

Bioprospección de bacterias ácido lácticas productoras de biofloculante aisladas de jugo de caña residual

Magaly De La Cruz Noriega¹, Medardo Alberto Quezada Alvarez²

Recibido: 12-06-2020

Aceptado: 28-09-2020



DOI: <https://doi.org/10.18050/revucv-scientia.v12i2.912>

Cómo citar: De La Cruz Noriega, M. Quezada Álvarez, M. (2020) Bioprospección de bacterias ácido lácticas productoras de biofloculante aisladas de jugo de caña residual. UCV-Scientia (12) 2, pág 121 -135. doi: 10.18050/revucv-scientia.v12i2.912

¹Ms. Universidad César Vallejo (Perú). mdelacruz@ucvvirtual.edu.pe ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3826-2140>

²Dr. Universidad César Vallejo (Perú). maqa69@hotmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0215-5175>

Bioprospección de bacterias ácido lácticas productoras de biofloculante aisladas de jugo de caña residual

Magaly De La Cruz Noriega¹
Medardo Alberto Quezada Alvarez²

Resumen

El objetivo fue aislar bacterias ácidas lácticas (BAL), productoras de biofloculante, a partir del jugo de caña residual. Por ello, las muestras de jugo de caña se obtuvieron a partir de 15 muestras de tallo de caña residual muestreadas al azar. Luego se procedió al aislamiento de las BAL mediante técnicas de microbiología convencional, para lo cual se empleó el medio de cultivo Agar Mayeux, Sandine y Elliker (MSE) a pH 7.2 y un tiempo de incubación de 30°C por 48 horas. Posteriormente, se realizó los cultivos puros a partir de las colonias características de *Leuconostoc mesenteroides* (colonias gomosas, viscosas, traslucidas y cremosas) para su identificación bioquímica de acuerdo al Manual de determinación bacteriológica de Bergey's. Para la identificación y selección de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* se realizó de acuerdo al método estadístico coeficiente Kappa, con la finalidad de utilizarla en la producción de dextrano (biofloculante) en un biorreactor aireado-agitado (Marca Aplikon). La pureza del dextrano se realizó mediante la técnica FT-IR el cual se comparó con el espectro de dextrano puro producido por la cepa NRRL P-640. Se logró aislar 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, LM (01-04), de las cuales la cepa LM03 se identificó como *L. meenteroides subsp. mesenteroides*. Los valores de dextrano producidos por LM03 fueron de 26.87 g/L a las 80 horas (concentración máxima) y 2.61 g/L a las 4 horas (concentración mínima). El dextrano producido por LM03 es puro de acuerdo al análisis FT-IR. En conclusión, se logró aislar a la BAL *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* (cepa LM03), la cual tuvo la capacidad de producir dextrano, el cual puede ser utilizado como biofloculante con distintos usos biotecnológicos e industriales.

Palabras clave: Bioprospección; biofloculante; *Leuconostoc mesenteroides*; bacterias ácido lácticas; dextrano.

¹Ms. Universidad César Vallejo (Perú). mdelacruz@ucvvirtual.edu.pe ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3826-2140>

²Dr. Universidad César Vallejo (Perú). maqa69@hotmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0215-5175>

Bioprospection of bioflocculant-producing lactic acid bacteria isolated from residual sugar cane juice

Magaly De La Cruz Noriega¹
Medardo Alberto Quezada Alvarez²

Abstract

The objective was to isolate bioflocculant-producing lactic acid bacteria (LAB) from residual sugarcane juice. For this reason, sugarcane juice samples were obtained from 15 randomly sampled residual sugarcane stalk samples. The isolation of LAB was then carried out by means of conventional microbiology techniques, using Agar Mayeux, Sandine and Elliker (MSE) culture medium at pH 7.2 and an incubation time of 30°C for 48 hours. Subsequently, pure cultures were made from the characteristic colonies of *Leuconostoc mesenteroides* (rubbery, viscous, translucent and creamy colonies) for their biochemical identification according to Bergey's Manual of Bacteriological Determination. The identification and selection of *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* was carried out according to the Kappa coefficient statistical method, with the purpose of using it in the production of dextran (bioflocculant) in an aerated-agitated bioreactor (Aplikon brand). The purity of the dextran was determined using the FT-IR technique, which was compared with the spectrum of pure dextran produced by the strain NRRL P-640. Four strains of *Leuconostoc mesenteroides*, LM (01-04) were isolated, of which the strain LM03 was identified as *L. meenteroides subsp. mesenteroides*. The dextran values produced by LM03 were 26.87 g/L at 80 hours (maximum concentration) and 2.61 g/L at 4 hours (minimum concentration). The dextran produced by LM03 is pure according to FT-IR analysis. In conclusion, it was possible to isolate BAL *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* (strain LM03), which had the capacity to produce dextran, which can be used as a bioflocculant with different biotechnological and industrial uses.

Keywords: Bioprospection; bioflocculant; *Leuconostoc mesenteroides*; lactic acid bacteria.

