL cell subpopulations to cultured pulmonary cells. *Invasion Metastasis* **6**: 347-366.
 - **Kilbane, J.J.** 1991. A biosystem for removal of metal ions from water. En: *Gas, Oil, Coal and Environmental Technology III*. Akin, C., Smith, J., (Eds.), pp. 207-226. Institute of Gas Technology, Chicago.
 - **Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y.** 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 41-46.
 - **Kim, J.S., Powalla, M., Lang, S., Wagner, F., Lunsdorf, H., Wray, V.** 1990. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol.* **13**: 257-266.
 - **Kimmel, S.A., Roberts, R.F.** 1998. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 87-92.
 - **Kimmel, S.A., Roberts, R.F., Ziegler, G.R.** 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 659-664.
-

- **Kirillina, O., Fetherstone, J.D., Brovov, A.G., Abney, J., Perry, R.D.** 2004. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* **54**: 75-88.
- **Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T.** 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 169-175.
- **Kitazawa, H., Ishii, Y., Uemura, J., Kawai, Y., Saito, T., Kaneko, T., Noda, K., Itoh, T.** 2000. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Food Microbiol.* **17**: 109-118.
- **Klekner, V., Kosaric, N.** 1993. Biosurfactants for cosmetics. En: *Biosurfactants: production, properties, applications*. Kosaric, N. (Ed.), pp. 329-372. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- **Kogut, M.** 1991. The "true" intracellular environment of moderately halophilic eubacteria. En: *General and applied aspects of halophilic microorganisms*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 217-224. Plenum Press. New York.
- **Koo, S.P., Higgings, C.F., Booth, I.R.** 1991. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2617-2625.
- **Korsmeyer, S.J.** 1992. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* **80**: 879-886.
- **Koser, S. A.** 1923. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J. Bacteriol.* **8**: 493-520.
- **Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., Shimeno, H.** 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* **15**:173-179.
- **Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., Shimeno, H.** 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 173-179.
- **Kraegeloh, A., Amendt, B., Kunte, H.J.** 2005. Potassium transport in a halophilic member of the bacteria domain: identification and characterization of the K⁺ uptake systems TRC and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J. Bacteriol.* **187**: 1036-1043.
- **Kristen, H., Vogel, C., Wrubel, F., Mahrwald, R., Schick, H.** 1988. Introduction of a new selective oxidation procedure into carbohydrate chemistry - An efficient conversion of D-galactose into L-fucose. *J. Carbohydr. Chem.* **7**: 277-281.
- **Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**: 150-163.
- **Kumon, H., Tomoshika, K., Matunaga, T., Ogawa, M., Ohmori, H.A.** 1994. Sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. *Microbiol. Immunol.* **38**: 615-619.
- **Kunte, H.J., Galinski, E.A.** 1995. Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 293-299.
- **Kushner, D.J.** 1985. The *Halobacteriaceae*. En: *The Bacteria*. Vol. VIII: Archaeobacteria. Woese, C.R. y Wolfe, R.S. (Eds), pp. 297-342. Academic Press, Boca Raton.
- **Kushner, D.J., Kamekura M.** 1988. Physiology of halophilic eubacteria. En: *Halophilic bacteria*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 109-138. CRC Press, Boca Raton, USA.
- **Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G., Choplin, L.** 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 202-207.
- **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

-
- **Lai, M.C., Sower, K.R., Robertson, D.E., Roberts, M.F., Gunsalus, R.P.** 1991. Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 5352-5358.
 - **Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M.Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., Santos, H.** 2000. Thermostabilisation of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1974-1979.
 - **Lamothe, G.T., Jolly, L., Mollet, B., Stingele, F.** 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch. Microbiol.* **178**: 218-228.
 - **Lang, S., Wullbrandt.** 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biot.* **51**: 22-32.
 - **Lapasin, R., Prici, S.** 1995. Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications. TJ Press Ltd, Padstow, Cornwall.
 - **Larsen, H.** 1980. Ecology of hypersaline environments. En: Hypersaline brines and evaporitic environments. Nissenbaum, A. (Ed), pp. 23-60. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 - **Larwood, V.L., Howlin, B.J., Webb, G.A.** 1996. Solvation effects on the conformational behaviour of gellan and calcium ion binding to gellan double helices. *J. Mol. Model.* **2**: 175-182.
 - **Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penades, J.R., Leiva, J.** 2005. Bacterial biofilms and infection. *An. Sist. Sanit. Navar.* **28**: 163-175.
 - **Lawford, H.G., Rousseau, J.D.** 1992. Production of β -1,3-Glucan exopolysaccharide in low shear system. *Appl. Biochem. Biotech.* **34**: 597-612.
 - **Laycock, M., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A., Wright, J.L.C.** 1991. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Agr. Food Chem.* **39**: 483-489.
 - **Lee, I.Y.** 2002. Curdlan. En: Biopolymers. Vol. 5. Steinbüchel, A., Vandamme, E.J., De Baets, S. (Eds), pp. 136-154. Wiley-VCH, Weinheim.
 - **Lee, J.C., Jeon, C.O., Lim, J.M., Lee, S.M., Lee, J.M., Song, S.M., Park, D.J., Li, W.J., Kim, C.J.** 2005. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2027-2032.
 - **Lee, K.H.** 2004. Current developments in the discovery and design of new drugs candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.* **67**: 273-283.
 - **Leela, J.K., Sharma, G.** 2000. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Eng.* **23**: 687-689.
 - **Leigh, J.A., Coplin, D.L.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 307-346.
 - **Leigh, J.A., Redd, J.W., Hanks, J.F., Hirsch, A.M., Walker, G.C.** 1987. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell.* **51**: 579-587.
 - **Leigh, J.A., Walker, G.C.** 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63-67.
 - **Leppard, G.G.** 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **165**: 103-131.
 - **Lessie, T.G., Phibbs, P.V.** 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilisation in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 359-387.
 - **Le-Tien, C., Millette, M., Lacroix, M., Mateescu, M.A.** 2004. Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**: 189-198.
-

- **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. *Appl. Microbiol. Biot.* **55**: 417-422.
- **Levander, F., Svensson, M., Rådström, P.** 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 784-790.
- **Ley, K., Cerrito, M., Arfors, K.E.** 1991. Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in venules by protamin and sulfated polysaccharides. *Am. J. Physiol.* **260**: H1667-H1673.
- **Li, G., Kim, D.H., Kim, T.D., Park, B.J., Park, H.D., Park, J.I., Na, M.K., Kim, H.C., Hong, N.D., Lim, K., Hwang, B.D., Yoon, W.H.** 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G₂/M phase arrest and apoptosis in WS480 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **216**: 175-181.
- **Li, Z.Y., Lang, S., Wagner, F., Witte, L., Wray, V.** 1984. Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. *Appl. Environ. Microb.* **48**: 610-617.
- **Lilly, V.G.** 1958. Bacterial polysaccharides II. Laboratory scale production of polysaccharides by species of *Xanthomonas*. *Appl. Microbiol. Biot.* **6**: 105-108.
- **Lim, J.M., Yoon, J.H., Lee, J.C., Jeon, C.O., Park, D.J., Sung, C., Kim, C.J.** 2004. *Halomonas koreensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2037-3042.
- **Lin, C.S., Lin, N.T., Yang, B.Y., Weng, S.F., Tseng, Y.H.** 1995. Nucleotide sequence and expression of UDP-glucose dehydrogenase gene required for the synthesis of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **207**: 223-230.
- **Lin, S.C.** 1996. Biosurfactants: recent advances. *J.Chem. Technol. Biot.* **66**: 109-120.
- **Lin, S.C., Minton, M.A., Sharma, M.M., Georgiou, G.** 1994. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by a *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microb.* **60**: 31-38.
- **Lin, X., Cai, Y.J., Li, Z.X., Chen, Q., Liu, Z.L., Wang, R.** 2003. Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel polysaccharide from *Cladonia furcata*. *Biochim. Biophys. Acta* **1622**: 99-108.
- **Lin, X., Cai, Y.J., Li, Z.X., Chen, Q., Liu, Zhl., Wang, R.** 2003. Structure determination, apoptosis induction and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochim. Biophys. Acta* **1622**: 99-108.
- **Lin, Y.S., Stout, J.E., Yu, V.L., Vidic, R.D.** 1998. Desinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.* **13**: 147-159.
- **Lindahl, U.** 1999. What else can 'Heparin' do?. *Haemostasis.* **29**: 38-47.
- **Lindberg, B.** 1990. Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Bi.* **48**: 279-318.
- **Lindberg, B., Lindquist, B., Lönngren, J., Nimmich, W.** 1976. 4-O-[(S)-1-carboxyethyl]-D-glucuronic acid: a component of the *Klebsiella* type 37 capsular polysaccharide. *Carbohydr. Res.* **49**: 411-7.
- **Linker, A., Evans, L.R., Impallomeni, G.** 2001. The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderia cepacia*. *Carbohydr. Res.* **335**: 45-54.
- **Linker, A., Jones, R.S.** 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* microorganism. *Nature.* **204**: 187-188.
- **Linker, A., Jones, R.S.** 1966. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3845-3851.
- **Linton, J.D.** 1990. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. *FEMS. Microbiol. Rev.* **75**: 1-18.

