

# PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO RICO EN L-FUCOSA POR *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* USANDO UN PROCESO FED-BATCH.

M. L. Ramirez-Castillo, G. Goma and J. L. Uribebarrea.

Institut National des Sciences Appliquées, Centre de Bioingénierie Gilbert Durand  
UMR-CNRS 5504 UR-INRA 792, Complexe Scientifique de Rangueil, 31077 Toulouse, FRANCE.

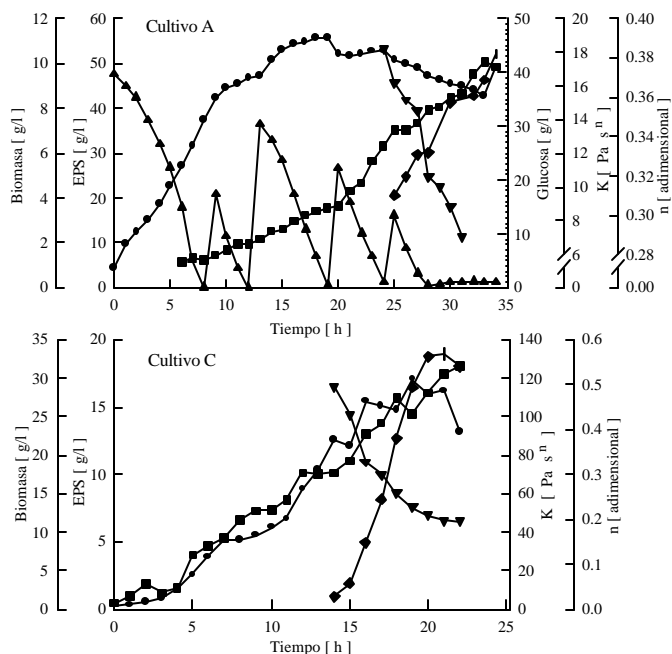
Tel. (33) 05 61 55 94 44, Fax: (33) 05 61 55 94 00, E-mail: lramirez@insa-tlse.fr

Palabras clave: *exopolisacárido*, *Klebsiella pneumoniae*, *fed-batch*

**Introducción.** Varios exopolisacáridos de origen microbiano son productos de la biotecnología ampliamente aceptados, que han encontrado aplicaciones comerciales por sus propiedades como emulsificantes, estabilizadores, agentes espesantes etc. El exopolisacárido (EPS) producido por *K.pneumoniae* sp *pneumoniae* presenta aplicaciones potenciales debido a sus propiedades pseudoplásticas y a su contenido de L-fucosa, carbohidrato inmunodominante en varios complejos antígeno-carbohidrato. El objetivo de este trabajo fue proponer una estrategia fed batch de producción de EPS de *K. pneumoniae* adaptada a la dinámica de reacción y a la transferencia de masa, con el fin de mejorar la producción del EPS.

**Metodología.** La bacteria fue cultivada en un reactor de 20 l equipado para medir y controlar los diferentes parámetros de fermentación, con adquisición de datos en línea y analizador de gas de salida. Se estudiaron diferentes condiciones de cultivo fed-batch. Cultivo A: alimentación de pulsos de glucosa únicamente; Cultivo B (resultados no mostrados): pulsos de glucosa y el nitrógeno fue alimentado exponencialmente con  $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$ ; Cultivo C: adición de glucosa limitada y constante y de nitrógeno exponencial con  $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$ . La biomasa y el EPS fueron determinados por gravimetría, y los metabolitos producidos mediante HPLC y CPG. Las propiedades reológicas fueron determinadas con un reómetro de cilindros concéntricos y control de la velocidad de corte a 25 °C; con los datos obtenidos se calculó K (índice de consistencia) y n (índice de flujo) usando el modelo de la "ley de la potencia",  $\tau=K \dot{\gamma}^n$ .

**Resultados y Discusión.** En todos los cultivos se observaron dos fases: 1) fase de no limitación de nutrientes en donde se lleva a cabo la formación de biomasa principalmente, aquí se requirió de alta aereación y agitación y también de C/N alta para favorecer la propagación de las células; 2) fase de limitación de nitrógeno en la cual se favoreció la producción del EPS. Comportamientos similares fueron obtenidos para otros exopolisacáridos bacterianos (De Vuyst y col., 1987; Farres y col., 1997). A y B presentaron comportamientos similares, en ellos se produjeron cantidades bajas de biomasa y altas de polímero y metabolitos secundarios, lo contrario al cultivo C en el cual se obtuvo al final 23.45 g/l de biomasa, 18 g/l de EPS y escasa producción de metabolitos (Figura 1). Los cultivos crecen exponencialmente con un valor de  $\mu_{\max}=0.5, 0.49$  y  $0.48 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, estos valores son similares a los encontrados por Farres et al. (1997) para la producción del EPS rico en ramnosa de *Klebsiella* I-714. Aunque el rendimiento y productividad del EPS fueron bajos en el cultivo C comparado con los otros cultivos,  $Y_{\text{EPS/S}}=0.23$  y  $R_{\text{EPS}}=0.82 \text{ g/lh}$ , este fue considerablemente más viscoso y pseudoplástico con un valor de n bajo, al final la agitación se dificultó presentándose limitación de  $\text{O}_2$ . Es posible que la alta producción de metabolitos en A y B haya afectado la estructura del EPS ya que en el cultivo C no



**Figura 1** Resultados cinéticos de los cultivos. Biomasa (●), glucosa residual (●), EPS (●), índice de consistencia K (●) e índice de flujo n (●).

hubo formación importante de metabolitos y la mayor parte del carbono fue convertido a biomasa, EPS y  $\text{CO}_2$ . La alta cantidad y variedad de metabolitos producidos en exceso de sustrato y en limitación de nutrientes ha sido reportada por Neijessel y Tempest (1975) en *K.aerogenes*, es conocido como metabolismo «overflow».

**Conclusiones.** Los resultados muestran que el proceso batch convencional usado para la producción de EPS puede ser reemplazado por un proceso fed-batch conducido adecuadamente. La estrategia de doble limitación de glucosa y nitrógeno para la producción de EPS resulta adecuada ya que se logra obtener un EPS de buena calidad. La calidad y cantidad del EPS depende no solo de la limitación de nutrientes sino también de la velocidad específica de consumo del sustrato y del metabolismo energético de la bacteria.

**Agradecimiento.** CONAC yT, beca extranjero M.L Ramirez-Castillo.

**Bibliografía.** 1. De Vuyst L., Van Loo J. Vandamme E.J. (1987) Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *J. Chem Tech. Biotechnol.* **39**: 263-273.  
2. Farres J., Carminal G., López-Santin J. (1997) Influence of phosphate on rhamnase-containing exopoly saccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:522-527.  
3. Neijssel G.M., Tempest D.W. (1975) The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* **106**: 251-258.