¹Ms. Universidad César Vallejo (Perú). mdelacruz@ucvvirtual.edu.pe ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3826-2140>

²Dr. Universidad César Vallejo (Perú). maqa69@hotmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0215-5175>

INTRODUCCIÓN

Los biofloculantes son polímeros de alto peso molecular y suelen ser producidos por algunos microorganismos (Feng et al., 2008; Wu & Ye, 2007). Estos biofloculantes pueden ser biopolímeros extracelulares (EPS) y pueden estar constituidos por proteínas, carbohidratos y lípidos, y varían en su proporción de acuerdo al género microbiano que los produce; además, poseen ventajas sobre otros floculantes de características no biológicas. (Friedman et al., 1969; Vatansever, 2005; Cosa, 2010; Salehizadeh & Yana, 2014). Son empleados principalmente para la potabilización convencional de agua, para el lodo biodegradado en la agricultura y el tratamiento de efluentes; además, se pueden aplicar en procesos posteriores de las industrias de fermentación (García, 2007; Okaiyeto et al., 2016). El potencial industrial de los biofloculantes se ha reconocido desde hace mucho tiempo debido a su inocuidad, biodegradabilidad y falta de contaminación secundaria de sus intermedios degradantes (Wang et al., 2011).

Existen varios estudios donde han utilizado biofloculantes como una alternativa a los floculantes químicos utilizados en el tratamiento de efluentes y aguas residuales, por ejemplo, Suryani et al. (2011), en su trabajo de caracterización de biofloculantes obtenidos de bacterias aisladas de aguas contaminadas, evaluó el origen bacteriano y la optimización de la floculación. Como resultado de su investigación encontró que *Chromobacterium violaceum* y *Citrobacter koseri* mostraron una alta actividad floculante (68.9% y 71.3%). Por otro lado, Zhao et al. (2013) evaluaron el potencial de un nuevo biopolímero intracelular producido por *Klebsiella pneumoniae* denominado MBF-5, la cual fue aislada de una muestra de esputo con la finalidad de remover quistes de *Acanthamoeba*, potente patógeno que prevalece en el agua, el suelo, el aire y el polvo. También se demostró que la presencia de cationes no mejoró la floculación y que los principales componentes del biopolímero de MBF-5 fueron polisacáridos y proteínas con una proporción de 96.8% y 2.1% respectivamente.

En la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) es posible encontrar una amplia diversidad microbiana, siendo comunes las bacterias productoras del ácido láctico a partir de la fermentación de la sacarosa, también llamadas bacterias ácido lácticas BAL (Mulet et al., 2010).

Las BAL como los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y especies de *Weissella* producen principalmente dextranos que difieren en el tipo de enlace glucosídico, el grado y tipo de ramificación, longitud de la cadena, distribución del peso molecular y conformación de la cadena polimérica (Capek et al., 2011; Freitas et al., 2011). Según su composición química, estos biopolímeros se clasifican en: (a) homopolisacáridos, compuestos por un solo tipo de monosacárido o (b) heteropolisacáridos, que contienen dos o más tipos diferentes de monosacáridos (Besrou-Aouam et al., 2019).

Las dextranas tienen una consistencia gomosa o muciforme, son polisacáridos de elevado peso molecular, formados por al menos 50% glucosas unidas por enlaces α -1.6, con ramificaciones enlazadas α -1.3, aunque puede presentar otras unidas α -1.2 o α -1.4 y sus pesos moleculares oscilan entre 15,000 a 2,000,000 o más (Barker, 1990). El género *Leuconostoc* tiene cepas que son buenas productoras de dextrano, por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 aislado de jugo de chucrut chino es un buen productor intensivo de dextrano. Otro ejemplo es *L. mesenteroides* CMG713, quien produjo un máximo dextrano después de 20 horas de incubación a 30°C con 15% de sacarosa a pH 7.0 (Du et al., 2020). Por otro lado, el dextrano producido por *L. mesenteroides* NRRL B512F y *L. mesenteroides* NRRL B1299 se han caracterizado y clasificado bien. El dextrano de *L. mesenteroides* B512F contiene 95% de enlaces α -(1 → 6) y 5% de enlaces ramificados α -(1 → 3); mientras que el dextrano insoluble de *L. mesenteroides* 1299 contiene 63% de enlaces α -(1 → 6), 27% de α -(1 → 2) y 8% de enlaces α -(1 → 3) (Sarwat et al., 2008).

Cierto grupo de estos coagulantes tienen propiedades antimicrobianas, reduciendo o eliminando el número de microorganismos patógenos susceptibles de causar enfermedades garantizando la inocuidad para el ser humano; de esta manera, otras características como alta efectividad, fácil descomposición, disminución de productos contaminantes secundarios, eficiencia en la remoción de color y sus amplias área de aplicación han ocasionado actualmente un notorio uso de biofloculantes (Pan et al., 2009).

Por todo lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo la bioprospección de bacterias ácido lácticas productoras de dextrano a partir de jugo de caña residual, con la finalidad de obtener un biofloculante el cual puede ser utilizado para usos biotecnológicos e industriales debido a su compatibilidad con el medio ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Material

2.1.1.- Material biológico

Estuvo conformada por muestras del jugo de caña procedentes de tallos en descomposición con presencia de sustancia gomosa presentes en *Saccharum officinarum* "Caña de azúcar" (Caro, 2013), las que se recolectaron al azar a partir de diversos cultivares; de la Azucarera Agroindustrial Casa Grande S AA.

