

Caracterización Química de Exopolisacáridos Sintetizados por un Consorcio Nativo

Alina Dianela Sosa Durán, Mónica Noel Sánchez González, Araceli González-Burgos

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma De Yucatán, Periférico Norte, Kilómetro 33.5 Tablaje Catastral 13615 Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, C.P. 97203.

Fecha de recepción: 29 de octubre de 2021 - Fecha de aceptación: 7 de diciembre de 2021

Resumen

Los exopolisacáridos sintetizados por bacterias halófilas tienen aplicaciones de gran interés industrial. Exopolisacáridos provenientes de cultivos axénicos han sido mayormente estudiados; sin embargo, se ha visto mayor eficiencia de producción en consorcios microbianos. Por lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización química del exopolisacárido sintetizado por un consorcio microbiano proveniente de la Laguna Rosada de Uaymitún, un cuerpo de agua hipersalino ubicado en el estado de Yucatán, México. Los resultados mostraron que la composición química del exopolisacárido fue de 61.38% carbohidratos, 1.55% proteínas y el 37.07% restante a compuestos desconocidos. Se pudo determinar la presencia de ácidos urónicos, lo que sugiere que el exopolisacárido podría poseer capacidad gelificante. El análisis cromatográfico de capa fina indicó la probable presencia de fucosa, lo cual es común en exopolisacáridos de ambientes halófilos. Adicionalmente, el análisis electroforético sugirió la presencia de diferentes proteínas en su estructura.

Palabras clave: Exopolisacáridos, Microorganismos halófilos, Consorcio microbiano, Ambiente hipersalino, Composición química.

Chemical Characterization of Exopolysaccharides Synthesized by a Native Consortium

Abstract

Exopolysaccharides synthesized by halophilic bacteria have important industrial applications. The molecules mainly studied are produced by axenic cultures; however, microbial consortia produce exopolysaccharides more efficiently. Therefore, in this work the chemical characterization of exopolysaccharide synthesized by a microbial consortium obtained from the Laguna Rosada of Uaymitun, a hypersaline water body in Yucatan, Mexico, was carried out. The exopolysaccharide was composed by 61.38% carbohydrates, 1.55% proteins and the remaining 37.07% of unknown compounds. The presence of uronic acids suggest gelling properties. Thin layer chromatographic analysis indicated the possible presence of fucose, that is common in halophilic exopolysaccharides. In addition, electrophoretic analysis suggested the presence of different proteins in the structure.

*araceli.gonzalez@correo.uady.mx

Keywords: Exopolysaccharides, Halophilic microorganisms, Microbial consortium, Hypersaline environment, Chemical composition.

Introducción

En la naturaleza, los microorganismos viven en comunidades complejas, capaces de interactuar para realizar tareas que resultarían imposibles para un solo microorganismo (Kant *et al.*, 2018). Los consorcios microbianos son capaces de sobrevivir a diversas condiciones, como ambientes extremos, mediante la formación de estructuras sinérgicas a nivel de población, como estromatolitos, esteras microbianas y, con mayor frecuencia, biopelículas (Zhang *et al.*, 2018).

Actualmente, el estudio se ha enfocado en los exopolisacáridos (EPS) provenientes de consorcios, ya que han demostrado tener mayor eficiencia de producción que un cultivo puro (Kant *et al.*, 2018). Así mismo, existe evidencia de que los EPS provenientes de microorganismos halófilos poseen propiedades emulsificantes, antioxidantes, de pseudoplasticidad, de unión de metales pesados e incluso actividad antitumoral, lo que sugiere su potencial aplicación en diferentes sectores industriales como alimentos y biomedicina, así como su utilización como biomaterial (Wang *et al.*, 2018).

Los EPS microbianos son biopolímeros de alto peso molecular localizados en el exterior de la superficie celular microbiana constituidos principalmente por carbohidratos, aunque con diversos sustituyentes orgánicos como restos de acetilo, restos de piruvatos, hexosaminas y proteínas (Santos *et al.*, 2016; Escartin, 2017; Amjres *et al.*, 2010). Los carbohidratos presentes en los EPS son muy importantes debido a que la estructura química compleja de los mismos se encuentra formada por homopolisacáridos lineales y heteropolisacáridos ramificados, los cuales, dependiendo de su configuración van a otorgar

las características físicas a los EPS, como elasticidad, pseudoplasticidad y viscosidad (Santos *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2011; Mollakhalili *et al.*, 2015). Los monosacáridos que constituyen los EPS pueden ser pentosas, hexosas, aminoazúcares y ácidos urónicos, (Mollakhalili *et al.*, 2015). De esta manera, la composición química y estructural de los EPS puede variar, por lo que la versatilidad de estas moléculas es lo que le permite múltiples aplicaciones biotecnológicas (Escartin, 2017; Amjres *et al.*, 2010). Los exopolisacáridos sintetizados por microorganismos halófilos están compuestos mayoritariamente por heteropolisacáridos, manosa y/o glucosa y suelen tener cantidades significativas de ácidos urónicos (Wang *et al.*, 2018).