-
- **Lion, L.W., Shuler, M.L., Hsieh, K.M., Ghiorse, W.C.** 1988. Trace metal interactions with microbial biofilms in natural and engineered systems. *CRC Crit. Rev. Env. Control.* **17**: 273-306.
 - **Lippert, K., Galinski, E.A.** 1992. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 61-65.
 - **Litchfield, C.** 1998. Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Met. Plan. Science* **33**: 813-819.
 - **Llamas, I., Argandoña, M., Quesada, E., del Moral, A.** 2000. Transposon mutagenesis in *Halomonas eurihalina*. *Res. Microbiol.* **151**: 1-7.
 - **Llamas, I., Suárez, A., Quesada, E., Béjar, V., del Moral, A.** 2003. Identification and characterization of the *carAB* genes responsible for encoding carbamoylphosphate synthetase in *Halomonas eurihalina*. *Extremophiles.* **7**: 205-211.
 - **Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Gronquist, M., Eberhard, A., González, J.E.** 2005. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extremophiles* **9**: 333-341.
 - **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. *Appl. Environ. Microbiol.* **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. *Appl. Environ. Microb.* **64**: 1024-1028.
 - **Lo, Y.M., Yang, S.T., Min, D.B.** 1997. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 689-694.
 - **Loaëc, M., Olier, R., Guezennec, J.** 1998. Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohyd. Polym.* **35**: 65-70.
 - **Lobas, D., Schumpe, S., Deckwer, W.D.** 1992. The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314). *Appl. Microbiol. Biot.* **37**: 411-415.
 - **Looijesteijn, P.J., van Casteren, W.H.M., Tuinier, R., Doeswijk-Voragen, C.H.L., Hugenholtz, J.** 2000. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *J. Appl. Microbiol.* **89**:116-122.
 - **López, A., Lázaro, N., Morales, S., Marqués, A.M.** 2002. Nickel biosorption by free and immobilized cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Water Air Soil Poll.* **135**: 157-172.
 - **López, A., Lázaro, N., Priego, J.M., Marqués, A.M.** 2000. Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **24**: 146-151.
 - **López-Munguía, A., Brito de la Fuente, E., Galindo, E.** 1993. Biopolímeros. In: *Biotecnología Alimentaria*. García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R., López-Munguía-Canales, A. (Eds), pp. 423-451. Limusa Noriega. México D.F.
 - **Lu, R., Yoshida, T., Nakashima, H., Premanathan, M., Aragaki, R., Minura, T., Kaneko, Y., Yamamoto, N., Miyakoshi, T., Uryu, T.** 2000. Specific biological activities of chinese lacquer polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **43**: 47-54.
 - **Ludwig, W.** 1999. The role of rRNA as a phylogenetic marker in the context of genomics. *USFCC newsl.* **29**: 2-6.
 - **Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleiner, M., Schleifer, K.H.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
-

- **Lynch, G., Low, L., Li, S., Sloane, A., Adams, S., Parish, C., Kemp, B., Cunningham, A.L.** 1994. Sulfated polyanions prevent HIV infection of lymphocytes by disruption of the CD4-gp120 interaction, but do not inhibit monocyte infection. *J. Leukoc. Biol.* **56**: 266-272.
- **Macosko, C.W.** 1994. *Rheology. Principles, measurements and applications.* VCH Publishers, New York.
- **Mah, T.F., O'Toole, G.A.** 2001. Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trens Microbiol.* **9**: 34-39.
- **Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewarts, P.S., O'Toole, G.A.** 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* **426**: 306-310.
- **Mähner, C., Lechner, M.D., Nordmeier, E.** 2001. Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate. *Carbohydr. Res.* **331**: 203-208.
- **Malik, A.** 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* **30**: 261-278.
- **Mancuso Nichols, C., Garon Lardière, S., Bowman, J.P., Nichols, P.D., Gibson, J.A.E., Guézennec, J.** 2005b. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol.* **49**: 578-589.
- **Mancuso-Nichols, C., Bowman, J.P., Guezennec, J.** 2005a. Effect of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *App. Environ. Microbiol.* **71**: 3519-3523.
- **Manna, B., Gambhir, A., Ghosh, P.** 1996. Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 141-145.
- **Manzini, G., Cesaro, A., Delben, F., Paoletti, S., Reisenhofer, E.** 1984. Copper (II) binding by natural ionic polysaccharides. Part I Potentiometric and spectroscopy data. *Bioelectroch. Bioener.* **12**: 443-454.
- **Margesin, R., Schinner, F.** 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles.* **5**: 73-83.
- **Marín, M., Pedregosa, A., Laborda, F.** 1996. Emulsifier production and microscopic study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* Mm5. *Appl. Microbiol. Biot.* **44**: 660-667.
- **Marshall, V.M.E., Cowie, E.N., Moreton, R.S.** 1995. Analysis and production of two polysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *J. Dairy Res.* **62**: 621-628.
- **Martín Bourgon, C., Pelaz, C.** 1992. Legionellosis. Implicaciones de las instalaciones de agua sanitaria, climatización y otros sistemas generadores de aerosoles como difusores de la enfermedad. *El instalador* **278**: 101-116.
- **Martinez-Canovas, M.J., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Paez, R., Quesada, E.** 2004e. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1793-1797.
- **Martínez-Cánovas, M.J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Quesada, E.** 2004b. *Halomonas anticariensis*, sp. nov., from Fuente de Piedra, a saline-wetland wewdowl reserve in Malaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1329-1332.
- **Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Llamas, I., Béjar, V.** 2004c. *Halomonas ventosae* sp. nov, a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 733-737.
- **Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Béjar, V.** 2004a. A taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *Curr. Microbiol.* **48**: 348-353.
- **Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., del Moral, A., Béjar, V.** 2004d. *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the alpha-Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1735-1740.

-
- **Martínez-Checa F, Bejar V, Llamas I, Del Moral A, Quesada E.** 2005c. *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2385-90.
 - **Martínez-Checa, F., Béjar, V., Martínez-Cánovas, M.J., Llamas, I., Quesada, E.** 2005a. *Halomonas almeriensis* sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Cabo de Gata, Almería, south-east, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2007-2011.
 - **Martínez-Checa, F., Calvo, C., Caba, M.A., Ferrer, M.R., Béjar, V., Quesada, E.** 1996. Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscosidad y capacidad emulgente del biopolímero V2-7 de *Volcaniella eurihalina*. *Microbiología SEM.* **12**: 55-60.
 - **Martínez-Checa, F., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M.J., Llamas, I., Béjar, V.** 2005b. *Palleronia marismminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2525-2530.
 - **Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Vilchez, R., Quesada, E., Calvo, C.** 2002. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* **58**: 358-363.
 - **Martins, L.O., Sá-Correia, I.** 1993. Temperature profiles of gellan synthesis and activities of biosynthetic enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20**: 385-395.
 - **Mata, J.A., Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Béjar, V.** 2002. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 360-375.
 - **Matou, S., Colliec-Jouault, S., Galy-Fauroux, I., Ratskol, J., Siquin, C., Guezennec, J., Fischer, A.M., Helley, D.** 2005. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **69**:751-759.
 - **Matsuda, M., Hasmi, M., Okutani, K.** 1993. Structural analysis of a sulfated polysaccharide from a marine *Pseudomonas*. *Nippon Suisan Gakk.* **59**: 535-538.
 - **McComb, E.A., Mcready, R.M.** 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction. *Anal. Chem.* **29**: 819-821.
 - **McKenney, D., Hubner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D.A., Pier, G.B.** 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* **66**: 4711-4720.
 - **McNeil, B., Harvey, L.M.** 1993. Viscous fermentation products. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**: 275-304.
 - **Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J., Ventosa, A.** 1995. Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina* and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 712-716.
 - **Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A., Sanderson, G.R.** 1976. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **46**: 245-257.
 - **Mendrygal, K.E., González, J.E.** 2000. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **182**:599-606.
 - **Meyer, B.** 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeter. Biodegr.* **51**: 249-253.
 - **Meyer, B.** 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeter. Biodegr.* **51**: 249-253.
 - **Milas, M., Rinaudo, M.** 1986. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: role of the conformational transition. *Carbohydr. Res.* **158**: 191-204.
-