2.2.- Técnicas

2.2.1.- Procesamiento de las muestras de Caña de azúcar

Se recolectó 15 muestras de tallos afectados (descompuestos y con presencia de sustancia gomosa) cortados cuidadosamente, se colocaron en bolsas de polipropileno de primer uso; rotulándose cada muestra colectada, y se trasladaron al Instituto de Investigación de la Universidad César Vallejo. Cada muestra se procesó hasta obtener jugo y en condiciones asépticas se realizó una coloración de Gram (Madigan et al., 1997).

2.2.2.- Aislamiento de la BAL *Leuconostoc* sp.

Se tomó una alícuota de 1 ml de jugo de caña de azúcar y se procedió a realizar diluciones en tubos que contenían 9 ml de solución salina fisiológica estéril, hasta llegar a la dilución de 10⁵, para luego tomar de la última dilución 0,1 ml de muestra y sembrarlo por duplicado mediante la técnica de siembra por superficie en Agar MSE a pH 6.7, incubando a 30°C por 48 horas.

Se seleccionaron las cepas bacterianas que mostraron mayor crecimiento, producción de goma, colonias de forma circular, superficie lisa, traslúcida, color crema, consistencia viscosa, las que fueron repicadas en Caldo MSE a pH 6.7 siendo incubados a 30° C por 48 horas y conservados en refrigeración (Caro, 2013).

2.2.3.- Identificación de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

Aquellos microorganismos que fueron seleccionados se identificaron en función al protocolo de pruebas de identificación bioquímicas y diferenciales, según el Manual de determinación bacteriológica de Bergey's (Holt et al., 1994).

A partir de las colonias obtenidas se realizó la tinción Gram (+), tinción de endosporas (-) y tinción de cápsula (+), y las pruebas de catalasa y oxidasa (-) (Mora, 1995).

2.2.4.- Producción de dextrana por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* en Biorreactor Aireado -Agitado

2.2.4.1.- Obtención del inóculo

El cultivo puro *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* se reactivó en una placa Petri con Agar MSE a pH 6,7 y se incubó a 30±1°C por 48 horas.

Una vez detectado el crecimiento microbiano, se realizó una coloración Gram para evaluar la pureza del inóculo. Luego se realizó una suspensión en solución salina fisiológica estéril y se inoculó 10 ml en un matraz

conteniendo 90 ml de Caldo MSE modificado (sacarosa comercial), obteniéndose un inóculo equivalente al 10% del volumen total del medio de producción. (Caro, 2013).

2.2.4.2.- Proceso fermentativo

El proceso fermentativo se realizó en un Biorreactor Aireado-Agitado que contenía 900 mL de caldo Mayeux con sacarosa comercial (10 gL⁻¹), adicionalmente se depositó 100 mL (10 % v/v) del inóculo bacteriano (1,6 x 10⁸) incubándose a 30 °C, durante 74 horas. (Fuentes et al., 2013), luego se tapó herméticamente el biorreactor iniciándose el bioproceso a pH 7,2 temperaturas a 30 °C, 0.5 + vvm de aireación estéril, con 200 rpm por 4, 10,22,28,48 y 75 horas. (Pinchi et al., 2017).

2.2.4.3.- Tratamiento y precipitación de la goma dextrana

Terminado el bioproceso, se extrajo el medio de producción fermentado aproximadamente 200 mL se le agrego etanol al 80%. Se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos, luego se extrajo el precipitado, y se lo colocó en papel caramelo previamente tarado, se secó en estufa a 55°C por 4 horas, finalmente se pesó (Pinchi et al., 2017).

2.2.5.- Análisis de la goma dextrana producida por *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*

2.2.5.1.- Propiedades físicas de la goma dextrana

a.- Determinación de la densidad y viscosidad

En una probeta de 250 mL se preparó una solución de goma dextrana al 1.0 %, y se colocó el densímetro. Lopretti (2002). Se realizó una solución colocando un gramo de dextrano en 300 ml de NaOH 3 % y se calentó a baño María por 3 hr a 90 °C, se dejó reposar por 12 horas y se filtró la solución ajustándolo a 300 mL con NaOH al 3%, determinándose la viscosidad lo cual se

utilizó un viscosímetro Fungilab modelo Rotacional SMART L'PPR

b.- Determinación de la solubilidad, pH

Se disolvió 10 g de dextrano en polvo en 250 mL de agua bidestilada y se evaluó la solubilidad, después se determinó el pH de la solución usando el pHmetro Thermo Scientific .

c.- FTIR

Se realizó a los polisacáridos un análisis en el espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier FTIR, con el objetivo de identificar los grupos funcionales representativos en los materiales obtenidos y hacer una aproximación a la química del polímero. Los resultados se compararon con el espectro conocido y obtenido de un dextrano producido por la cepa NRRL P-640.

2.2.6.- Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante el coeficiente de Kappa para evaluar la concordancia de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* según Bergey's con las cepas aisladas en el laboratorio, ya que esta prueba mide el grado de concordancia entre dos resultados, es decir hasta qué punto coinciden sus valores tomando valores entre -1 y +1; mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter observador.

RESULTADOS

Con respecto a los resultados, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* creció en el medio de cultivo Agar Mayeux, Sandine y Elliker (MSE) a pH 7.2 y un tiempo de incubación de 30°C por 48 horas. a partir de muestras de caña de azúcar y fue posible identificar sus características macro y microscópicas propias de la especie, que se aprecian en la figura 1, en donde las bacterias se muestran como cocos grampositivos dispuestas en cadenas (vistas al microscopio) [A], con colonias gomosas y circulares con bordes definidos, son observables a simple vista [B].

