



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
CELULOSA POR CULTIVO SUMERGIDO DE *Gluconacetobacter
xylinus*”**

TESIS

Para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.B.I Mariana Quintana Quirino

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores:

Dra. Zaizy Rocha Pino

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, Departamento de
Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros

Dr. Humberto Vázquez Torres

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, Departamento de Física,
Área de Polímeros

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 237292).

México D.F. a 27 de Julio de 2015

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Estudio de la producción y caracterización de celulosa por cultivo sumergido de *Gluconacetobacter xylinus*”

Que presenta:

I.B.I Mariana Quintana Quirino

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros Planta Piloto 10.

Asesores de tesis:

Dra. Zaizy Rocha Pino

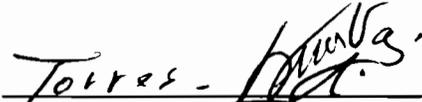
Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y PP10

Dr. Humberto Vázquez Torres

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Física, Área de Polímeros.

H. Jurado:

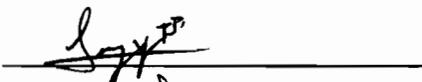
Presidente:

Humberto Vázquez Torres - 

Secretario: J. Gabriel Uguero Ramírez



Vocal: Dra. Zaizy Rocha Pino



Vocal: Dra. Alma Gpc Villa Lerma



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la atención y los consejos brindados, por los conocimientos transmitidos, por guiarme en la preparación de esta etapa profesional. Muchas gracias por ser ejemplo de fortaleza y perseverancia, por mostrarme que tengo potencial para lograr todo lo que me proponga, por hacer de mí una persona independiente. Gracias por todo el cariño y el tiempo dedicado.

Al Dr. Humberto Vázquez Torres, por su disposición a lo largo de este proyecto, por apoyarme incondicionalmente, por los consejos y conocimientos compartidos durante mi maestría.

A la Dra. Zaizy Rocha Pino, quien más que una asesora fue una gran compañera de trabajo. Muchas gracias por motivarme y apoyarme siempre que surgían dudas, por la asesoría en este trabajo así como por los conocimientos brindados.

A mis compañeros de laboratorio, por la ayuda que me brindaron en su momento cada quien; especialmente a Carmen Hernández, Leticia Hidalgo, Ivana Peñuelas, Angélica Ramos, y Alex Barrea por apoyarme y motivarme cuando más lo necesite, y sobre todo por su sincera amistad.

A mis compañeros de maestría: Adriana Arvízu, Isabel Hernández, Rosalinda Tafolla, Dario Gómez y Fernando Jiménez, por las pláticas motivacionales, por sus consejos y compañía a lo largo de esta etapa de mi vida.

A Jesús Rojas, quien además de ser un miembro del laboratorio de biopolímeros ha sido una persona importante en mi vida a lo largo de la maestría. Gracias por tu comprensión, cariño y apoyo; eres un ser humano increíble.

DEDICATORIAS

A mis padres, Mateo y María Inés, por su cariño y apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante y a ser una mejor persona cada día, por impulsarme a seguir mis sueños y por enseñarme a valorar las pequeñas cosas de esta vida. Gracias por apoyar mis decisiones, por confiar en mí, y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis hermanas Adriana, Patricia Guadalupe, Julieta y Norma Paola, por su cariño y por todos los buenos momentos que hemos compartido juntas, por acompañarme en mis desvelos, por hacer de mis largos ratos de trabajo momentos de alegría, por motivarme a no rendirme y alcanzar mis metas, sin ustedes nada sería igual. Gracias por llenar mi vida de alegría y felicidad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	6
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. HIPÓTESIS.....	12
V. OBJETIVOS	12
V.1. General.....	12
V. 2. Particulares.....	12
VI. METODOLOGÍA.....	13
VI.1 Microorganismo.	13
VI.1.1 Estandarización de inóculo.....	13
VI.1.2 Preparación del inóculo.	14
VI.2 Cultivo Sumergido	14
VI.2.1 Cultivo sumergido para la producción de celulosa en matraces.	15
VI.2.2 Cultivo sumergido para la producción de celulosa en biorreactores.....	15
VI.2.2.1 Efecto de la aireación en la producción de celulosa en condiciones estáticas y agitadas.....	15
VI.2.2.2 Efecto de la relación C/N en la producción de celulosa.....	16
VI.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	16

VI.3.1	Determinación del consumo de glucosa.	16
VI.3.2	Determinación del crecimiento microbiano.	17
VI.3.3	Determinación de la producción de celulosa.	17
VI.3.4	Determinación del pH.	17
VI.4	PURIFICACION DE BC.	17
VI.4.1	Modificación de las condiciones de purificación de celulosa.	18
VI.5	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CELULOSA.....	18
VI.5 .1	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR).....	18
VI.5 .2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	19
VI.5 .3	Índice de cristalinidad (I_{CR}).	19
VI.5 .4	Peso molecular (M_v).	19
VI.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
VII.1	Estandarización del inóculo.	21
VII.2	CULTIVO SUMERGIDO.....	23
VII. 2.1	Cultivo sumergido en matraces.	23
VII.2.2	Cultivo sumergido en biorreactores.	24
VII.2.2.1	Evaluación del efecto de la aireación en la producción de celulosa en condiciones estáticas y agitadas.....	26
VII.2.2.2	Evaluación del efecto de la relación C/N en la producción de celulosa.....	30
VII.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE BC.	42
VII.3.1	FTIR.....	42
VII.3.2	XRD y M_v	48
VII.3.3	SEM.....	51

VIII. CONCLUSIONES	54
IX. PERSPECTIVAS	55
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
XI. ANEXOS.....	59
XI.1. Metodología para el análisis de glucosa y curva patrón.	59
XI. 2. Metodología para lowry-peterson y curva patrón de seroalbúmina (BSA)	60
XI.3. Técnica para determinación de peso molecular mediante viscosidad intrínseca	61
XI.4. Análisis estadístico: Concentración de proteína.	63
XI.5. Análisis estadístico: Productividad de celulosa.....	65
XI.6. Análisis estadístico: Producción de celulosa.	67
XI.7. Análisis estadístico: pH.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de extracción de BC.....	9
Tabla 2. Composición del medio de YGC.	13
Tabla 3. Composición del Medio Hestrin- Schramm.	14
Tabla 4. Parámetros Cinéticos evaluados y ajustados con la Ecuación de Gompertz para cada una de las relaciones C/N.....	40
Tabla 5. Concentración de BC en mg/mL utilizando dos concentraciones de NaOH.	44
Tabla 6. Índice de cristalinidad y peso molecular de BC.	50
Tabla 7. Composición de la solución de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS).	59
Tabla 8. Diluciones de BC para determinar viscosidad.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de síntesis de celulosa de <i>G. xylinus</i> (Chavez-Pacheco et al., 2004).	8
Figura 2. Tinción de Gram de <i>G. xylinus</i> ATTC 700178 (100 X).	21
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>G. xylinus</i> en medio HS.	22
Figura 4. Formación de celulosa en la superficie con medio HS.	23
Figura 5. Concentración de glucosa y comportamiento de pH en la fermentación.	24
Figura 6. Crecimiento microbiano durante la fermentación.	25
Figura 7. Consumo de glucosa durante la producción de BC.	27
Figura 8. Crecimiento microbiano durante la producción de BC.	28
Figura 9. Evolución de pH durante la producción de BC.	29
Figura 10. Concentración de glucosa y producción de BC durante la fermentación con relación C/N de 7.1.	31
Figura 11. Crecimiento microbiano y comportamiento del pH con concentración de glucosa inicial a 20 gL ⁻¹	32
Figura 12. Determinación de proteína soluble por el método de Lowry- Peterson en un reactor con 5 gL ⁻¹ de fuente de nitrógeno.	33
Figura 13. Concentración de glucosa a lo largo de la fermentación.	35
Figura 14. Crecimiento microbiano a lo largo de la fermentación.	36
Figura 15. Producción de BC en gL ⁻¹ con las diferentes relaciones C/N empleadas.	37
Figura 16. Máxima producción de BC en gL ⁻¹ a las 24h con las diferentes relaciones C/N.	38
Figura 17. Comportamiento del pH a lo largo de la producción de BC.	40
Figura 19. Espectros infrarrojos de BC purificada (BC) y Estándar de Celulosa (CO).	43
Figura 20. Espectros infrarrojos del estándar de celulosa (CO), BC purificada con NaOH 0.5 M (BC 0.5) y con NaOH 0.25 M (BC 0.25).	45

Figura 21. Espectros infrarrojos de Estándar de Celulosa (CO) y BC Purificada (BC) obtenida de la evaluación del efecto de la aireación.....	46
Figura 22. Espectros infrarrojos de BC purificada de las relaciones C/N y estándar de celulosa (CO).....	47
Figura 23. Difractograma de BC tratada con NaOH 0.5M a 80 °C.	49
Figura 24. Difractogramas de BC purificada 3.5(A), 7.1(B), 14.2(C) y 21.2(D).....	51
Figura 25. Micrográficas de BC con NaOH obtenidas de cultivo sumergido: A) 0.5 M y B) 0.25 M.....	52
Figura 26. Micrográficas de BC con las relaciones C/N: 3.5 (A), 7.1 (B), 14.2 (C) y 21.2 (D).	53
Figura 27. Curva patrón para el análisis de glucosa por el método de DNS.	59
Figura 28. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry- Peterson (Peterson, 1977).....	60
Figura 29. Técnica para determinación de peso molecular.....	62

ABREVIATURAS

BC	Celulosa Bacteriana
KDa	Kilo Dalton
HS	Hestrin-Schramm
C/N	Carbono/Nitrógeno
GLC	Glucosa
rpm	Revoluciones por Minuto
vvm	Volumen de Aire por Volumen de Medio por Minuto
nm	Nanómetro
DNS	Acido 3,5- Dinitrosalicílico
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
XRD	Difracción de Rayos X
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo
UDPG	Uridín Difosfato Glucopirofosforilasa
min	Minuto
h	Hora
YGC	Extracto de levadura, glucosa y carbonato de calcio.

RESUMEN

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, que puede ser sintetizado por plantas, algas, hongos y bacterias. Dentro de este último, encontramos que bacterias pertenecientes al género *Gluconacetobacter* son capaces de producir celulosa de manera eficiente como un agregado extracelular el cual confiere protección a la célula y facilita su supervivencia. Se ha reportado la producción de celulosa empleando bacterias del género *Gluconacetobacter* en diversos medios de cultivo, y diferentes fuentes de carbono de variada concentración.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la producción de celulosa por cultivo sumergido de *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 así como caracterizar el producto obtenido; evaluando el efecto de la aireación y el efecto de la relación C/N sobre la producción de la celulosa.

Se empleó el medio HS (Hestrin- Schramm , 1953) el cual contiene glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura y peptona de caseína como fuentes de nitrógeno, ácido cítrico monohidratado y fosfato de sodio dibásico anhidro como sistema amortiguador de pH. En la evaluación del efecto de la aireación, el mejor sistema resultó ser el sistema agitado obteniendo 2 veces mayor producción de celulosa que el sistema estático. Mientras que al utilizar la relación C/N 14.2 se alcanzó la mayor producción de celulosa (0.46 gL^{-1}), con resultados de 5.3, 3.5 y 1.4 veces mayor producción en comparación a las relaciones C/N de 3.5, 7.1 y 21.2, respectivamente.

Se purificó el biopolímero producido en cada uno de los experimentos y, en sus espectros de infrarrojo, mostró las bandas características de la celulosa. Su índice de cristalinidad fue alrededor del 70% con pesos moleculares que van de 220 a 280 kDa.

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant polysaccharide in nature, which can be synthesized by plants, algae, fungi and bacteria. The latter has been found in bacteria belonging to the genus *Gluconacetobacter*, which are able to produce efficiently cellulose as an extracellular aggregate that brings protection and facilities to its survival. It has been reported the production of cellulose using these bacteria by assimilation of several carbon sources.

The objective of this work was to study the production of cellulose by submerged culture of *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178 and characterize the product obtained. The effect of aeration, as well as the C/N ratio was evaluated on the production of cellulose. For this purpose, it was used a medium that contained glucose as carbon source, yeast extract and peptone as nitrogen sources, as well as citric acid monohydrate and anhydrous dibasic sodium phosphates as buffer.

Submerged cultures were carried out in non-stirred and stirred tank reactors. The bacterial cellulose production was significantly achieved in the agitated system with 2-fold higher yield of the biopolymer than that with static system. Meanwhile, in the evaluation of the effect of C/N ratio, production was increased with 14.2 ratio (0.46 gL⁻¹) within 5.3, 3.5 and 1.4 times more cellulose than ratios of 3.5, 7.1 and 21.2, respectively.

The produced biopolymer was purified and its pureness was evidenced by the infrared spectroscopy analysis. Bacterial cellulose presented a crystallinity index of 70% with molecular weights ranging from 220 to 280 kDa.

I. INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros son macromoléculas producidas por sistemas biológicos como las plantas, los animales y los microorganismos. Sus propiedades físicas y químicas dependen de sus propiedades estructurales y de sus funciones metabólicas. Son de origen natural y se pueden encontrar tanto en plantas, caparazones de crustáceos y microorganismos, teniendo funciones como la de servir como soporte estructural confiriéndoles resistencia mecánica y servir como reservorio (glucógeno) entre otras, por lo que son la categoría más grande de la familia de los biopolímeros (Phisalaphong-Jatupaiboon, 2008).

El término polisacárido es aplicable a los polímeros que pueden o no contener estructuras que se repiten periódicamente siendo que el grupo dominante, pero no necesariamente exclusivo, está unido por enlaces tipo glucosídicos. Entre los polímeros naturales de mayor importancia industrial encontramos a la celulosa la cual es sintetizada por una variedad de organismos. La celulosa es un polisacárido de estructura lineal que comprende unidades repetidas de anhidroglucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4 (Esa *et al*, 2014). Este polímero es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas (Carreño *et al.*, 2012).

Desde inicios del siglo XX ya se mencionaba en la literatura la formación de materiales poliméricos a partir de microorganismos, encontrados muchas de las veces como resultado de experimentos y en los cuales, se evaluaban las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros. Estos polisacáridos de origen microbiano se pueden encontrar como: inclusiones intracelulares o polisacáridos extracelulares, este último como material mucilaginoso extracelular en forma de cápsulas. Existen reportes acerca de que bacterias, algas, hongos y levaduras suelen producir polisacáridos extracelulares con diferentes estructuras químicas y propiedades físicas (Jaramillo *et al.*, 2013).

La celulosa es un biopolímero insoluble en agua, estable en soluciones básicas, pero susceptible a hidrólisis alcalina bajo condiciones drásticas (NaOH 0.1 M, 170 °C). Posee regiones con alto ordenamiento (cristalinas) y otras donde el grado de ordenamiento es bajo (amorfos). Presenta varias formas que dan lugar al polimorfismo (Khajavi *et al* 2011). La celulosa tiene una gran variedad de aplicaciones en industrias como la del papel, textil, alimenticia, además de tener aplicaciones en las industrias del papel, alimenticia, de explosivos y de azúcares fermentables, entre otras, además de aplicaciones específicas en biotecnología y medicina, tales como en la fabricación de membranas usadas como agentes de separación y biopelículas para curar heridas, respectivamente. (Chavez- Pacheco *et al*, 2004).

Actualmente, la celulosa puede obtenerse de diversas fuentes: de origen vegetal, procedente de plantas leñosas (de mayor empleo e importancia a nivel industrial); de organismos como las bacterias pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* y *Sarcina*. La celulosa producida por esos microorganismos es comúnmente conocida como Celulosa Bacteriana (BC) (Lin *et al*, 2013).

Sin embargo, en los últimos años la celulosa ha generado grandes expectativas al ser producida por microorganismos como las bacterias que pertenecen al género *Gluconacetobacter*, ya que posee ciertas características cuya aplicación la hacen atractiva. La celulosa bacteriana (BC) posee la misma composición química que la celulosa vegetal, se distingue por su pureza ya que no está asociada a hemicelulosas ni lignina, así como también por su alto grado de cristalinidad, que es mayor al 60% (Khajavi *et al*, 2011). Además, una vez purificada la celulosa bacteriana no es tóxica, ni alérgica, y es biocompatible y biodegradable.

La celulosa vegetal normalmente está mezclada con lignina y hemicelulosas pero la celulosa de bacterias o celulosa bacteriana (BC) contiene una serie de cadenas paralelas compuestas de β -D-glucopiranosas interconectadas por enlaces de hidrógeno intermoleculares, que es idéntica en composición química a la celulosa vegetal (Mohammadkazemi *et al*, 2014).

Gluconacetobacter xylinus, es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*, la cual es un aerobio estricto que realiza la oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes (fermentación oxidativa). Su hábitat natural son las frutas y vegetales en proceso de descomposición (Yamada-Yukphan, 2008; Dayal *et al*, 2013).