En el estudio realizado por González (2011) se enriquecieron comunidades microbianas provenientes de dos nichos hipersalinos nativos (agua y manto) de la “Laguna Rosada de Uaymitún” en Yucatán, México. Estas comunidades microbianas enriquecidas demostraron potencial como productoras de EPS. El consorcio proveniente del manto de la Laguna Rosada de Uaymitún e inoculado con glucosa (*M(glu)*) obtuvo un mayor rendimiento de EPS con 3.5% de sal en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos en ese trabajo brindan la oportunidad de profundizar en la investigación del EPS provenientes del *M(glu)*, por lo que en el presente trabajo se realizó la caracterización química del EPS sintetizados por dicho consorcio con la finalidad de identificar la composición y así determinar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Metodología

Desproteinización de las muestras

Se diluyeron 2 mg de exopolisacárido (EPS) liofilizado en 8 mL de agua destilada, se

tomaron 500 μL de la muestra diluida y se mezclaron con 250 μL de ZnSO_4 al 10% y 250 μL de NaOH 0.5 N para su desproteización, se dejaron en reposo y se centrifugaron (10,000 RPM x 5 min), se traspasó el sobrenadante a tubos de ensayo y se resguardaron para la determinación de azúcares totales y ácidos urónicos.

Determinación de azúcares totales

Se utilizó la técnica fenol-ácido sulfúrico basada en la metodología propuesta por *Dubois et al.* (1956) con sus pertinentes adecuaciones. El análisis se realizó por triplicado. Se prepararon 6 estándares de glucosa con concentraciones conocidas de 0 a 150 mg/L. Después, se tomaron 200 μL de la muestra desproteizada y de los estándares y añadieron 500 μL de Fenol al 5% e inmediatamente después se adicionaron 2.5 mL de H_2SO_4 . Inmediatamente, se agitaron y dejaron en reposo durante 10 minutos y se dejaron en baño con hielo durante 15 minutos. Las absorbancias se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ GENESYS 20).

Determinación de ácidos urónicos

Se siguió la metodología descrita por *Taylor et al.* (1992) con sus respectivas modificaciones. El análisis se realizó por triplicado. Se mezcló 1 mL de NaOH al 5% con 1.5 mg de fenilfenol ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$). Por otro lado, se pesaron 135 mg de tetraborato de sodio (TBNa) y mezclaron con 27 mL de H_2SO_4 . Se prepararon 6 soluciones estándar con diferentes concentraciones de 0 a 200 mg/L de ácido galacturónico. Posteriormente, se tomaron 200 μL de la muestra desproteizada y los estándares y se añadió a cada uno 1.2 mL de la solución TBNa- H_2SO_4 , se dejaron en reposo y después se calentaron (100 °C x 5 min). Se añadió a cada solución estándar y a la muestra 35 μL de la solución $\text{NaOH-C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$, se agitaron en un vórtex y dejaron reposar. Se leyeron las absorbancias a 530 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ GENESYS 20).

Identificación de monosacáridos

Se diluyeron 5 mg de muestra liofilizada de EPS en 500 μL de agua destilada, posteriormente se desproteizó con ácido trifluoroacético (TFA) y neutralizó con BaCO_3 . Para el análisis cromatográfico mediante TLC, se utilizó la técnica descrita por *Mancilla-Margalli et al.* (2006) con sus pertinentes adecuaciones. Se preparó la mezcla de solventes con 36 mL de propanol, 9 mL de butanol y 12 mL de agua y se resguardó hasta su uso. Después, se preparó la solución reveladora con difenilamina en acetona al 4% (2g/50mL), anilina en acetona al 4% (2mL/50mL), y ácido orto-fosfórico (10 mL). Se utilizó un cromatofolio (10 x 10 cm) de aluminio recubierto con gel de sílice al cual con un capilar se agregó una gota de la muestra hidrolizada de EPS y una gota de cada estándar (manosa, glucosa, galactosa y fucosa). Posteriormente, se adicionó la mezcla de solventes a la cámara de TLC y se colocó la placa. Se dejó correr durante hora y media. Posteriormente, se retiró la placa y dejó secar en la incubadora durante 7 minutos. Después, se asperjó la solución reveladora uniformemente en toda la placa y se calentó durante 20 minutos a 100°C. Finalmente, se observó la cromatoplaqueta resultante en una cámara de luz ultravioleta (UVP®, UV transilluminator M-1E).