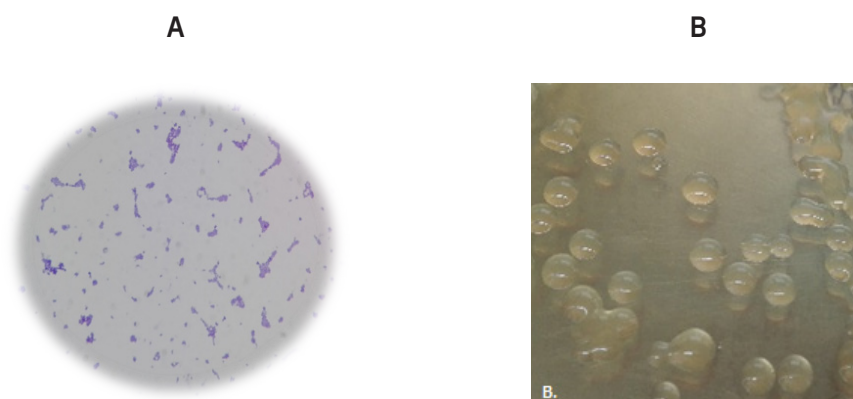


Figura 1. A. Observación microscopía de la coloración gram de la cepa de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LM03 B. Observación macroscópica de las colonias de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LM03 en Agar MSE.

A partir de las colonias obtenidas se realizó la tinción Gram (+), tinción de endosporas (-), tinción de cápsula (+), las pruebas de catalasa y oxidasa (-), siendo la prueba de arabinosa (+) propia de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Mora, 1995). Estos resultados fueron comparados con los datos de pruebas bioquímicas expuestas en el Manual según Bergey's para la identificación bioquímica de la cepa aislada (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación morfológica y bioquímica de los cultivos aislados del jugo de caña residual con *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* según Bergey's.

Pruebas bioquímicas	L. mesenteroides subsp mesenteroides según Bergey's	Cepas Experimentales			
	1	1 (LM01)	2 (LM01)	3 (LM01)	4 (LM01)
Morfología Celular	c	c	c	c	c
Coloración Gram	+	+	+	+	+
Coloración de cápsula	+	+	+	+	+

Agrupación	k	k	k	k	k
Formación de Dextrana	+	+	+	+	-
Hidrolisis al Almidón	d	D	D	d	-
Caldo Arabinosa 5%	+	-	-	+	-
Caldo Fructuosa 5%	+	+	+	+	-
Caldo Glucosa 5 %	+	+	+	+	+
Caldo Lactosa 5%	(d)	+	+	(d)	+
Caldo Maltosa 5 %	+	+	+	+	d
Caldo Manitol 5%	d	D	D	d	-
Caldo Sacarosa 5 %	+	+	+	+	-
Catalasa	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-
Crecimiento en Agar Nutritivo	-	-	-	-	-
Crecimiento en Agar Hipersaca-rosado	+	+	+	+	+
Crecimiento en Agar Mayeux	+	+	+	+	d
Crecimiento en Na Cl 3%	+	D	D	+	-
Crecimiento en Na Cl 6.5 %	d	-	-	d	-
Crecimiento en Na Cl 10 %	-	-	-	-	-
Coeficiente de Kappa		0,684	0,684	1,000	0,401
% de concordancia		71%	71%	100%	48%

+, 90% o más de cepas son positivas; -, 90% o más de cepas son negativas; d, 11 -89% de cepas son positivas; (d) retardado; D, no determinado.

La curva de producción de dextrano se realizó con las concentraciones de dextrano (g/L) producidos hasta las 75 horas de incubación. Esta producción estuvo relacionada directamente con el crecimiento celular de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*. La producción del dextrano se realizó bajo condiciones de fermentación en el caldo Mayeux (Figura 2).

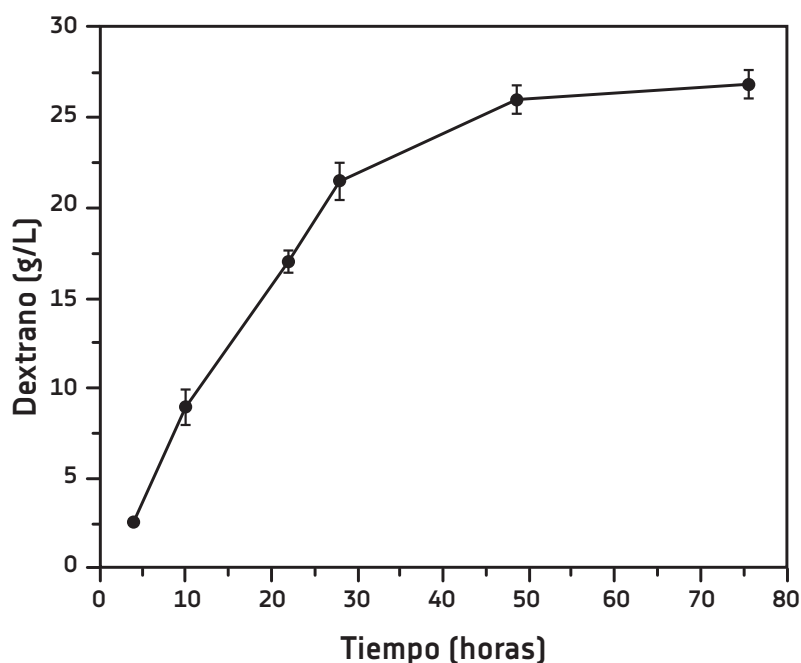


Figura 2. Producción de dextrano g/L sintetizado por *L. mesenteroides subsp mesenteroides* LM03 aislado de jugo de caña residual a diferentes tiempos de fermentación.