Estas bacterias son capaces de producir un tipo particular de biopolímero denominado celulosa bacteriana (BC). *G. xylinus* es capaz de producir altos niveles de celulosa en cultivo líquido a partir de una amplia gama de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, sacarosa, melaza, manosa, glicerol, lactato, citrato, entre otros; motivo por el cual ha sido considerado un organismo modelo para el estudio de la producción de BC (Jaramillo *et al*, 2013).

La película producida funciona como mecanismo de flotación permitiéndole a la bacteria estar en la interfase aire/líquido para obtener con mayor facilidad el O₂ necesario para su crecimiento. La película es una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y su carácter altamente higroscópico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato (Chavez-Pacheco *et al*, 2004).

II. ANTECEDENTES

Schramm y Hestrin (1953), realizaron uno de los primeros trabajos sobre producción de BC, empleando *Acetobacter xylinum* en cultivo estático. En ese estudio se encontró que la producción de celulosa es función del suministro de oxígeno, tanto para cultivo estático como agitado.

En 1954, Hestrin y Schramm desarrollaron un medio compuesto por: glucosa 20 gL⁻¹, peptona de caseína 5 gL⁻¹, extracto de levadura 5 gL⁻¹, fosfato de sodio dibásico anhidro 2.7 gL⁻¹ y ácido cítrico 1.15 gL⁻¹ a pH 6.0; a este medio se le conoce como HS y es uno de los más utilizados en estudios de producción de BC.

Dudman (1959), presentó un estudio en el cual evaluó el efecto de las condiciones del medio de cultivo para la síntesis de celulosa empleando como microorganismo *Acetobacter acetogenum* en el cual encontró que el uso de glicerol como fuente de carbono aumentó la producción un 40% a comparación de fructosa.

La composición del medio de cultivo es variable y va acorde con la cepa utilizada en el sistema, los carbohidratos son la fuente de carbono adecuada para la síntesis de BC, por ello se ha reportado la producción de celulosa en medio con fructosa, manitol, glicerol, entre otros (Ramana *et al*, 2000). En cuanto a la fuente de nitrógeno, el extracto de levadura es la fuente más empleada para el crecimiento de *G. xylinus* aunque también han sido empleados la peptona, triptona, licor de maíz y sulfato de amonio (Poyrazoglu- Biyik, 2011). Es común la adición de fosfato de sodio o potasio para amortiguar los cambios drásticos de pH aunque también se reporta el uso de sulfato o cloruro de magnesio.

En cultivo estático, la celulosa se produce en forma de una película, mientras que en cultivo agitado se produce en forma de flóculos o gránulos suspendidos en el medio de fermentación (Carreño *et al*, 2012). Los periodos de incubación son dependientes del cultivo; en agitación se emplean lapsos de 24 a 72 h mientras que el cultivo estático requiere de periodos largos que van desde una semana hasta dos.

Shoda y Sugano (2005), describen los últimos avances de la ingeniería en diseño y tipos de reactores así como la importancia de la agitación mecánica en la producción de este biopolímero; así mismo también describen los aspectos genéticos para mejorar la producción de BC de la bacteria *G. xylinus*. Posteriormente, Carreño *et al* (2012) presentaron un estudio acerca del efecto de las condiciones del medio de cultivo (agitado y estático) sobre la producción de BC empleando como microorganismo *G. xylinus*.

Sin embargo, no sólo se ha estudiado a *G. xylinus* en cuanto a las condiciones que necesita para producir celulosa; también se ha descrito la biosíntesis de dicho biopolímero encontrándose que para la biosíntesis de BC dos vías importantes operan en esta bacteria: el ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. La biosíntesis de BC (Fig. 1) se realiza a partir de glucosa la cual es transportada al interior de la célula y por acción de las enzimas glucoquinasa, fosfoglucomutasa y UDPG-pirofosforilasa presentes en la bacteria; transforman a la glucosa en UDP-glucosa el cual es el sustrato de la enzima celulosa sintasa; encargada de realizar la polimerización (Chavez-Pacheco *et al.*, 2004). Debido a las rutas metabólicas que operan en este microorganismo se conoce que la bacteria puede sintetizar glucosa “*de novo*” a partir de ácido láctico, ácido succínico, además de otros intermediarios del ciclo de Krebs como el glicerol.

Tabla 1. Condiciones de extracción de BC.

AUTOR	EXTRACCIÓN DE BC
Trovatti <i>et al</i> , 2011.	Se removió el medio de cultivo mediante centrifugación. El <i>pellet</i> se trató con solución de NaOH 0.5 M a 90 °C por 30 min para eliminar las células. Posteriormente, la celulosa se lavó con agua destilada hasta el blanqueamiento y su neutralidad. La celulosa purificada se secó a 105 °C.
Zeng <i>et al</i> , 2011 (A).	El caldo de fermentación se separó mediante centrifugación, el <i>pellet</i> se lavó con agua destilada y se centrifugó de nuevo. El proceso de lavado se repitió 3 veces. El <i>pellet</i> se trató con una solución de NaOH 1% (p/v) a 90 °C por 30 min. La celulosa purificada se lavó nuevamente con agua destilada, y se secó a 60 °C por 24 h.
Zeng <i>et al</i> , 2011 (B).	El producto obtenido fue separado del medio de cultivo mediante centrifugación. El <i>pellet</i> se procesó con una solución de NaOH 1% por 20 min en un baño de agua a ebullición. Después se lavó la celulosa purificada hasta la neutralidad.
Ummartyotin <i>et al</i> , 2011.	La celulosa fue extraída de Nata de coco. La Nata de coco se enjuagó con agua destilada y se mezcló. La suspensión de celulosa se trató con solución de NaOH 0.1 M a 80 °C por 20

	<p>min. La celulosa purificada se lavó a fondo con agua destilada hasta pH neutro.</p>
Mohammadkazemi <i>et al</i>, 2014.	<p>Las películas de celulosa producidas fueron lavadas con agua y con una solución de NaOH 1% a 80 °C por 1 h y posteriormente se lavó con agua hasta pH neutro.</p>
Poyrazoglu-Biyik, 2011.	<p>Los flóculos de celulosa se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación, y se lavaron con agua destilada y se trataron con una solución de NaOH 4% (w/v) a 80 °C por 1 h. Posteriormente, la celulosa se enjuagó con ácido acético 6% y después con agua destilada hasta pH neutro.</p>
Suwanposri <i>et al</i>, 2013.	<p>Las películas de celulosa fueron extraídas y lavadas tres veces con agua destilada y se purificaron por calentamiento con una solución de NaOH 2% a 121 °C por 15 min. Se secaron a 80 °C.</p>

III. JUSTIFICACIÓN

La extracción de celulosa a partir de fuentes vegetales presenta varias desventajas debido a la lenta producción y a la dificultad de extraer grandes cantidades de biopolímero puro. Un ejemplo de ello es la industria papelera que genera diversos problemas ambientales al producir papel y otros subproductos a partir de celulosa vegetal, ya que emplea disolventes tóxicos para eliminar hemicelulosa, lignina y aceites, entre otras sustancias.

Por estas razones, muchas investigaciones se han enfocado a la producción de celulosa a partir de microorganismos (BC) como un metabolito primario asociado al crecimiento, siendo así que bacterias del género *Gluconacetobacter* son utilizados ampliamente en la producción de celulosa a nivel industrial.

Desde hace años, la BC ha generado grandes expectativas teniendo un amplio uso en la industria papelera, textil, alimentaria, médica entre otras referencias.

Es por lo anterior que este proyecto tiene la finalidad de estudiar la producción y caracterización de BC utilizando a *Gluconacetobacter xylinus* ATTC 700178 como microorganismo productor en cultivo sumergido con altas expectativas de generar un biopolímero que sea biocompatible, no tóxico, y con propiedades semejantes a las que posee la celulosa vegetal.

IV. HIPÓTESIS

La aireación y la relación carbono-nitrógeno son factores que influirán en el rendimiento de la celulosa en un cultivo sumergido de *G. xylinus*.

V. OBJETIVOS

V.1. General

Estudiar la producción microbiana de celulosa por cultivo sumergido de *G. xylinus*.

V.2. Particulares

- Estandarizar el inóculo para la producción de celulosa en cultivo sumergido.
- Determinar el efecto de la agitación en la producción de celulosa mediante cultivo sumergido.
- Establecer el método de purificación del biopolímero.
- Determinar el efecto de la relación carbono-nitrógeno del medio de cultivo de la producción de celulosa.
- Caracterizar físicoquímicamente el biopolímero producido.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa de *Gluconoacetobacter xylinus* de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC No. 700178), se propagó en medio YGC (Extracto de levadura, glucosa y carbonato de calcio) (Tabla 2). Se incubó a 30 °C por 48 h y se mantuvo a 4 °C. Una vez propagado fue observado al microscopio óptico para verificar la existencia y su morfología haciendo uso de la tinción de Gram.

Tabla 2. Composición del medio de YGC.

REACTIVO	CANTIDAD (gL ⁻¹)
Glucosa	50
Extracto de Levadura	5
CaCO ₃	12.5
Agar Bacteriológico	15

VI.1.1 Estandarización de inóculo.

Previamente a la preparación del inóculo, se llevó a cabo la estandarización del mismo. Para ello se realizó una curva de crecimiento de la bacteria y se utilizó la técnica de dilución y siembra en placa para el conteo de colonias.

La curva de crecimiento se realizó utilizando el medio HS, se inoculó y se incubó a 30°C. Durante las primeras 48 h se tomaron muestras cada 2h posteriormente cada 24 h hasta por 144 h. Se midió la turbidez de la muestras mediante densidad óptica a 560 nm.

En condiciones asépticas se tomó 1 mL del cultivo al tiempo y se diluyó en un matraz Erlenmeyer con 99 mL de solución salina isotónica (SSI) (dilución 10⁻²). Se hicieron diluciones centesimales del cultivo hasta 10⁻⁸. Se depositaron 100µL de cada una de las diluciones (10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸) en placas con agar HS y se distribuyeron en toda la superficie de la caja con una varilla de vidrio doblada en

“L”, previamente esterilizada. Se incubaron las placas en forma invertida a 30°C de 24 a 48 h hasta observar crecimiento y se realizó el conteo de colonias viables.

VI.1.2 Preparación del inóculo.

Habiendo estandarizado el inóculo, se realizó un pre-inóculo con la finalidad de activar a la bacteria. El inóculo que se utilizó en cada uno de los experimentos en el biorreactor consistió de 250 mL de medio HS inoculado con el 5% v/v de bacteria. Se incubó a 30° C por 48 h sin agitación.

VI.2 Cultivo Sumergido

La producción de celulosa en cultivo sumergido se realizó en un biorreactor de 3.5 L el cual se trabajó al 64% de su capacidad nominal, empleando 2 L de medio de cultivo HS (Schramm-Hestrin, 1953). En cada fermentación se controló la temperatura a 30 °C, la agitación a 100 rpm y la aireación a 1 vvm durante 144 h, siguiendo lo propuesto por Monhammadkazemi (2014) y Poyrazoglu (2011). Se utilizó el medio de cultivo HS (Czaja *et al*, 2004) (Tabla 3), se esterilizó a 121 °C durante 15 min y se ajustó el pH inicial a 6.0 con HCl o NaOH en una concentración 0.1 N, según fuera el caso; posteriormente, el pH no se controló durante la fermentación en ningún experimento.

Tabla 3. Composición del Medio Hestrin- Schramm.

REACTIVO	CANTIDAD (gL⁻¹)
Glucosa	20
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	5
Fosfato de potasio dibásico anhidro	2.7
Ac. Cítrico monohidrato	1.15

VI.2.1 Cultivo sumergido para la producción de celulosa en matraces.

La primera etapa consistió en la evaluación de la capacidad productora de celulosa que posee *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178. Dicha evaluación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer empleando el medio HS (Hestrin-Schramm, 1953). Se inoculó el medio con la bacteria (5%) y se incubó a 30° C aproximadamente un mes. En esta etapa se determinó la concentración de BC obtenida después del tiempo de fermentación indicado anteriormente.

VI.2.2 Cultivo sumergido para la producción de celulosa en biorreactores.

Como segunda etapa se llevó a cabo la producción de BC empleando un biorreactor (fabricación propia) con capacidad nominal de 3.5 L y capacidad de trabajo de 2L. El tiempo del cultivo fue de 144 h durante los cuales se tomaron muestras de 30 mL cada 24 h para determinar consumo de glucosa, biomasa y pH. Estas muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente, se filtró el sobrenadante de cada una de las muestras con el uso de papel Whatman No. 44 y se guardaron el sobrenadante y el *pellet* para su posterior tratamiento.

VI.2.2.1 Efecto de la aireación en la producción de celulosa en condiciones estáticas y agitadas.

Para evaluar el efecto de la aireación sobre la producción de BC de *G. xylinus* se llevaron a cabo experimentos en condiciones estáticas (sin agitación) y otros en condiciones agitadas- aireadas utilizando 100 rpm y 1 vvm, respectivamente. En ambos experimentos se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente (VI.2). Se tomaron muestras por duplicado cada 24 h para determinar el consumo de la fuente de carbono, la biomasa y el pH.

VI.2.2.2 Efecto de la relación C/N en la producción de celulosa.

Para conocer la influencia de la relación C/N se procedió a evaluar la producción de celulosa en condiciones agitadas-aireadas variando la concentración de glucosa a 10, 20, 40 y 60 gL⁻¹. Mientras que la fuente de nitrógeno se mantuvo constante en cada uno de los experimentos. La evaluación del efecto de estas concentraciones se llevaron a cabo en un biorreactor en el cual se mantuvo constante el medio de cultivo HS, el volumen del mismo (2 L) el tamaño del cultivo (5% v/v bacteria), la temperatura (30°C), la agitación (100rpm) y la aireación (1vvm).

El tiempo de fermentación fue de 144 h para cada uno de los reactores, sin control del pH. Se tomaron muestras cada 2 h hasta 48 h y posteriormente cada 24 h hasta completar 144 h. Se determinó el consumo de glucosa, la biomasa, el pH y la concentración de celulosa.

VI.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS

VI.3.1 Determinación del consumo de glucosa.

La concentración de glucosa fue determinado mediante el método de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). Para tal fin, previamente se realizó una curva estándar de glucosa (XI.1 Anexo).

Dicha determinación se llevó a cabo de la siguiente manera: se adicionaron 0.5 mL de muestra y 0.5 mL del reactivo de DNS. Los tubos se colocaron en baño de agua a 100° C por 7 min. Después se colocaron en hielo para enfriarlos y así detener la reacción. Posteriormente se agregaron 4 mL de agua destilada, se agitaron vigorosamente y se determinó la absorbancia a 575 nm en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic "Genesys 6"). Cada muestra se leyó por triplicado.

VI.3.2 Determinación del crecimiento microbiano.

La biomasa (BM) se separó del medio de cultivo mediante centrifugación a 10,000 rpm y se determinó mediante gravimetría, secando la muestra a 105 °C por 24 h.

VI.3.3 Determinación de la producción de celulosa.

Para la determinación de la BC se purificaron las muestras de biomasa para separar el biopolímero de la bacteria, posteriormente se cuantificó mediante gravimetría, secando las muestra a 105 °C por 24 h, respectivamente.

VI.3.4 Determinación del pH.

Para estudiar el comportamiento del pH, este se midió en cada uno de los experimentos realizados en el presente proyecto (matraces y reactores) con un potenciómetro (Hanna Instruments pH 216, Microprocessor pH meter).

VI.4 PURIFICACION DE BC.

El método de purificación empleado fue el descrito por Trovatti *et al* (2011). En el cual, el caldo de fermentación fue separado de la biomasa y celulosa producida mediante centrifugación a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente se colectó el precipitado y se sometió a un tratamiento con solución de NaOH 0.5 M a 90 °C por 30 min en agitación. Se centrifugó el *pellet* tratado a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Este procedimiento se repitió tres veces con el propósito de separar las células bacterianas de la celulosa. Posteriormente, la celulosa purificada se lavó con agua destilada hasta llegar a pH neutro (7). Después de cada lavado se recuperó el *pellet* mediante centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente, la celulosa purificada se secó a 105 °C. Cabe mencionar que este método se aplicó a las primeras muestras obtenidas en la evaluación de la capacidad productora de celulosa y en el primer ensayo en el biorreactor.

VI.4.1 Modificación de las condiciones de purificación de celulosa.

Para establecer las condiciones del método de purificación se revisaron en la bibliografía las condiciones de extracción de BC las cuales se describen en la Tabla 1, encontrándose como diferencia una serie de lavados con agua destilada antes del tratamiento alcalino y las concentraciones de NaOH (0.25 y 0.5 M).

