




**Centro de Investigación  
de Polímeros Avanzados**

**Informe Técnico Proyecto Corfo 21SN-182439:** “Caracterización física, química y biológica de Expolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana”

**Mandante:**

Dra. Lorena Barra,  
Directora proyecto Súmate Innovar Reactívale.

**Concepción-Chile, 30 de mayo de 2022.**

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>2 de 32</b>

El presente informe técnico, reporta los resultados del servicio de Asistencia técnica: Purificación y caracterización preliminar de Exopolisacaridos de un proceso de fermentación bacteriana, a través de su caracterización física, química y biológica, solicitado por la Dra. Lorena Barra.

## 1. OBJETIVOS GENERAL

Extracción y Purificación de exopolisacáridos, obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana.

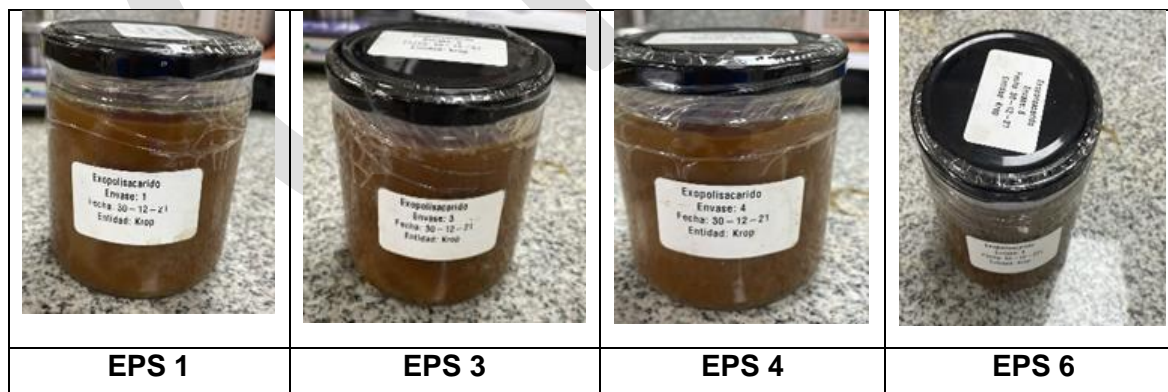
### 1.1 Objetivos específicos

#### Caracterización del Exopolisacáridos purificado:


- Análisis preliminar Ph, Humedad, Viscosidad, Temperatura
- Determinación del contenido de proteína y azúcares totales
- Análisis termogravimétrico TGA
- Análisis térmico a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
- Análisis de Espectroscopia Infrarroja (FT-IR)
- Determinación del Peso molecular de Exopolisacáridos EPS.
- Comportamiento Reológico DMA
- Análisis Morfología a través de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)
- Confección de Film por método casting.

## 2 RECEPCION DE MUESTRAS

Se recibió en el laboratorio del Centro de Investigación de Polímeros Avanzados CIPA, 4 frascos de 500 ml cada uno, muestras semi sólidas que contienen el consorcio de microorganismos provenientes de una fermentación bacteriana.



**Figura 1:** Recepción de muestras en laboratorios CIPA: Fecha de recepción 7 de enero 2022.

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>3 de 32</b>

## 2.1 RECEPCION DE MUESTRAS

Para el análisis de extracción y purificación de Exopolisacáridos (EPS), se trabajó con 3 frascos de acuerdo a lo presentado en tabla 2, incluyendo estas muestras para la determinación de azúcares y proteínas totales.




## 2.1 ANALISIS PRELIMINAR RECEPCION DE MUESTRAS

Para la realización de los análisis se utilizaron las muestras EPS 1 y EPS 3, dejando como contramuestra la EPS 4.





A continuación, se presenta la tabla resumen de la caracterización original del consorcio de microorganismos para las muestras 1 y 3.


Tabla 1: Análisis preliminar de muestras originales.

Muestra	Variables analizadas			Observaciones
	Peso húmedo (g)	pH	Temperatura (°C)	
<i>EPS1</i>	235,94	3,23	3,85	Muestras con características de textura, color y resistencia mecánica similares.
<i>EPS3</i>	388,26	3,26	3,74	

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>4 de 32</b>

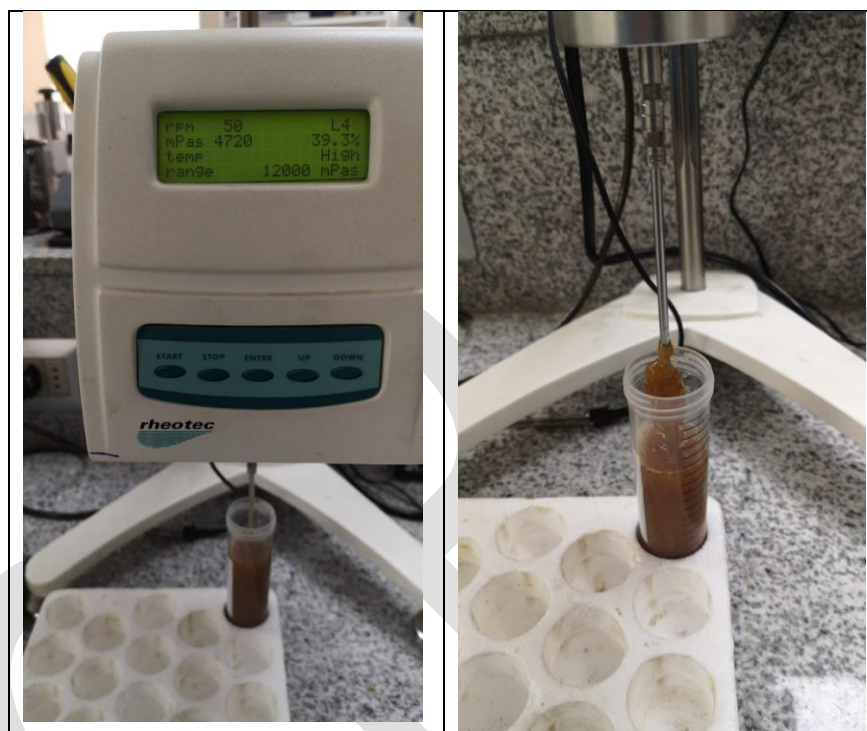
A continuación, se presenta imágenes referenciales del procesamiento preliminar y determinación de pH de la muestra original antes (abajo a la izquierda) y después de triturar con NaOH.

	
<b>Imagen 1:</b> Muestra original sin triturar	<b>Imagen 2:</b> Ph 3.2 de muestra original sin triturar
	
<b>Imagen 3:</b> Muestra triturada con NaOH	<b>Imagen 4:</b> Ph 13.06 de muestra triturada con NaOH

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>5 de 32</b>

### Medición de viscosidad


La medición de la viscosidad rotacional del consorcio bacteriano se midió en un viscosímetro marca Rheotec a una temperatura de 25°C, con los husillos L4. La muestra fue triturado durante 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea de partículas uniformes.



**Figura 1.** Procedimiento de medición de viscosidad en muestra original.

Muestra	Viscosidad 25°C, 50 rpm, L4 (mPas)	Torque 25°C, 50 rpm, L4 (%)
<b>EPS 6</b>	4720	39,3

Conversión de unidades: 1mPas = 1 centipoise = 1cp.


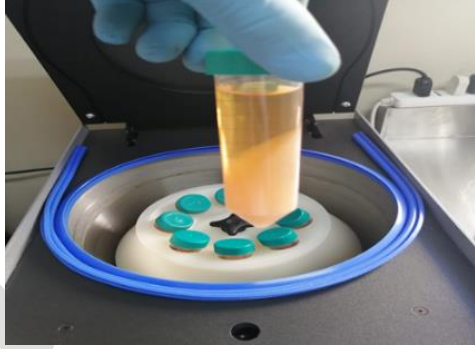


	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>6 de 32</b>


### 3 PROCEDIMIENTO

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1.1 Extracción de EPS

La extracción de los EPS presentes en las muestras se realizó mediante un procedimiento similar al descrito por Bales *et al.* (2013). Brevemente, para la extracción de EPS, el total del contenido en las muestras EPS1 y EPS3 (624,20 g, peso húmedo) fue triturado durante 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea de partículas uniformes, luego resuspendido en NaOH 1M a una proporción de 1:1,5 (p/v) e incubado durante 3 horas en un agitador orbital a 100 rpm y temperatura ambiente ( $22 \pm 1$  °C). Luego de esto, los sólidos presentes en la suspensión fueron removidos mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos, lavados de la misma forma en dos oportunidades con agua milli-Q esteril, traspasando el total de los sobrenadantes a un nuevo envase. Finalmente, fueron filtrados a través de papel filtro grado 292a (5-8  $\mu$ m de poro; Munktell) estériles y almacenado a 4°C hasta su posterior proceso de purificación.





	
<b>Imagen 5:</b> muestra con NaOH incubado por 3 hrs en agitador orbital	<b>Imagen 6:</b> Centrifugación por 5 minutos a 6000rpm
	
<b>Imagen 7:</b> Centrifugación por 5 minutos a 6000rpm	<b>Imagen 8:</b> Filtración en papel filtro grado 292 <sup>a</sup> (5-8 $\mu$ m de poro)


	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>7 de 32</b>

### 3.1.2 Purificación de EPS

La purificación preliminar de los EPS extraídos desde las muestras N°1 y N°3, se realizó mediante un procedimiento similar al descrito por Bales *et al.* (2013) para la eliminación de proteínas y lípidos presentes en suspensión. La purificación final de los EPS se realizó mediante precipitación con etanol según la metodología propuesta por Ziadi *et al.* (2018). Brevemente, la separación del EPS de las proteínas y ácidos nucleicos presentes en la suspensión, estos últimos fueron sometidos a un proceso de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) a una proporción final de 5 % (p/v) a temperatura ambiente ( $22 \pm 1$  °C) en agitación constante a 450 rpm, utilizando un en agitador magnético RT Touch 4L (Thermo Scientific) durante 1 hora y posteriormente incubado a 4°C durante 30 minutos adicionales para promover la precipitación. Luego de esto, los sólidos presentes en la suspensión fueron removidos mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos, traspasando el total de los sobrenadantes a un nuevo envase para luego ser filtrado a través de filtros de membrana ester-celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de poro, estériles.