- **Miller, V.L., Mekalanos, J.J.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- **Min-Yu, L., Ono, H., Takano, M.** 1993. Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Annu. Rep. Int. Center Cooperative Res. Biotechnol. Jpn.* **16**: 193-200.
- **Misaki, A., Kishida, E., Kakuta, M., Tabata, K.** 1993. Shyzophyllan. En: *Carbohydrates and Carbohydrate Polymers*. Yalpani, M. (Ed.), pp. 116-129. ATL Press, Mt Prospect, IL, USA.
- **Miyoshi, E., Nishinari, K.** 1999. Non-newtonian flow behaviour of gellan gum aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.* **277**: 727-734.
- **Moe, S.T., Draget, K.I., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O.** 1995. Alginates. En: *Food Polysaccharides and their applications*. Stephen, A.M. (Ed.), pp.245-286. Marcel Dekker, New York.
- **Molina, J.F.** 1998. Production of new oligo/polysaccharides and amino acid derivatives by biotechnology-application in cosmetology, Cosming 98, Rennes, France.
- **Monteoliva-Sánchez, M., Ferrer, M.R., Ramos-Comenzana, A., Quesada, E., Monteoliva, M.** 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth, temperature and salt concentration. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 199-203.
- **Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Comenzana, A., Russel, N.J.** 1993. The effect of salinity and solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1877-1884.
- **Moraine, R.A., Rogovin, P.** 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **8**: 511-524.
- **Moreno, J., Vargas, M.A., Madiedo, J.M., Muñoz, J., Rivas, J., Guerrero, M.G.** 2000. Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 283-290.
- **Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T.** 1992. Isolation of a new surfactin producer, *Bacillus pumilis* A-1, cloning and nucleotide sequence of the regulatory gene *psf-1*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 255-261.
- **Moritaka, H., Nishinari, K., Nakahama, N., Fukuba, H.** 1992. Effects of potassium chloride and sodium chloride on the thermal properties of gellan gum gels. *Biosci. Biotech. Bioch.* **56**: 595-599.
- **Mormile, M.R., Romine, M.F., García, M.T., Ventosa, A., Bailey, T.J., Peyton, M.** 1999. *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 551-558.
- **Morris, E.R.** 1994. En: *Food hydrocolloids: structures, properties and functions*. Nishinari K., Doi, E. (Eds), pp. 201-210. Plenum New York.
- **Morris, E.R., Rees, D.A., Sanderson, G.R., Thom, D.** 1975. Conformation and circular dichroism of uronic acid residues in glycosides and polysaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions* **2**: 1418-1425.
- **Morse, D.L.** 1998. Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers.2. Linear response. *Macromolecules.* **31**: 7044-7067.
- **Moskowitz, S.M., Foster, J.M., Emerson, J., Burns, J.L.** 2004. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1915-1922.
- **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
- **Mota, R.R., Márquez, M.C. Arahal, D.A., Mellado, E., Ventosa, A.** 1997. Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1231-1235.

-
- **Mourey, T.H., Coll, H.** 1995. Size exclusion chromatography with light scattering detection at two angles polystyrene in THE. En: Chromatographic characterisation of polymers. Provder T., Barth, H.G., Urban, M.W. (Eds). Advances in chemistry series 247.
 - **Mozzi, F., Oliver, G., De Giori, G.S., Font de Valdez, G.** 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Milchwissenschaft*. **51**: 670-673.
 - **Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Oliver, G., Font de Valdez, G.** 1995. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I. Influence of salts. *Milchwissenschaft* **50**: 186-188.
 - **Muralidharan, J., Jayachandran, S.** 2003. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Proc. Biochem.* **38**: 841-847.
 - **Nagasawa, K., Inoue, Y., Kamata, T.** 1977. Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water metanol. *Carbohydr. Res.* **58**: 47-55.
 - **Nagata, S., Wang, Y.B.** 2001. Interrelation between synthesis and uptake of ectoine for the growyh of the halotolerant *Brevibacterium* species JCM 6894 at high osmolarity. *Microbios.* **104**: 7-15.
 - **Nahapetian, K., Challemed, O., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P., Squinazi, F.** 1991. The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res. Microbiol.* **142**: 677-685.
 - **Nakajima, S., Funahashi, H., Yoshida, T.** 1990. Xanthan gum production in a fermenter with twin impellers. *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 392-407.
 - **Nakanishi, I., Kimura, K., Suzuki, T., Ishikawa, M., Banno, I., Sakane, T., Harada, T.** 1976. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other β -1,3-glucan in microorganisms with aniline blue. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **22**: 1-11.
 - **Nakar, D., Gutnick, D.L.** 2001. Analysis of the wee gene cluster responsible for the biosynthesis of the polymeric bioemulsifier from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *Microbiol.* **147**: 1937-1946.
 - **Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N.** 1987. Antiretroviral activity in a marine red algae: reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Shizymenia pacifica*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **113**: 413-416.
 - **Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., Shinmyo, A.** 2000. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **122**: 1239-1247.
 - **Nankai, H., Hashimoto, W., Miki, H., Kawai, S., Murata, K.** 1999. Microbial system for polysaccharide depolymerization. Enzymatic route for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain G11. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 2520-2526.
 - **Navon-Venezia, S., Banin, E., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 1998. The bioemulsifier alasin: role of protein in maintaining structure and activity. *Appl. Microbiol. Biot.* **49**: 382-384.
 - **Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 1995. Alasin: a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 3240-3244.
 - **Neelon, K., Schreier, H.J., Meekins, H., Robinson, P.M., Roberts, M.F.** 2005. Compatible solute effects on thermostability of glutamine synthetase and aspartate transcarbamoylase from *Methanococcus jannaschii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1753**: 164-173.
 - **Nemery, B., Lewis, C.P., Demedts, M.** 1994. Cobalt and possible oxidant-mediated toxicity. *Sci. Total Environ.* **150**: 57-64.
 - **Neu, T.R., Lawrence, J.R.** 1999. In situ characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems. En: Microbial extracellular polymeric substances. Characterization, structure and function. Wingender, J., Neu, T.R. y Flemming, H.C. (Eds.), pp. 21-42. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
-

- **Neu, T.R., Poralla, K.** 1990. Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biot.* **32**: 521-525.
- **Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y.Y.** 2002. Anti-HIV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate microbicides. *BMC Infect. Dis.* **2**: 27.
- **Newburg, D.S., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A.L.** 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* **25**: 37-58.
- **Niemeyer, D., Becker, A.** 2001. The molecular weight distribution of succinoglycan produced by *Sinorhizobium meliloti* is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J. Bacteriol.* **183**: 5163-5170.
- **Nies, D.H.** 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 730-750.
- **Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E., Ruíz-Berraquero, F.** 1989. A survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2385-2390.
- **Nieto, J.J., Vargas, C., Ventosa, A.** 2001. Síntesis de compuestos osmoprotectores por bacterias halófilas moderadas: aspectos aplicados. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Comunicación personal.
- **Nisbet, B.A., Sutherland, I.W., Bradshaw, I.J., Kerr, M., Morris, E.R., Shepperson, W.A.** 1984. XM6, a new gel-forming bacterial polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* **4**: 377-394.
- **Nishimura-Uemura, J., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., Oda, M., Saito, T.** 2003. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Food Microbiol.* **20**: 267-273.
- **Nishino, T., Nagumo, T.** 1992. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydr. Res.* **229**: 355-362.
- **Nolte, H., John, S., Smidsrod, O., Stokke, B.** 1992. Gelation of xanthan with trivalent metal ions. *Carbohydr. Polym.* **18**: 243-251.
- **Novak, J.S., Tanenbaum, S.W., Nakas, J.P.** 1992. Heteropolysaccharide formation by *Arthrobacter viscosus* grown on xylose and xylose oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3501-3507.
- **O'Toole, G. A., Kolter, R.** 1998a. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
- **O'Toole, G.A., Kaplan, H.B., Kolter, R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
- **O'Toole, G.A., Kolter, R.** 1998b. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449-461.
- **O'Connor, L.** 2002. Market forecast: microbial biosurfactants. *Ind. Bioprocess.* **24**: 10-11.
- **O'Brien, K.L., Santosham, M.** 2004. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am. J. Epidemiol.* **159**: 634-644.
- **Oba, T., Higashimura, M., Iwasaki, T., Master, A.M., Steeneken, P.A.M., Robjin, G.W., Sikkema, J.** 1999. Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide "villian" from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Polym.* **39**: 275-281.
- **Ogawa, D., Shikata, K., Matsuda, M., Okada, S., Wada, J., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Miyasaka, M., Tojo, S., Makino, H.** 2002. Preventive effect of sulphated colominic acid on P-selectin-dependent infiltration of macrophages in experimentally induced crescentic glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **129**: 43-53.
- **Ogawa, E.** 1999. Temperature dependence of the conformational properties of sodium-type gellan gum in aqueous solutions. *Prog. Colloid.Polym. Sci.* **114**: 8-14.