Para evaluar la calidad del dextrano obtenido, se tuvieron en cuenta los parámetros físicos los cuales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físicos, químicos de la goma dextrana producida por *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* LM03

PARÁMETROS	VALORES
Densidad (g/L)	1,041
Viscosidad (cp)	12.9
Elasticidad	40 mm
Solubilidad en agua	Regular
pH	6

En la figura 3A se presenta el espectro del dextrano donde las bandas de mayor intensidad y anchura se presentan de 1644.25 cm⁻¹ a 2923.99 cm⁻¹, las cuales son la principal característica de las gomas procedentes de microorganismos relacionados a la producción de dextrano. El grafico obtenido se comparó con un FT-IR de la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-640 (Figura 3B), con esto fue posible corroborar la producción de dextrano (en el proceso fermentativo) por parte de la cepa aislada.

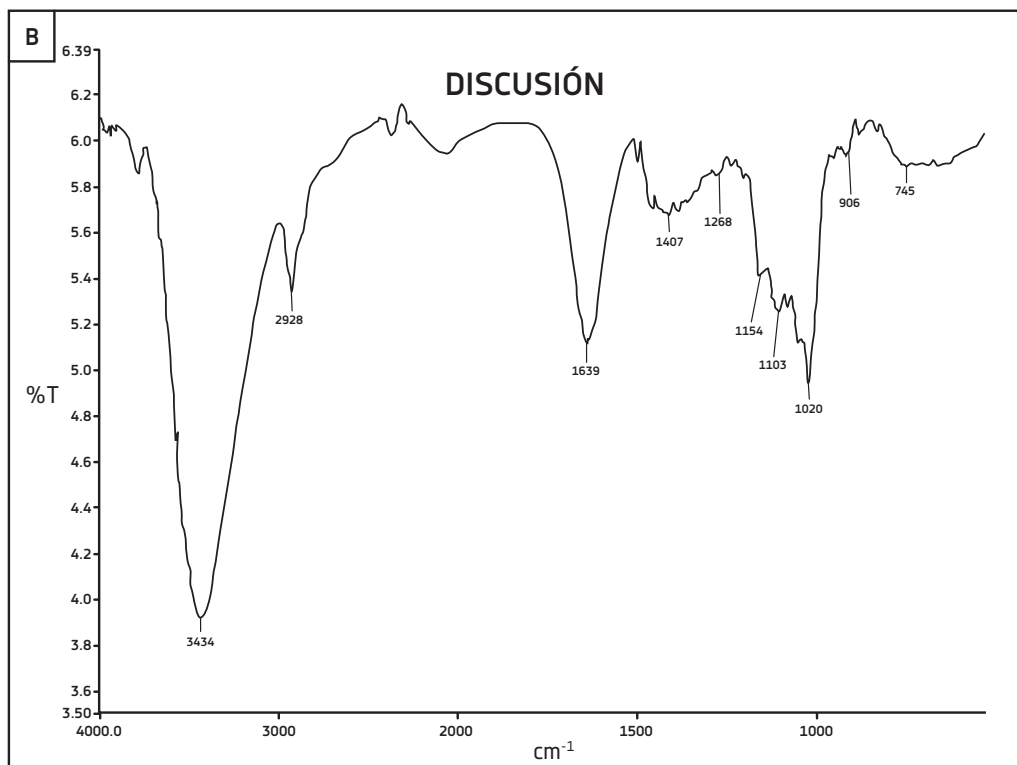
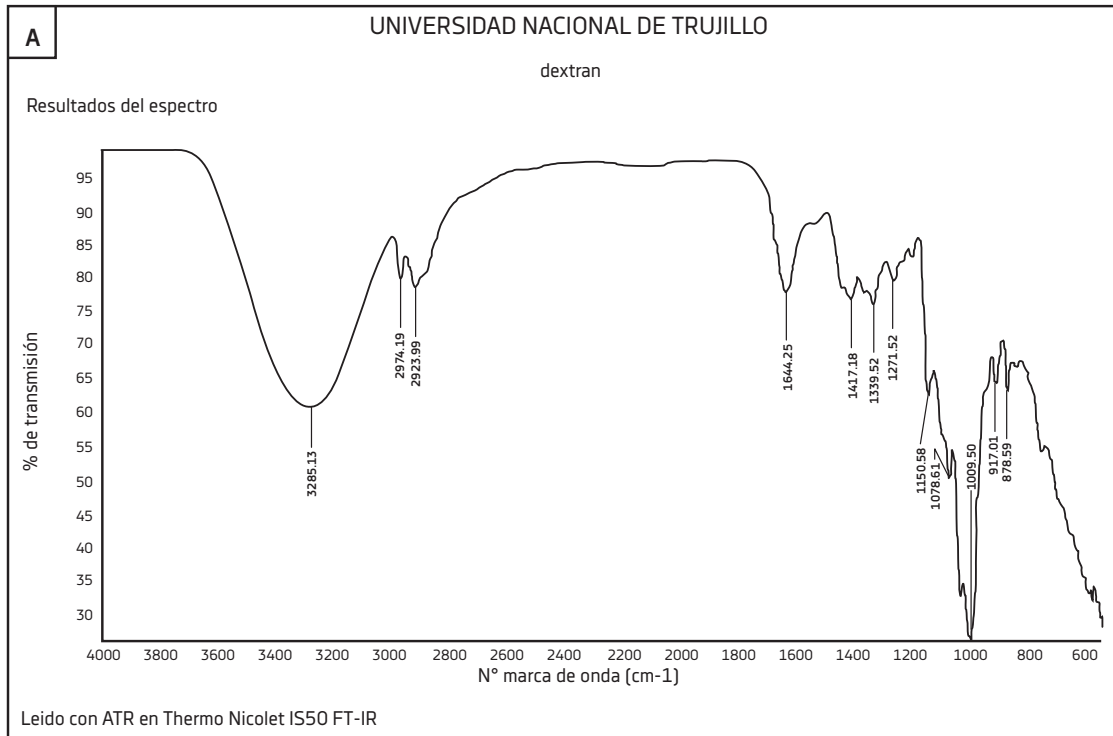