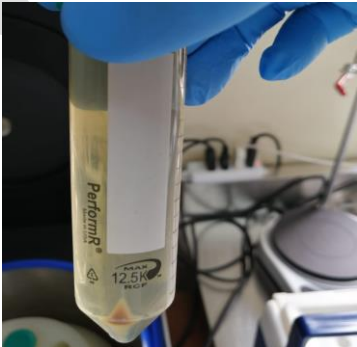
Imágenes del procesamiento de precipitación de proteínas y ácidos nucleicos con TCA.

	
<b>Imagen 9:</b> pH 13.26 filtrado	<b>Imagen 10:</b> pH 3.86 luego de aplicar TCA
	
<b>Imagen 11:</b> Solución después de aplicar TCA	<b>Imagen 12:</b> Precipitado obtenido mediante centrifugación


	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>8 de 32</b>

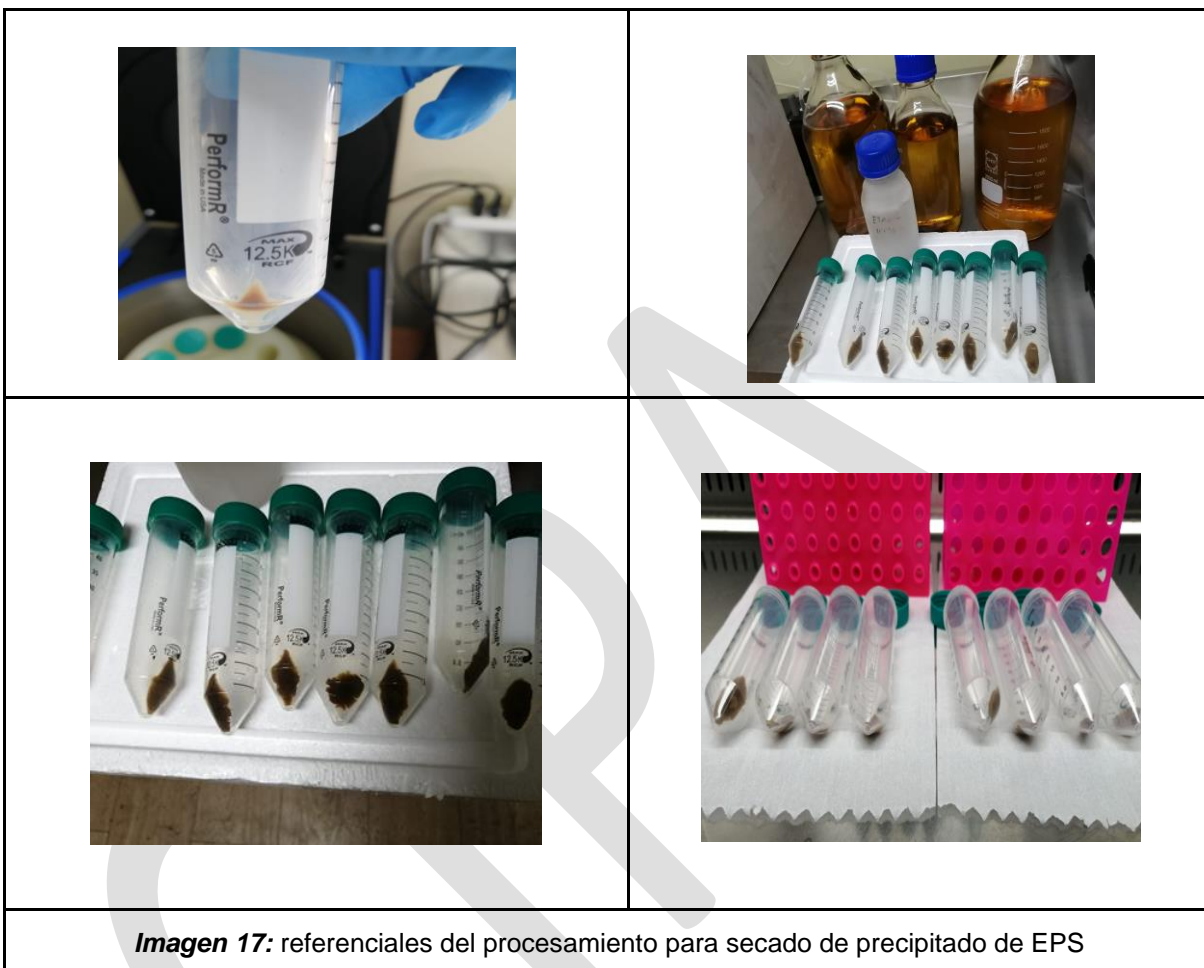
Para la purificación final de los EPS, el sobrenadante fue tratado con NaCl a una concentración final de 1M a temperatura ambiente ( $22 \pm 1$  °C) bajo agitación constante en agitador magnético a 450 rpm durante 30 minutos. Luego de esto los EPS fueron precipitados mediante la adición de 1,5 volúmenes etanol al 96% frío (-20°C) e incubados durante 24 horas a -20°C. De esta forma, los EPS fueron obtenidos mediante centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos, almacenando los sobrenadantes a -20°C, y lavando los precipitados (EPS) de la misma forma en dos oportunidades con etanol absoluto, traspasando el total de los sobrenadantes a un nuevo envase, para finalmente dejar secar a temperatura ambiente bajo gabinete de bioseguridad y ser posteriormente almacenados a 4°C hasta su entrega.


Imágenes del procesamiento de precipitación final de EPS mediante etanol

	
<b>Imagen 13:</b> Suspensión luego del etanol	<b>Imagen 14:</b> Almacenamiento a -20°C
	
<b>Imagen 15:</b> Proceso de precipitación	<b>Imagen 16:</b> Precipitado de EPS purificado obtenido mediante centrifugación

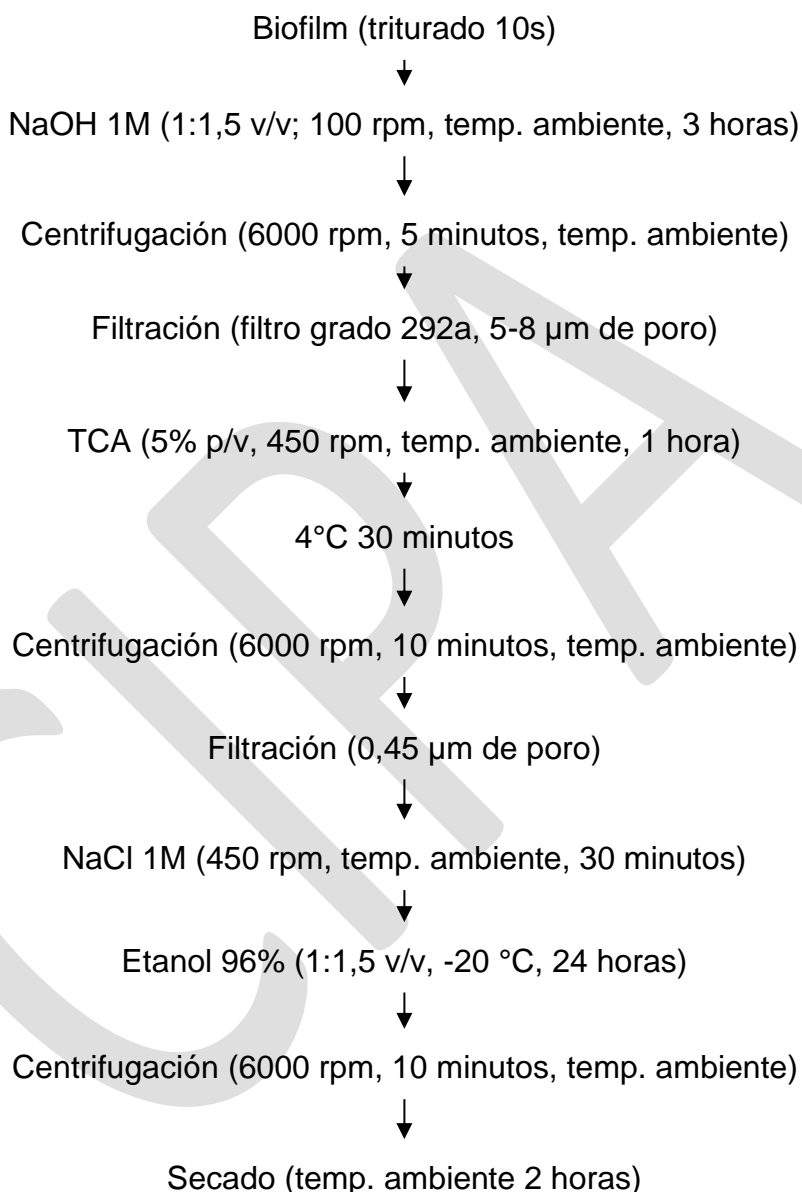


	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: “Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana”	Página: <b>9 de 32</b>




	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>10 de 32</b>

A continuación se presenta el resumen del proceso de extracción y purificación de EPS:



**Figura 2:** Esquema general del procedimiento implementado para la extracción y purificación de EPS.


	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>11 de 32</b>

### 3.1.3 Determinación de azúcares totales

El contenido total de carbohidratos de los exopolisacáridos obtenidos mediante precipitación con etanol se estimó mediante el método calorimétrico de fenol-ácido sulfúrico, según el procedimiento descrito por Dubois *et al.* (1956). Para esto el EPS fue resuspendido en agua milli-Q estéril a una concentración final de 10 mg mL<sup>-1</sup>, del cual 300 µL fueron tratados con 200 µL de una solución de fenol al 25% y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente (22 ± 1 °C) durante 30 min y la concentración de azúcares totales se determinó midiendo su absorbancia a 492 nm, utilizando agua milli-Q como blanco y una solución de glucosa como estándar para la curva de calibración (0.625 a 20 µg mL<sup>-1</sup> de glucosa; Sigma Aldrich Inc.) en un espectrofotómetro con lector de placas multipocillos (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA).