Se probaron los lavados con agua destilada previo al tratamiento alcalino así como también ambas concentraciones de NaOH. Se integraron al método de purificación original donde el lavado con agua destilada se repitió tres veces para eliminar los residuos del medio que aún estuvieran presentes. Mientras tanto, para probar las dos concentraciones de NaOH se asignó una muestra de celulosa para cada concentración. El tratamiento alcalino se repitió tres veces. El resto del método se llevó a cabo y se determinó la concentración en g_{BC}/L de medio de cultivo.

VI.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CELULOSA

La celulosa producida en cada una de las etapas de este proyecto se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X y peso molecular (Mv) con el objeto de verificar la pureza y la existencia de los grupos funcionales característicos de la celulosa, para conocer la morfología y el índice de cristalinidad (I_{CR}) del mismo.

VI.5.1 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR).

La espectroscopia se realizó en un equipo ATR-FTIR (Perkin Elmer Spectrum 100, Inglaterra) aplicando 32 barridos para la muestra de 4000 a 650 cm^{-1} .

VI.5 .2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Una vez que se secaron las muestras se procedió al montaje de las mismas en porta-muestras, se cubrieron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 5900 LV, Tokio).

VI.5 .3 Índice de cristalinidad (I_{CR}).

El I_{CR} del biopolímero producido fue determinado por difracción de rayos X de polvo en aire, a temperatura ambiente usando un difractómetro (Bruker Advance D-8) con la geometría de Bragg-Brentano θ - θ , la radiación Cu Ka, un filtro de Cu-Ni Kb 0,5% en la viga secundaria y un detector de tira de silicio unidimensional positivo-sensible. La intensidad de difracción como una función del ángulo 2θ se midió entre 5 y 70° , con un paso 2θ de 0.02037° , y 0.400 s por punto.

El I_{CR} se determinó usando la ecuación de Focher (1990) (Ecuación. 1)

$$I_{CR} (\%) = \left[\frac{I_{020} - I_{am}}{I_{020}} \right] * 100 \quad (1)$$

Donde I_{020} es la intensidad máxima de la región cristalina e I_{am} es la intensidad de la región amorfa.

VI.5 .4 Peso molecular (M_v).

El peso molecular del biopolímero se determinó mediante viscosidad intrínseca. En esta prueba, se disolvió 0.1 g de celulosa en 25 mL de dimetilacetamida con 9% de cloruro de litio (Schult *et al.*, 2002) en baño maría a 40 °C. Una vez disuelta la celulosa, se filtró dicha solución con una malla metálica # 100 y se hicieron diluciones (XI.3 Anexo). Mediante gravimetría se determinó la concentración real de la solución preparada.

El M_v se determinó usando la ecuación de Mark-Houwink- Sakurada (Ecuación 2)

$$[\eta] = kM^a \quad (2)$$

Donde η es la viscosidad intrínseca, k y a son constantes que dependen particularmente del sistema solvente-polímero, teniendo así que para este sistema se manejó una k de 1.278×10^{-4} y una a de 1.19; siguiendo lo reportado por McCormick *et al* (1985).

VI.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para datos balanceados en el que las variables dependientes fueron el consumo de glucosa y proteína soluble (para estos casos los datos se presentaron con mediciones por triplicado); así como el pH, biomasa y concentración de celulosa para las cuales las determinaciones se realizaron por duplicado; cada uno con sus respectivas desviaciones estándares. La variable independiente fue el tiempo. Se realizaron pruebas de comparación múltiple de medias por Tukey – Kramer con el paquete estadístico NCSS con una $p \leq 0.05$. Así mismo, se utilizó el modelo matemático *Gompertz* para ajustar los datos experimentales de consumo de glucosa, biomasa, pH y concentración de celulosa (Ecuación. 3)

$$X = Ae(-be^{(-\mu t)}) \quad (3)$$

Donde A es la máxima producción o consumo correspondiente al parámetro evaluado estimado por el modelo, b es un parámetro no biológico relacionado a las condiciones iniciales del cultivo, μ es la tasa de crecimiento o de producción de BC y t es el tiempo (Winsor, 1931).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Estandarización del inóculo.

Gluconacetobacter xylinus ATCC 700178 es una bacteria que pertenece a la familia *Acetobacteraceae* la cual posee una alta eficiencia en la producción de celulosa y debido a ello ha sido empleada como modelo de estudio. El cultivo de *G. xylinus* para la producción de celulosa se practica en condiciones estáticas o en cultivo agitado con fines biotecnológicos (Chavez - Pacheco *et al*, 2004).

Se propagó el microorganismo, se verificó su pureza y morfología mediante la técnica de tinción de Gram, observándose que *G. xylinus*, es una bacteria Gram-negativa con morfología de bacilo corto encontrándose como individuos, pares cadenas o en pequeños grupos, tal como se aprecia en la Figura 2.

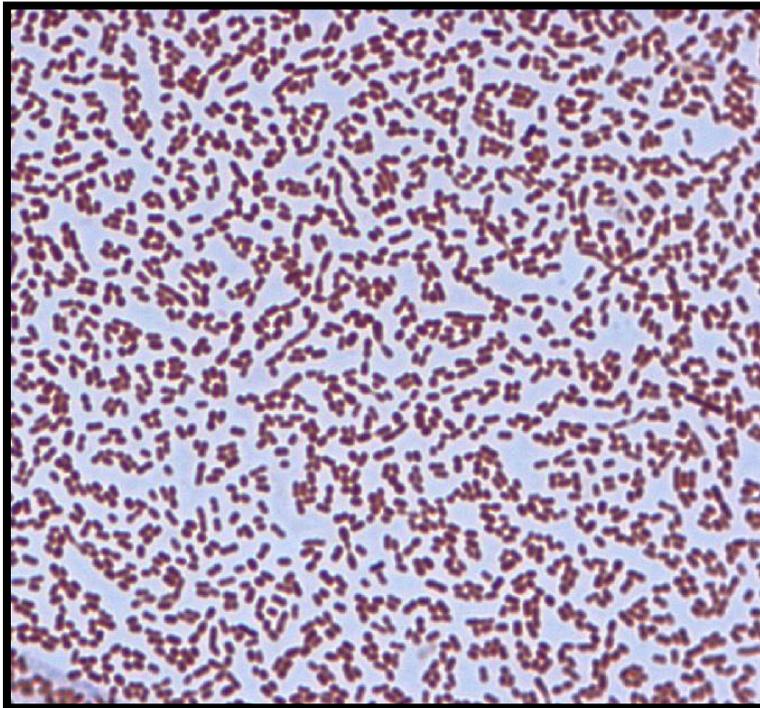


Figura 2. Tinción de Gram de *G. xylinus* ATCC 700178 (100 X).

Se llevó a cabo la estandarización del inóculo por utilizar en la producción de BC en cultivo sumergido, se realizó una curva de crecimiento del microorganismo con la finalidad de evaluar su crecimiento en un periodo de 7 días.

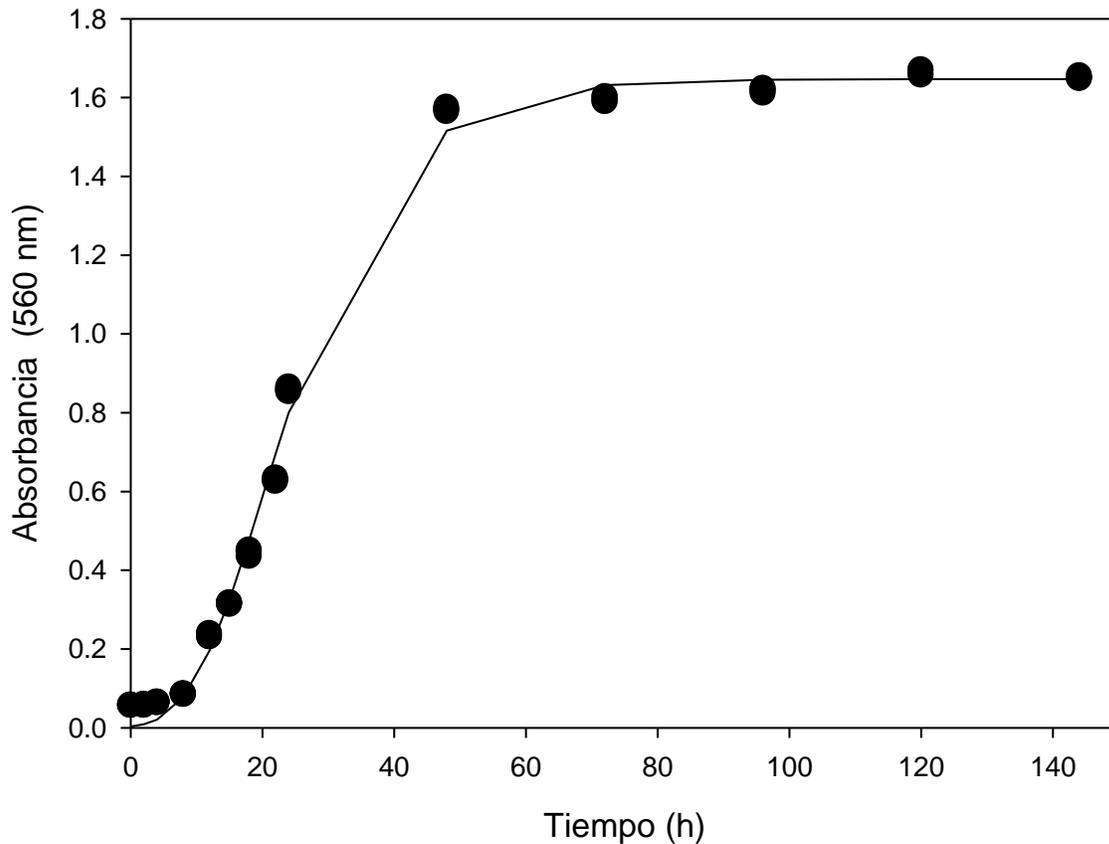


Figura 3. Curva de crecimiento de *G. xylinus* en medio HS.

En la Figura 3, se puede observar que la bacteria se adaptó a las condiciones del medio durante las primeras 8 h, posteriormente la biomasa fue aumentando durante su fase exponencial con una tasa de crecimiento de 0.09 h^{-1} .

Considerando el tiempo en que se observó la concentración máxima de biomasa, se tomó un cultivo de 48 h para realizar conteo de microorganismos viables teniendo así un total de 3.16×10^7 UFC/ mL.

VII.2 CULTIVO SUMERGIDO

VII. 2.1 Cultivo sumergido en matraces.

Como primera etapa se llevó a cabo la evaluación de *G. xylinus* en medio líquido bajo condiciones estáticas (Fig. 4) en matraces Erlenmeyer en los cuales se observó una película blanca en la superficie del medio. La producción de celulosa en estas condiciones llevó aproximadamente un mes de fermentación, obteniéndose una concentración de celulosa de 0.95 gL^{-1} . Este valor coincide con lo reportado por Mohammadkazemi *et al* (2015) quienes obtuvieron 0.85 gL^{-1} de BC al estudiar la producción de BC usando diferentes fuentes de carbono y medios de cultivo.



Figura 4. Formación de celulosa en la superficie con medio HS.

VII.2.2 Cultivo sumergido en biorreactores.

Considerando el tiempo prolongado requerido para producir celulosa en un cultivo estático; se procedió a modificar las condiciones de producción para disminuir el tiempo en la producción; de este modo se llevó a cabo un primer ensayo utilizando un cultivo sumergido en un tanque agitado-aireado.

En estas condiciones, la glucosa fue asimilada por parte de la bacteria observándose un consumo de 16 gL^{-1} a lo largo de la fermentación. Se determinó el pH el cual tuvo variaciones entre 5.8 y 6.3 (Fig. 5).

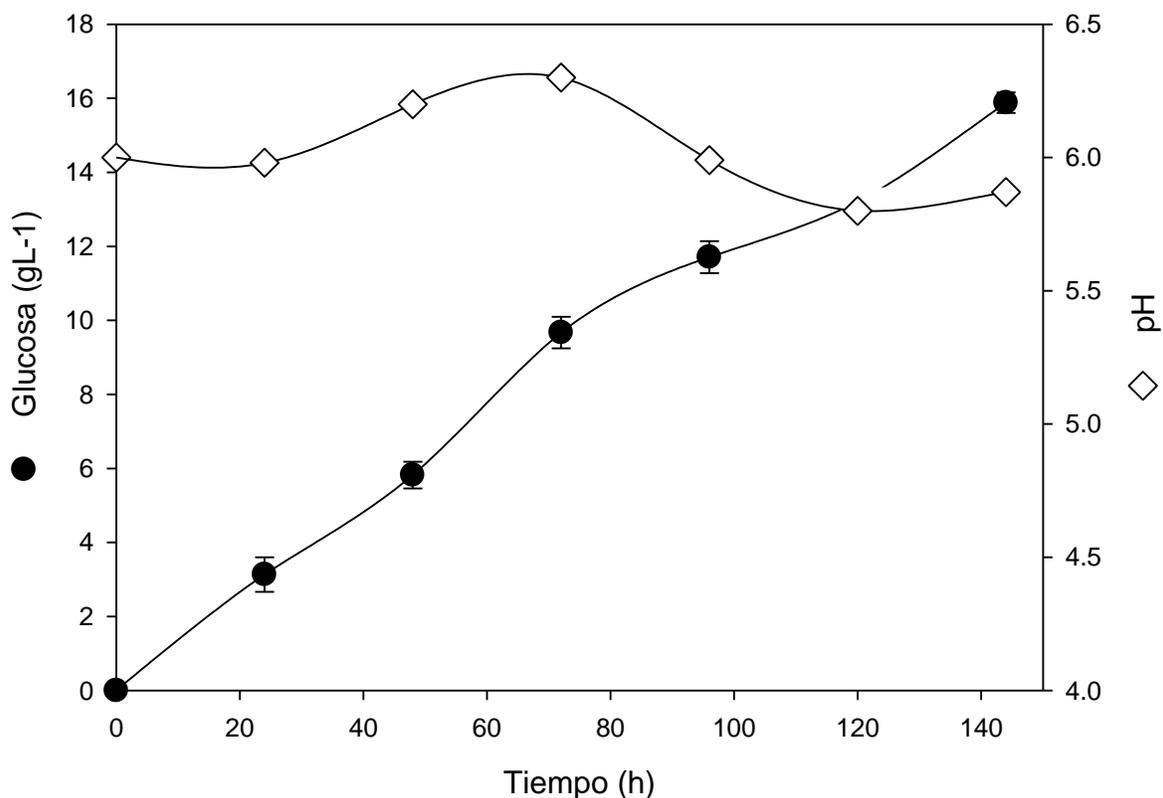


Figura 5. Concentración de glucosa y comportamiento de pH en la fermentación.

En la Figura 6 se puede observar que la bacteria creció conforme asimiló la fuente de carbono. Se observó que a las 24 h ya se había adaptado a las condiciones del medio. Posteriormente, la biomasa incrementó durante su fase exponencial con una tasa de crecimiento de 0.0349 h^{-1} la cual indica el cambio que hay en la

biomasa por unidad de tiempo. Después de las 96 h se observó que la bacteria comenzó a estar limitada de nutrientes y debido a ello inició su etapa de desaceleración para posteriormente alcanzar su estado estacionario en el cual la bacteria ya no proliferó por falta de la fuente de carbono.

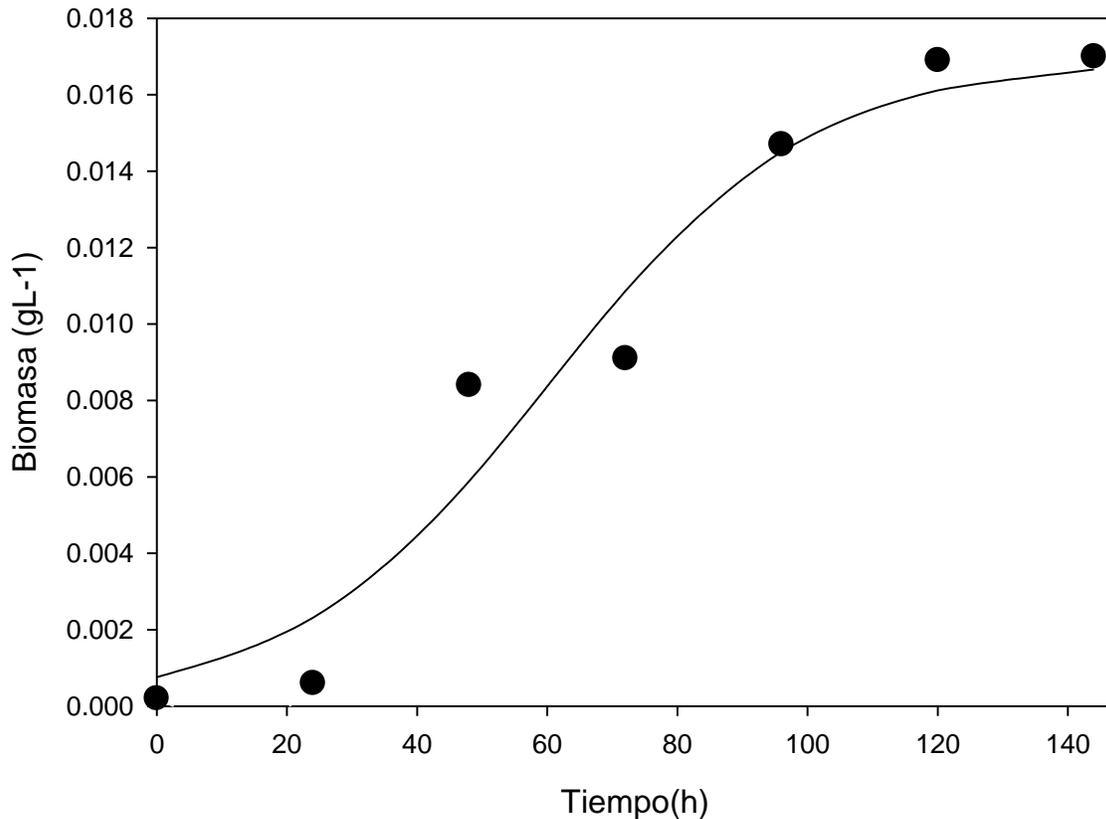


Figura 6. Crecimiento microbiano durante la fermentación.