Figura 3. A) Espectro del dextrano obtenido a partir de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LMO3 utilizando FT-IR B) FT-IR (KBr) spectrum of dextran produced from the purified dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640.

DISCUSIÓN

En la figura 1, se puede observar que *L. mesenteroides subsp mesenteroides* es una bacteria gram positiva de forma cocoide ovoide y a menudo forman cadenas, con la capacidad de producir polisacáridos llamados dextranos. Estos tienen la apariencia de una goma; que se debe a que en el exterior de la célula microbiana (glicocálix), se forman redes entrecruzadas de cadenas de polímeros llamadas exopolisacáridos, los cuales se ponen en manifiesto por la producción de mucosidad en las colonias y viscosidad en medios líquidos. (Cuesta, 2016). Además, los exopolisacáridos permiten que hacen que la bacteria se una a superficies y protejan la célula de la fagocitosis, predación, desecación, acción de endotoxinas, actuando como reservas de carbono y energía (Vatansever, 2005). Así mismo, *z* es capaz de producir dextrano porque está presente en un medio que contiene sacarosa, en el que las células están creciendo y al mismo tiempo van secretando enzimas inducibles llamadas dextransucrasa, hidrolizando el exceso de sacarosa produciendo dextrano y liberando fructosa al medio. (Romero, 2014; Rodríguez y Hanssen, 2007). Por otro lado, esta bacteria al producir floculantes naturales ha recibido mucha atención científica y biotecnológica en los últimos años debido a su alta eficiencia, inocuidad y biodegradabilidad en comparación con los floculantes tradicionales. (Zhao et al., 2013); minimizando los costos en un proceso de remediación, ya que no necesita adicionar nutrientes al sistema, por no tener un metabolismo microbiano activo. Estas ventajas han hecho que la búsqueda de estos microorganismo crezca constantemente, conjuntamente con el estudio de sistemas biosorbentes, como emplear consorcios microbianos y macromoléculas (polímeros) adsorbentes, que podrían incrementar los rendimientos y selectividad de la captación de mezclas de contaminantes orgánicos e inorgánicos. (Takeda et al., 1992).

En la tabla 1, se puede observar que a partir del jugo de caña de azúcar se aislaron 4 presuntas cepas de *L. mesenteroides*, a las cuales se les realizó pruebas morfológicas y bioquímicas, que al ser comparadas con las claves que se encuentran en el Manual de Bergey's se pudo observar que la cepa LMO3 fue la que obtuvo

un porcentaje de similitud de secuencia del 100% con las características que *L. mesenteroides subsp mesenteroides* presenta, confirmando su adscripción con la misma, siendo corroborado por la prueba estadística de Coeficiente de Kappa que al medir la concordancia de las cepas se obtuvo una concordancia perfecta de 1.000, valor máximo que se puede encontrar en la tabla de concordancia de ésta prueba.

En la figura 2, se muestra un aumento proporcional de la producción de dextrano conforme avanza el tiempo de fermentación, hasta obtener 26.87 g/L en 80 horas de bioproceso; con lo antes mencionado, se sustenta que los diferentes tiempos de fermentación influyen en la producción de dextrano producida por *L. mesenteroides subsp mesenteroides* siendo la máxima producción se obtuvo a los 80 horas, mientras que la menor obtención de dextrano se obtuvo en a las 10 horas.; esto se explica, por la fisiología de *L. mesenteroides*, pues el comportamiento de ésta bacteria es diferente conforme avanza el tiempo de crecimiento celular, ya que no es lo mismo para la bacteria consumir y crecer en 10 horas que en 80 horas (Pinchi, 2017). Estos resultados concuerdan con lo dicho por Rodríguez y Hanssen (2007), quienes dicen que cuando la fermentación enzimática es más o menos 20%, se obtiene una concentración de dextrano de 20 g/L; lo cual se confirma en sus resultados, mostrando para cada sustrato concentraciones mayores a 20 g/L de sacarosa, lo cual es adecuado para que se realice el proceso de fermentación sin tener que adicionar nutrientes como sacarosa u otra fuente de carbono, convirtiendo los residuos en fuentes potenciales para desarrollar investigaciones dirigidas a su aprovechamiento, además el tiempo en el que se obtiene una concentración máxima de dextrano en el medio concuerda con el máximo valor de biomasa obtenido, revelándose que es un producto asociado parcialmente al crecimiento celular; sin embargo, Behravan et. al. (2003) cuando realizaron un estudio sobre la producción de dextrano a partir de fuentes económicas del país, como melazas de remolacha azucarera y extracto de salvado de trigo, lograron sólo una concentración de 9,44 g/L de dextrano.