### 3.1.4 Determinación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales presentes en los exopolisacáridos obtenidos mediante precipitación con etanol se estimó mediante el método descrito por Bradford (1976). Para esto el EPS fue resuspendido en agua milli-Q estéril a una concentración final de 10 mg mL<sup>-1</sup>, del cual 200 µL fueron tratados con 800 µL de un reactivo Bradford (Sigma-Aldrich Inc.) y se incubó minutos a temperatura ambiente (22 ± 1 °C) durante 5 minutos. De este modo, la concentración de proteínas se determinó midiendo su absorbancia a 595 nm, utilizando agua milli-Q como blanco y una solución de albúmina de suero bovino (BSA: 0 a 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich Inc.) en un espectrofotómetro con lector de placas multipocillos (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA).

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>12 de 32</b>

## 4. RESULTADOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACION DE EPS Y DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES.

### 4.1 Extracción de exopolisacáridos

Los resultados obtenidos durante el procesamiento de las muestras "EPS1 y SPS3" (Tabla 2) para la extracción de exopolisacáridos, utilizando la metodología aplicada, demuestran que fue posible obtener un total aproximado de 294,42 g (peso húmedo) de moléculas solubles en suspensión, incluidos EPS y otras moléculas solubles como proteínas y ácidos nucleicos (EPS-crudo), lo cual corresponde alrededor del 47,16% del peso húmedo total de ambas muestras (624,20 g).

### 4.2 Purificación de exopolisacáridos

Los resultados obtenidos durante el procesamiento del extracto EPS-crudo para su purificación preliminar mediante la precipitación de proteínas y ácidos nucleicos presentes en la suspensión, demuestran que fue posible separar un total de 1,99 g (peso húmedo) de moléculas solubles, presentes en la suspensión, susceptibles de ser precipitadas mediante la adición de TCA, según la metodología utilizada, lo cual corresponde alrededor del 0,67% de la masa total del EPS-crudo. De este modo se obtuvo un total aproximado de 292,43 g (peso húmedo) de EPS pre-purificado, lo cual corresponde alrededor del 47,30% del peso húmedo total de ambas muestras (624,20 g). Por último, los resultados obtenidos del proceso final de purificación mediante precipitación de EPS con etanol, demuestran que fue posible obtener un total aproximado de 0,5919 g de EPS purificado (peso seco).


Tabla 2: Resultados de análisis para la determinación de azúcares y proteínas totales en EPS purificado.

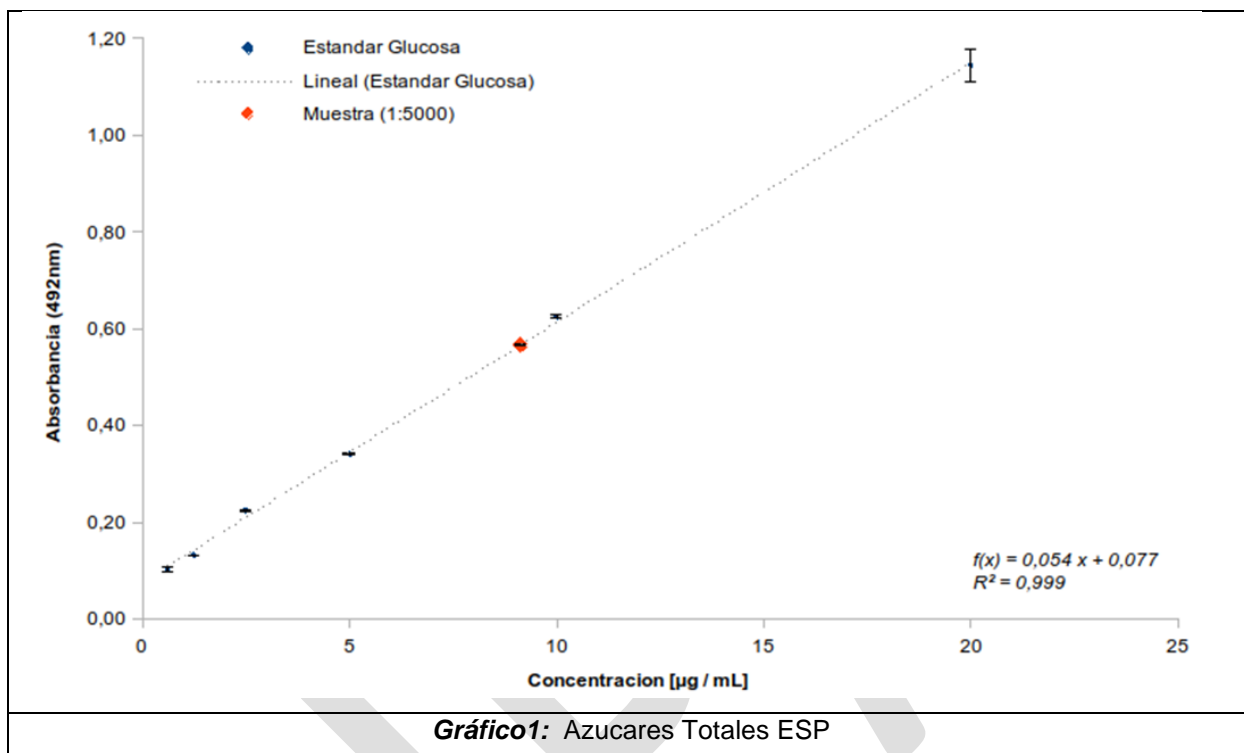
Muestra	Variables analizadas				
	EPS purificado (mg)	Azúcares totales* (mg/mL)	Proteínas totales* (µg/mL)	Proporción de azúcares en EPS (%)	Proporción de proteínas en EPS (%)
<b>ESP1 + ESP3</b>	591,9	4,57 ± 0,011	0,22 ± 0,006	45,6 ± 0,11	0,21 ± 0,01

\* Concentraciones determinadas en según curvas de calibración (Gráficos 1 y 2) a partir de una suspensión de EPS purificado de 10 mg/L diluido 1:500.

### 4.3 Determinación de azúcares totales en EPS


El contenido total de azúcares presentes en el EPS purificado, demuestra que la suspensión de EPS analizada (10 mg/mL) muestra una concentración aproximada de azúcares totales correspondiente a 4,56 mg/mL, lo cual representa un 45,6% del total de la biomasa de exopolisacárido purificado, obtenido mediante la metodología utilizada.

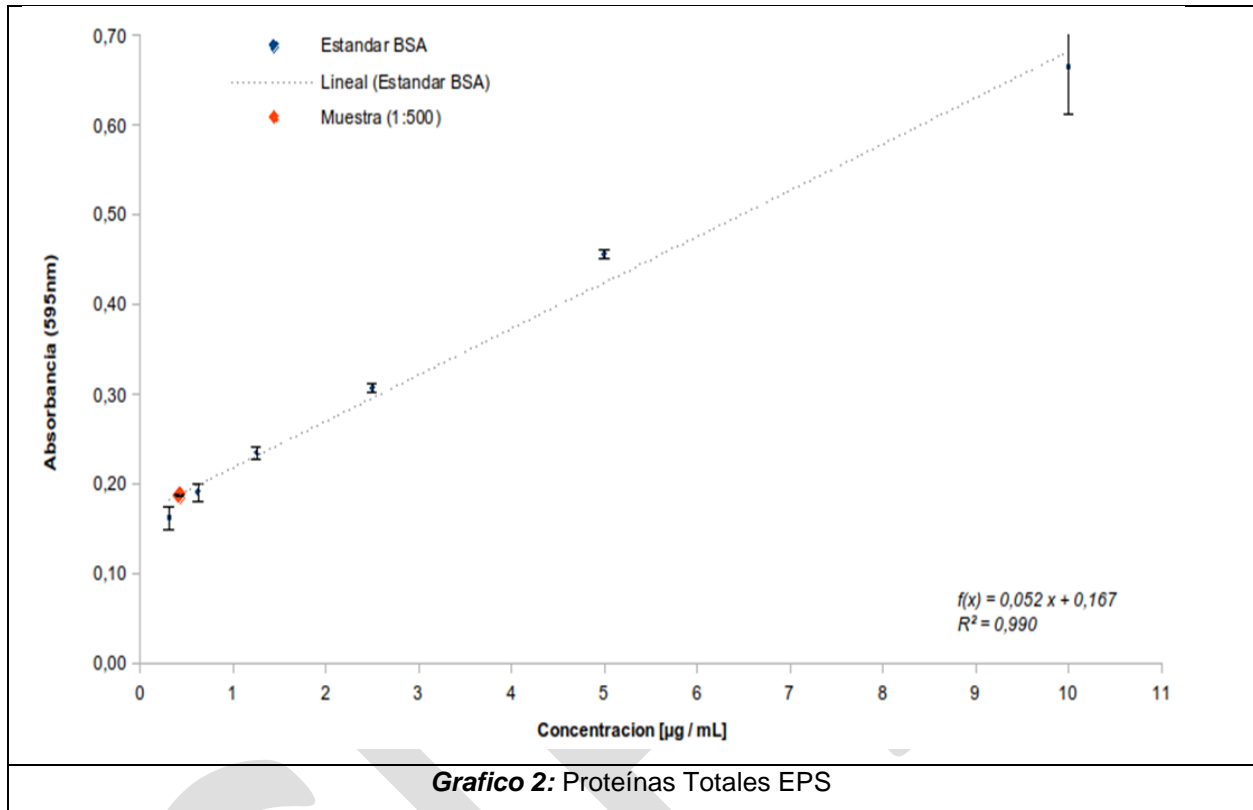
	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>13 de 32</b>