La concentración de celulosa producida por *G. xylinus* fue de 0.995 gL⁻¹ y de 1.12 gL⁻¹ en cultivo estático y agitado, respectivamente, determinándose que no hay diferencia significativa con la agitación. No obstante, el tiempo de fermentación requerido para producir dicha cantidad de celulosa en el sistema agitado fue de una semana, mientras que para producir lo mismo en el sistema estático se requirió un mes de fermentación.

Lo anterior es similar a lo reportado por Chavez- Pacheco *et al* (2004) quienes mencionan que los periodos de producción de celulosa varían dependiendo del sistema de cultivo. Mencionado que para el sistema agitado se requieren lapsos cortos que van de 24 a 72 h hasta una semana; mientras que el cultivo estático se caracteriza por requerir periodos de cultivo largos que van de una a dos semanas y hasta 28 días.

VII.2.2.1 Evaluación del efecto de la aireación en la producción de celulosa en condiciones estáticas y agitadas.

Para poder hacer una comparación en la producción de celulosa empleando estos dos sistemas de fermentación (agitada y estática) fue necesario evaluar la producción bajo ambas condiciones en biorreactores.

- **Consumo de Glucosa**

Uno de los parámetros evaluados en ambos experimentos fue el consumo de glucosa el cual se muestra en la Figura 7, donde se puede observar que la bacteria consumió la fuente de carbono a lo largo del cultivo tanto en el experimento en condiciones estáticas como en agitadas. Sin embargo, en el sistema agitado la bacteria consumió totalmente la fuente de carbono, mientras que en el estático el consumo fue parcial, lo cual se puede atribuir a que el desarrollo de la bacteria se limitó por la menor transferencia de oxígeno.

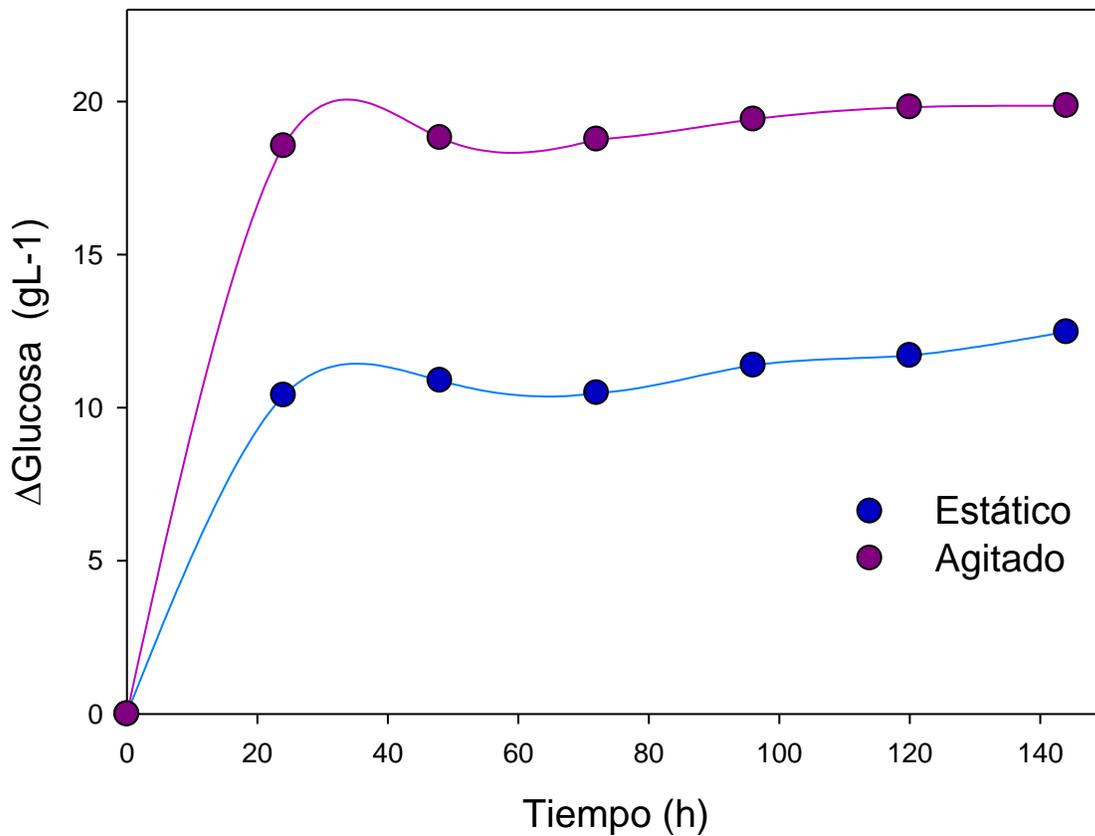


Figura 7. Consumo de glucosa durante la producción de BC.

- **Crecimiento Microbiano**

En la Figura 8 se puede observar que la bacteria fue creciendo a lo largo del cultivo conforme consumía la fuente de carbono tanto en el sistema agitado como en el sistema estático. En el sistema agitado, la bacteria se adaptó rápidamente a las condiciones del medio (10 h). Posteriormente, con el paso del tiempo la biomasa fue aumentando durante su fase exponencial. A las 48 h se pudo observar que la bacteria inició su etapa de desaceleración para alcanzar un estado estacionario en el cual ya no se multiplica por el agotamiento de la fuente de carbono.

En el sistema estático la etapa de desaceleración inició poco después de las 24 h para así alcanzar un estado estacionario en el cual la bacteria no crece por el agotamiento de la fuente de carbono. Sin embargo, el escaso crecimiento de la bacteria en el cultivo estático se puede atribuir a la limitación del oxígeno; contrastando con el abundante crecimiento en el sistema agitado por la aireación durante el tiempo de fermentación.

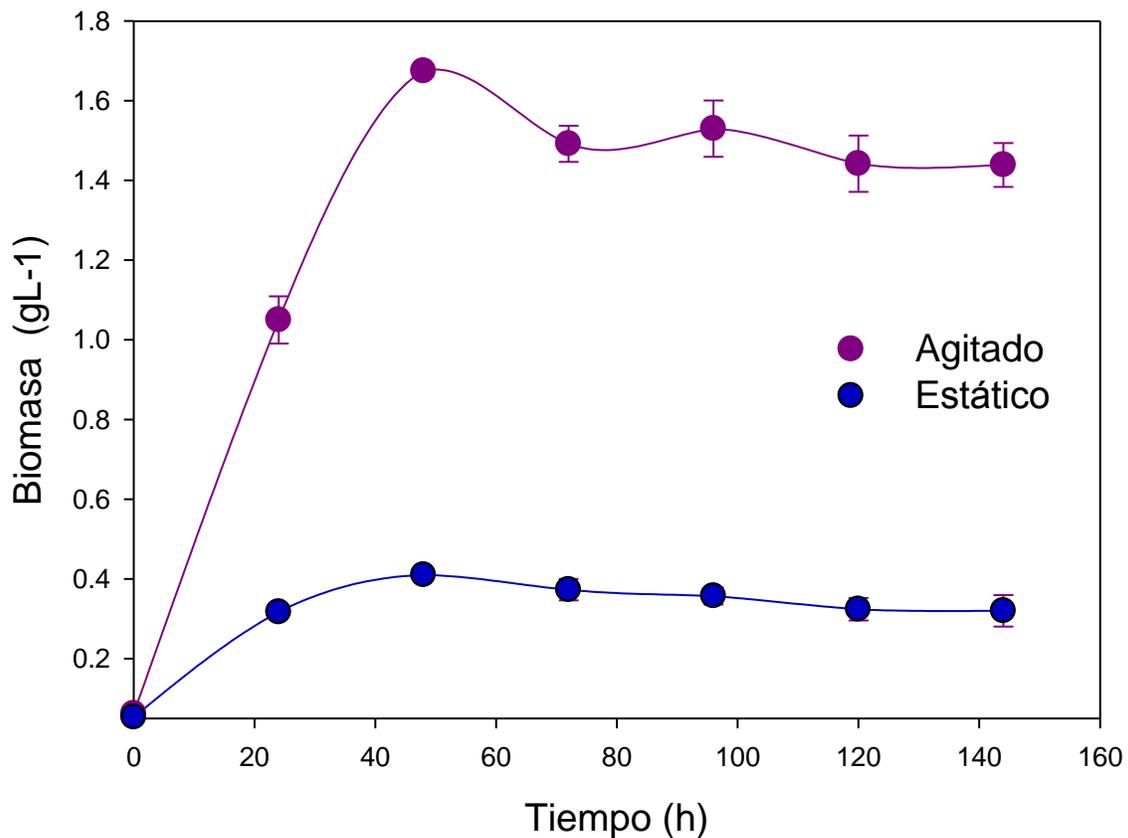


Figura 8. Crecimiento microbiano durante la producción de BC.

- **Comportamiento del pH**

En la Figura 9, se puede observar cómo el pH tuvo un comportamiento lineal en el sistema estático, presentando variaciones muy pequeñas durante el cultivo oscilando entre 5.7 y 6.01. Mientras que en el sistema con agitación, el

pH presentó una mayor oscilación (entre 5.85 y 6.5). Estos cambios en el pH pueden ser un indicio de las posibles reacciones secundarias tales como la formación de ácidos orgánicos y otros productos derivados del consumo de la fuente de carbono que tienen lugar en el medio de cultivo en la producción de celulosa (Keshk-Sameshima, 2005).

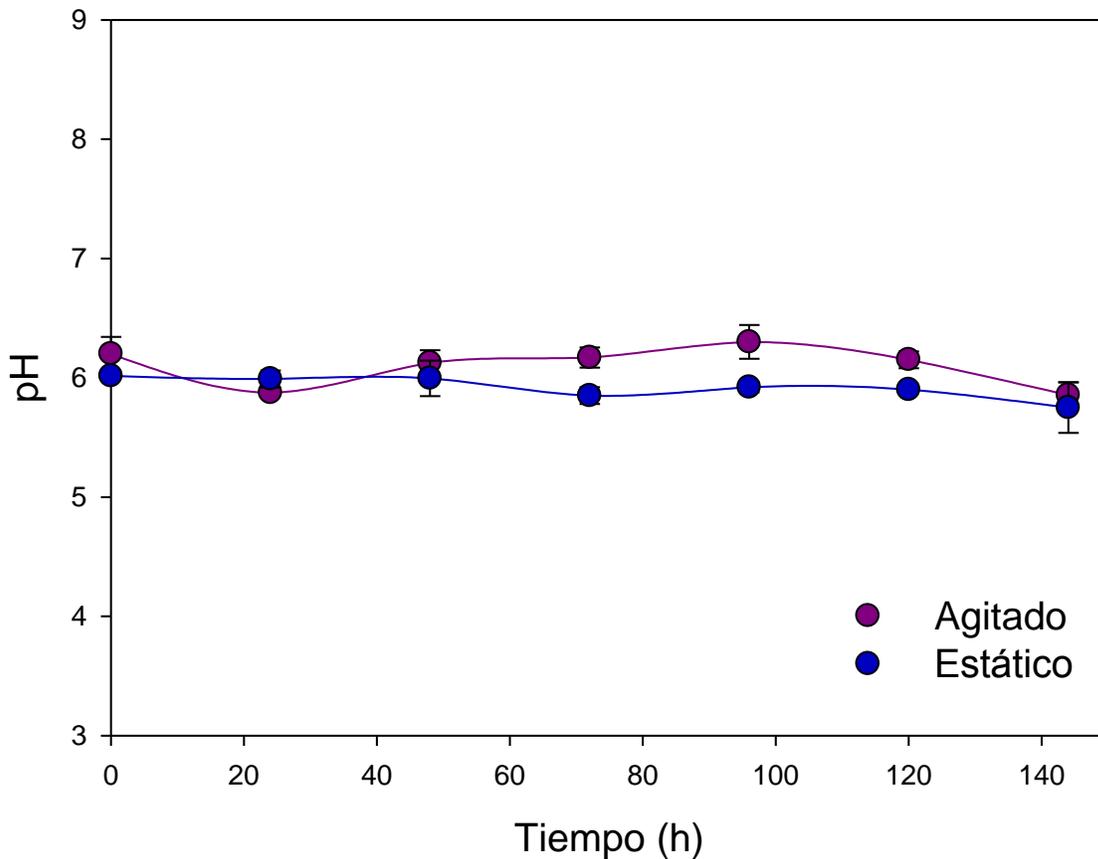


Figura 9. Evolución de pH durante la producción de BC.

Los rendimientos de celulosa obtenidos fueron de 0.036 y 0.019 g-BC/g-Glucosa obteniéndose 2 veces mayor rendimiento en el sistema agitado que en el estático. Considerando los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la aireación sobre la producción de celulosa; se infirió que la mejor condición para *G. xylinus* en la producción del biopolímero fue bajo condiciones agitadas.

Esto se puede atribuir a que *G. xylinus* es una bacteria aerobia estricta y, por lo tanto requiere de O₂ para su proliferación lo que lleva consigo un incremento en la producción de celulosa (Carreño *et al.*, 2012).

Finalmente, de esta etapa se concluyó que para evaluar el efecto de la relación C/N se emplearía el cultivo sumergido en condiciones agitadas para la producción de celulosa.

VII.2.2.2 Evaluación del efecto de la relación C/N en la producción de celulosa.

La glucosa puede ser metabolizada para ser guardada como glucógeno o para la síntesis de biopolímeros como la celulosa (Chávez-Pacheco *et al.*, 2004). A continuación se muestran los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de la relación C/N empleando diversas concentraciones de glucosa y una misma concentración de fuente de nitrógeno sobre la producción de BC en cultivo sumergido bajo condiciones agitadas-aireadas.

En el primer experimento que se llevó a cabo se consideró la concentración estándar de glucosa (fuente de carbono), peptona de caseína y extracto de levadura como fuente de nitrógeno a 20, 5 y 5 gL⁻¹ respectivamente, con una relación C/N de 7.1.

En la Figura 10 se observa cómo incrementó la producción de celulosa conforme va disminuyendo la concentración inicial de glucosa a lo largo de la fermentación, esto se debe a que la bacteria va polimerizando la fuente de carbono (Jaramillo *et al.*, 2012).

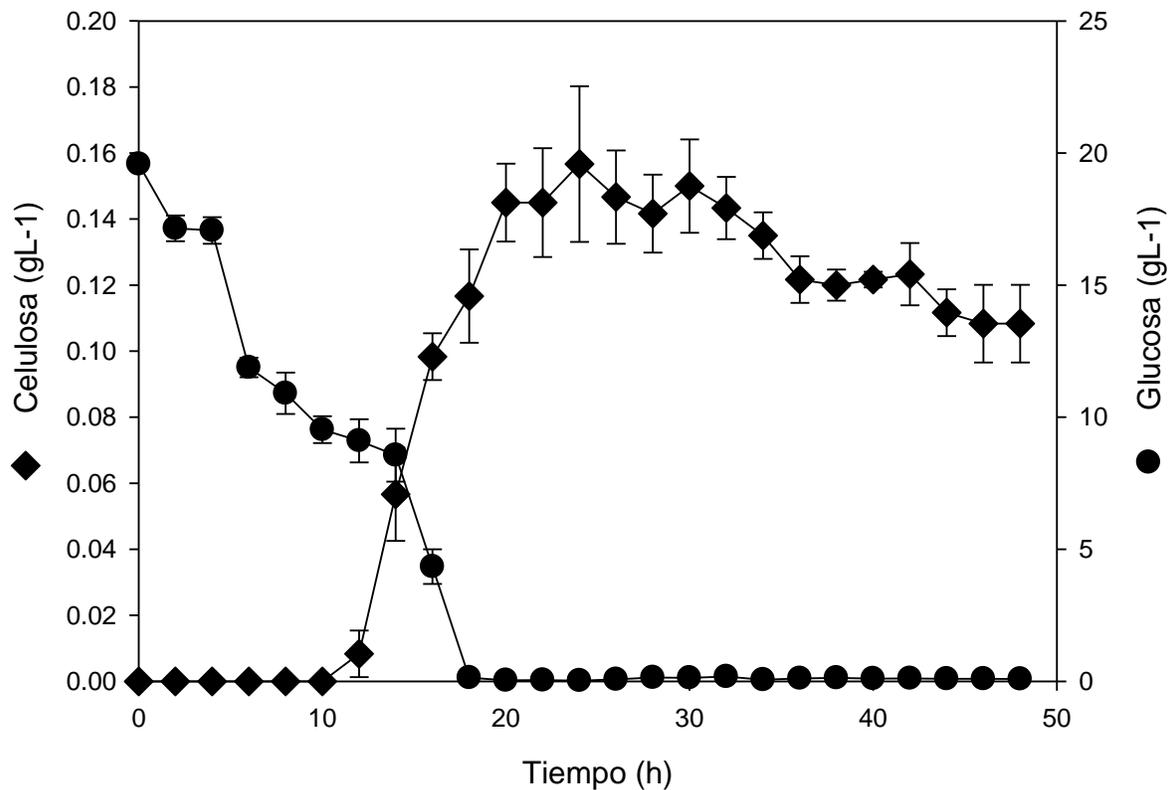


Figura 10. Concentración de glucosa y producción de BC durante la fermentación con relación C/N de 7.1.

