

## Cuantificación y caracterización química de exopolisacáridos (EPS) producidos por una cepa de *Penicillium* sp. aislada de la Antártida

### Quantification and chemical characterization of exopolysaccharides (EPS) produced by a strain of *Penicillium* sp. isolated from Antarctica

Jaime Santos<sup>1,\*</sup>, Kleber León<sup>2</sup>, Jean Alcívar<sup>2</sup>,  
Edwin Flores<sup>2</sup> & Santiago Olivares<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Docente de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil,  
Laboratorio de Biotecnología, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo (Campus  
Mapasingue), 04-3080777 ext. 218 Guayaquil, Ecuador.

<sup>2</sup> Estudiante de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil,  
Laboratorio de Biotecnología, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo (Campus  
Mapasingue), 04-3080777 ext. 218 Guayaquil, Ecuador.

Recibido 4 de agosto 2016; recibido en forma revisada 15 de noviembre 2016, aceptado 14 de noviembre 2016  
Disponible en línea 31 de diciembre 2016

#### Resumen

El interés en la producción de exopolisacáridos (EPS) a nivel mundial se ha incrementado debido a la versatilidad en sus usos como biosurfactantes, emulgentes, antibióticos entre otros. El objetivo de este proyecto fue determinar la producción de EPS de una cepa del hongo *Penicillium* sp., aislado de la Antártida. El ensayo se realizó bajo un diseño factorial en dos medios de cultivo MEB y PDB, los cuales se evaluaron bajo las siguientes condiciones: temperatura 25 °C y 30 °C; pH: 6, 7 y 8; y agitación constante a 130 rpm. La composición química de los EPS evaluados en el presente estudio fueron carbohidratos, proteína, restos acetilo, restos piruvato y hexosaminas. Los mejores resultados obtenidos fueron: proteínas 9,984±1.5 µg/g en MEB, pH 8 y 25 °C, restos de acetilo 2742±1983 µg/g en PDB, pH 6 a 30 °C, carbohidratos 2,5495±1.43 µg/g en PDB, pH 8 a 25 °C, hexosaminas 7.53±6.41 mg/g en PDB, pH 6 a 30 °C y restos de piruvato 4242±3087 µg/g en PDB, pH 8 a 25 °C. La producción de EPS dependió de los parámetros a las que el hongo fue sometido, siendo el pH y la temperatura factores determinantes en el proceso. Además, se determinó que no existe correlación entre la producción de biomasa y los EPS.

**Palabras claves:** Carbohidratos, exopolisacáridos, hexosaminas, piruvato, *Penicillium* sp., restos de acetilo.

#### Abstract

The worldwide interest on exopolysaccharides (EPS) production has increased due to the versatility in its uses as biosurfactants, emulsifiers, and antibiotics among others. The aim of this work was to determine EPS production from a strain of *Penicillium* sp. isolated from Antarctica. The assay was performed under a factorial design on MEB and PDB culture media, those were evaluated under the following conditions: temperature 25 °C and 30 °C; pH: 6, 7, and 8; and a constant stirring at 130 rpm. The chemical composition of EPSs tested in the present study were carbohydrates, protein, acetyl residues, pyruvate residues and hexosamines. The best results were: proteins 9,984±1.5 µg/g in MEB, pH 8 and 25 °C, acetyl residues 2742±1983 µg/g in PDB, pH 6 at 30 °C, carbohydrates 2,5495±1.43 µg/g in PDB, pH 8 to 25 °C, hexosamines 7.53±6.41 mg/g in PDB, pH 6 at 30 °C and residues of pyruvate 4242±3087 µg/g in PDB, pH 8 at 25 °C. The production of EPS depends on the parameters under which the fungus was submitted, among those, pH and temperature were the determining factors on the process. In addition, no proportional correlation between biomass production and EPS was determined.

**Key words:** Acetyl residues, carbohydrates, exopolysaccharides, hexosamines, pyruvate, *Penicillium* sp.

\* Correspondencia del autor:  
E-mail: j.santos2387@gmail.com



## Introducción

Los polisacáridos son carbohidratos relativamente complejos, es decir; que constan de uniones de monosacáridos, estos polisacáridos se caracterizan por poseer una propiedad de adherencia o viscosidad, por lo que actualmente están siendo estudiados debido a su alto interés comercial (Laroche y Michaud, 2007).

La composición química de los EPS está constituida fundamentalmente por carbohidratos, aunque con diversos sustituyentes orgánicos en su composición como restos acetilo, restos piruvatos, hexosaminas y proteínas, las cuales le confieren características ácidas al EPS (Gómez, 2006; Paris, 2009).