-
- **Ogawa, K., Yui, T., Nakata, K., Nitta, Y., Kakuta, M., Misaki, A.** 1996. Chain conformation of deacetylated beijeran calcium salt. *Biosci. Biotech. Bioch.* **60**: 551-553.
 - **Okutani, K.** 1992. Antiviral activities of sulfated derivates of a fucosamine containing polysaccharide of marine bacterial origin. *Nippon Suisan Gakk.* **58**: 927-930.
 - **Okutani, K., Shigeta, S.** 1993. Inhibitory effect of sulfated derivates of a marine bacterial polysaccharide on replication of human immunodeficient virus in vitro. *Nippon Suisan Gakk.* **59**: 1433-1438.
 - **Okutani, K., Tandavanitj, S.** 1991. Isolation and characterization of a fucosamine-containing polysaccharide from a Marine strain of *Pseudomonas*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**: 2151-2156.
 - **Ollivier, B., Caumette, P., García, J.L., Mah, R.A.** 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**: 27-38.
 - **Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I.M., Coimbra, T.L., Gorin, P.A., Sierakowski, M.R.** 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulphated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue virus 1 (Hawaii strain). *Antiviral Res.* **60**: 201-208.
 - **Ooi, V.E., Liu, F.** 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Med. Chem.* **7**: 715-729.
 - **Oppenheim, R.W.** 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 453-501.
 - **Oren, A.** 1991. Estimation of the contribution of archaeobacteria and eubacteria to the bacterial biomass and activity in hypersaline ecosystems: novel approaches. En: *General and applied aspects of halophilic bacteria*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 25-31. Plenum Press, New York, N.Y.
 - **Oren, A.** 1999. Bioenergetics aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334-348.
 - **Oren, A., Heldal, M., Norland, S.** 1997. X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 588-592.
 - **Oren, A., Kessel, M., Stackebrandt, E.** 1989. *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligate anaerobic, moderately halophilic purple sulfur bacterium from hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. *Arch. Microbiol.* **151**: 524-529.
 - **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. *J Biol Chem.* **266**:8312-21.
 - **Osman, S.F., Fett, W.F.** 1989. Structure of an acidic exopolysaccharide of *Pseudomonas marginalis* HT041B. *J. Bacteriol.* **171**: 1760-1762.
 - **Osman, S.F., Fett, W.F., Fishman, M.L.** 1986. Exopolysaccharides of phytophathogen *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *J. Bacteriol.* **166**: 66-71.
 - **Oviatt, H.W., Brant, D.A.** 1993. Thermal treatment of semi-dilute aqueous xanthan solutions yields weak gels with properties resembling. *Int. J. Biol. Macromol.* **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.
 - **Ozdemir, G., Ceyhan, N., Manav, E.** 2005. Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beds for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Bioresource Technol.* **96**: 1677-1682.
 - **Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R., Cosar, T.** 2003. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technol.* **90**: 71-74.
 - **Pace, G.W.** 1987. *Microbial Gums*. En: *Basic Biotechnology*. Bullock, J., Kristiansen, B. (Eds.) Academic Press. London.
 - **Páez, R.** 2004. Producción de xantano y gelano a partir de coproducidos de la industria azucarera. Tesis Doctoral.
-

- **Palmen, R., Driessen, A.J., Hellingwerf, K.J.** 1994. Bioenergetic aspects of the translocation of macromolecules across bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1183**: 417-451.
- **Paradossi, G., Chiessi, E., Barbiroli, A., Fessas, D.** 2002. Xanthan and glucomannan mixtures: synergistic interactions and gelation. *Biomacromol.* **3**: 498-504.
- **Paranychianakis, N.V., Chartzoulakis, K.S.** 2005. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Environ.* **106**: 171-187.
- **Parente, A.M. y Silva, M.T.** 1984. Ultrastructural aspects of autolysis of *Pseudomonas fluorescens* induced by osmotic shock. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1459-1470.
- **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.
- **Patel, M.K., Mulloy, B., Gallagher, K.L., O'Brien, L., Hughes, A.D.** 2002. The antimitogenic action of the sulphated polysaccharide fucoidan differs from heparin in human vascular smooth muscle cells. *Thromb. Haemost.* **87**: 149-154.
- **Paterek, J.R., Smith, P.H.** 1988. *Methanohalophilus maii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 122-123.
- **Peciña, A., Paneque, A.** 1994. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in mucoid and nonmucoid *Azotobacter chroococcum* strains. *Appl. Biochem. Biotech.* **49**: 51-58.
- **Peciña, A., Pascual, A., Paneque, A.** 1999. Cloning and expression of the *algI* gene, encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase. Purification and characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **181**: 1409-1414.
- **Peitsch, M.C., Mannherz, H.G., Tschopp, J.** 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol.* **4**: 37-41.
- **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.
- **Peña, C., Trujillo-Roldán, M.A., Galindo, E.** 2002. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *J. Ferm. Bioeng.* **27**: 390-398.
- **Pérez, M.E., Quesada, E., Gálvez, J., Ruíz, C.** 2000. Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina*, on the proliferation in vitro of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharm. Immunot.* **22**: 131-141.
- **Peterszegi, G., Isnard, N., Robert, A.M., Robert, L.** 2003. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. *Biomed. Pharmacother.* **57**: 187-194.
- **Petronella, J.L., Hugenholtz, J.** 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 178-182.
- **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. *Appl. Environ. Microb.* **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. *Appl. Environ. Microb.* **51**: 1224-1229.
- **Pflughoef, K.J., Kierek, K., Watnick, P.I.** 2003. Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5919-5927.
- **Phale, P.S., Savithri, H.S., Rao, N.A., Vaidyanathan, C.S.** 1995. Production of biosurfactant "Biosur-Pm" by *Pseudomonas maltophilia* CSV 89. Characterization and role in hydrocarbon uptake. *Arch. Microbiol.* **163**: 424-431.

-
- **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. *Appl. Environ. Microb.* **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. *Biotech. Bioeng.* **28**: 1484-1496.
 - **Poli, A., Moriello, V.S., Esposito, E., Lama, L., Gambacorta, A., Nicolaus, B.** 2004. Exopolysaccharide production by a new *Halomonas* strain CRSS isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica growing on complex and defined medium. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1635-1638.
 - **Pollock, T.J.** 1993. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **139**: 1939-1945.
 - **Pollock, T.J.** 2001. Sphingian Group of Exopolysaccharides (EPS). En: *Biopolymers*. E. Vandamme, S. de Baets, and A. Steinbüchel (Eds), pp. 239-58. Wiley-VCH, Weinheim.
 - **Pollock, T.J., Thorne, L., Yamazaki, M., Mikolajczak, M., Armentrout, R.W.** 1994. Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **176**: 6229-6237.
 - **Poolman, B., Glaasker, E.** 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397-407.
 - **Prigent-Combaret, C.O., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P.** 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of the gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993-6002.
 - **Pszczola, D.E.** 1993. Gellan gum wins IFT's Food Technology Industrial Achievement Award. *Food Technol.* **47**: 94-96.
 - **Quesada, E., Béjar, V., Calvo, C.** 1993. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia.* **49**: 1037-1041.
 - **Quesada, E., Valderrama, M.J., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruíz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A.** 1990. *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic nonmotile Gram-negative rod. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 261-267.
 - **Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Ramos-Cormenzana, A.** 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.* **53**: 155-161.
 - **Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A.** 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 287-292.
 - **Quester, I. Becker, A.** 2004. Four promoters subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti* *exoYFQ* operon involved in the biosynthesis of succinoglycan. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 115-132.
 - **Quillaguamán, J., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., Álvarez, M.T., Delgado, O.** 2004. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 721-725.
 - **Raff, M.C.** 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 397-400.
 - **Raguenes, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G., Guezennec, J.** 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijensis* and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microb.* **62**: 67-73.
 - **Rai, M., Pal, M., Sumesh, K.V., Jain, V., Sankaranarayanan, A.** 2006. Engineering for biosynthesis of ectoine (2-methyl 4-carboxy tetrahydro pyrimidine) in tobacco chloroplasts leads to accumulation of ectoine and enhanced salinity. *Plant Science.* **170**: 291-306.
-