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se siguió la metodología propuesta por *Bradford* en 1976 con sus respectivas modificaciones como se describe a continuación. El análisis se realizó por triplicado. Se preparó una solución diluida del reactivo de Bradford (1:2) y posteriormente se prepararon las soluciones estándar de albúmina de suero bovino (BSA) cuyo rango de ensayo lineal se realizó de 20 mg/L a 500 mg/L. Así mismo, se preparó la muestra diluyendo 11 mg de muestra liofilizada de EPS en 5 mL de

agua destilada. Se tomaron 200 μL de la muestra diluida de EPS y cada estándar y adicionó 1 mL del reactivo diluido de Bradford a cada uno y se homogenizó con ayuda de un vórtex. Las muestras se resguardaron sin luz durante 5 minutos. Las absorbancias se leyeron a 595 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ GENESYS 20).

Análisis electroforético

La electroforesis SDS-PAGE se desarrolló de acuerdo con el método propuesto por Laemmli (1970) y los protocolos Laemmli SDS-PAGE y Coomassie Blue Staining descritos por He (2011) usando geles de poliacrilamida al 12% (v/v). Se preparó la muestra diluyendo 20 mg de EPS en 4.5 mL de agua destilada. Seguidamente, se tomaron 10 μL de la muestra y agregaron a un pocillo. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (BIORAD®, Cat: 161-0305). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 115 voltios a 35 mA durante 90 minutos (se utilizó el sistema Mini Protean III® Laboratorios BIORAD®) y a 5°C. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 30 minutos en la solución colorante (100 mL de metanol + 20 mL de ácido acético glacial + 80 mL de agua destilada y 0.25 g de azul de Coomassie R-250). Para la decoloración se utilizó una solución decolorante (100 mL de ácido acético glacial + 400 mL de metanol + 500 mL de agua destilada) durante 30 minutos. Una vez desteñidas, se hidrataron y conservaron en agua destilada

Resultados y discusión

El EPS sintetizado por *M(glu)* está mayormente conformado por carbohidratos (61.38% p/p) y contiene una pequeña proporción de proteínas (1.55% p/p) (ver Figura 1). El 37.07% de la composición del EPS sintetizado por *M(glu)* es desconocido, por lo que podría tratarse de sulfatos y/o sustituyentes orgánicos, como grupos acilo y amino que son otros compuestos

comúnmente encontrados en EPS (Mollakhalili *et al.*, 2015).

El porcentaje de azúcares totales representa un porcentaje similar a lo obtenido en estudios de caracterización de EPS sintetizados por microorganismos halófilos. *Amjres et al.* (2010) determinaron que los EPS sintetizados por las cepas del género *Pantoea*, microorganismo halófilo, contenían entre 59.1 y 66.8 % (p/p) de carbohidratos totales. Por otro lado, *Arun et al.* (2017) caracterizaron EPS sintetizados por *Halolactibacillus miurensis* extraídos de una salina y determinaron un contenido de 56.9 % (p/p) de carbohidratos totales.

Por otro lado, en la Figura 1 también se puede apreciar que casi la mitad de los carbohidratos totales del EPS derivado del *M(glu)* son ácidos urónicos. Es común que se realice el análisis de la presencia de ácidos urónicos durante la caracterización química de exopolisacáridos ya que podrían conferir propiedades físicas de gran interés. Por ejemplo, en los EPS halófilos se ha visto que el contenido de ácidos urónicos genera como resultado una alta viscosidad y capacidad de gelificación. EPS con concentraciones altas de componentes cargados, como los ácidos urónicos, a menudo forman geles en presencia de iones metálicos lo que le confiere un enorme potencial para eliminar metales tóxicos de ambientes contaminados y aguas residuales como alternativa a otros métodos físicos y químicos (Wang *et al.*, 2018). Se obtuvo un alto porcentaje de ácidos urónicos en los EPS nativos comparado con el estudio de *Amjres et al.* (2010). En dicho estudio, los EPS contenían entre 0.1 % (p/p) y el 13.9 % (p/p) de ácidos urónicos; sin embargo, en el trabajo realizado por *Sran et al.* (2019) obtuvieron que los EPS sintetizados por actinobacterias marinas contenían 26 % (p/p) de ácidos urónicos.