Existen EPS de origen microbiano que poseen funciones viscosantes, emulgentes y estabilizadoras; estas propiedades las han adquirido hongos y bacterias como evolución para poder adherirse y adaptarse a sustratos u otros medios (Mathur y Mathur 2006).

Algunas especies de hongos han sido estudiados en los últimos años por ser productores de EPS, tales como: *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazi*, *Cordyceps sp.*, *Lentinus edodes* y *Grifola frondosa*, estos reportan actividades biológicas interesantes que van a depender de las condiciones físicas a las que sea sometido el hongo como también del medio de cultivo y su composición (Yang y He, 2008).

La producción de EPS a partir de microorganismos ofrece una variedad de alternativas para su utilización en las industrias farmacéuticas y cosméticas, además de su uso como estabilizadores en la industria alimenticia, un claro ejemplo de polisacáridos de origen microbianos es el xantano (Sutherland, 2002). El objetivo del presente estudio fue caracterizar por espectrofotometría de luz visible los principales

componentes químicos de los exopolisacáridos producidos por una cepa de *Penicillium sp.*, aislada de la Antártida.

## Materiales y métodos

### Material Biológico

La cepa de *Penicillium sp.* fue aislada de la Antártida y reposa en el Laboratorio de Biotecnología a  $-40^{\circ}\text{C}$  con un crioprotectante para su mantenimiento, su identificación se estableció mediante el trabajo propuesto por Samson (1990; Fig. 1).

### Diseño experimental

El ensayo se realizó bajo un diseño factorial en dos medios de cultivo Extracto de Malta Broth (MEB): dextrosa 15 g, peptona 1 g, extracto de malta 20 g y agua destilada 1000 mL y Papa Dextrosa Broth (PDB): extracto de papa 200 g, dextrosa 20 g, agua destilada 1000 mL, los cuales fueron ajustados a un volumen final de 150 mL y la salinidad de 30 ppt. Las condiciones bajo las cuales se evaluó la producción de EPS fueron las siguientes: temperatura  $25^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}$ ; pH: 6, 7 y 8; y agitación constante a 130 rpm.

### Extracción de EPS

Luego de obtener la biomasa, los EPS se extrajeron mediante filtración habitual empleando embudo y gasa para lograr la separación entre el líquido y el micelio.

Una vez separado la biomasa del medio de cultivo se precipitó con etanol al 98% frío con una proporción igual a tres veces el volumen, debido a que el etanol bloquea las interacciones entre el agua y el EPS.

Luego de la precipitación, el sustrato se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se solubilizó empleando agua destilada para una mejor

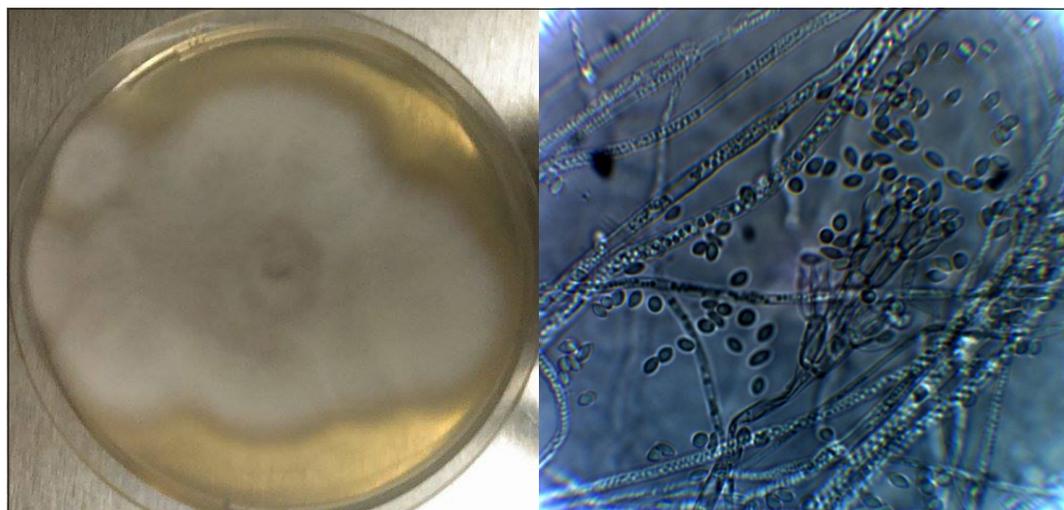


Figura 1. Cepa de *Penicillium sp.* a la izquierda, foto macroscópica de la colonia (color rosado claro); a la derecha, fotografía microscópica 10x de la cepa.

purificación de los EPS. Los restos de impurezas fueron separados mediante centrifugación a 7000 rpm por 60 minutos. Los EPS obtenidos de manera pura fueron sometidos a un proceso de secado a 60 °C durante 48 horas, pulverizados mediante mortero para su posterior pesado.