#### 4.4 Determinación de proteínas totales en EPS

El contenido total de proteínas presentes en el EPS purificado, demuestra que la suspensión de EPS analizada (10 mg/mL) muestra una concentración aproximada de proteínas totales correspondiente a 0,23 µg/mL, lo cual representa un 0,21% del total de la biomasa de exopolisacárido purificado, obtenido mediante la metodología utilizada.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>14 de 32</b>



	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>15 de 32</b>

## 5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA-TERMICA

### 5.1 Espectrografía Infrarroja FT-IR

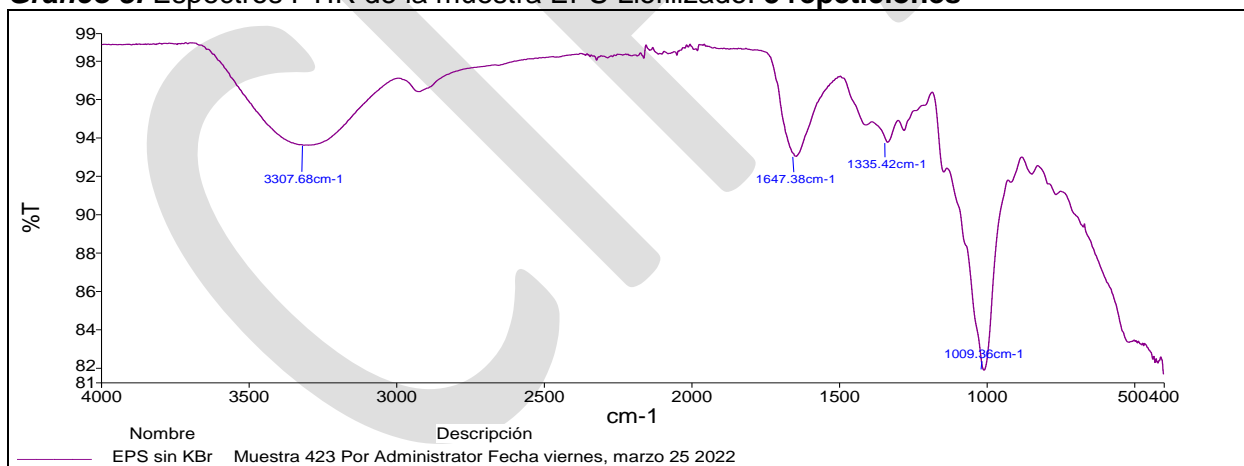
La caracterización se realizó utilizando un espectrofotómetro Infrarrojo (del Inglés: Fourier Transform Infrared spectroscopy FT- IR), Perkin Elmer Modelo Spectrum Two con accesorios dedicados al estudio de polímeros, con sistema ATR (Reflectancia Total Atenuada).


El ensayo FT-IR se realizó en el rango entre 450 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y una incidencia del láser de 10 repeticiones.

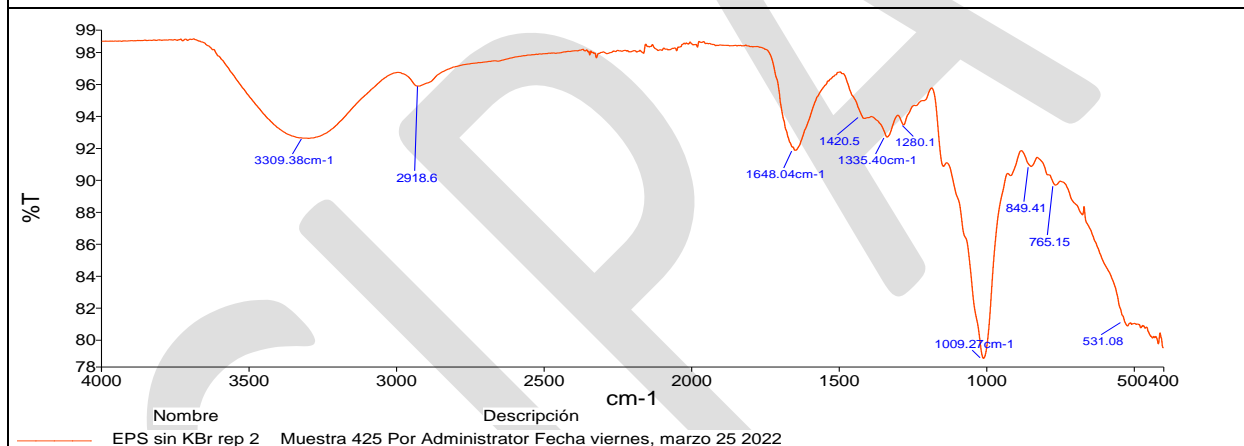
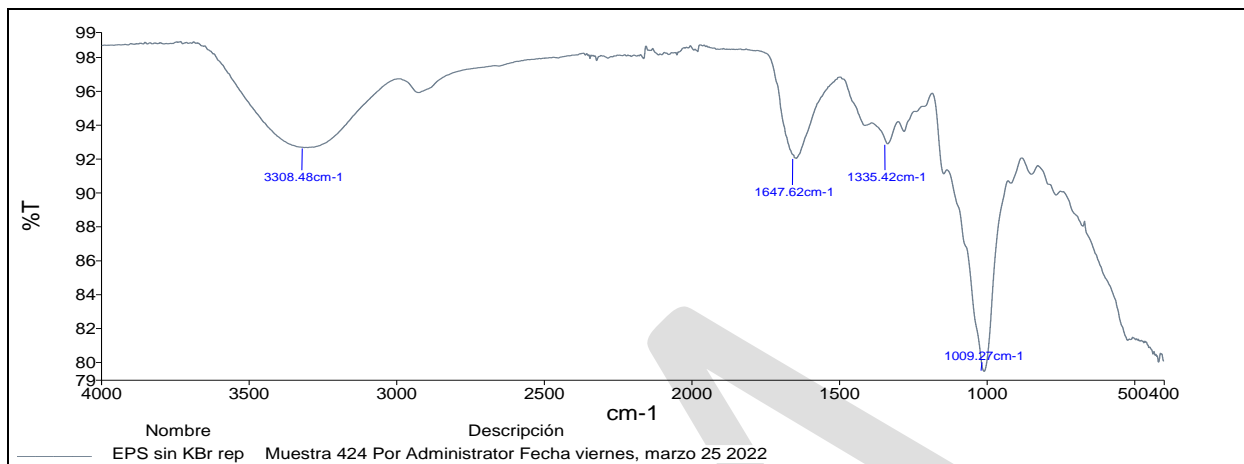


**Imagen 17:** Espectrofotómetro FTIR-ATR Perkin Elmer Spectrum Two.

**Gráfico 3:** Espectros FTIR de la muestra EPS Liofilizado: **3 repeticiones**




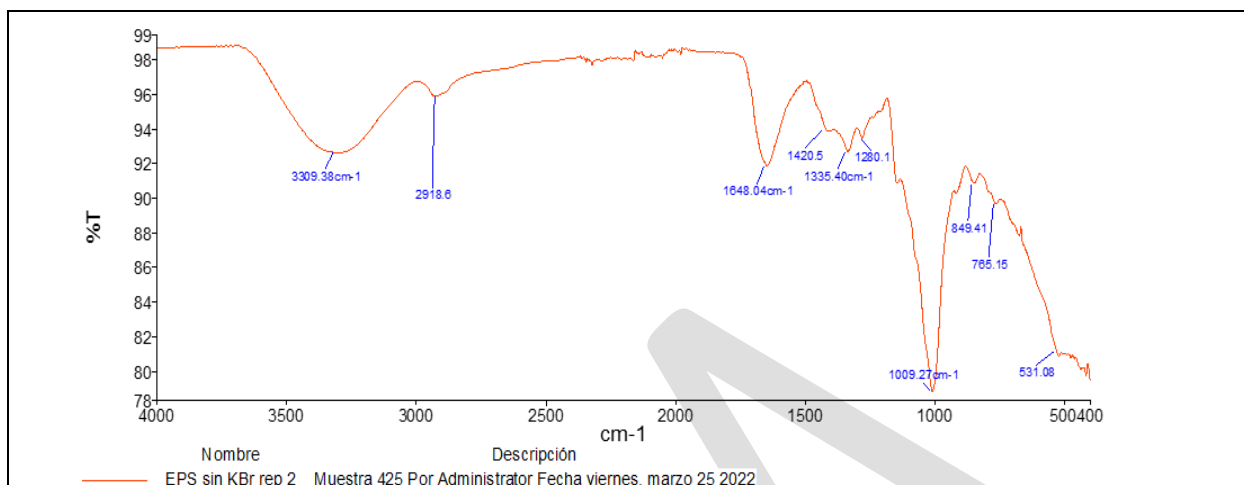
	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>16 de 32</b>