En la Figura 11, se observa el crecimiento de la bacteria conforme fue consumiendo los nutrientes presentes en el medio. La bacteria se adaptó a las condiciones del cultivo; sin embargo, después de las primeras 10 h inició su fase exponencial y se multiplicó con una tasa de crecimiento de 0.31 h^{-1} . A las 24 h se pudo observar que la bacteria comenzó su etapa de desaceleración para después alcanzar su estado estacionario, etapa en la cual la bacteria ya no se multiplica debido a la escasez de los nutrientes. Por otro lado, el comportamiento del pH se mantuvo sin cambios significativos durante las primeras 48 h y posteriormente se observó un incremento hasta pH 7.5. Este incremento puede atribuirse a la posible presencia del ácido glucónico que al ser consumida por parte de la bacteria sin más producción de BC induce a pHs casi neutros (Wook *et al.*, 1999).

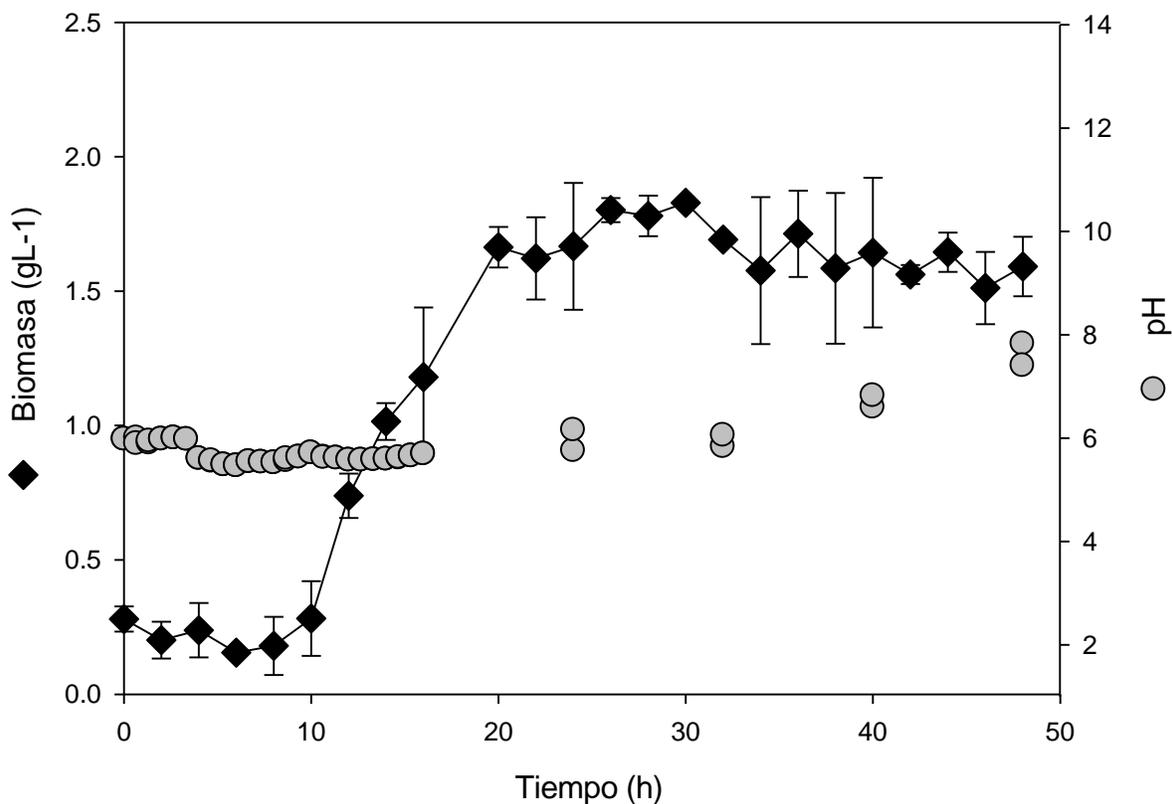


Figura 11. Crecimiento microbiano y comportamiento del pH con concentración de glucosa inicial a 20 gL⁻¹.

En la Figura 12 se muestran los resultados de la determinación de proteína soluble por el método de Lowry-Peterson (1977)(XI.2. Anexo) a través de la fermentación, la cual permaneció constante durante las primeras 10 h de la fermentación. Posteriormente, presentó un ligero descenso de las 12 a las 48 h.

Debido a este cambio en la concentración de la proteína se realizó un análisis estadístico (XI.4 Anexo) con los datos obtenidos el cual mostró que no hay diferencia significativa en la concentración de proteína soluble a lo largo de la fermentación, concluyendo que, para continuar con la evaluación de la relación C/N, sólo se debía variar la fuente de carbono mientras que la fuente de nitrógeno debía mantenerse constante en cada uno de los experimentos. Esta inferencia se apoyó por los resultados de Ramana *et al* (2000) quienes estudiaron el efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de celulosa, y

encontraron que la fuente de nitrógeno óptima varía dependiendo del microorganismo así como de la fuente de carbono que se empleen para tal fin. En su estudio mencionan que con extracto de levadura y glucosa obtienen la mayor producción de BC en comparación con el uso de sulfato de amonio o hidrolizado de caseína, como fuente de nitrógeno. Concluyendo que las fuentes de nitrógeno tales como la peptona y el extracto de levadura son indispensables para el crecimiento celular además de contribuir a la mejora de la síntesis de BC, por lo que se sugiere incluir fuentes de nitrógeno en el medio (Mohammadkazemi *et al*, 2014).

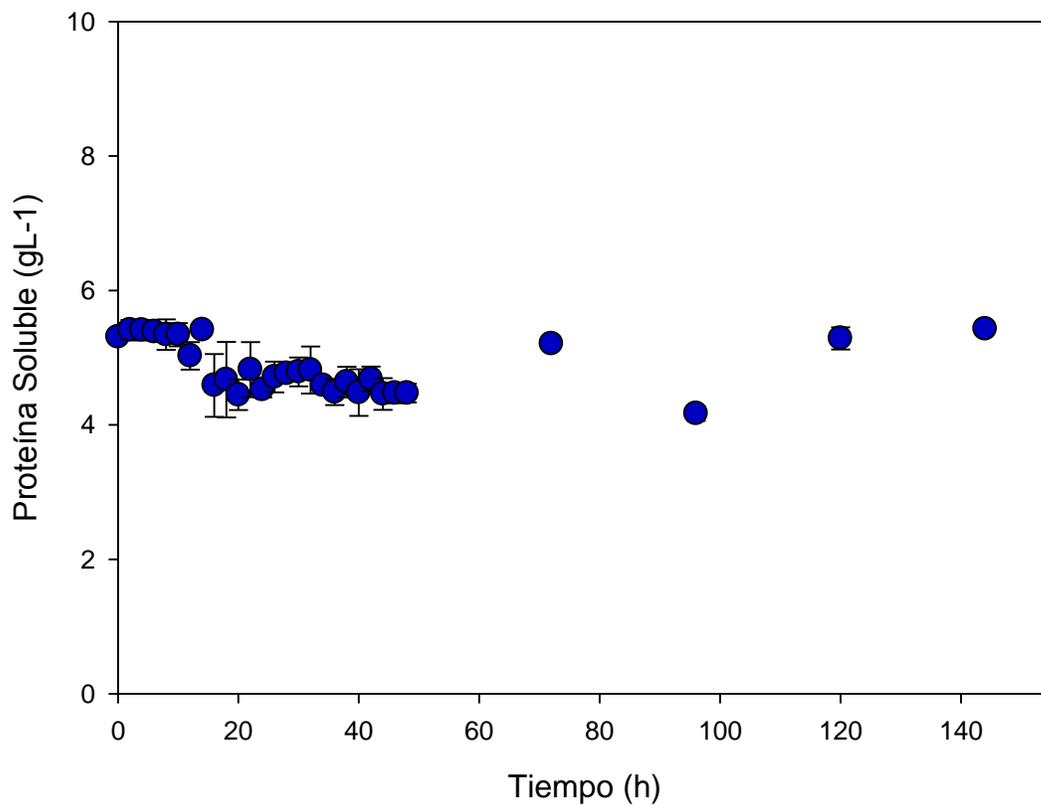


Figura 12. Determinación de proteína soluble por el método de Lowry- Peterson en un reactor con 5 gL⁻¹ de fuente de nitrógeno.

Posteriormente, se llevaron a cabo tres experimentos más en los que se probaron las siguientes concentraciones de glucosa: 10, 40 y 60 gL⁻¹ con relaciones C/N de 3.5, 14.2 y 21.2, respectivamente. Manteniendo constante la fuente de nitrógeno por las razones mencionadas anteriormente.

Los datos experimentales de consumo de glucosa, celulosa y biomasa de cada una de las relaciones C/N fueron ajustados con el modelo matemático Gompertz, el cual es ampliamente utilizado para ejemplificar el crecimiento de microorganismos. Así mismo, dichos datos se analizaron mediante ANOVA y comparación múltiple de medias por Tukey – Kramer con el paquete estadístico NCSS. Es importante mencionar que cada uno de los experimentos tuvo un tiempo de fermentación de 144h. Sin embargo, al realizar los ajustes al modelo se observó que después de las 48 h no había diferencia significativa en la concentración de glucosa, la biomasa, y la producción de celulosa.

Debido a esto todos los ajustes se realizaron considerando los datos hasta las 48 h donde hubo cambios con respecto al tiempo. La concentración de proteína soluble y el pH, se ajustaron considerando todos los datos experimentales ya que en ellos se observaron diferencias para las cuales fue necesario analizar su significancia.

En la Figura 13 se aprecia cómo fue consumiéndose la concentración inicial de glucosa en cada uno de los experimentos a lo largo de la fermentación. En la Tabla 4 se muestran los valores del coeficiente de determinación (R^2) los cuales están cercanos a 1, esto nos indica que la mayoría de los datos experimentales se ajustaron bien al modelo matemático. Asimismo, se pueden apreciar las tasas de consumo de glucosa de los cultivos adicionados con 10, 20, 40 y 60 gL⁻¹ observándose que con una concentración de 60 gL⁻¹ se tiene la menor tasa de consumo respecto a las otras concentraciones.

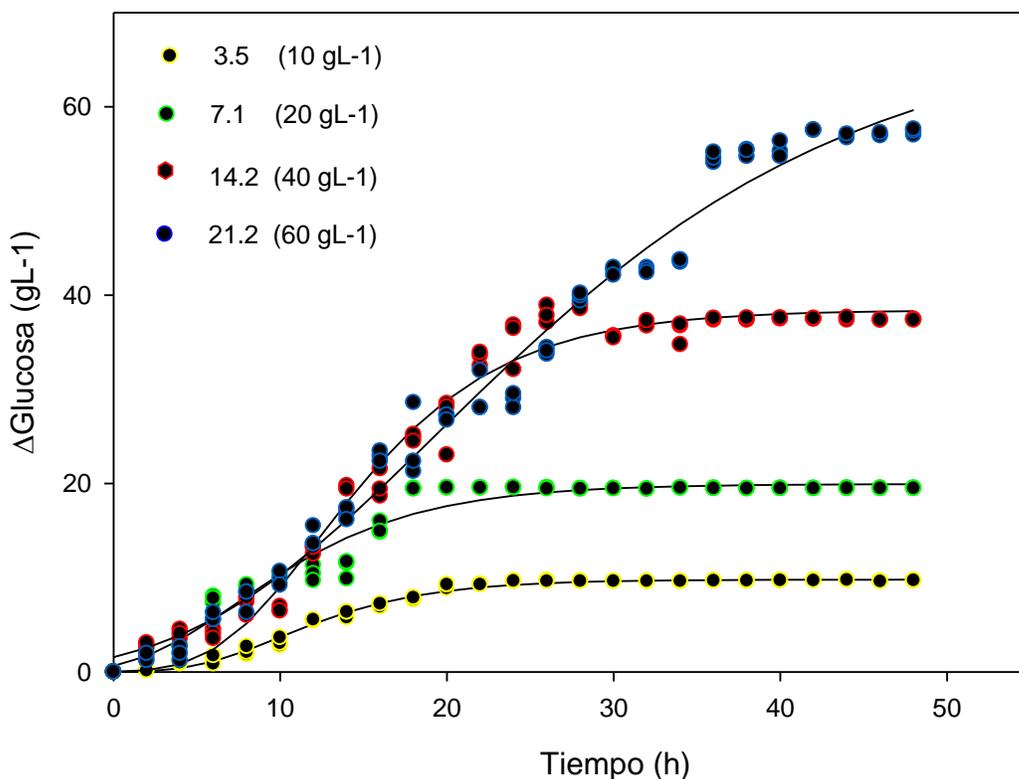


Figura 13. Concentración de glucosa a lo largo de la fermentación.

En cuanto al crecimiento microbiano, en la Figura 14 se observa cómo fue creciendo *G. xylinus* a lo largo de la fermentación conforme consumía los nutrientes presentes en el medio. Se adaptó en las primeras 10 h a las condiciones del cultivo e inició su fase exponencial (10 - 24 h). Posteriormente comenzó su etapa de desaceleración para alcanzar su estado estacionario.

En la Tabla 4 se muestran los coeficientes de determinación (R^2) observándose así que los datos experimentales de biomasa se ajustaron bien al modelo. Del mismo modo, se muestran las tasas de crecimiento microbiano, así como la concentración microbiana máxima en cada uno de los tratamientos probados. Aunque al utilizar una relación C/N de 7.1 se obtuvo la tasa de crecimiento más alta (0.31 h^{-1}), es con la relación C/N de 14.2 que se obtuvo una concentración celular mayor (3.09 gL^{-1}) en comparación a lo obtenido con las otras relaciones C/N.

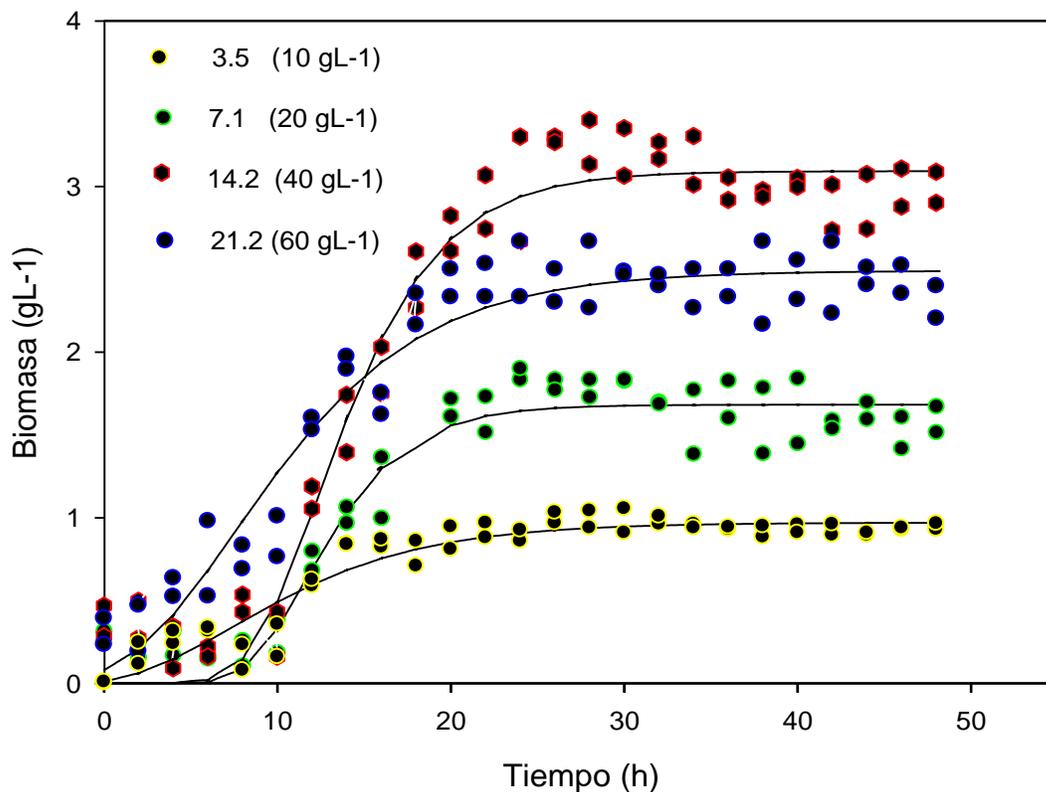


Figura 14. Crecimiento microbiano a lo largo de la fermentación.