**Caracterización de EPS**

La caracterización química se realizó mediante espectrofotometría con el equipo Genesys 20Vis Thermo scientific, las técnicas utilizadas fueron las siguientes: carbohidratos (Dubois *et al.*, 1956), proteínas (Bradford, 1976), restos acetilo (McComb y McCready, 1957), restos piruvato (Sloneker y Danutes, 1962) y hexosaminas (Johnson, 1971).

**Resultados**

**Variables evaluadas**

La mayor producción de EPS se observó empleando PDB con un valor de 0.524±0.00 g/mL, a 25 °C y pH 7; mientras que el menor rendimiento fue de 0.0267±0.00 g/mL empleando MEB a 25 °C y pH 8 (Fig. 2).

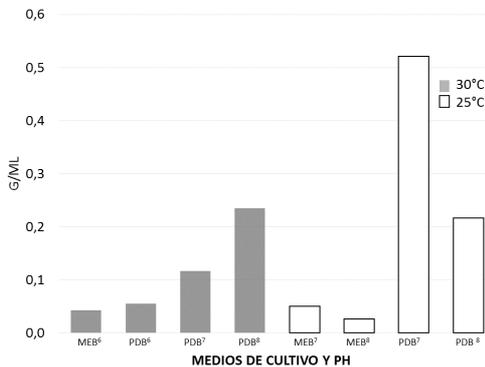


Figura 2. Producción de EPS bajo las condiciones de temperatura, pH y medios de cultivo.

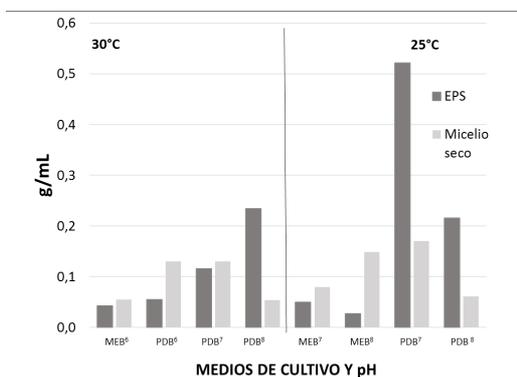


Figura 3. Comparación entre los EPS y la biomasa a temperaturas de 30°C y 25°C

Se evidenció que en el medio MEB hubo una mayor producción de biomasa y baja producción de EPS

comparadas con PDB. En medio PDB se obtuvieron los mejores resultados de EPS 0.2346±0.002 g/mL y 0.524±0.002 g/mL valores correspondientes a 30 °C y 25 °C, respectivamente. A pH 6 a 25 °C no se obtuvieron EPS, a 30 °C bajo estas mismas condiciones de pH los valores fueron los más bajos en MEB 0.0425±0.01 g/mL y PDB 0.0550±0.001 g/mL (Fig. 3).

**Caracterización química**

**Proteínas**

Las mayores concentraciones de proteínas se dieron en los EPS producidos a 25 °C en MEB con valores de 4,185±0.47 µg/g y 9,984±0.15 µg/g a pH 7 y 8, respectivamente. Además, no existió una correlación entre la cantidad de EPS producidas y las concentraciones de proteínas (Navon *et al.*, 1995). Hay que tener en cuenta que la concentraciones proteicas le dan una actividad emulgente a estos polisacáridos (Fig. 4).

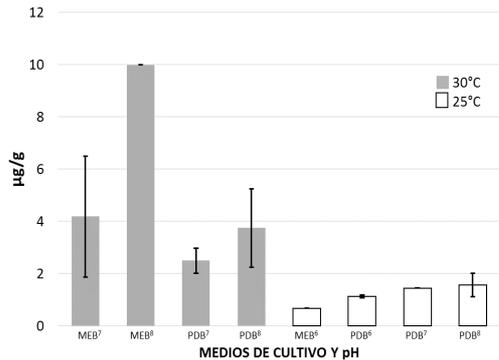


Figura 4. Concentraciones de proteínas en los EPS obtenidos en los diferentes ensayos.