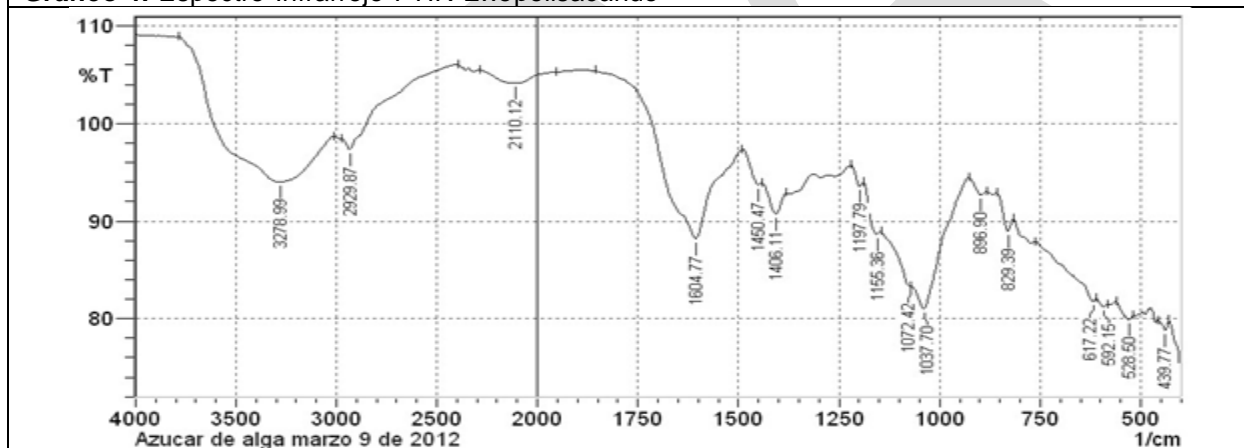
A continuación se presenta la comparación de espectros con una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc sp*, que presentan muy similares peak de espectros FTIR.



	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: “Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana”	Página: <b>17 de 32</b>




**Gráfico 4:** Espectro Infrarrojo FTIR Exopolisacárido




**Gráfico 5:** Espectro Infrarrojo FTIR Exopolisacárido *Nostoc sp.* (Herrera Pérez, (2012).)

El gráfico 4 se muestra un amplio estiramiento donde se observa alrededor de la región de  $3309.39 \text{ cm}^{-1}$  característica de alcoholes primarios y secundarios asociado con la presencia de etanol remanente de la precipitación del polisacárido en la muestra y con la vibración que generan los grupos hidroxilos presentes en los azúcares, de acuerdo con lo estudiado por (Herrera Pérez, (2012).). El pico de absorción a  $2918.6 \text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración asimétrica de estiramiento C-H del grupo metilo. (Herrera Pérez, (2012).). El pico de absorción alrededor de  $1648.04 \text{ cm}^{-1}$  indica la absorción IR característica de los exopolisacáridos (Bremer, (1991).) y corresponde a la vibración de estiramiento de  $\text{C}=\text{O}$  (Singh, (2011).). El sector de mayor relevancia en el espectrograma es la zona comprendida entre los  $1200 \text{ cm}^{-1}$  y  $950 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la huella digital del exopolisacárido (GD Manrique, 2002).

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>18 de 32</b>

**En la tabla 4:** Se observa Asignación de las bandas obtenidas en FTIR (Herrera Pérez, (2012).

<b>Banda cm<sup>-1</sup></b>	<b>Grupo funcional/modo Vibración</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Identificación de grupos funcionales</b>
3400-3200	O-H estiramiento	amplio, grande	alcoholes (etanol, azúcares)
3380-3280	NH <sub>2</sub> estiramiento		proteínas
3000-2800	C-H estiramiento sim. y asim.	definido	lípidos, azúcares, proteínas
1740-1720	C=O estiramiento	definido	aldehídos, cetonas, ácidos
1630-1600	COO- estiramiento asimétrico	fuerte	ácidos, ésteres
1400	COO- estiramiento simétrico	débil	ácidos, ésteres
1300-1000	C=O estiramiento	débil	aldehídos, cetonas, ácidos
1200-900	C-O-C estiramiento, doblamiento C-C-C	fuerte	huella digital de carbohidratos
830-500	C-C-O, C-O-C sim., asim.	débil	carbohidratos

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>19 de 32</b>


## 5.2 Análisis Termogravimétrico o Termogravimetría (TGA)

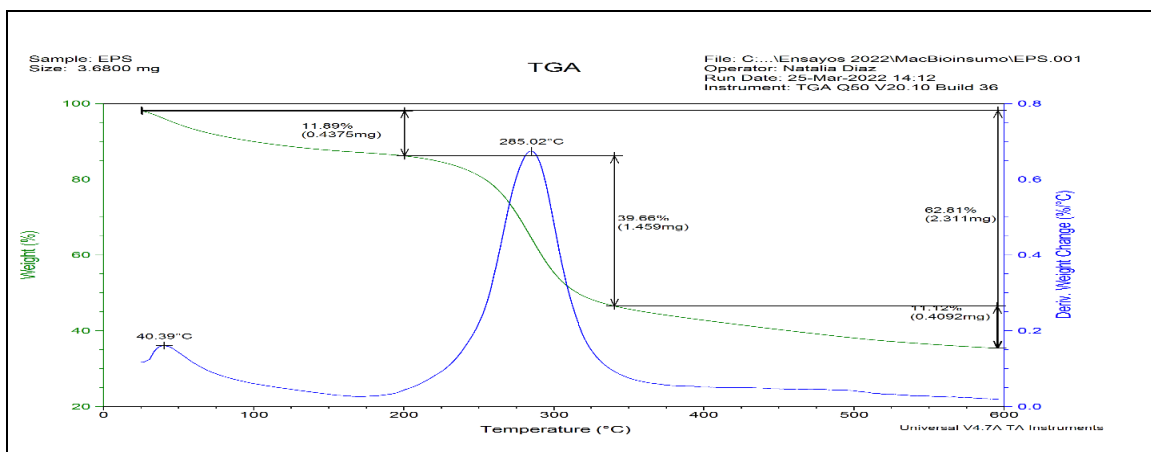
Esta técnica de caracterización permite estudiar el comportamiento y estabilidad térmica de las muestras, con lo cual se puede analizar el desempeño térmico de una muestra, así como establecer una comparación directa entre la resistencia que presentan los materiales a degradarse composicionalmente por efecto de la temperatura. Las muestras fueron analizadas a través del uso de un Analizador Termogravimétrico, marca TA Instruments, modelo Q50.



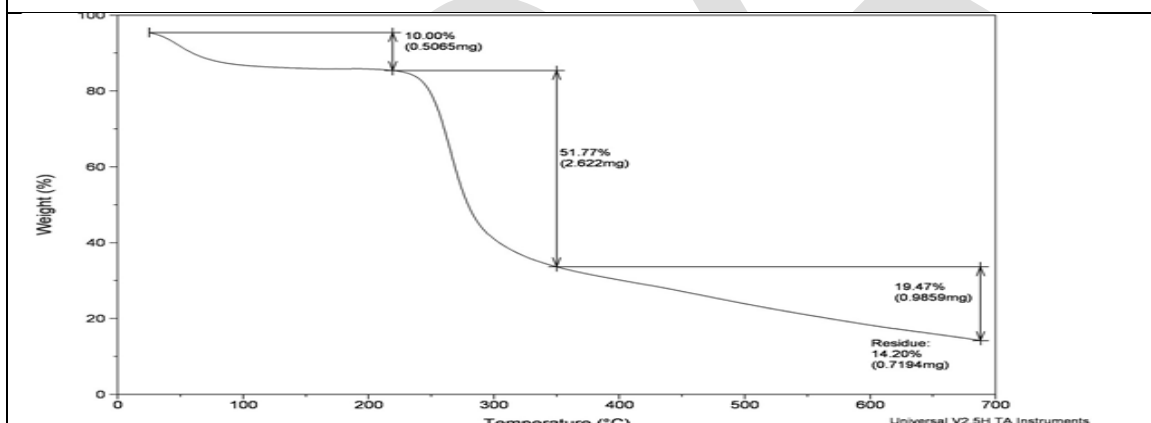
**Imagen 18:** Analizador Termogravimétrico.

La estabilidad térmica de la muestra se evaluó en el intervalo de 25 °C a 600°C, empleando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>20 de 32</b>




**Gráfico 6:** Curva de Análisis Termogravimétrico (TGA) expolisacáridos



**Gráfico7:** Curva de Análisis Termogravimétrico (TGA) e x polisacáridos extraídos de la cepa *Nostoc sp.* LAUN015. (Herrera Pérez, (2012). )

El análisis termogravimétrico (Grafico 6) se muestra en tres pasos diferenciados de acuerdo con lo estudiado por (Herrera Pérez, (2012). )

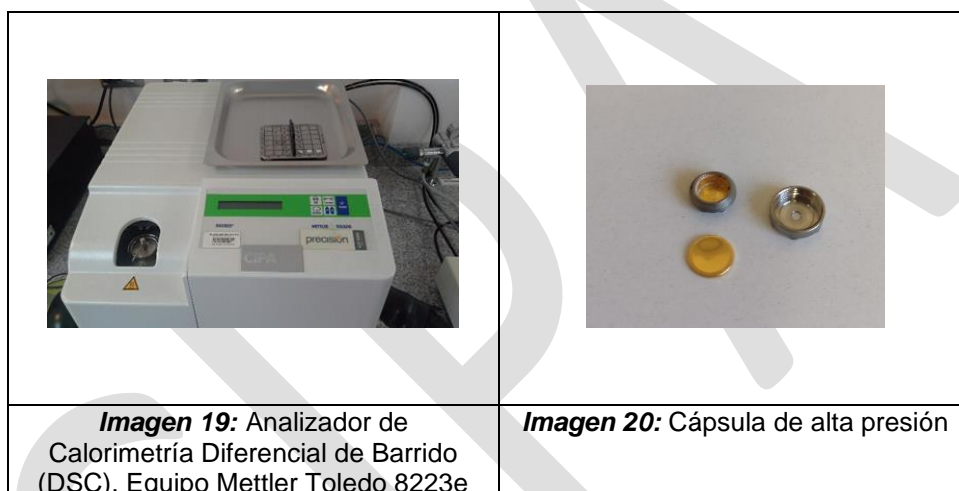
- 1) Desorción del agua físicamente absorbida en un intervalo 25°C a 125°C donde se pierde aproximadamente el 11.89 % del peso total de la muestra
- 2) La segunda fase de degradación que tiene lugar entre 210°C y 340°C. En este rango de temperaturas ocurre la mayor pérdida de peso de la muestra correspondiente a cerca del 39.66% del peso total. De acuerdo con (Herrera Pérez, (2012). ) en esta fase ocurre la despolimerización de los polisacáridos, además de la eliminación de los grupos polihidroxílicos presentes.