En la Figura 15, se observa que conforme disminuyó la concentración inicial de glucosa, se incrementó la producción de celulosa a través del tiempo. La producción de dicho biopolímero fue mayor conforme se incrementó la concentración de glucosa para cada uno de los experimentos con las diferentes relaciones C/N. Sin embargo, al aumentar la concentración de glucosa a 60 gL⁻¹ hubo un decremento en la producción de dicho biopolímero que puede atribuirse a posible una inhibición debido a la acidificación del medio lo cual afecta a la viabilidad celular; por lo que se puede decir que una disminución en el pH del medio de cultivo es muy influyente sobre el crecimiento celular y la productividad de BC de *G. xylinus* (Lestari *et al*, 2013).

En la Tabla 4 se muestra una vez más que la mayoría de los datos experimentales se ajustaron bien al modelo de Gompertz teniendo así valores cercanos a 1. Así mismo, se puede observar la cantidad de producto máximo obtenido en cada uno

de los reactores, teniendo que con una relación C/N de 14.2 se obtuvo la mayor concentración de producto (0.46 gL^{-1}) en comparación con lo obtenido con las otras relaciones manejadas; es decir, con la relación C/N de 14.2 se produjeron 5.3, 3.5 y 1.4 veces más celulosa que con las relaciones C/N 3.5, 7.1 y 21.2, respectivamente. Respecto a las productividades alcanzadas con las diferentes relaciones C/N también se puede apreciar (Tabla 4) que con una relación de 14.2 se obtuvo una mayor productividad ($0.055 \text{ g-BC /g-BM}^* \text{ h}$) en comparación con lo obtenido empleando las otras relaciones C/N.

Al realizar los análisis estadísticos pertinentes (XI. 5-6 Anexo) se concluyó que la mejor relación C/N, en cuanto a la productividad y producción de celulosa, fue 14.2 con $0.055 \text{ g-BC/g-BM}^* \text{ h}$ y 0.46 gL^{-1} ; respectivamente, empleando una concentración de 40 gL^{-1} de glucosa, 5 gL^{-1} de extracto de levadura y 5 gL^{-1} de peptona de caseína.

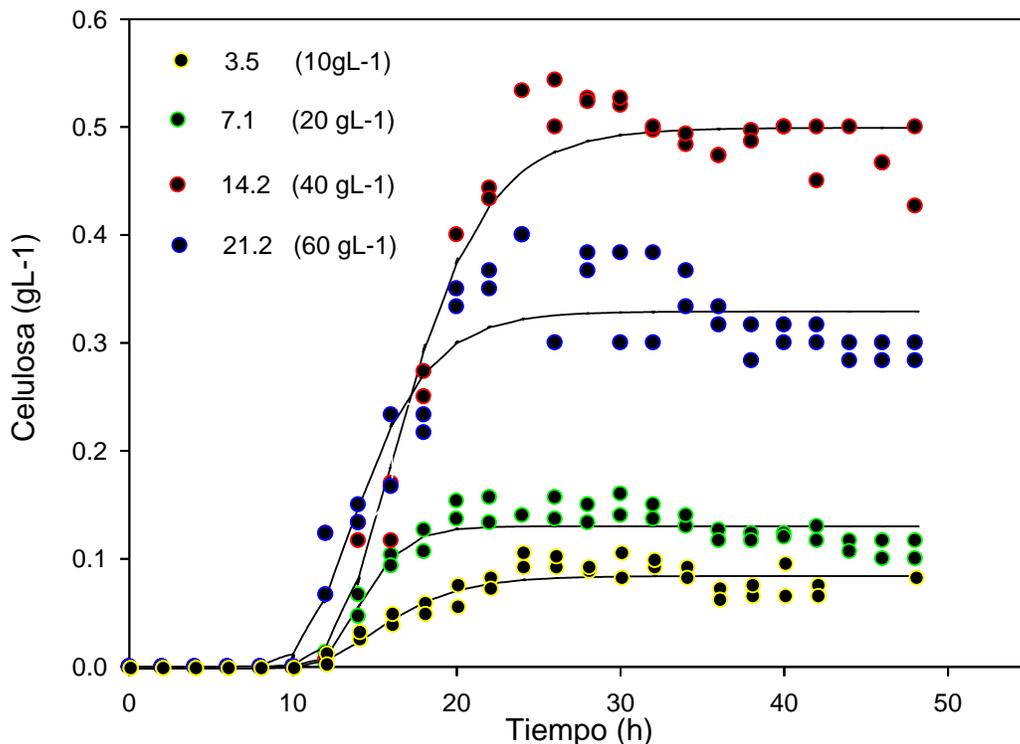


Figura 15. Producción de BC en gL^{-1} con las diferentes relaciones C/N empleadas.

En la Figura 16, se muestra la máxima producción de BC en gL^{-1} a las 24 horas de cada una de las diferentes relaciones C/N probadas, observándose que con la relación 14.2 se tuvo una concentración de 0.46 gL^{-1} la cual es significativamente mayor respecto a la concentración obtenida con las otras relaciones.

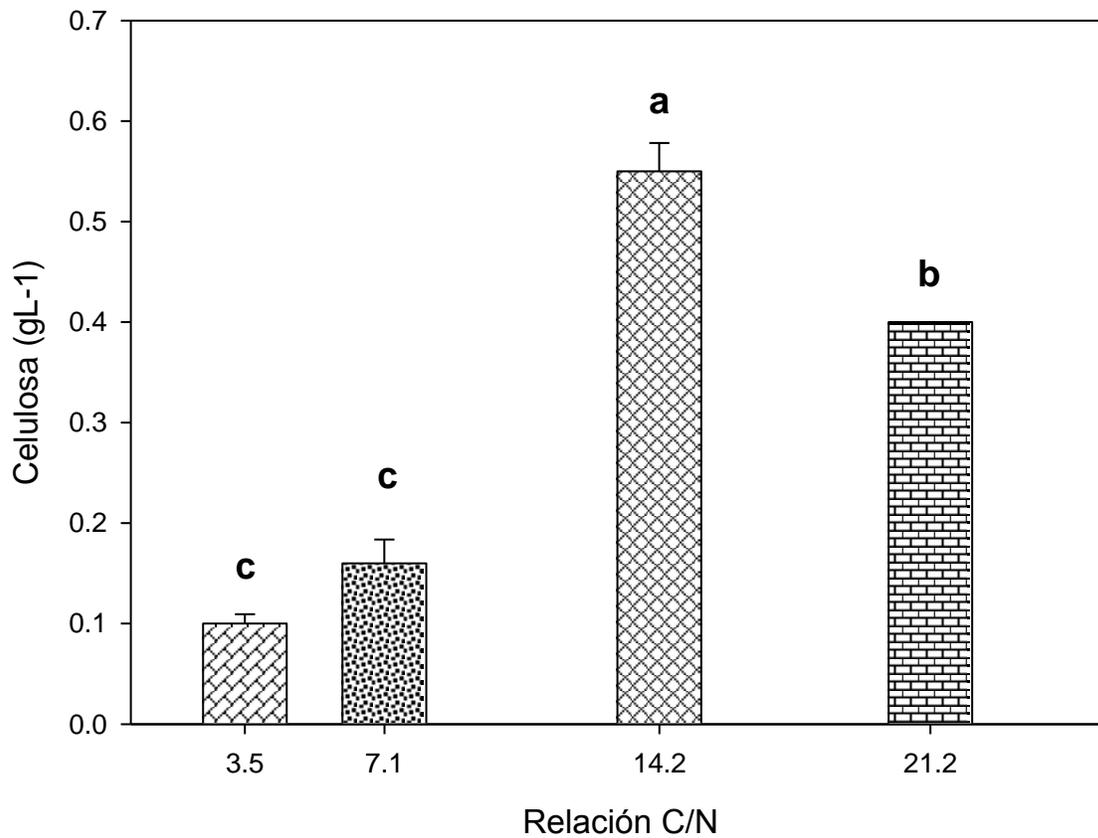


Figura 16. Máxima producción de BC en gL^{-1} a las 24h con las diferentes relaciones C/N.

Tabla 4. Parámetros Cinéticos evaluados y ajustados con la Ecuación de *Gompertz* para cada una de las relaciones C/N.

Relación C/N	GLUCOSA			BIOMASA				CELULOSA				
	A (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	R ²	A (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	R ²	Y _{x/s}	A (gL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	R ²	Y _{p/s}	Productividad ($\frac{gP}{gBiomasa \cdot h}$)
3.5	9.8	0.19	0.99	0.99	0.17	0.95	0.046	0.086	0.33	0.96	0.0052	0.019
7.1	19.9	0.16	0.98	1.68	0.31	0.97	0.071	0.13	0.62	0.97	0.0080	0.035
14.2	38.4	0.16	0.99	3.09	0.26	0.98	0.074	0.46	0.38	0.96	0.016	0.055
21.2	57.3	0.068	0.99	2.49	0.17	0.97	0.076	0.3	0.36	0.96	0.014	0.030

Datos experimentales ajustados con la ecuación de *Gompertz* donde A es el producto, consumo o biomasa máxima, μ la tasa de producción, consumo o crecimiento, R² es el coeficiente de determinación, Y_{p/s} es el rendimiento producto-sustrato, Y_{x/s} es el rendimiento biomasa-sustrato.

El comportamiento del pH también fue estudiado a lo largo de la fermentación. En la Figura 17 se puede observar que el pH no sufrió cambios las primeras 10 h en las cuatro cinéticas. Sin embargo, de las 12 a las 72 h el pH tuvo un ligero descenso, este comportamiento puede ser sustentado por lo reportado por Chawla *et al* (2009) quienes en su estudio más reciente reportan que el pH óptimo para la producción de celulosa se encuentra entre 4.5 y 6. Posteriormente, después de las 72 h el pH comenzó a incrementar alcanzando valores de 7 y 7.5 para las relaciones C/N de 3.5 y 7.1.

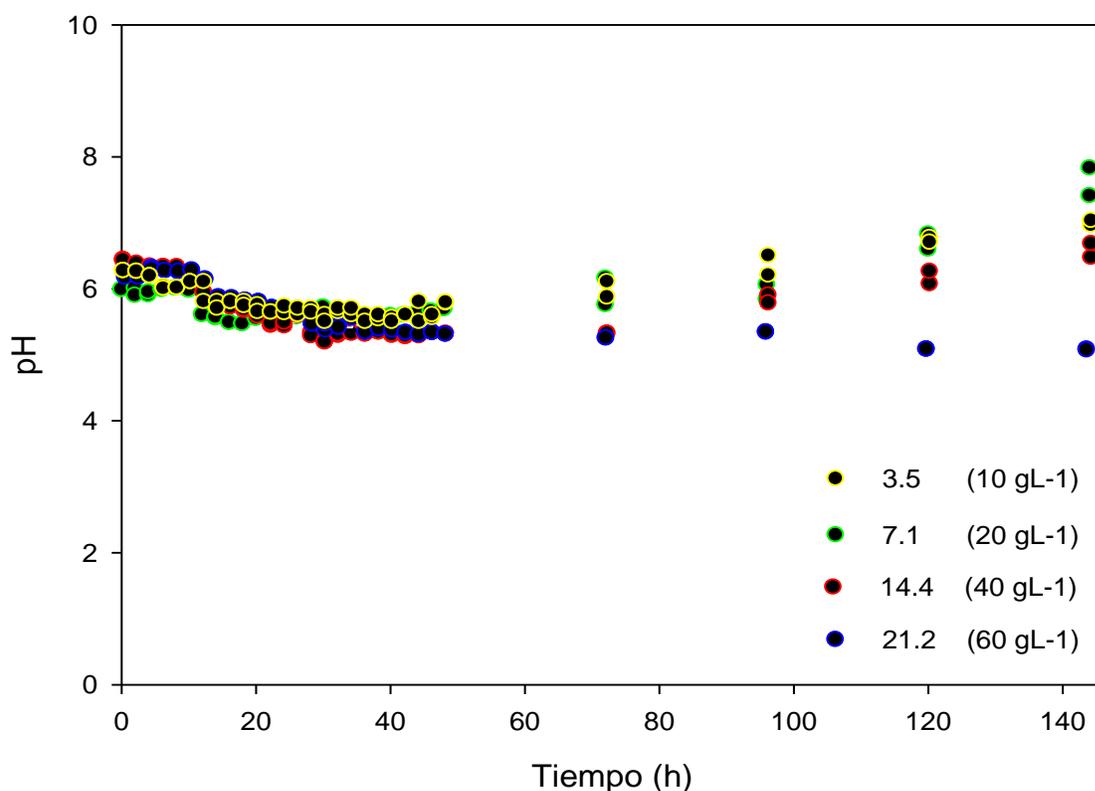


Figura 17. Comportamiento del pH a lo largo de la producción de BC.

Dicho cambio se ve reflejado en el decremento en la producción de celulosa ya que después de las 48 h la producción del biopolímero se mantuvo constante hasta finalizar el tiempo del cultivo. La relación C/N de 14.2 no presentó cambios significativos en el pH después de las 72 h, alcanzando finalmente un valor similar

al pH inicial del medio de cultivo (6.0), encontrándose aun en el rango óptimo para la producción de BC, según lo reportado por Masaoka *et al* (1992).

En el caso del reactor con relación de 21.2, el pH presentó un decremento después de las 48 h, que fue significativo según el análisis estadístico realizado (XI.7 Anexo). Esta disminución se atribuyó a la formación de ácidos orgánicos como el ácido glucónico ($pK_a = 3.86$) y ácido láctico ($pK_a = 3.5$), ya que al tener glucosa como fuente de carbono se favorece la formación de dichos ácidos por parte de la bacteria reduciendo así la cantidad de glucosa disponible para su polimerización, incrementando la acidez el medio de cultivo (Dudman, 1959).

Shoda y Sugano (2005), atribuyen los cambios en el pH a la acumulación de metabolitos secundarios debidos al consumo de glucosa y nitrógeno. Sin embargo, Ramana *et al* (2000) reportan que las fuentes de nitrógeno proteínicas pueden contribuir a la mejora de la síntesis de celulosa si se eligen adecuadamente.

VII.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE BC.

VII.3.1 FTIR

Inicialmente, se purificaron las muestras de BC con el método reportado por Trovatti *et al* (2011). Se realizó una primera caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo comparando el biopolímero producido con un estándar de celulosa vegetal (algodón “CO”). Dicho estándar muestra unas bandas a los 3333.8, 2899.9, 1160.5 y 1029.6 cm^{-1} , las cuales se encuentran en las regiones características de 3800 a 2600, entre 1200 y 900 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones de los grupos O-H y C-H, y C-O-C y C-O, respectivamente.

En la Figura 18 se muestra la comparación de los espectros del estándar de celulosa respecto a la celulosa purificada, donde se puede observar que la BC purificada cuenta con bandas en las regiones características mencionadas, observándose a los 3272, 1160.8, 1033.6 cm^{-1} ; bandas asignadas a las vibraciones de los grupos funcionales O-H, C-O-C, C-O. Sin embargo, también se observan bandas que no son características de celulosa (1634, 1403, y 1315.3 cm^{-1}) las cuales se atribuyeron a impurezas del medio de cultivo, debidas al método empleado en la purificación de la muestra ya que posiblemente no fue el adecuado. Por consiguiente, el método de purificación tuvo que mejorarse para el tratamiento de muestras celulósicas posteriores.