- Rainey, F.A., Zhilina, T.N., Boulygina, E.S., Stackebrandt, E., Tourova, T.P., Zavarin, G.A. 1995. The taxonomic study of the fermentative halophilic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteriaceae* fam. Nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe*. **1**: 185-199.
- Ramos, A., Boels, I.C., de Vos, W.M., Santos, H. 2001. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 33-41.
- 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. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 62-8.
- Rau, U., Gura, E., Olzewski, E., Wagner, F. 1992. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **9**: 19-26.
- Reed, R.H., Chudeck, J.A., Foster, R., Stewart, D.P. 1984. Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environments. *Arch. Microbiol.* **138**: 333-337.
- Regev, R., Peri, I., Gilboa, H., Avi-Dor, Y. 1990. ¹³C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 106-112.
- Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R., Cole, J. 1990. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1045**: 189-193.
- Reshetnikov, A.S., Khmelenina, V.N., Trotsenko, Y.A. 2006. Characterization of the ectoine genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. *Arch. Microbiol.* **184**: 286-297.
- Reuber, T.L., Walker, G.C. 1993a. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**: 269-280.
- Reuber, T.L., Walker, G.C. 1993b. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J. Bacteriol.* **175**: 3653-3655.
- Rha, C.K., Pradipasena, P., Nakamura, T., Easson, D., Sinskey, A.J. 1989. Method for utilizing an exocellular polysaccharide isolated from *Zoogloea ramigera*. US patent 4.851.393.
- Richardson, R.K., Ross-Murphy, S.B. 1987. Nonlinear viscoelasticity of polysaccharide solutions.2. Xanthan polysaccharide solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **9**: 257-264.
- Ridout, M.J., Brownsey, G.J., York, G.M., Walker, G.C., Morris, V.J. 1997. Effect of O-acyl substituents on the functional behaviour of *Rhizobium meliloti* succinoglycan. *Int. J. Biol. Macromol.* **20**: 1-7.
- Rinaudo, M. 2004. Role of substituents on the properties of some polysaccharides. *Biomacromol.* **5**: 1155-1165.
- Riou, D., Collic-Jouault, S., Pinczon du Sel, D., Bosch, S., Siavoshian, S., Le Bert, V., Tomasoni, C., Sinquin, C., Durand, P., Roussakis, C. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Res.* **16**: 1213-1218.
- Ristau, E., Wagner, F. 1983. Formation of novel anionic trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* **5**: 95-100.
- Rizzoti, R. 1994. Les agents de texture: epaississants, gelifiants, stabilisants. *IAA.* **9**: 563-573.
- Robert, C., Robert, A.M., Robert, L. 2005. Effect of a preparation containing a fucose-rich polysaccharide on periorbital wrinkles of human voluntaries. *Skin Res. Technol.* **11**: 47-52.
- Robert, L., Fodil-Bourahla, I., Bizbiz, L., Robert, A.M. 2004a. Effects of L-fucose and fucose-rich oligo- and polysaccharides (FROP's) on collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. Modulation of the effect of retinol, ascorbate and α -tocopherol. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 65-70.
- Robert, L., Fodil-Bourahla, I., Bizbiz, L., Robert, A.M. 2004b. Effect of L-fucose and fucose-rich polysaccharides on elastin biosynthesis, in vivo and in vitro. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 123-128.

-
- **Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285-315.
 - **Robertson, D.E., Lai, M.C., Gunsalus, R.P., Roberts, M.F.** 1992. Composition, variation and dynamics of major osmotic solutes in *Methanohalophilus* strain FDF1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2438-2443.
 - **Robertson, E.B., Firestone, M.K.** 1992. The relationship between desiccation and exopolysaccharide production by a soil *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microb.* **58**: 1291-1297.
 - **Robijn, G.W., van den Berg, D.J.C., Haas, H., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G.** 1995. Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. *Carbohydr. Res.* **276**: 117-136.
 - **Robijn, G.W., Wienk, H.L.J., van den Berg, D.J.C., Haas, H., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G.** 1996. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydr. Res.* **285**:129-139.
 - **Robinson, J., Gibbons, N.E.** 1952. The effect of salts on the growth of *Micrococcus halodenitrificans* n. sp. *Can J. Bot.* **30**: 147-154.
 - **Rodd, A.B., Dunstan, D.E., Boger, D.V.,** 2000. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydr. Polym.* **42**: 159-174.
 - **Rodríguez-Montelongo, L., de la Cruz-Rodríguez, L.C., Farias, R.N., Massa, E.N.** 1993. Membrane associated refox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**: 77-84.
 - **Rodríguez-Valera, F., Lillo, J.G., Antón, J., Meseguer, I.** 1991. Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. En: *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, Rodríguez-Valera, F. (Ed.), pp. 373-380. Plenum Press, New York.
 - **Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A.** 1981. Characteristics of the heterotropic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbiol. Ecol.* **7**: 235-243.
 - **Rogers, J., Keevil, C.W.** 1992. Immunogold and florescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2326-2330.
 - **Roller, S., Dea, I.C.M.** 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**: 261-277.
 - **Romanenko, L.A., Schumann, P., Rohde, M., Mikhailov, V.V., Stackebrandt, E.** 2002. *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1767-1772.
 - **Romano, I., Giordano, A., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A.** 2005. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 610-618.
 - **Romano, I., Nicolau, B., Lama, L., Manca, M.C., Gambacorta, A.** 1996. Characterization of a haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 326-333.
 - **Roseiro, J.C., Esgalhado, M.E., Amaral-Collaco, M.T., Emery, A.N.** 1992. Medium development for xanthan production. *Process Biochem.* **27**: 167-175.
 - **Rosenberg, E.** 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. *Trends Biotechnol.* **11**: 419-424.
 - **Rosenberg, E., Kaplan, N.** 1987. Surface-active properties of *Acinetobacter* exopolysaccharides. En: *Bacterial outer membranes as model systems*. Inouye, M. (Ed), pp. 311-342. Wiley, New York.
 - **Rosenberg, E., Perry, A., Gibson, D.T., Gutnick, D.** 1979a. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. *Appl. Environ. Microb.* **37**: 409-413.
 - **Rosenberg, E., Ron, E.Z.** 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biot.* **52**: 154-162.
-

- **Rosenberg, E., Ron, E.Z.** 2002. Bioemulsans : surface-active polysaccharide-containing complexes. En : Biopolymers. Vol.5. Steinbüchel, A., Bañadme, E.J. y De Baets, S. (Eds), pp.92-108. Wiley-VCH, Weinheim.
- **Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L.** 1979b. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microb. **37**: 402-408.
- **Ross, P., Mayer, R., Benziman, M.** 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. **55**: 35-58.
- **Ross-Murphy, S.B.** 1995. Structure-property relationships in food biopolymer gels and solutions. J. Rheol. **39**: 1451-1463.
- **Ross-Murphy, S.B., Shatwell, K.P.** 1993. Polysaccharide strong and weak gels. Biorheology. **30**: 217-227.
- **Ross-Murphy, S.B., Shatwell, K.P., Sutherland, I.W., Dea, I.C.M.** 1996. Influence of acyl substituents on the interaction of xanthans with plan polysaccharides. Food Hydrocolloid. **10**: 117-122.
- **Roszkowski, W., Beuth, J., Ko, H. L., Uhlenbruck, G., Pulverer, G.** 1989. Blocking of lectin-like adhesion molecules on pulmonary cells inhibits lung sarcoma L colonization in BALB/c-mice. Experientia **45**: 584-588.
- **Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., Guezennec, J.** 1999. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolis* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Carbohydr. Res. **322**: 40-45.
- **Rougeaux, H., Talaga, P., Carlson, R.W., Guezennec, J.** 1998. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. Carbohydr. Res. **312**: 53-59.
- **Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P.** 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J. **12**: 163-171.
- **Ruijsenaars, H.J., Debont, J.A.M., Hartmans, S.** 1999. A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2446-2452.
- **Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., Newburg, S.** 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. J. Biol. Chem. **278**: 14112-14120.
- **Russel, N.J.** 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganism. J. Bioenerg. Biomembr. **21**: 93-113.
- **Russel, N.J., Adams, R.L.** 1991. Effect of salinity on membrane lipids and membrane-derived oligosaccharides. En: General and applied aspects of halophilic microorganism. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 225-231. Plenum Press, New York.
- **Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A.** 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. Wat. Res. **37**: 4231-4235.
- **Sambrook, J., Russell, D. W.** 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Harbour Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbor.
- **Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., Ventosa, A.** 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol. **94**: 295-300.
- **Sanderson, G.R., Clark, R.C.** 1983. Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. Food. Technol. Biotech. **37**: 63-70.
- **Sarbajna, S., Das, S.K., Roy, N.** 1995. A novel synthesis of L-fucose from D-galactose. Carbohydr. Res. **270**: 93-96.
- **Sarig, S., Roberson, E.B., Firestone, M.K.** 1993. Microbial activity-soil structure: response to saline water irrigation. Soil Biol. Biochem. **5**: 93-97.