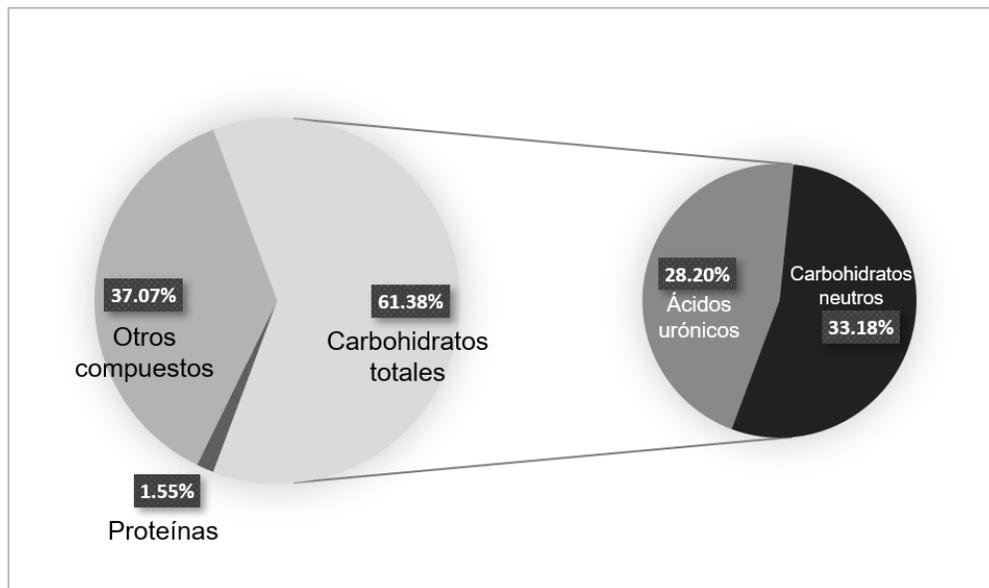


Figura 1. Composición química de los EPS sintetizados por *M(glu)*.

Por otra parte, en el análisis de TLC se seleccionaron manosa (Man), glucosa (Glu), galactosa (Gal) y fucosa (Fuc) como estándares debido a que son los monosacáridos que se han reportado con mayor frecuencia en los EPS provenientes de microorganismos halófilos (Wang *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2017). Se puede ver en la Figura 2, la separación de los monosacáridos presentes en la muestra hidrolizada del EPS proveniente del *M(glu)* en la cual se obtuvo un valor de R_f de 0.7359, este valor coincide mejor con el de fucosa ($R_f = 0.71$), por lo que existe la posibilidad de que los EPS nativos contenga fucosa en su estructura. Algunos EPS sintetizados por microorganismos halófilos que contienen fucosa resultan de gran interés en la industria cosmética, ya que la producción de este monosacárido mediante síntesis química es muy costosa (Amjres *et al.*, 2010). Así mismo, la presencia de fucosa ha sido reportada en EPS provenientes de cultivos mixtos con potencial aplicación en un proceso de biolixiviación (Wang *et al.*, 2018). También es importante recordar que los ácidos urónicos son compuestos muy polares por lo que no pueden ser vistos en la separación de

monosacáridos mediante TLC debido a que en esta técnica los compuestos menos polares son los que correrán hacia arriba en la placa y por lo tanto obtendrán un R_f más alto (Bele *et al.*, 2011).

El ensayo de *Bradford* (ver Figura 1) y análisis electroforético (ver Figura 3) confirman la presencia de proteínas asociadas al EPS analizados en este estudio. La presencia de proteínas en los EPS podría disminuir la carga negativa de la superficie de las células bacterianas y reducir las repulsiones electroestáticas entre las células, lo que favorecería aún más la producción de los EPS (More *et al.*, 2015). El porcentaje de proteínas en los EPS es muy variable, Amjres *et al.* (2010) reporta contenidos de proteína de 0% hasta el 63.5% (p/p) en EPS sintetizados por 26 cepas de microorganismos halófilos. A través de un análisis electroforético de las proteínas presentes se determinó la presencia de diferentes proteínas en donde abunda una fracción de bajo peso molecular y proteínas con peso molecular aproximado de 62.44 kDa (ver Figura 3).