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>21 de 32</b>


3) La última fase de degradación tiene inicio cerca a los 350°C hasta temperaturas superiores a los 700°C, en esta fase el polisacárido presenta una degradación constante en la cual se pierde cerca del 20% del peso total antes de alcanzar los 600°C y continua más allá de esta temperatura.

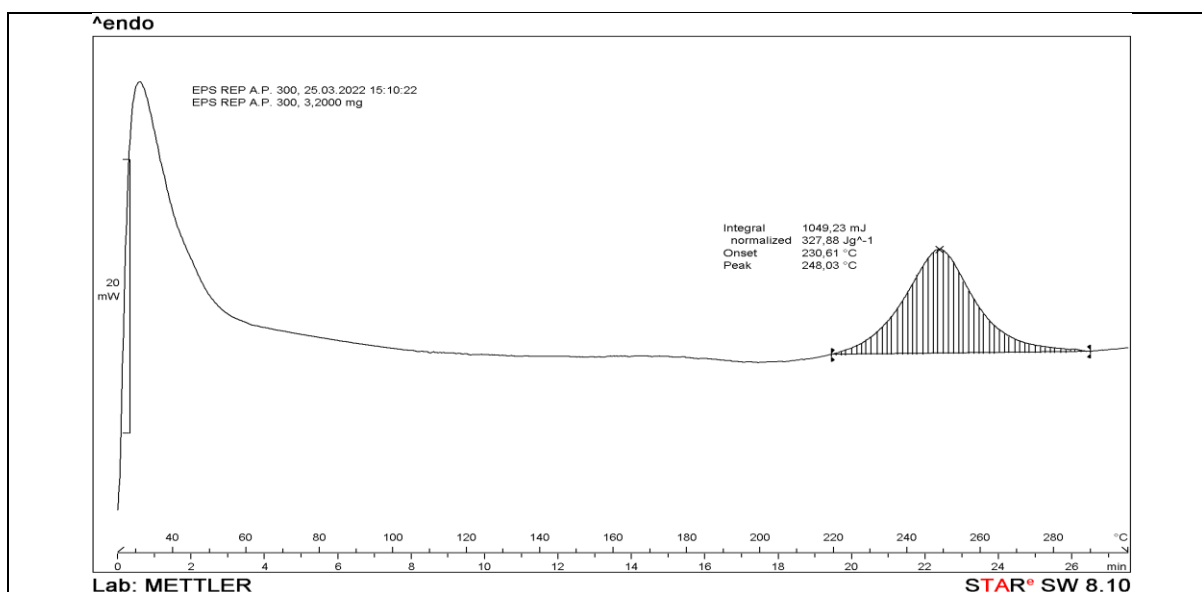
### 5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La caracterización térmica se realizó con la ayuda de un analizador de calorimetría diferencial de barrido (del inglés: Differential Scanning Calorimetry DSC), equipo *Mettler Toledo 822e*, equipado con cápsulas de alta presión.

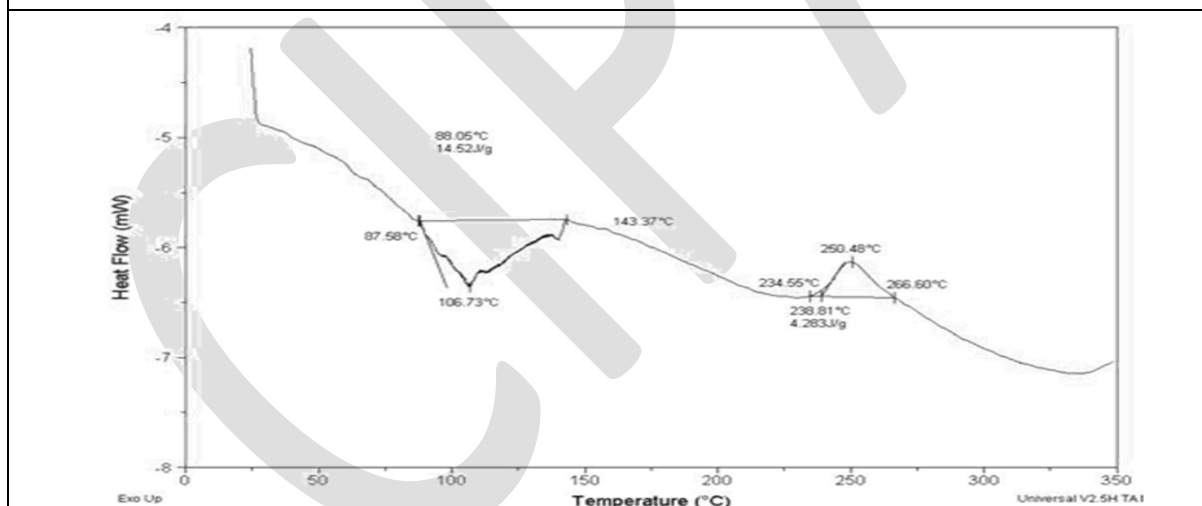


Dinámico desde 25 °C hasta 300°C a una velocidad de barrido de 10 °C/min.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>22 de 32</b>




**Gráfico 9:** Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) exopolisacáridos



**Gráfico 10:** Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) exopolisacáridos extraídos de la cepa *Nostoc sp* LAUN015 (Herrera Pérez, (2012). )

La calorimetría diferencial de barrido obtenida para el Expolisacarido presenta un pico exotérmico cercano a los 248.03°C con una (entalpia) de 327.88Jg<sup>-1</sup>, causado por la degradación de la muestra a CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, como se confirma en el TGA al presentarse la mayor pérdida de peso en el mismo rango de temperatura.

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>23 de 32</b>

Si lo compararnos con La calorimetría diferencial de barrido obtenida para el polímero de *Nostoc sp.* LAUN015 (Herrera Pérez, (2012). ) que se presenta en la Grafico10, muestra dos picos principales. El pico más grande se observa cercano a los 105°C, es un pico endotérmico y parece ser causado por la eliminación del agua aún contenida en el polisacárido después de la extracción y purificación, así como una posible contribución debida a la desnaturalización de proteínas presentes. La presencia de este pico justifica la pérdida de peso cercana al 10% del peso total en el rango de 25°C a 100°C mostrada en el TGA que concuerda con la evaporación de agua aún presente, en el grafico 9, Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) exopolisacáridos CIPA, no se observa este pico debido que fueron utilizado cápsulas de alta presión, que eliminan el efecto de agua que pueda contener la muestra.


Igualmente, se presenta un pico exotérmico cercano a los 250.5°C con una entalpía de 4.28 J/g, causado por la degradación de la muestra a CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, como se confirma en el TGA al presentarse la mayor pérdida de peso en el mismo rango de temperatura. Debido a que el único pico endotérmico obtenido no concuerda con la fusión del polisacárido se infiere que el polisacárido presenta una descomposición térmica directa a los 235°C sin haber presentado fusión previa.

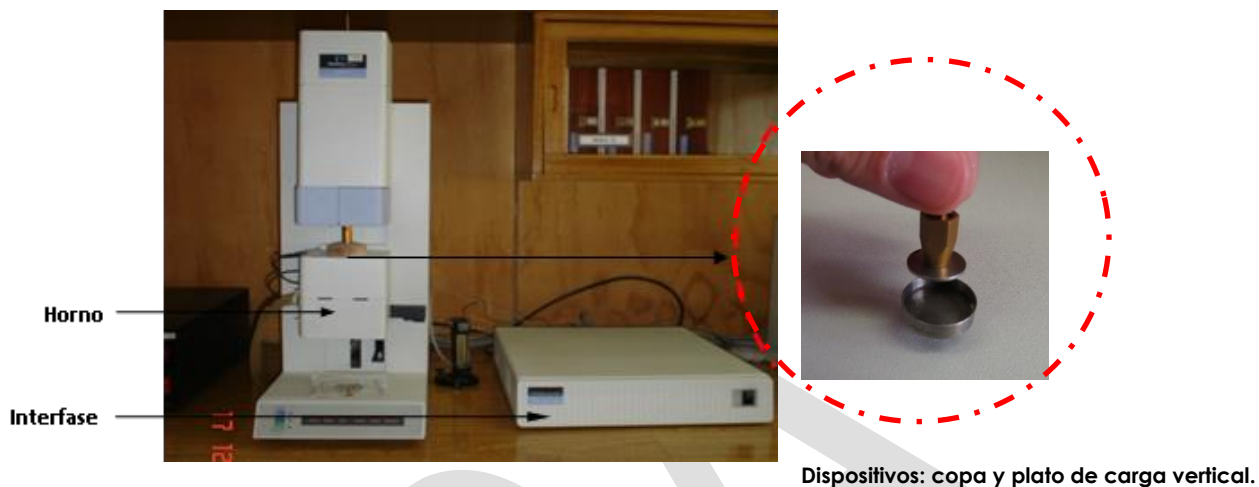
## 6 CARACTERIZACIÓN REOLOGICA, Análisis Dinámico Mecánico (DMA).