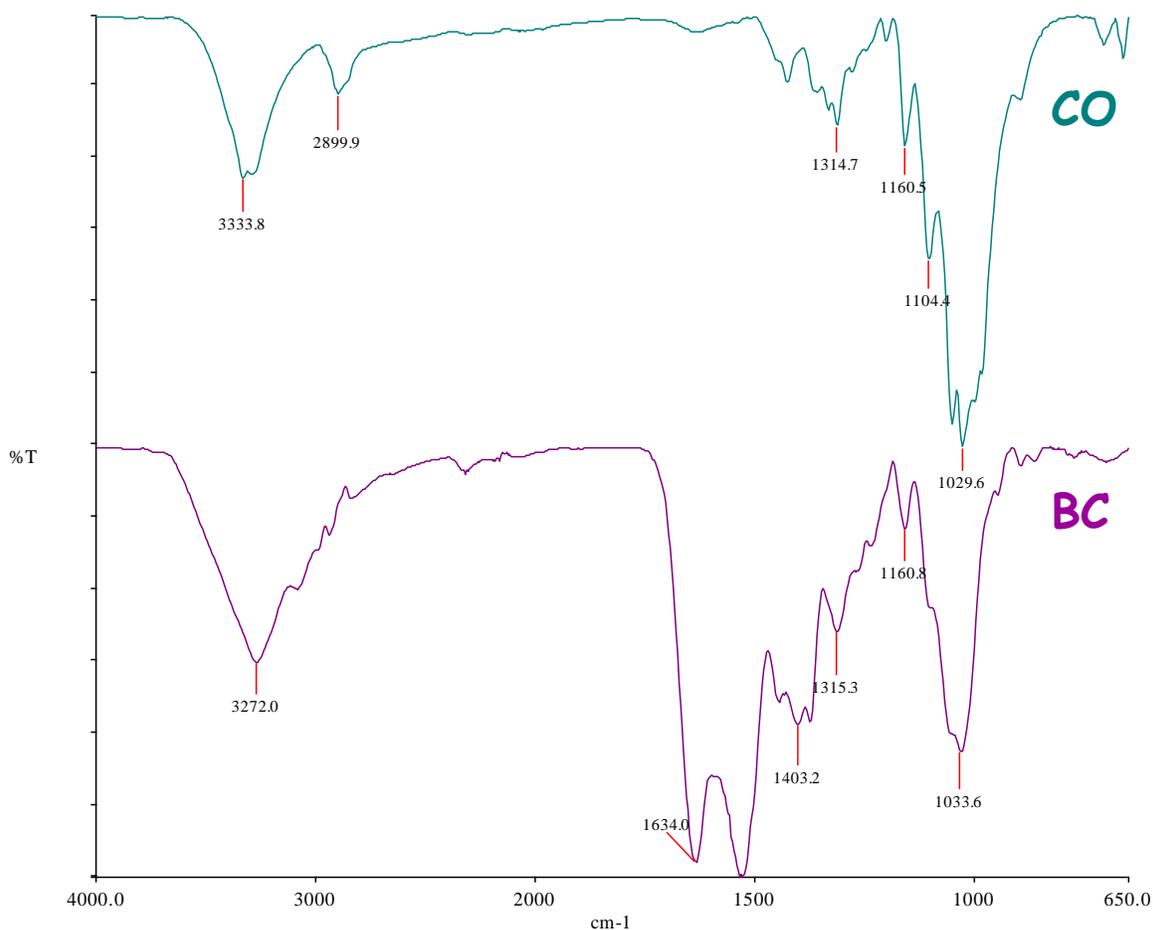


Figura 18. Espectros infrarrojos de BC purificada (BC) y Estándar de Celulosa (CO).

Debido a la escasa pureza que presentaron las muestras anteriores en el análisis FTIR se procedió a mejorar el método de purificación; Zeng *et al*(2011B) y Trovatti *et al*(2011) entre otros, siguieron un método de similar al empleado en esta investigación; sin embargo, Zeng *et al*(2011A) propone que antes del tratamiento alcalino se realice una serie de lavados con agua destilada para eliminar residuos del medio de cultivo, y que se utilice la concentración de NaOH del 1% (0.25 M) (Tabla 1).

Por lo tanto, tomando en cuenta lo mencionado anteriormente se purificaron las muestras obtenidas en la evaluación del efecto de la aireación, probando los lavados con agua destilada antes de tratar la muestra, así como dos

concentraciones de NaOH (0.25 M y 0.5 M) con la finalidad de ver con cual se lograba mejorar la purificación del biopolimero. Para probar experimentalmente las dos concentraciones de NaOH se asignó una muestra de celulosa para cada concentración de cada reactor.

Tabla 5. Concentración de BC en mg/mL utilizando dos concentraciones de NaOH.

MUESTRA	Concentración NaOH (mg/mL)	
	[0.5 M]	[0.25 M]
Celulosa- Agitado	4.2	3.9
Celulosa- Estático	2.3	2.2

En la Tabla 5 se muestra la concentración de las muestras de BC, las cuales indican que la mejor concentración de NaOH podría ser la de 0.5 M, que es la que se ha estado utilizando. Sin embargo, esto no fue un indicio suficiente para elegir una concentración u otra, y debido a ello se procedió a realizar un análisis por espectroscopía de infrarrojo el cual ayudó a verificar la pureza de la muestra y la existencia de los grupos funcionales.

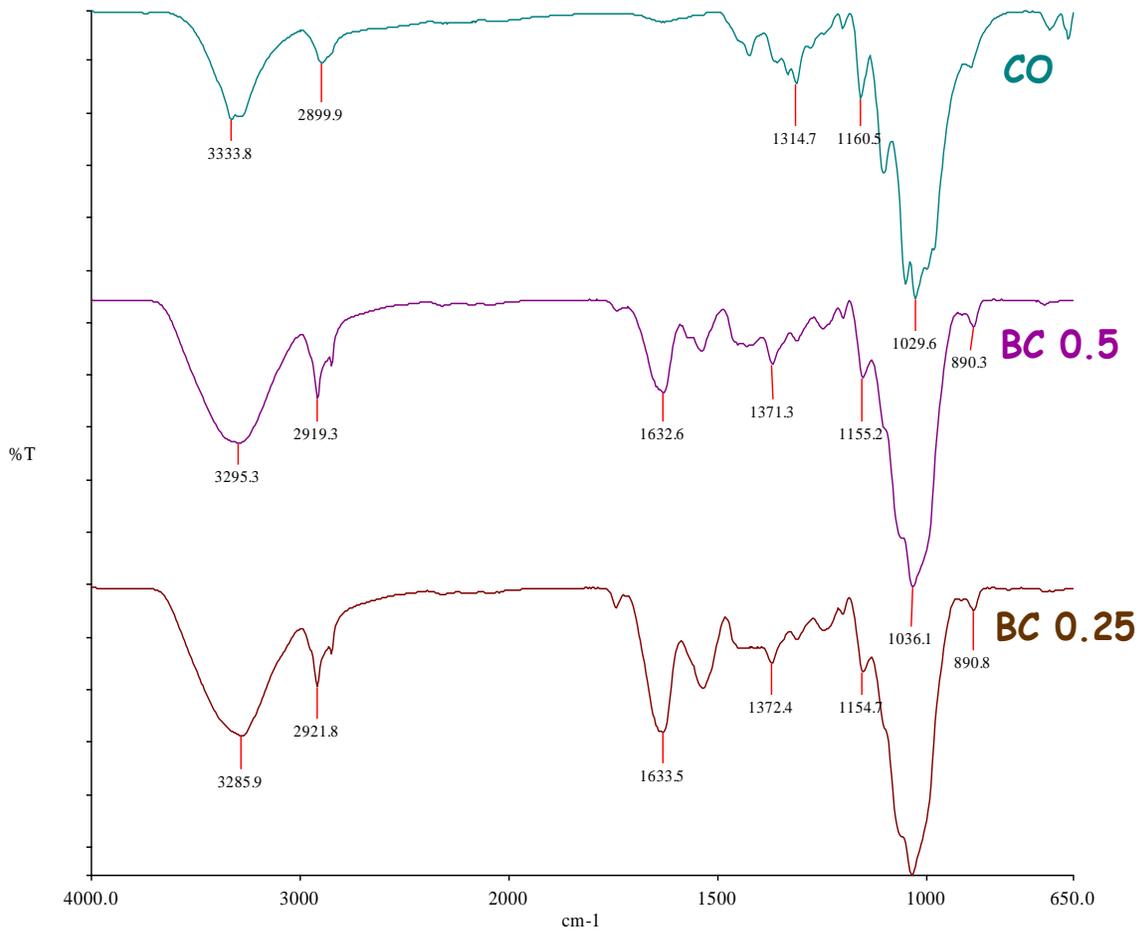


Figura 19. Espectros infrarrojos del estándar de celulosa (CO), BC purificada con NaOH 0.5 M (BC 0.5) y con NaOH 0.25 M (BC 0.25).

Comparando los espectros de la muestra obtenida con el estándar de celulosa (Fig. 19), se pudo observar que, tanto la muestra tratada con NaOH 0.5 M y la que se trató con NaOH 0.25 M presentan los grupos funcionales característicos de la celulosa. Sin embargo, también se pudo ver que la muestra tratada con NaOH 0.5M tuvo una mayor pureza comparada con la muestra tratada con NaOH 0.25 M, esto con base a la presencia de las bandas características de la celulosa. De este modo, considerando la concentración obtenida y la pureza de las muestras se pudo concluir que la mejor concentración de NaOH para la purificación de celulosa es el tratamiento alcalino a una concentración 0.5 M.

Integrando los aspectos anteriores, al método que se utilizó en la purificación de las primeras muestras celulósicas, este quedó de la siguiente manera:

El caldo de fermentación se centrifugó para separar la biomasa del medio de cultivo. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y el *pellet* se lavó con agua destilada para eliminar residuos del medio que aún estuvieran presente. El lavado con agua destilada se repitió tres veces y se centrifugó entre cada lavado. Posteriormente, el *pellet* se sometió a tratamiento con NaOH 0.5M a 80°C por 20 min para eliminar las células bacterianas presentes en la celulosa, el tratamiento alcalino se repitió tres veces y se centrifugó nuevamente para separar la celulosa. Después, se lavó con agua destilada las veces necesarias hasta alcanzar un pH de 7.0. En las etapas del efecto de la aireación y la relación C/N se obtuvieron muestras celulósicas en las cuales se aplicó el método de purificación mejorado y posteriormente se caracterizaron mediante FTIR.

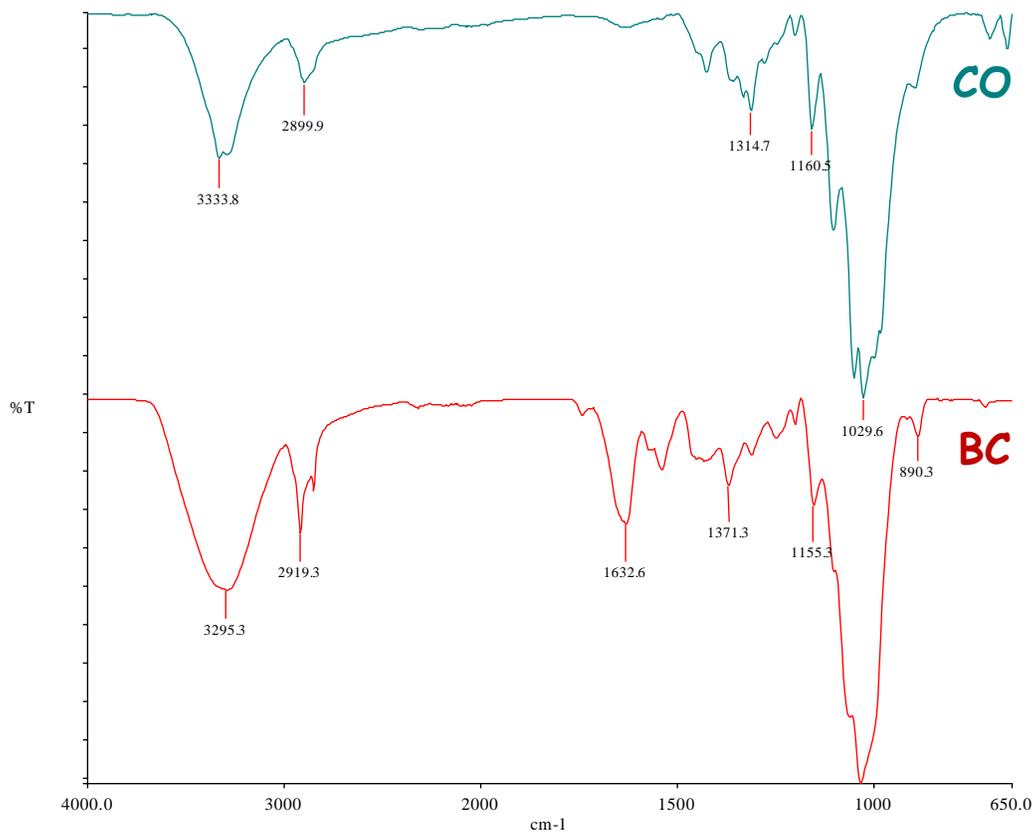


Figura 20. Espectros infrarrojos de Estándar de Celulosa (CO) y BC Purificada (BC) obtenida de la evaluación del efecto de la aireación.

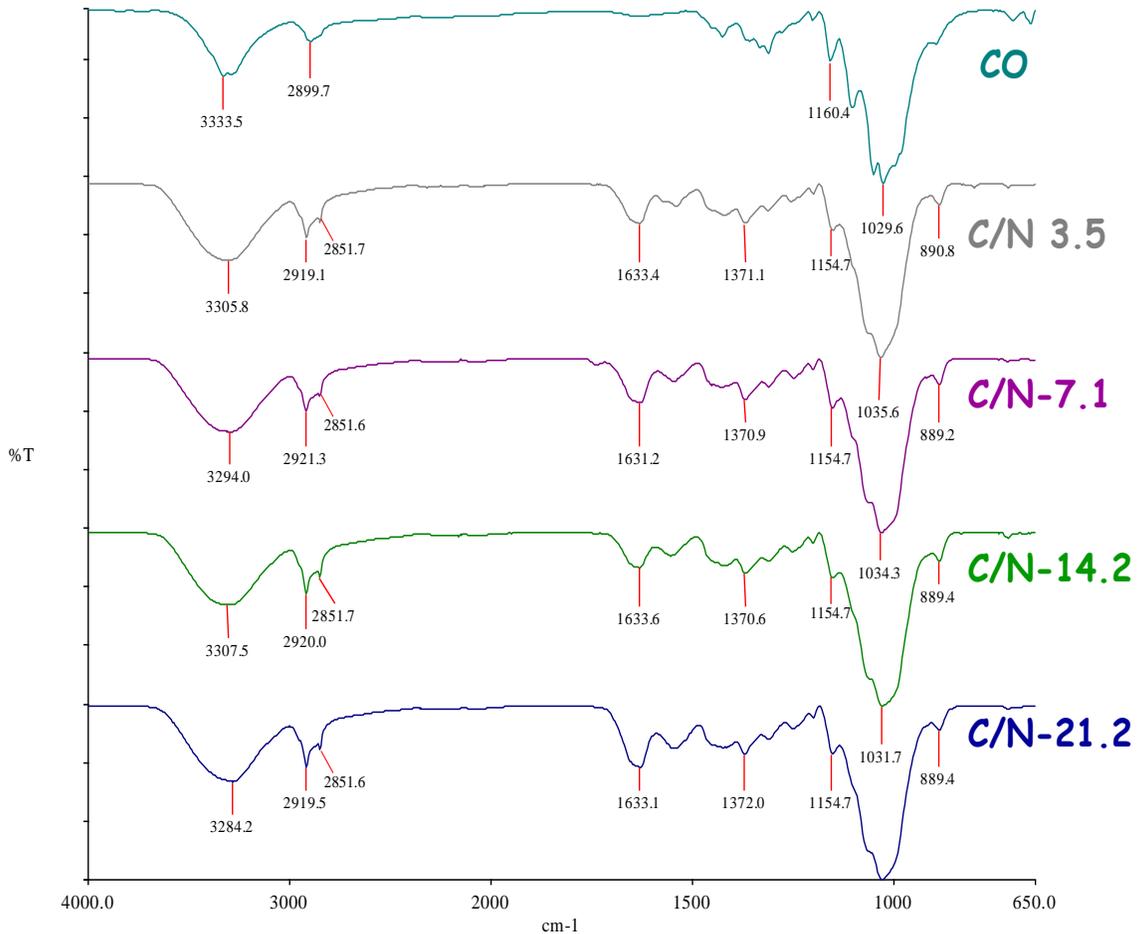


Figura 21. Espectros infrarrojos de BC purificada de las relaciones C/N y estándar de celulosa (CO).

En la Figura 20 y 21 se pueden apreciar las respectivas comparaciones de la BC con el estándar de celulosa empleado (CO), observándose bandas en las regiones características de la celulosa entre 1200 y 900 cm^{-1} ; y, 3800 y 2600 cm^{-1} .

Dichas bandas se encuentran a los 3294.5, 2919.3, 2851.6, 1154.8 y 1033.7 cm^{-1} las cuales están asociadas a las vibraciones características de los grupos funcionales O-H, C-H simétrico y asimétrico, C-O-C y C-O de la celulosa. También se aprecia una banda alrededor de los 1633.3 cm^{-1} la cual está asignada a las moléculas de agua absorbida, puesto que la celulosa de origen bacteriano tiene

una mayor capacidad de absorción y retención acomodando las moléculas de agua mediante enlaces inter e intramoleculares (Rani *et al.*, 2011).