-
- **Sauer, T., Galinski, E.A.** 1998. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 306-313.
 - **Schwerger, G.** 1966. α -L-fucosides and L-fucose from fucoidan. US Patent 3-240-775.
 - **Shanmugan, M., Mody, K.H., Siddhanta, A.K.** 2001. Blood anticoagulant sulphated polysaccharides of the marine green algae *Codium dwarkensen* (Boergs.) and *C. tomentosum* (Huds.) Stackh. *Indian J. Exp. Biol.* **39**: 365-370.
 - **Shepherd, R., Rockey, R., Sutherland, I.W., Rollers, S.** 1995. Novel bioemulsifiers from microorganism for use in food. *J. Biotechnol.* **40**: 207-217.
 - **Shin, Y.C., Kim, Y.H., Lee, H.S., Cho, S.J.** 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 129-133.
 - **Shu, C.H., Wen, B.J.** 2003. Enhanced shear protection and increased production of an anti-tumor polysaccharide by *Agaricus blazei* in xanthan-supplemented cultures. *Biotechnol. Lett.* **25**: 873-876.
 - **Shu, C.H., Yang, S.T.** 1990. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 454-468.
 - **Silman, R.W., Bryan, W.L., Leathers, T.D.** 1990. A comparison of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**: 65-70.
 - **Sim, L., Ward, O.P., Li, Z.** 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19**: 232-238.
 - **Sime, W.J.** 1990. Alginates. En: *Food Gels*. Harris, P. (Ed.), pp. 53-78. Elsevier, Amsterdam.
 - **Singh, P., Cameotra, S.S.** 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* **22**: 142-146.
 - **Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A.** 1980. Approved List of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225-240.
 - **Skjak-Braek, G., Grasdalen, H., Larsen, L.** 1986. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. *Carbohydr. Res.* **154**: 225-238.
 - **Skjak-Braek, G., Zanetti, F., Paoletti, S.** 1988. Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. *Carbohydr. Res.* **185**: 131-138.
 - **Sleator, R.D., Hill, C.** 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.
 - **Sloneker, J.H., Orentas, D.G.** 1962. Quantitative determination of pyruvic acid. *Nature.* **194**: 478.
 - **Smith, L.T., Smith, G.M., D'Souza, M.R., Pocard, J-M., LeRudulier, D., Madkour, M.A.** 1994. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Mechanism and control by other environmental signals. *J. Exp. Zool.* **268**: 162-165.
 - **Sogawa, K., Kodama, E., Matsuda, M., Shigeta, S., Okutani, K.** 1998. Marine microalgal polysaccharide induces apoptosis in human lymphoid cells. *J. Mar. Biotechnol.* **6**: 35-38.
 - **Sogawa, K., Yamada, T., Sumida, T., Hamakawa, H., Kuwabara, H., Matsuda, M., Muramatsu, Y., Kose, H., Matsumoto, K., Sasaki, Y., Okutani, K., Kondo, K., Monden, Y.** 2000. Induction of apoptosis and inhibition of DNA topoisomerase-I in K-562 cells by a marine microalgal polysaccharide. *Life Sci.* **66**: 227-231.
 - **Sogawa, K., Yamada, T., Sumida, T., Hamakawa, H., Kuwabara, H., Matsuda, M., Muramatsu, Y., Kose, Y., Matsumoto, K., Sasaki, Y., Okutani, K., Kondo, K., Monden, Y.** 2000. Induction of apoptosis and inhibition of DNA topoisomerase I in K-562 cells by a marine microalgal polysaccharide. *Life Sci.* **66**: 227-231.
 - **Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Lasa, I.** 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose.
-

- **Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G., Lee, S.-J.** 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **33**: 1-5.
- **Son, H.J., Lee, O.M., Kim, Y.G., Lee, S.J.** 2000. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 134-138.
- **Southern, E.** 1975. Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503.
- **Souw, P., Demain, A.L.** 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1186-1192.
- **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, B.** 2002. Report of the ad committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- **Stackebrandt, E., Goebel, B.M.** 1994. Taxonomy note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- **Stankowski, J.D., Mueller, B.E., Zeller, S.G.** 1993. Location of second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.* **241**: 321-326.
- **Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Hoibi, N., Mathee, K.** 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J. Med. Microbiol.* **53**: 679-690.
- **Stauffer, K.R., Leeder, J.G., Wand, S.S.** 1980. Characterization of zooglan 115, an exocellular glycan of *Zoogloea ramigera* 115. *J. Food Sci.* **45**: 946-952.
- **Steginsky, C.A., Beale, J.M., Floss, H.G., Mayer, R.M.** 1992. Structural determination of alginic acid and the effect of calcium binding as determined by high-field n.m.r. *Carbohydr. Res.* **225**: 11-26.
- **Stelmack, P.L., Gray, M.R., Pickard, M.A.** 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microb.* **65** (1): 163-168.
- **Stokke, B.T., Elgsaeter, A., Kitamura, S.** 1993. Microcyclization of polysaccharides visualized by electron microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**: 63-68.
- **Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M.** 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 19-28.
- **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187-209.
- **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.
- **Sudo, H., Burgess, J.G., Takemasa, H., Nakamura, N., Matsunaga, T.** 1995. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*. *Curr. Microbiol.* **30**: 219-222.
- **Sutherland, I.W.** 1980. Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. En: *Microbial adhesion to surfaces*. Berkeley, R.C.W., Lyrch, J.M., Melling, J., Ruther, P.R., Vincent, B. (Eds). London, Ellis Horwood. pp. 329-338.
- **Sutherland, I.W.** 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **23**: 79-100.
- **Sutherland, I.W.** 1984. Hydrolysis of unordered xanthan in solution by fungal cellulases. *Carbohydr. Res.* **131**: 201-206.

-
- **Sutherland, I.W.** 1988. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. *Internacional Review of Cytology* 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*. Vol. 9. Cambridge University Press, Cambridge.
 - **Sutherland, I.W.** 1993. Xanthan. En: Xanthomonas. Swings, J.G., Civerolo, E.L. (Eds.), pp. 363-388. Chapman & Hall, London.
 - **Sutherland, I.W.** 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharide. *Biotechnol. Adv.* **12**: 393-448.
 - **Sutherland, I.W.** 1997. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure & Appl. Chem.* **69**: 1911-1917.
 - **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.** 2001a. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol.* **147**: 3-9
 - **Sutherland, I.W.** 2001b. Microbial polysaccharide from Gram-negative bacteria. *Int. Dairy. J.* **11**. 663-674.
 - **Sutherland, I.W., Kennedy, L.** 1996. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology.* **142**: 867-872.
 - **Sutton, G.C., Russel, N.J., Quinn, P.J.** 1991. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipids extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim, Biophys. Acta* **1061**: 235-246.
 - **Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K., Tsukamoto, K.** 1965. The chemical structure of polymixin E. The identities of polymixin E₁ with colistin A and polymixin E₂ with colistin B. *J. Biol. Chem.* **57**: 226-227.
 - **Swarbrick.** 1998. *Dispersiones groseras*. En: Remington Farmacia, vol.I, 19Ed. Gennaro, A.R. (Ed), pp 405-425. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
 - **Tait, M.I., Sutherland, I.W., Clarke-Sturman, A.J.** 1986. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1483-92.
 - **Takemura, M., Lijima, B., Tateno, Y, Kataura, K., Kato, K., Yamazaki, F.** 1986. A process for manufacturing L-fucose from *Chordariaceae* or *Spermatochneaceae*, Jp Pat 63027496 A2.
 - **Takemura, M., Lijita, B., Tateno, Y., Kataura, K.** 1988. Production of L-fucose. Jp Pat 63027496 A
 - **Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.** 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* **154**: 705-712.
 - **Tang, J., Lelievre, J., Tung, M.A., Zeng, Y.** 1994. Polymer and ion concentration effects on gellan strength and strain. *J. Food Sci.* **59**: 216-220.
 - **Tanimura, A.** 1961. Synthesis of L-fucose. *Chem. Abstr.* **55**: 12306.
 - **Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Patel, B.K.C., Matheron,R., Caumette, P.** 1998. *Desulfotomaculum halophilum* sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil production facilities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **48**: 333-338.
 - **Tease, B.E., Walker, R.W.** 1987. Comparative composition of the sheath of the cyanobacterium *Gloeotheca* ATCC27152 cultured with and without combined nitrogen. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **133**: 3331-3339.
 - **Thiemman, B. E Imhoff, J.F.** 1991. The effect of salt on the lipid composition of *Ectothiorhodospira*. *Arch. Microbiol.* **156**: 376-384.
 - **Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, K., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.** 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
-