**Restos Acetilo**

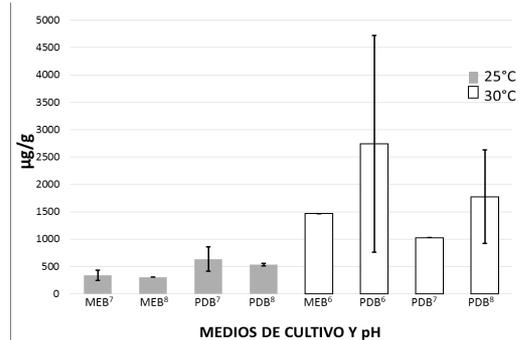


Figura 5. Concentraciones de restos acetilo en los EPS producidos.

Las concentraciones más altas en restos de acetilo se dieron en PDB, pH 6 a 30°C, con un valor de 2742±1983 µg/g. Cabe recalcar que los grupos acetilos le confieren un carácter hidrófobo a los EPS aportándole una propiedad emulgente a estos, aunque también pueden afectar la capacidad gelificante como el

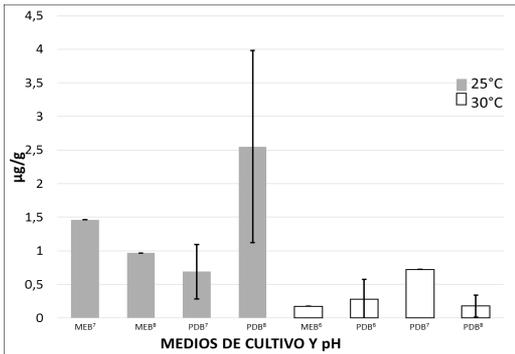


Figura 6. Contenido de carbohidratos totales en las muestras de EPS obtenidas.

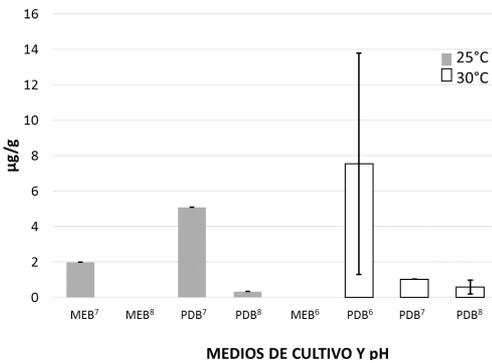


Figura 7. Concentraciones de hexosaminas presente en los EPS.

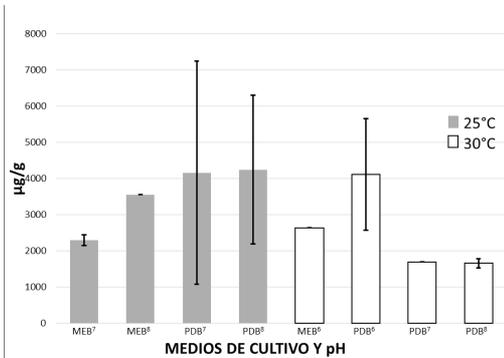


Figura 8. Concentraciones de piruvatos en EPS.

caso de ciertos alginatos (Ashtaputre y Shah, 1995). Además, no se encontró una correlación entre los EPS producidos y las concentraciones de restos acetilo (Fig. 5).

**Carbohidratos**

La producción de carbohidratos tuvo una mayor concentración en PDB, pH 8 a 25°C con un valor de 2,5495±1.43 µg/g. También se evidenció que a 25°C existe una mayor presencia de carbohidratos comparados con los resultados obtenidos a 30°C. Hay que tener en cuenta que los carbohidratos presentes en los EPS son muy importantes debido

a que la estructura de los mismos se encuentra formada por homopolímeros y heteropolímeros, los cuales, dependiendo de su configuración van a otorgar sus características físicas al EPS, como elasticidad, pseudoplasticidad y viscosidad (Limberg, 1990; Fig. 6).

**Hexosaminas**

La mayor producción de hexosaminas se dio en PDB, pH 6 a 30°C, con un valor 7.53±6.41 mg/g; la menor presencia de hexosaminas se observó en PDB, pH 8 a 25°C, con un valor 0,32±0.00 mg/g. Se observó que las variaciones en la producción de hexosaminas no mostraron una relación directa con las variables estudiadas, ni la producción de EPS (Fig. 7).