En la tabla 2, se observa las características físico, químicas y organolépticas que tiene la goma dextrana producida por *L. mesenteroides subsp mesenteroides* LMO3 aislada en el laboratorio; para lo cual se tuvo que tener en cuenta los nutrientes, la humedad, el pH del medio de cultivo, la disponibilidad o no de oxígeno, la temperatura de incubación, etc. Es decir; se le proporcionó las condiciones físicas, químicas y nutricionales adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada; sin embargo, dentro de estas características la viscosidad es la que se puede ver mayormente afectada debido al tipo de estructura molecular y concentración de polímeros, por lo que la viscosidad aumentará y a la vez el peso molecular de dextrano, también la solubilidad del dextrano puede variar de acuerdo con el linaje que lo produjo, el grado de ramificación afecta la solubilidad del dextrano en agua, con un gran número de enlaces 1-6 que aumentan la solubilidad del polímero en el agua e indican una alta estabilidad en condiciones ácidas y alcalinas, mientras que un gran número de conexiones disminuye esta solubilización (Elinalva et al., 2012).

En la Figura 3A, se utilizó la espectroscopia de infrarrojo utilizando el FT-IR, para seguir cualitativamente la formación del biopolímero y realizar comparaciones con estándares de una base de datos de polímeros, en el que se observó que las bandas de mayor intensidad y anchura se presenta de 1644.25 cm^{-1} a 2923.99 cm^{-1} , característico en la mayor parte de las gomas procedentes de microorganismos (Vidal, 2014); pudiendo afirmar que las señales del espectro de FT-IR del exopolisacárido fueron siempre repetitivas, lo que nos confirma que el proceso de producción es confiable y que el microorganismo se mantuvo puro durante todas las fermentaciones realizadas, así como lo muestra la Figura 3B, que es un FT-IR de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640.

Este método analítico se utilizó para obtener los posibles grupos funcionales con los que cuenta la estructura y compararlos con otros exopolisacárido ya reportadas en literatura, ya que el espectro de IR permite obtener información estructural de los grupos funcionales que lo

componen, porque la teoría de la radiación de infrarrojo nos dice que frecuencias entre $10000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ es absorbida y convertida por una molécula orgánica en energía de vibración molecular en donde esta absorción es cuantizada; lo cual genera un espectro de bandas, por lo que la frecuencia o longitud de onda de absorción dependerá de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces y de la geometría del átomo. (Orozco, 1999). Así mismo, Shukla et al. (2011) a partir del análisis espectral FT-IR encontraron que *L. mesenteroides* NRRL B-1149 contiene dextrano con enlaces $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$ lineales y enlaces $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ ramificados; estos últimos enlaces han mostrado diversas aplicaciones, como actividades adyuvantes, antimicrobianas, antitumorales y protectoras contra radiación.

CONCLUSIONES

Se aisló e identificó bioquímicamente a la bacteria de *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*, la cual fue capaz de producir polisacáridos llamados dextranos que tienen la apariencia de una goma; que pueden ser utilizados como un biofloculante de interés industrial y biotecnológico.

Se produjo mayor producción de dextrano a las 80 horas obteniendo 26.87 g/L en donde el tiempo de fermentación influye en la producción de dextrano producidas por *L. mesenteroides subsp mesenteroides*, siendo un producto parcialmente asociado al crecimiento celular.

Se obtuvo los parámetros físicos químicos del biofloculante que lo identifican como dextrano, goma producida por *L. mesenteroides subsp mesenteroides* LMO3, observándose que la viscosidad es la característica más variable, encontrándose que a mayor viscosidad mayor peso molecular del dextrano.

Se determinó que el polímero es dextrano utilizándose la espectroscopía de infrarrojo, observándose que las

bandas de mayor intensidad y anchura se presentaron de 1644.25 cm⁻¹ a 2923.99 cm⁻¹, una característica que presentan la mayoría de las gomas procedentes de microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Barker, P. E. (1990). The productions of the enzyme dextranucrase using nonaerate fermentation techniques. *Biotechnol Bioeng*, 37, 703-707. DOI: 10.1002/bit.260370803.

Behravan, J., Sedigheh, B. & Zohreh, S. (2003). Optimization production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. *Biotechnol Appl. Bio-chem*, 38, 267-269.

Besrou-Aouam, N., Mohedano, M. L., Fhoula, I., Zarour, K., Najjari, A., Aznar, R., Prieto, A., Ouzari, H. I., & López, P. (2019). Different Modes of Regulation of the Expression of Dextranucrase in *Leuconostoc lactis* AV1n and *Lactobacillus sakei* MN1. *Frontiers in microbiology*, 10, 959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00959>

Caro, J. V. (2013). Efecto de la concentración de inóculo y tiempo de fermentación en la producción de dextranos por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* aislados de jugo de caña de azúcar. *Revista Científica Pakamuros*, 1(1), 11.