- **Thorne, L., Micolajczak, M.J., Armentrout, R.W., Pollock, T.J.** 2000. Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by *Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 49-57.
- **Tindall, B.J.** 1988. Prokaryotic life in the alkaline, saline athalassic environment. En: *Halophilic Bacteria*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp 31-67. CRC Press, USA.
- **Tindall, B.J.** 1992. The family *Halobacteriaceae*. En: *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2ª Ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (Eds), pp.768-808. Springer-Verlag, New York.
- **Tiozzo, R., Cingi, M.R., Reggiani, D., Andreoli, T., Calandra, S., Milani, M.R., Piani, S., Marchi, E., Barbanti, M.** 1993. Effect of the desulfation of heparin on its anticoagulant and antiproliferative activity. *Thromb. Res.* **70**: 99-106.
- **Tiozzo, R., Reggiani, D., Cingi, M.R., Bianchini, P., Osima, B., Calanadra, S.** 1991. Effect of heparin derived fractions on the proliferation and protein synthesis of cells in culture. *Thromb. Res.* **62**: 177-188.
- **Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergará, M., Debarrouille, M., Penades, J.R., Lasa, I.** 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative ica-independent biofilm in the absence of arlRS two-component system. *J. Bacteriol.* **187**: 5318-5329.
- **Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, J., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., Lasa, I.** 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4538-4545.
- **Tolley, M.R., Macaskie, L.E.** 1993. Fossil energy materials, biorremediation, microbial physiology. En: *Biohydrometallurgical Technologies*, vol. 2. Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. (Eds.) , pp. 65-74. The Minerals, Metals, and Materials Society, Pennsylvania.
- **Tombs, M., Harding, S.E.** 1997. An introduction to polysaccharide biotechnology. Taylor y Francis. London.
- **Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 2001. Emulsifying activity of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistans* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1102-1106.
- **Toren, A., Orr, E., Paitan, Y., Ron, E.Z., Rosenberg, E.** 2002a. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistant* KA53 is an OmpA-like protein. *J. Bacteriol.* **184**:165-170.
- **Toren, A., Ron, E.Z., Bekerman, R., Rosemberg, E.** 2002b. Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AlnA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 580-584.
- **Trebbau-de, A.G., McInerney, M.J.** 1996. Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **16**: 1-7.
- **Tsukagoshi, S., Ophashi, F.** 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**: 557-558.
- **Tuinier, R., Zoon, P., Cohen Stuart, M.A., Fleer, G.J., de Kruijff, C.G.** 1999. Concentration and shear-rate dependence of the viscosity of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers* **50**: 641-646.
- **Uhlinger, D.J., White, D.C.** 1983. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl. Environ. Microb.* **45**: 64-70.
- **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.

-
- **Urbinati, C., Bugatti, A., Oreste, P., Zoppetti, G., Waltenberger, J., Mitola, S., Ribatti, D., Presta, M., Rusnati, M.** 2004. Chemically sulfated *Escherichia coli* K5 polysaccharide derivatives as extracellular HIV-1 Tat protein antagonist. *FEBS Letters* **568**: 171-177.
 - **Vafiadis, D.** 1999. Anti-shock treatment (frozen dairy products formulation). *Dairy Field*. **182**: 85-88.
 - **Valderrama, M.J., Monteoliva-Sánchez, M., Quesada, E., Ramos-Comenzana, A.** 1998. Influence of the salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Res. Microbiol.* **149**: 675-679.
 - **Valderrama, M.J., Quesada, E., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruíz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A.** 1991. *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic gram-negative bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 377-384.
 - **Van Casteren, W.H., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H.A., Voragen, A.G.** 2000. Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.* **327**: 411-22.
 - **Van den Berg, D.J.C., Robjin, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L.F., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebouer, A.M., Verrips, C.T.** 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* O-1 and characterization of the exopolysaccharide. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 2840-2844.
 - **Van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Ten Brink, B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Dijkhuizen, L.** 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 3008-3014.
 - **Van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L.** 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.* **50**: 697-703.
 - **Van Kranenburg, R., Boels, I.C., Kleerebezem, M., de Vos, W.M.** 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr. Opin. Biotech.* **10**: 498-504.
 - **Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P.** 1998. Improved Production of Bacterial Cellulose and its Application Potential. *Polymer Degradation and Stability* **59**: 93-99.
 - **Vanderslice, R.W., Doherty, D.H., Capage, M.A., Betlach, M.R., Hassler, R.A., Henderson, N.M., Ryan-Graniero, J., Tecklenburg, M.** 1990. Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. En: *Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides*. Crescenzi, V., Dea, I.C.M., Paoletti, S., Stivala, S.S., Sutherland, I. W. (Eds.), pp. 145-156. New York. Gordon and Breach.
 - **Vanhooren, P.T.** 1997. L-Fucose rich extracellular polysaccharides from *Clavibacter* and *Klebsiella* species: fermentation and rheological characterisation. Tesis doctoral.
 - **Vanhooren, P.T., Vandamme, E.J.** 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. En: *Recent research developments in fermentation and bioengineering*, Vol. 1. Pandalai, S.G. (Ed), pp. 253-300. Research Signpost, India.
 - **Vanhooren, P.T., Vandamme, E.J.** 1999. L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial sintesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**: 479-497.
 - **Vargas-García, M.C., López, M.J., Elorrieta, M.A., Suárez, F., Moreno, J.** 2001. Influence of nutritional and environmental factor son polysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **27**: 5-10.
-

- **Vartak, N.B., Lin C.C., Cleary, J.M., Fagan, M.J., Saier Jr. M.H.** 1995. Glucose metabolism in *Shingomonas elodea*: pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant. *Microbiol.* **141**: 2339-2350.
- **Vedamuthu, E.R., Neville, J.M.** 1986. Involvement of a plasmid production of ropiness (mucooidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 667-682.
- **Venglio, R., Beolchini, F.** 1997. Removal of ions by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**: 301-316.
- **Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., García, M.T., Ruíz-Berraquero, F.** 1989. Classification of *Chromobacterium marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 382-386.
- **Ventosa, A., Nieto, J.J.** 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 85-94.
- **Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 504-544.
- **Vescoso, M., Scolari, G.L., Bottazi, V.** 1989. Plasmid encoded ropiness production in *Lactobacillus casei* sp. *casei*. *Biotechnol.* **11**: 709-712.
- **Viebke, C., Williams, P.A.** 2000. Determination of molecular mass distribution of K-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloid.* **14**: 265-270.
- **Villain-Simmonet, A., Milas, M., Rinaudo, M.** 2000. A new bacterial polysaccharide (YAS34). Characterization of the conformations and conformational transitions. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**: 65-75.
- **Vischer, P., Buddecke, E.** 1991. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism. *Eur. J. Cell Biol.* **56**: 407-414.
- **Voigt, R., Bornschein, M.** 1979. Emulsiones. En: *Tratado de tecnología farmacéutica*. Núñez, A. (Ed.). Acribia. Zaragoza, España.
- **Volesky, B., Holan, Z.R.** 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Progr.* **11**: 235-250.
- **Volkering, F., Breure, A., Rulkens, W.** 1997. Microbiological aspects of surfactants use for biological soil remediation. *Biodegradation.* **8**: 401-417.
- **Von Wright, A., Tinkynen, S.** 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp. *Lactis* strain with a single plasmid associated with mucooid phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1385-1386.
- **Vreeland, R.H., Anderson, R., Murray, R.G.E.** 1984. Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* **160**: 869-873.
- **Vreeland, R.H., Daigle, S.L., Fields, S.T., Hart, D.J., Martin, E.L.** 1991. Physiology of *Halomonas elongata* in different NaCl concentrations. En: *General and applied aspects of halophilic microorganisms*. Rodríguez-Valera, F. (Ed), pp. 233-241. Plenum Press, New York.
- **Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Martin, E.L., Elliot, E.** 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 485-495.
- **Walling, E., Dols-Lafargue, Lonvaud-Funel, A.** 2005. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food Microbiol.* **22**: 71-78.
- **Wang, F.J., Pan, C.L., Wu, C.S.** 1999. Composition and rheological properties of extracellular mucilage from marine bacterium *Klebsiella oxytoca* CF154. *Fisheries Sci.* **65**: 742-749.
- **Wang, X., Preston III, J.F. and Romeo, T.** 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**: 2724-2734.
- **Wang, Y., McNeil, B.** 1995. The effect of temperature on sclerotium glucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium gluconicum*. *Enzyme Microb. Tech.* **17**: 124-130.