**Restos de piruvatos**

Los valores obtenidos en los análisis de piruvatos fueron de 4242±3087 µg/g en PDB, pH 8 a 25°C, siendo este el más alto, pero cabe recalcar que los piruvatos presentaron un aumento progresivo a medida que aumentó el pH, siendo indiferente el medio de cultivo utilizado a temperaturas de 25°C, a diferencia de los piruvatos presentes a 30°C, en donde éstos son muy variables. La presencia de piruvatos les da una carga neta negativa a las moléculas, otorgándole mayor viscosidad y termoestabilidad a los EPS (Gamini y Mandel, 1994; Fig. 8).

**Discusión**

Las condiciones del medio de cultivo van a favorecer a un crecimiento celular, pero no necesariamente este aumento en la producción de biomasa va ser proporcional a la producción de los exopolisacáridos, como ocurrió en este caso. La presencia de fuentes de carbono, nitrógeno y azúcar en los medios de cultivo son necesarios para la activación de la síntesis de EPS. En este estudio ese factor no se tomó en cuenta para los análisis, pero cabe mencionar que a pesar de tener una variación de composición en los medios de cultivo si se observa la relación EPS-Biomasa, estos al ser evaluados bajo las mismas condiciones presentaron diferencias de producción mayores o menores de EPS dependiendo de las variables temperatura-pH más que de la composición del medio. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Cheirslip *et al.*, 2001; Gorret *et al.*, 2001), quienes atribuyen que el crecimiento y la producción de EPS tienen requerimientos nutricionales diferentes debido a que los hongos adquieren mayor producción de exopolisacáridos como evolución para poder adherirse y adaptarse a sustratos u otros medios.

**Conclusión**

La producción de EPS depende de las condiciones a las que la cepa del hongo antártico *Penicillium sp.* sea sometido. De este modo, la mayor producción de EPS se presentó a 25°C, con un pH 7 y empleando PDB como medio de cultivo; el pH y la temperatura son los factores determinantes. Además, se registró que

no existe correlación entre la producción de biomasa y los EPS.

Las concentraciones de carbohidratos, proteínas, restos acetilo, piruvatos y hexosaminas presentes en los EPS están regidas a las condiciones físico-químicas a las que el hongo se ha expuesto, mas no a las cantidades de EPS y biomasa producidas.

## Recomendaciones

Realizar una caracterización química de sustituyentes como fosfatos y sulfatos ya que estos le dan una característica ácida a los EPS.

Determinar los carbohidratos que poseen éstos EPS ya sean homopolímeros o heteropolímeros.

Realizar un análisis para determinar propiedades reológicas de la cepa del hongo antártico *Penicillium* sp., basándonos en el interés comercial que tienen estos exopolisacáridos y sus propiedades como elasticidad, viscosidad y pseudoplasticidad.

## Referencias

- Ashtaputre, A. A y A. K. Shah. 1995. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11:219-222.
- 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.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- Cheirstip, B., H. Shimazu y S. Shioya. 2001. Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 57:639-46.
- Gamini, A. y M. Mandel. 1994. Physicochemical properties of aqueous xanthan solution: static light scattering. *Biopolymers*, 34:783-797.
- Gómez Mata, J. A. 2006. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/973/1/16115946.pdf>
- Gorret, A., N. Maubols, J. Engasser y J. Ghoul, 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.
- Johnson, A. R. 1971. Improved method of hexosamine determination. *Anal Biochem.* 44:628-635.
- Laroche, C. y P. Michaud. 2007. New Developments and Prospective Applications for (1, 3) Glucans, Recent, *Patents Biotechno.*, 1:59-73.
- Limberg, B. 1990. Components of bacterial polysaccharide. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 48:279-318.
- McComb, E. A. y R. M. McCready. 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Anal. Chem.*, 29(5):819-821.
- Mathur, V. y N. Mathur. 2006. Microbial polysaccharides based food hydrocolloid additives, *Sci. Tech. Enterprise*: 1-10.
- Navon-Venezia, S., Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmam, S. Carmeli, E. Z. Ron y E. Rosemberg. 1995. Alasam: A new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied Environmental Microbiology*, 61:3.240-3.244.
- Paris, X. 2009. *Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir de lactosuero y permeatos*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. <http://hera.ugr.es/tesisugr/18101604.pdf>
- Samson, P. 1990. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Vol. 185. Plenum Press. New York and London.
- Sloneker, J. H. y G. Danutes. 1962. Pyruvic Acid, a Unique Component of an Exocellular Bacterial Polysaccharide, *Nature*, 194:478-479.
- Sutherland, I.W. 2002. Microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiol. A sticky business*,70-71.
- Yang, H. y G. He. 2008. Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. *World J. Microb. Biot.*, 24(12):2903-7.