Capek, P., Hlavoňová, E., Matulová, M., Mislovicova, D., Růžička, J., Koutný, M. y Keprdová, L. (2011). Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydrate polymers*, 83(1), 88-93. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.07.024.

Cosa, S. (2010). Assessment of biofloculant production by some marine bacteria isolated from the bottom sediment of alga bay, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of science and agriculture, University of Fort Hare, Alice, South Africa.

Cuesta, F. (2016). Actividad biofloculante de *Pseudomonas luteola*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus amyloliquefaciens* en suspensiones de Caolín (Tesis de maestría). Universidad Católica de Manizales, Colombia.

Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2020). Functional Identification of the Dextranucrase Gene of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6596. <https://doi.org/10.3390/ijms21186596>

Elinalva, P. et. al. (2012). Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc mesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(2), 495-507. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652012000200018>

Feng, D. L. y Xu, S. H. (2008). Characterization of biofloculant MBF3-3 produced by an isolated *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1627-1632. DOI: 10.1007/s11274-008-9654-1.

Freitas, F., Alves, V. D., y Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.

DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.

Friedman, B. et al. (1969). Structure of exocellular polymers and their relationship to bacteria flocculation. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 98, 1328-1334.

Fuentes, A., Carreño, C. & Llanos, C. (2013). Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar". *Scientia Agropecuaria*, 4, 111 - 120.

- García B. (2007). Metodología de extracción in situ de coagulantes naturales para la clarificación de agua superficial. Aplicación en países en vías de desarrollo (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. Baltimor: William & Wilkins.
- Lopretti, M. (2002). Producción simultánea de dextrano y fructosa a partir de desechos agroindustriales en Iberoamérica. Aspectos científicos, técnicos y económicos. Cytel, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo: Buenos Aires.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Mora, Z. (1995). Estudio de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña en relación con el proceso de elaboración de azúcar (Tesis de pregrado). Universidad del Valle, Colombia.
- Mulet, R. C., Ledesma, J. A. y Vanegas, J. A. (2010). Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(2), 31-40.
- Orozco, C. (1999). Análisis de algunas características físicas y químicas de un biopolímero producido por *Klebsiella pneumoniae* en un proceso de fermentación simple (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Okaiyeto, K., Nwodo, U., Okoli, S., Mabinya, L. & Okoh, A. (2016). Implications for public health demands alternatives to inorganic and synthetic flocculants: bioflocculants as important candidates. *MicrobiologyOpen*, 5(2), 177-211. doi:10.1002/mbo3.334
- Pan Y., Shi B. y Zhang Y. (2009). Research on Flocculation Property of Bioflocculant PG. a21 Ca. *Modern applied Science*, 3(6), 106-112. DOI: 10.5539/mas.v3n6p106
- Pinchi, M. (2017). Influencia del tiempo de fermentación en la producción de dextranos por *Leuconostoc mesenteroides* en biorreactores tanque aireado y agita. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Rodríguez, O. y Hanssen, H. (2007). Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Revista EIA*, (7): 159-172.
- Romero, M. (2014). Efecto de la temperatura y la concentración de carbohidratos sobre la producción de exopolisacáridos por *Leuconostoc* spp. (Tesis de acreditación). Universidad Veracruzana, México.
- Salehizadeh, H y Yana, N. (2014). Recent advances in extracellular biopolymer flocculants. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1506-1522. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.004.
- Sarwat, F., Ul Qader, S. A., Aman, A., & Ahmed, N. (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International journal of biological sciences*, 4(6), 379-386 <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.379>.
- Suryani, L., Artika, I. & Susanti, H. (2011). Characterization of bioflocculant producing-bacteria isolated from tapioca waste water, HAYATI. *Journal of Biosciences*, 18 (4), 193-196, DOI: 10.4308/hjb.18.4.193
- Shukla, R., Shukla, S., Bivolarski, V., Iliev, I., Ivanova, I. y Goyal, A. (2011). Structural Characterization of Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the Presence of Maltose. *Food Technol. Biotechnol*, 49(3), 291-296. DOI: 10.13140/2.1.2567.7442.

Takeda, M., Koizumi, J., Matsuoka, H. y Hikuma, M. (1992). Factors affecting the activity of a Protein Bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 74 (6), 408-409. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90043-T](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90043-T).

Vatansever A. (2005). Bioflocculation of activated sludge in relation to Calcium ion concentration. Department of environmental engineering, Middle East Technical University.

Vidal, M. (2014). Produção e caracterização de um polissacarídeo bacteriano com vistas a seu potencial biotecnológico [Tesis de Maestría]. Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Zhao, H., Liu, H. y Zhao, J. (2013). Characterization of abioflocculant MBF-5 by *Klebsiella pneumoniae* and its application in *Acanthamoeba* cysts removal. *Bioresource Technology*, 137, 226-232. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.079.

Wang, L., Ma, F., Qu, Y., Sun, D., Li, A., Guo, J. y Yu, B. (2011). Characterization of a compound bioflocculant produced by mixed culture of *Rhizobium radiobacter* F2 and *Bacillus sphaericus* F6. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2559-2565. DOI: 10.1007/s11274-011-0726-2.

Wu, J. Y. y Ye, H. F. (2007). Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process Biochemistry*, 42(7), 1114-1123. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.05.006.