-
- **Ward, O.P.** 1989. Biotecnología de la Fermentación. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
 - **Watanabe, K., Hino, S., Takahashi, N.** 1996. Responses of activated sludge to an increase in phenol loading. J. Ferment. Bioeng. **82**: 522-524.
 - **Watnick, P.I., Kolter, R.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. **34**: 586-595.
 - **Wei, C.L., Lin, N.T., Weng, S.F., Tseng, Y.H.** 1996. The gene encoding UDP-glucose pyrophosphorylase is required for the synthesis of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **226**: 607-612.
 - **Wei, Y.H., Chu, I.M.** 1998. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Enzyme Microb. Tech. **22**: 724-728.
 - **Weldman, A.D., Maddox, I.S.** 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends Microbiol. **21**: 269-274.
 - **Weon-Taek, S., Goon-Gjung, K., Sang-Hae, N., Sang-Do, C., Hyun-Hyo, S., Seon-Won, K., Yong-Ha, P.** 1999. Isolation and characterization of a novel exopolysaccharide-producing *Paenibacillus* sp. WN9 KCTC 8951P. J. Microbiol. Biotechn. **9**: 820-825.
 - **Wernau, W.C.** 1979. Fermentation process for production of xanthan. British patent 2008600A.
 - **Wernau, W.C.** 1980. Fermentation process for production of xanthan. US patent 4282321.
 - **Weser, C.** 1980. Measurement of interfacial tension and surface tension. General review for practical man. Reprint from "GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium". **24**: 642-648.
 - **West, T.P., Strohfus, B.** 1999. Influence of yeast extract on gellan production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. Microbios. **97**: 85-93.
 - **Westphal, O., Jann, K.** 1965. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further application of the procedure. En: Carbohydrate Chemistry, Whistler, R.I. (Ed), pp. 83-91. Academic Press, Inc, New York.
 - **Whistler, R.L.** 1993. Exudate gums. En: Industrial Gums, 3rd ed. Whistler, R.L., BeMiller, J.N. (Eds), pp 309-339. Academic Press Inc., San Diego, CA.
 - **Whistler, R.L., Spencer, W.W.** 1961. Preparation and properties of several polysaccharides sulfates. Arch. Biochem. Biophys. **95**: 36-41.
 - **Whitfield, C.** 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. Can. J. Microbiol. **34**: 415-419.
 - **Whitfield, C., Roberts, I.S.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **31**: 1307-1319.
 - **Whitfield, C., Valvano, M.A.** 1993. Biosynthesis and expression of cell surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. **35**: 135-245.
 - **Wilhelmi, B.S., Duncan, J.R.** 1995. Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. Biotechnol. Lett. **17**: 1007-1012.
 - **Wilson, M., McNab, R., Henderson, B.** 2002. Bacterial disease mechanisms. An introduction to cellular microbiology. Cambridge University Press.
 - **Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C.** 1999. Microbial extracellular polymeric substances. Springer Verlag, Berlin.
 - **Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C.** 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? En: Microbial Extracellular polymeric substances. Characterization, structure and function. Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (Eds.), pp. 1-15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
 - **Winiecka-Krusnell, J., Linder, E.** 1999. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: The tip of an iceberg? Scand. J. Infct. Dis. **31**: 383-385.

- **Witrouw, M., de Clercq, E.** 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* **29**: 497-511.
- **Wohlfarth, A., Severin, J., Galinski, E.A.** 1993. Identification of N-acetylmethionine as novel osmolyte in some Gram-positive halophilic eubacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 568-573.
- **Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., Caldwell, D.E.** 1995. Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 152-158.
- **Wong, A.C.** 1998. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* **81**: 2765-2770.
- **Wong, C., Alajarin, R., Moris-Varas, F., Blanco, O., Garcia-Junceda, E.** 1995. Enzymatic synthesis of L-fucose and analogs. *J. Org. Chem.* **60**: 7360-7363.
- **Wright, J.B., Ruseska, I., Athar, M.A., Corbett, S., Costerton, J.W.** 1992. *Legionella pneumophila* grows adherent surfaces in vitro and in situ. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**: 408-415.
- **Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Curri, A.R.** 1980. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- **Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D.** 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142**: 67-77.
- **Xiao, L., Yang C., Patterson, P.S., Udhayakumar V., Lal, A.A.** 1996. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect. Immun.* **64**: 1373-1378.
- **Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L.** 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 1706-1713.
- **Yamame, T.** 1987. Enzyme technology for the lipid industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 1657-1662.
- **Yang, J., Du, Y., Huang, R., Wan, Y., Li, T.** 2002. Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of chinese lacquer polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **31**: 55-62.
- **Yao, S.Y., Luo, L., Har, K.J., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G.Q., Zhu, J.B., Cheng, H.P.** 2004. *Sinorhizobium melliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and falgellum production. *J. Bacteriol.* **186**: 6042-6049.
- **Yelin, G., Taff, M.L., Sadowski, G.E.** 1987. Copper toxicity following massive ingestion of coins. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **8**: 78-85.
- **Yemmas, L., Soetaert, W., Vandamme, E.J.** 2003. Enzymatic conversion of the clavan exopolysaccharide by *Streptomyces* sp. YSDL-20. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **68**: 327-330.
- **Yemmas, L., Vandamme, E.J.** 2001. *Streptomyces* strains as a source of enzymes, able to hydrolyse the *Clavibacter* exopolymer, clavan. Proceedings part 1, 341-344. 15th FAB-Symposium, Ghent, Belgium.
- **Yemmas, L., Vandamme, E.J.** 2002. A new isolated clavan hydrolysing microorganism and its clavanase activity. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **67**: 269-271.
- **Yilmazer, G., Carrillo, A.R., Kokini, J.L.** 1991. Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of o/w emulsions. *J. Food Sci.* **56**: 513-517.
- **Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., Lee, C.K., Rhie, K.T., Lee, H.K.** 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Mar. Biotechnol. (NY)* **6**:17-25.
- **Yim, J.H., Kim, S.J., Ahn, S.H., Lee, H.K.** 2003. Optimal conditions for the production of sulphated polysaccharide by marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Biomol. Eng.* **20**: 273-80.
- **Yoon, J.H., Choi, S.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H., Park, Y.H.** 2001. *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1171-1177.

-
- **Yoon, J.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H. Kim, C.J., Park, Y.H.** 2002. *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 123-130.
 - **Yoshida, T., Ayabe, T., Yasunaga, M., Usami, Y., Habe, H., Nojiri, H., Omori, T.** 2003. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus* sp. strain 12S. *Microbiology.* **149**, 431-444.
 - **Yuguchi, Y., Mimura, M., Kitamura, S., Urakawa, H., Kajiwara, K.** 1993. Structural characteristics of gellan in aqueous solutions. *Food Hydrocolloid.* **7**: 373-385.
 - **Zahran, H.H.** 1991. Cultural and physiological properties of some root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soil of Egypt. *Bull. Fac. Sci. (Assiut Univ)* **20**: 85-99.
 - **Zahran, H.H.** 1992a. Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *J. Basic Microbiol.* **32**: 279-287.
 - **Zahran, H.H.** 1992b. DNA-DNA hybridization of some root. Nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt. *Folia Microbiol.* **37**: 295-298.
 - **Zahran, H.H.** 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Bio. Fertil Soils* **25**: 211-223.
 - **Zahran, H.H., Ahmad, M.S., Afkar, E.A.** 1993. Modification of cell morphology of some *Rhizobium* strains subjected to high salt stress. En: Proceedings of the VIII Conference of Applied Microbiology, Cairo, March 29-30. pp. 1-18. *Egypt Soc. Appl. Microbiol.*
 - **Zahran, M.A.** 1989. Principles of plants ecology and flora of Egypt. Dar El-Nashr for Egyptian Universities. El-Wafa Library, Cairo.
 - **Zeikus, J.G., Hegge, P.W., Thompson, T.E., Phelps, T.J., Langworthhy, T.A.** 1983. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov., and sp. nov. an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. *Curr. Microbiol.* **9**: 225-234.
 - **Zevenhuizen, L.P.T.M.** 1997. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydr. Polym.* **33**: 139-144.
 - **Zhang, C.X., Huang, K.X.** 2005. Apoptosis induction on HL-60 cells of a novel polysaccharide from the mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Ethnopharmacol.* **99**: 385-390.
 - **Zhang, C.X., Huang, K.X.** 2006. Mechanism of apoptosis induced by a polysaccharide, from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (MAP) in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **210**: 236-245.
 - **Zhang, M., Chen, H., Huang, J., Li, Z., Zhu, C., Zhang, S.** 2005. Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci.* **76**: 2115-2124.
 - **Zhilina, T.N., Zavarin, G.A.** 1987. *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic *Archaeobacterium*. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **293**: 464-468.
 - **Zhilina, T.N., Zavarin, G.A.** 1990. A new extremely halophilic homoacetogen bacteria *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov., *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **311**: 745-747.
 - **ZoBell, C.E., Upham, H.C.** 1944. A list of marine bacteria including description of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.* **5**: 239-292.
 - **Zohar-Pérez, C., Chernin, L., Chet, I., Nussinovitch, A.** 2003. Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against UVC radiation. *Radiat. Res.* **160**: 198-204.
 - **Zuckerberg, A., Driver, A., Gutnick, D.L., Rosenberg, E.** 1979. Emulsifiers of *Arthrobacter* RAG-1 chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 414-420.
-