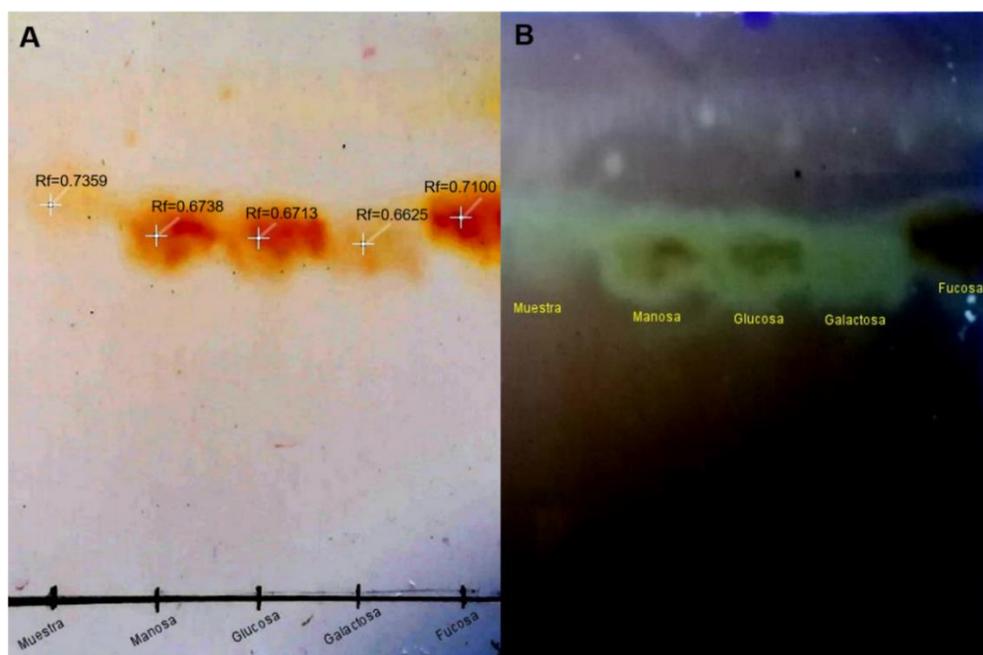


Figura 2. Evaluación de diferentes soluciones de referencia mediante la cromatografía en capa fina (TLC). A) Cromatofolio visto con luz blanca. B) Cromatofolio visto en una cámara de luz UV. Fase estacionaria: gel de sílice de aluminio (10x10 cm). Fase móvil: propanol:butanol:agua (12:3:4). Desarrollador: Difenilamina en C_3H_6O 4%/Anilina en C_3H_6O 4% / H_3PO_4 .

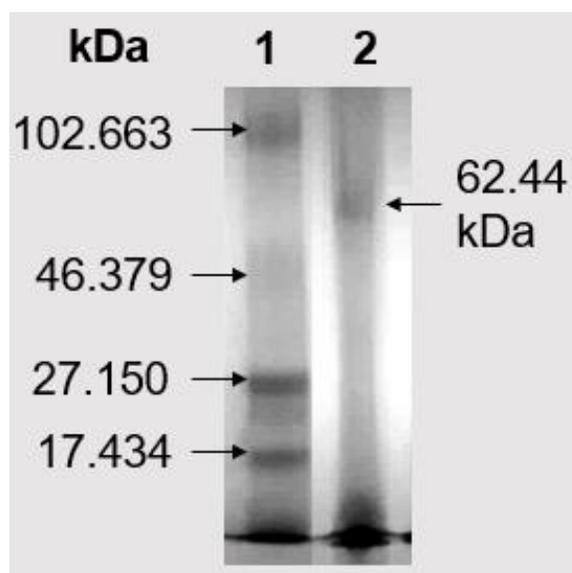


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% corrida a 115 V a 35 mA por 90 minutos a 5°C para la determinación del tamaño de las proteínas presentes en el EPS sintetizado por el *M(glu)*. El carril 1 corresponde al marcador y el carril 2 a la muestra del EPS.