El análisis mecánico dinámico conocido por sus siglas en inglés como DMA. Es un análisis utilizado en estudios de procesos de relajación y en reología, para estudiar y caracterizar el comportamiento de materiales viscoelásticos como polímeros y sus respuestas ante impulsos, estrés, deformación en tiempo y frecuencia.

El equipo de DMA, está compuesto por un horno de calentamiento, cuenta con un dispositivo específico, aplicados a las muestras, según las propiedades del material que se requiera medir, para este caso se utilizó dispositivo copa y plato para determinar el comportamiento viscoelástico del material. El equipo DMA, está compuesto por un horno de calentamiento, además, se compone de una interface, capaz de conectar el equipo DMA con una base de datos, almacenando todos los valores numéricos, capturados durante el ensayo tal cual de observa en la figura

A través del Análisis Dinámico Mecánico (DMA), se determinó la temperatura de ablandamiento del EPS purificado, bajo el método ASTM D1525. El Análisis Dinámico Mecánico (DMA), se realizó bajo el método de cizalla copa y plato, desde una temperatura de 25°C hasta 300°C con una tasa de calentamiento de 10°C/min.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>24 de 32</b>



**Figura 3.** Equipo de Análisis Dinámico Mecánico DMA modelo 7e, *Perkin Elmer*.


A continuación, se presenta los valores resumen obtenidos de las temperaturas de ablandamiento, a través de análisis DMA.

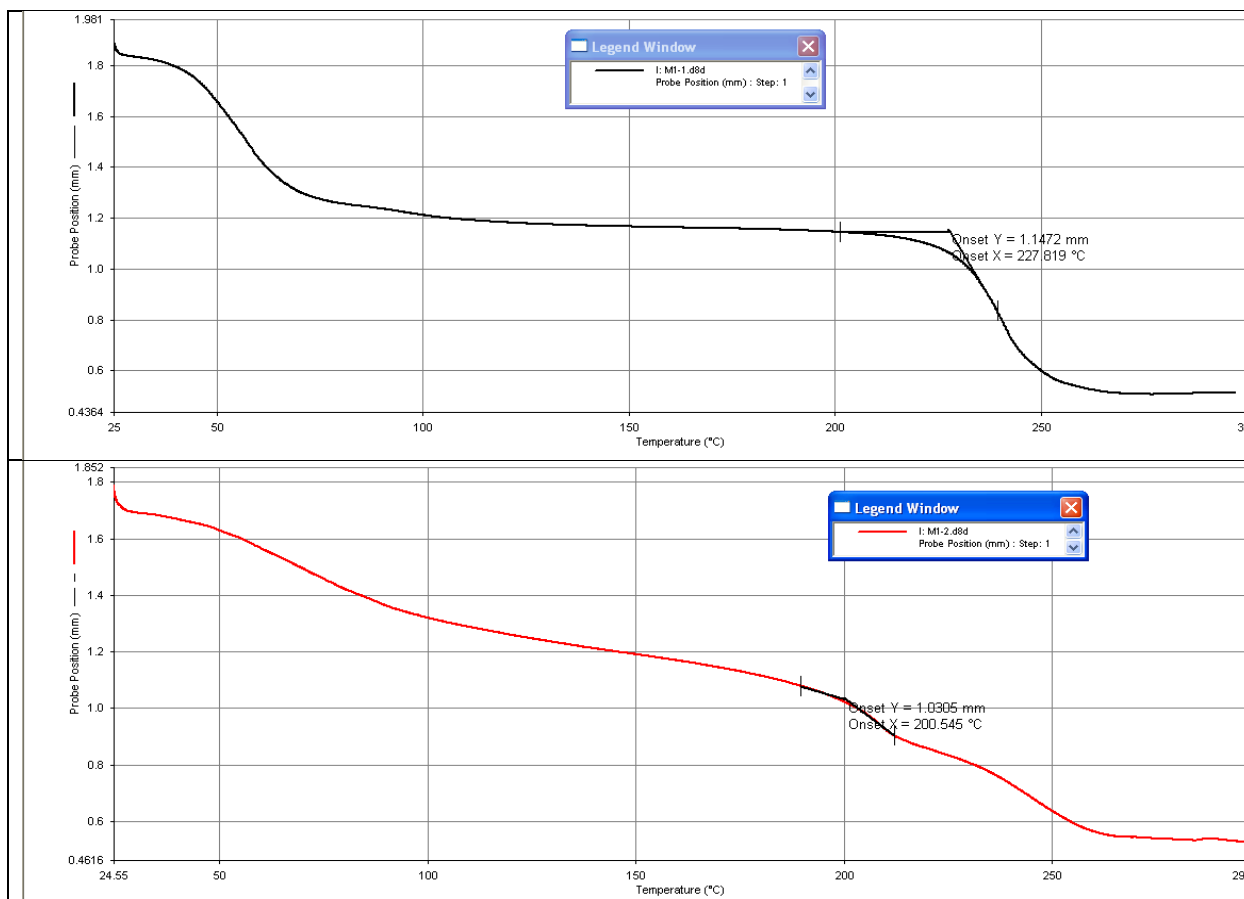
**Tabla 4.** Resumen de Temperatura de ablandamiento.

Muestras	Temperatura pico de ablandamiento (°C)
EPS	227,82°C
	200,54°C
<b>Promedio</b>	<b>214,18°C</b>

A continuación se presentan los resultados gráficos obtenidos:




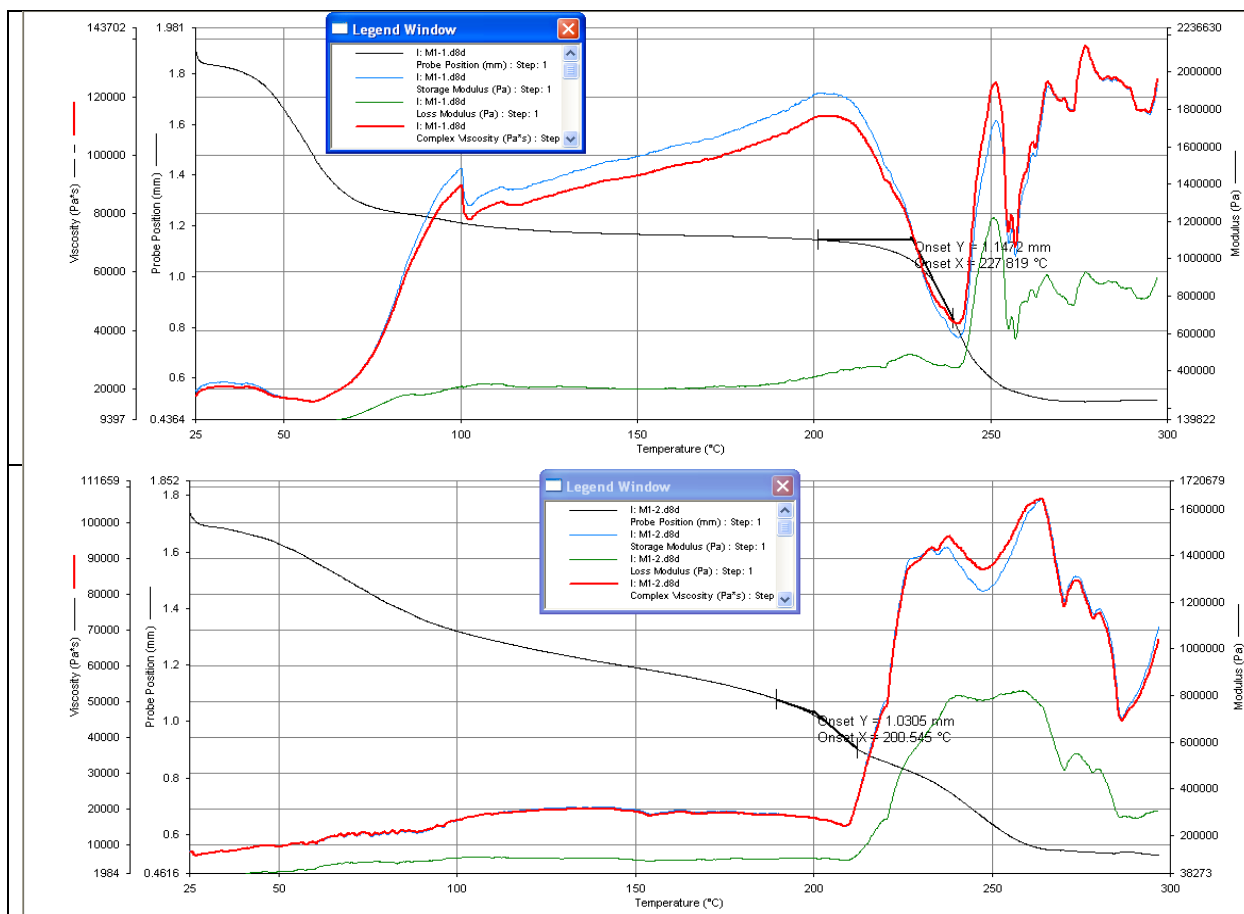
	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>25 de 32</b>



**Gráfico 11.** Resultados de temperatura de ablandamiento del polímero a través de DMA. Ensayo realizado por duplicado.


A continuación se presentan los resultados gráficos obtenidos en la evaluación del comportamiento reológicos y su comportamiento mecánico del EPS:

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: “Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana”	Página: <b>26 de 32</b>