Conclusiones

El EPS producido por el consorcio *M(glu)* está compuesto principalmente por carbohidratos entre los que se determinó la presencia de ácidos urónicos y posiblemente fucosa. Por otro lado, el polisacárido contiene proteínas de

diferente peso molecular. Los datos obtenidos son coincidentes con EPS obtenidos de ambientes salinos. El análisis de la composición de los EPS obtenidos de ambientes no convencionales, es una herramienta para determinar sus posibles propiedades y potenciales aplicaciones.

Referencias

- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J., Llamas, I. (2010). Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de *Halomonas nitroreducens* en la industria farmacéutica. “Ars Pharmaceutica”, 51, 255-266. <http://hdl.handle.net/10481/26428>
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Carranza, D., Abrini, J., Siquin, C., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S., Llamas, I. (2015). Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. “International Journal of Biological Macromolecules”, 72, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052>
- Arun, J., Selvakumar, S., Sathishkumar, R., Moovendhan, M., Ananthan, G, Maruthiah, T., Palavesam, A. (2017). *In vitro* antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus miurensis*. “Carbohydrate Polymers”, 155, 400-406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.085>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. “Analytical Biochemistry”, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bele, A., Khale, A. (2011) An overview on thin layer chromatography. “International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research”, 2(2), 256-267. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(2\).256-67](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(2).256-67)
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. “Analytical Chemistry”, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Escartin, A. (2017). “Producción de un exopolisacárido por la cepa *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado”. Tesis de maestría, Universidad Veracruzana, Veracruz, México. <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/Escartin-Torres-Alejandra.pdf>
- Freitas, F., Alves, V., Reis, M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. “Trends in Biotechnology”, 29(8), 388-398.
- Freitas, F., Torres, C., Reis, M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. “Bioresource Technology”, 245, 1674-1683. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>

- González, A. (2011). “Caracterización genómica y funcional de consorcios microbianos procedentes de una laguna costera”. Tesis de posgrado institucional, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.
- He, F. (2011). Coomassie Blue Staining. “Bio-protocol”, Bio101: e78. <https://bio-protocol.org/bio101/e78>
- He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. “Bio-protocol”, Bio101: e80. <https://bio-protocol.org/bio101/e80>
- Kant, S., Kant, R., Choi, Y., Kan, E., Kim, Y., Yang, Y. (2018). Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. “Critical Reviews in Biotechnology”, 38(8), 1209-1229. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471445>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. “Nature”, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Mancilla-Margalli, N., López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and dasylirion species. “Journal of Agricultural and Food Chemistry”, 54(20), 7832-7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Mollakhalili, N., Mohammadifar, M. (2015). Microbial exopolysaccharide: A review of their function and application in food science. “Journal of Food Quality and Hazards Control”, 2, 112-117. https://jfqhc.ssu.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-1-114&slc_lang=en&sid=1
- More, T., Yan, S., Tyagi, R. and Surampalli, R. (2015). Biopolymers production by mixed culture and their applications in water and wastewater treatment. “Water Environment Research”, 87(6), 533-546. <https://doi.org/10.2175/106143015x14212658614676>
- Ruiz, L. (2011). “Diseño de un Proceso para la Obtención de una Galleta a partir de Harina de Trigo Enriquecida con Paraíso Blanco (*Moringa oleifera*) y su Respectiva Evaluación Nutricional”. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1210_Q.pdf
- Santos, J., León, K., Alcívar, J., Flores, E., Olivares, S. (2016). Cuantificación y caracterización química de exopolisacáridos (EPS) producidos por una cepa de *Penicillium* sp. aislada de la Antártida. “Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales”, 10(2), 97-101.
- Sran, K., Bisht, B., Mayilraj, S., Choudhury, A. (2019). Structural characterization and antioxidant potential of a novel anionic exopolysaccharide produced by marine *Microbacterium aurantiacum* FSW-25. “International Journal of Biological Macromolecules”, 131, 343-352. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.016>
- Taylor, K., Buchanan-Smith, J. (1992). A colorimetric method for the quantitation of uronic acid and a specific assay for galacturonic acid. “Analytical Biochemistry”, 201(1), 190-196. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90194-c](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90194-c)
- Wang, J., Salem, D., Sani, R. (2018). Extremophilic exopolysaccharides: a review and new perspectives on engineering strategies and applications. “Carbohydrate Polymers”, 205, 8-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.011>

Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M. and Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. “International Journal of Biological Macromolecules”, 63, 133-139.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.036>

Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A. and Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. “Microbial Biotechnology”, 11(5), 833-847.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>