**Gráfico 12.** Análisis DMA, curvas viscosidad, módulo de pérdida y de almacenamiento versus temperatura.

El comportamiento reológico a través de DMA observa que el EPS purificado, presenta una estabilidad térmica desde los 100 hasta los 200°C. Sobre los 200°C se observa el inicio de su degradación térmica. El comportamiento viscoso presenta una mayor variabilidad en el rango medido desde 2.000 hasta los 100.000 Pa\*s, esto puede deberse a la composición misma del EPS. En termino de los módulos de almacenamiento y de pérdida este comienza a cambiar sobre los 200°C, aumentando y manteniéndose constante entre los 220 a 270°C, obteniéndose un valor entre 0,8 a 2MPa.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>27 de 32</b>

## 7 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE EPS.


### Determinación de masas molares

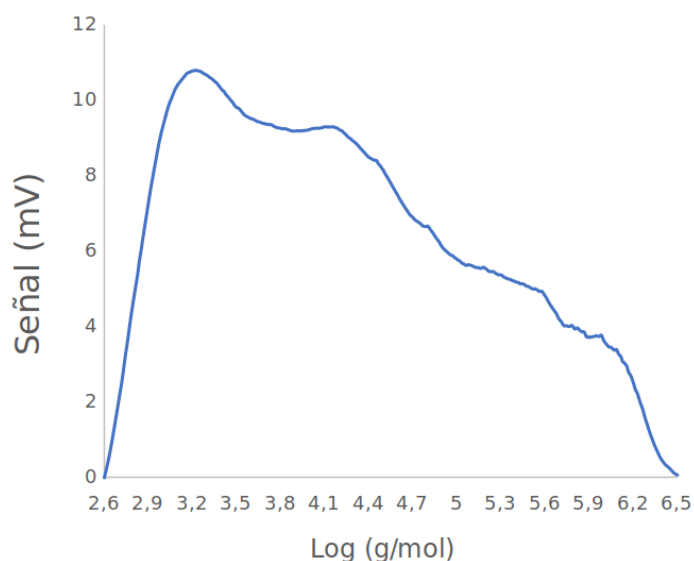
La determinación del peso molecular del EPS purificado se determinó a través de cromatografía de exclusión por tamaño mediante permeación en gel (SEC/GPC), de forma similar a lo descrito por Rehman et al., (2021). Para esto las muestras fueron previamente resuspendidas en buffer acetato 0,4 M (pH 5) a una concentración final de 10 mg mL y luego filtradas a través de filtros de membrana ester-celulosa estériles de 47 mm de diámetro y 0,2 µm de poro (Whatman® ME24/21; Merck Inc.).

De estas, 50 µL fueron procesadas utilizando un sistema GPC equipado con una columna PL aquagel-OH MIXED-H de 8 µm, 300 × 7,5 mm, conectada en serie con una precolumna PL aquagel-OH de 8 µm, 50 × 7,5 mm (Agilent, Waldbronn, Germany), para la separación de moléculas dentro del rango desde 190 a 22800 g/mol, utilizando buffer acetato 0,4 M (pH 5) como fase móvil a un flujo 0,5 mL min<sup>-1</sup>, y 12 estándares de polietilenglicol para la calibración. Todos los análisis fueron realizados en duplicado utilizando un cromatógrafo HPLC equipado con un detector de índice de refracción (IR) (UltiMate™ 3000 Systems System; Thermo Scientific Inc.)

Los resultados obtenidos mediante SEC/GPC<sup>1</sup> para la determinación de masas molares de la muestra EPS, muestran una distribución de masas, en función del logaritmo de sus masas molares promedio, por sobre 2,6 e inferior a 6,5 (Figura 1). De este modo, se determinó que los parámetros de la muestra analizada corresponden a una masa **molecular promedio (Mn) de 3.698 ± 160 g/mol** y una masa molecular media (Mw) de 135.550 ± 11.100 g/mol, cuyo índice de polidispersidad (PI) es de 36,7 ± 3,4 (Tabla 1).

<sup>1</sup> Nota: Además de lo anterior, los resultados evidenciaron que fue posible detectar la presencia de compuestos con masas molares menores a 190 g/mol. Sin embargo, dado que lo anterior representa el límite de la técnica utilizada, en las condiciones descritas, estas masas no fueron consideradas para los análisis posteriores.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	 Centro de Investigación de Polímeros Avanzados
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>28 de 32</b>




**Grafica 13.** Cromatogramas de distribución de masas molares presentes en la muestra EPS, obtenidas mediante SEC/GPC.

**Tabla 5:** Parámetros de distribución de masas molares determinados desde cromatogramas. Variables analizadas

Muestra	Variables analizadas		
	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PI (Mw/Mn)
EPS	3.698 ± 160	135.550 ± 11.100	36,7 ± 3,4

Nota: Error corresponde a incertidumbre expandida, equivalente a un intervalo de confianza del 95%.

	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>29 de 32</b>

## 8 ELABORACIÓN DE FILM O PELICULA


Para la elaboración de una película o film de EPS, se trabajó bajo el método casting, en el cual luego de formada la solución de los componentes de la película, se realiza la evaporación del solvente a temperatura y humedad controladas, formándose así la película. Para ello se trabajó con el EPS purificado utilizando una pequeña muestra de 50 mg en 2 ml de agua nanopura para evaluar su disolución en agua, tal como observa en la figura 4. Para la figura 5. Se observa el trabajo con la muestra original, ya que considerando existe muy poco de materia prima para trabajar desde el EPS purificado, se inicia el trabajo con la muestra original y evaluando diferentes formulaciones para probar en la formulación de film.



**Figura 4.** Prueba y análisis de disolución en agua de EPS purificado.



**Figura 5.** Prueba y análisis de disolución en agua y mezclas con Glicerol al 99,5% de pureza, para la muestra original.

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>30 de 32</b>

## 10. CONCLUSIONES<sup>2</sup>

El presente informe reporta los resultados obtenidos durante el procesamiento para la "Extracción y Purificación de Exopolisacáridos", y su caracterización.

Los resultados evidencian que fue posible la extracción y purificación de alrededor de 591,9 mg de EPS (peso seco) desde un total de 624,20 g correspondiente al peso húmedo total de la sumatoria de la muestra analizada. Obteniéndose un rendimiento del 0,09%.


El contenido total de azúcares y proteínas presentes en el EPS purificado representó alrededor del  $45,6 \pm 0,11$  % y  $0,21 \pm 0,01$  %, del total de la biomasa de exopolisacárido purificado.

La determinación de la masa molecular promedio (Mn) de  $3.698 \pm 160$  g/mol y una masa molecular media (Mw) de  $135.550 \pm 11.100$  g/mol, cuyo índice de polidispersidad (PI) es de  $36,7 \pm 3,4$ .



**M.Sc. Ximena Bustos Palacios**  
Coordinadora de Análisis y Ensayos  
Gestión Tecnológica y Asistencia Técnica en Polímeros SPA.  
CIPA-CHILE

<sup>2</sup> Los resultados entregados corresponden a las muestras analizadas y enviadas por el cliente. Se prohíbe cualquier modificación de los resultados informados de los servicios entregados. Este informe no debe ser reproducido parcial o completamente sin la aprobación escrita del responsable de su emisión.


	<b>Informe Técnico Cipa</b> <b>Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>31 de 32</b>

## Referencias

- Bales, P. M. ( (2013).). Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. .
- Bales, P. M. ((2013).). Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens.
- Bradford, M. M. ((1976).). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. . In *Analytical biochemistry*, (pp. 72(1-2), 248-254.).
- Bremer, P. J. ((1991).). An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. . *Biofouling*,, 89-100.
- Dilna, S. V. ((2015). ). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. .
- Dilna, S. V. ((2015).). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*,, 64(2), 1179-1186.
- Dubois, M. G. ((1956).). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. . In *Analytical chemistry*, . (pp. 28(3), 350-356).
- GD Manrique, F. L. (2002). *Espectroscopía FT-IR como herramienta para medir el grado de esterificación de metilo en pectinas aisladas de frutos de papaya en maduración*. *Postharvest Biology and Technology* 25.
- Herrera Pérez, R. M. ((2012). ). *Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc sp.* como sustrato en la producción de bioetanol*. . Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.
- Singh, R. P. ( (2011). ). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. . *Carbohydrate polymers*, 84(3), , 1019-1026.
- Ziadi, M. B.-H. ((2018).). Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by th.

Bales, P. M. ( (2013).). Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. .

Bales, P. M. ((2013).). Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens.

	<b>Informe Técnico Cipa Proyecto Corfo 21SN-182439</b>	
Fecha: <b>30-05-2022</b>	Título: "Caracterización física, química y biológica de extracción y Purificación de exopolisacáridos obtenidas desde un proceso de fermentación bacteriana"	Página: <b>32 de 32</b>

- Bradford, M. M. ((1976).). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. . En *Analytical biochemistry*, (págs. 72(1-2), 248-254.).
- Bremer, P. J. ((1991).). An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. . *Biofouling*,, 89-100.
- Dilna, S. V. ((2015). ). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. .
- Dilna, S. V. ((2015).). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*,, 64(2), 1179-1186.
- Dubois, M. G. ((1956).). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. . En *Analytical chemistry*, . (págs. 28(3), 350-356).
- GD Manrique, F. L. (2002). *Espectroscopía FT-IR como herramienta para medir el grado de esterificación de metilo en pectinas aisladas de frutos de papaya en maduración*. *Postharvest Biology and Technology* 25.
- Herrera Pérez, R. M. ((2012). ). *Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc sp.* como sustrato en la producción de bioetanol*. . Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.
- Singh, R. P. ( (2011). ). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. . *Carbohydrate polymers*, 84(3), , 1019-1026.
- Ziadi, M. B.-H. ((2018).). Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by th.
- Z.U. Rehman, J.S. Vrouwenvelder, P.E. Saikaly (2021). Physicochemical properties of extracellular polymeric substances produced by three bacterial isolates from biofouled reverse osmosis membranes. *Front. Microbiol.*, 12 (2021), pp. 1-13.