Caso contrario a la celulosa de origen vegetal, ya que su capacidad de retención de agua es menor, estas diferencias están relacionadas a la cristalinidad del polímero ya que entre menos cristalina sea la celulosa vegetal con mayor facilidad absorbe las moléculas de agua entre las cadenas del polímero (Contreras *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que, aunque se está comparando la BC con un estándar de celulosa (algodón), no se espera que sea totalmente idéntica puesto que la presencia de la banda a 1633.3 cm^{-1} es característico de la vibración asociada al enlace H-O-H de la celulosa producida mediante cultivo sumergido de bacterias como *G. xylinus* y no de celulosa vegetal (Rani *et al.*, 2011). De este modo se pudo confirmar que el material polimérico obtenido en cada una de las cinéticas corresponde a la BC.

VII.3.2 XRD y Mv.

Las muestras celulósicas obtenidas de la comparación entre sistemas (estático y agitado) y de las diferentes relaciones C/N lotes se analizaron por difracción de rayos X de ángulo amplio (WAXS) para determinar su índice de cristalinidad. A continuación se muestra el difractograma del biopolímero obtenido mediante el sistema agitado el cual se trató con solución de NaOH 0.5M a 80°C en comparación con de la BC sin purificar (cruda) (Fig. 22).

En dicho análisis se puede ver que la muestra de celulosa purificada presenta una estructura amorfa con regiones semicristalinas predominando en su mayoría el amorfismo. Cabe mencionar que este resultado no fue el esperado ya que se esperaba que en la muestra predominara la cristalinidad.

Sin embargo, esto se pudo atribuir a la presentación de la muestra, ya que se encontraba parcialmente pulverizado lo cual pudo dificultar el análisis puesto que para realizarlo es necesario que la muestra se encuentre totalmente pulverizada para así facilitar la difracción de los rayos X sobre la muestra.

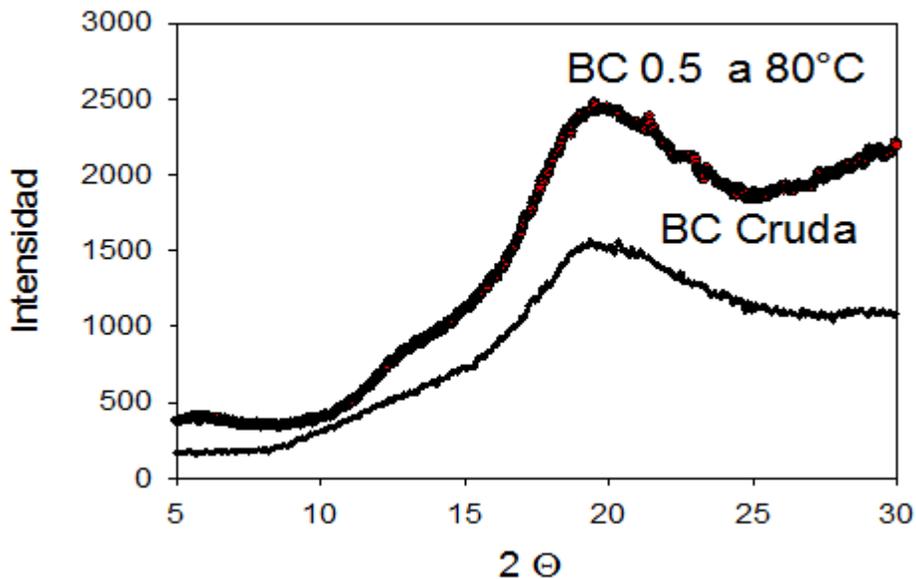


Figura 22. Difractograma de BC tratada con NaOH 0.5M a 80 °C.

En la Figura 23, se muestran los difractogramas de las muestras provenientes de las relaciones C/N empleadas en los que el pico característico de la estructura cristalina aparece en 2θ alrededor de 19 y 20 para cada una de las relaciones C/N. En la Tabla 6, se muestran las intensidades de las regiones amorfas y cristalinas de la BC para cada una de las relaciones C/N, además de su respectivo índice de cristalinidad y peso molecular, los cuales fueron mayores en comparación con lo obtenido por Wanichapichart *et al* (2002) quienes obtuvieron BC con una masa molecular aproximadamente de 142.7 kDa. Los valores de índice de cristalinidad son similares a lo reportado por Watanabe *et al* (1998), quienes reportan BC con un índice del 72 % obtenida mediante cultivo sumergido agitado; y mayores a lo reportado por Khajavi *et al* (2011) quienes reportan BC con un índice del 52%. Estudios realizados se ha demostrado que la cristalinidad

de la BC se considera generalmente un determinante clave de las propiedades de la misma. Por ejemplo, debido a esta se puede conocer la capacidad de retención de agua del biopolímero (Yoshinaga *et al*, 1997). Sin embargo, la aplicación que se le dé al biopolímero dependerá en su mayoría de la estructura química y las propiedades que este posea (cristalinidad, peso molecular, capacidad de absorción de agua, capacidad de retención de agua, tamaño de partícula, porosidad, etc) (Mohite – Patil, 2014).

Tabla 6. Índice de cristalinidad y peso molecular de BC.

Relación C/N	I_{am}	I₀₂₀	(%)I_{CR}	M_v (kDa)
3.5	803.4	2691.7	70.1	250
7.1	740.5	2720.7	72.7	280
14.2	760.0	2745.7	72.3	220
21.2	796.5	2699.6	70.5	238

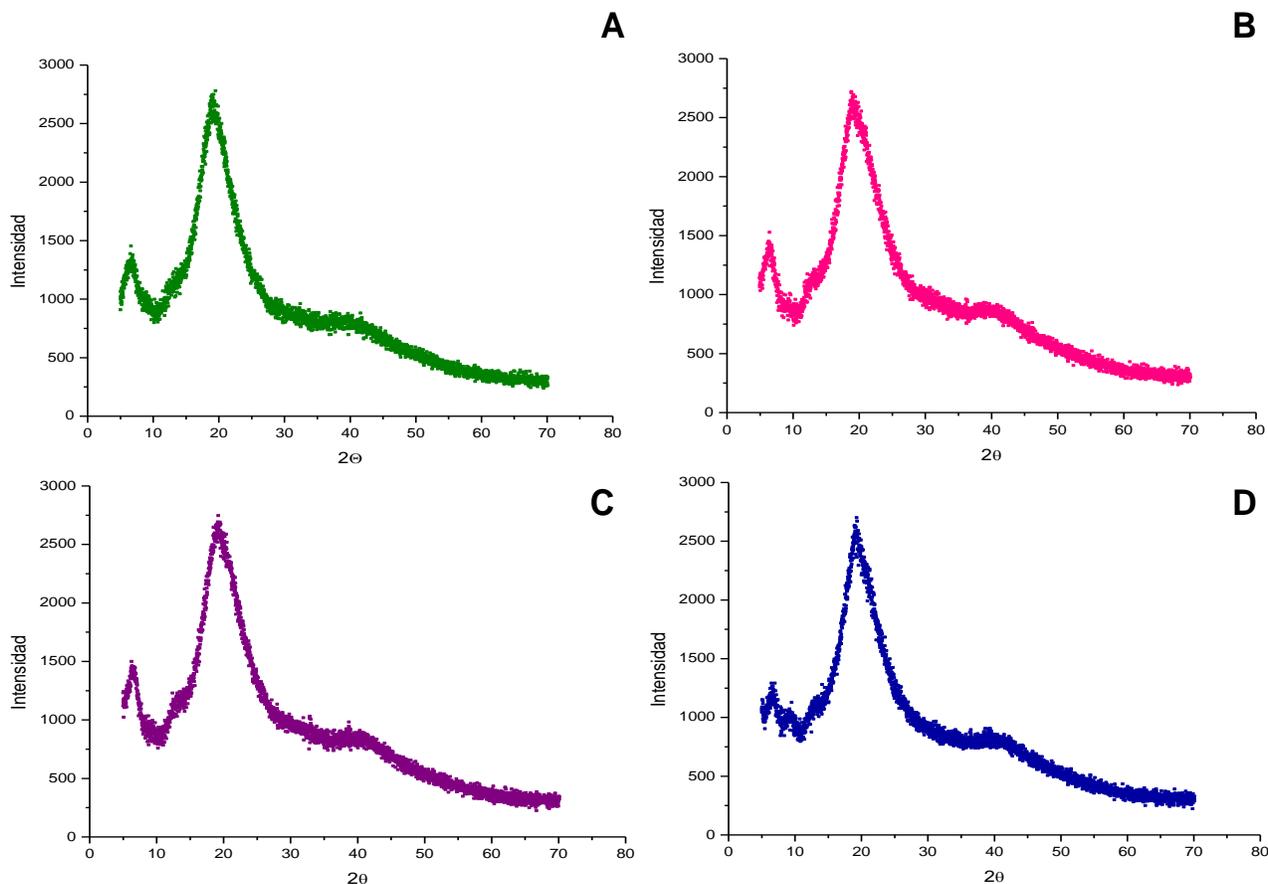


Figura 23. Difractogramas de BC purificada 3.5(A), 7.1(B), 14.2(C) y 21.2(D).

VII3.3 SEM

Para conocer la morfología superficial de la BC producida en este proyecto se realizaron microscopías electrónicas de barrido. En la Figura 24, se observa la morfología superficial de la BC obtenida mediante un sistema agitado y purificada con NaOH 0.5M y 0.25M. En dichas imágenes se puede apreciar que la morfología superficial de la BC tratada con NaOH 0.5M es más uniforme y con aspecto más poroso que la purificada a 0.25 M.

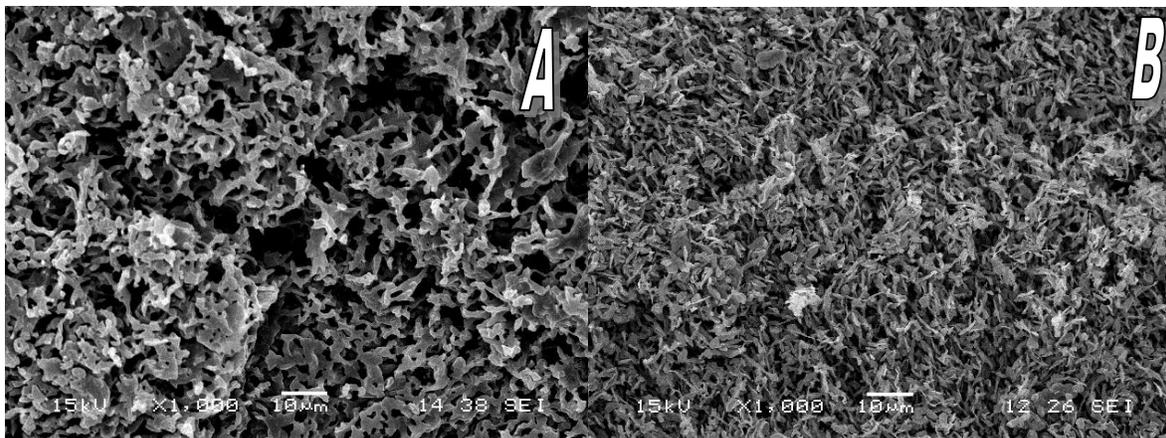


Figura 24. Micrografías de BC con NaOH obtenidas de cultivo sumergido: A) 0.5 M y B) 0.25 M.

Microscópicamente, la morfología de la BC depende estrictamente de las condiciones del medio de cultivo en que se lleve a cabo la producción ya sea bajo condiciones agitadas o estáticas; ya que en condiciones estáticas se produce como una biopelícula mientras que en condiciones estáticas se produce como una suspensión fibrosa (Watanabe *et al*, 1998). A continuación se muestran las (Fig. 25) micrografías de BC provenientes de las diferentes relaciones C/N, en las que se puede apreciar una morfología superficial uniforme y de aspecto poroso, típico de la celulosa obtenida por cultivo sumergido.

Para la BC obtenida de la relación 14.2 se observa una superficie más compacta con menos porosidad. Esto cambios en la morfología se pueden atribuir las condiciones del método de purificación empleado más que a la estructura química de los biopolímeros debido a que aspectos como la cristalinidad y el peso molecular están relacionados con las propiedades y aplicaciones de la BC.

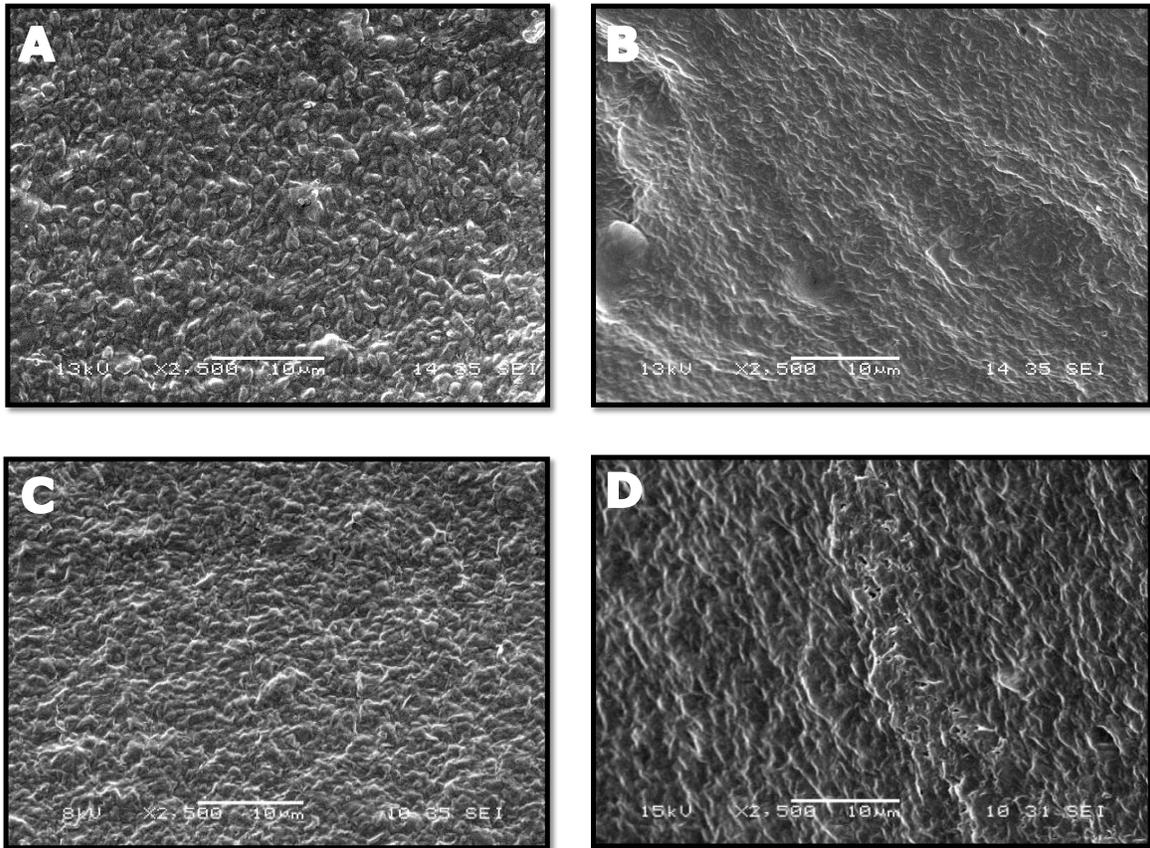


Figura 25. Micrografías de BC con las relaciones C/N: 3.5 (A), 7.1 (B), 14.2 (C) y 21.2 (D).

La diferencia que se observa entre la morfología de las imágenes de la Figura 24 y 25 puede atribuirse al método de secado que se empleó ya que las primeras muestras (Fig. 24) fueron secadas mediante liofilización y las de la Figura 25 se secaron a 105 °C, lo cual pudo haber afectado la apariencia del biopolímero.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a lo realizado en el presente trabajo se concluye que *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178, es una bacteria con gran eficiencia en la producción de celulosa. También es importante mencionar que el mejor sistema para la producción de BC fue el sistema agitado, debido a la alta producción de celulosa en un periodo de tiempo corto, a diferencia del sistema estático..

Finalmente, se estudiaron diversas relaciones C/N de las cuales resultó ser mejor la de 14.2 C/N con 40 gL⁻¹ de concentración de glucosa y 5 gL⁻¹ de extracto de levadura y 5 gL⁻¹ de peptona de caseína, alcanzando una máxima producción de 0.46 gL⁻¹ de BC y con una productividad de 0.055 g-BC/g-BM* h.

El biopolímero obtenido presentó las bandas características de la celulosa mediante FTIR, confirmándose la existencia de los grupos funcionales y la pureza de la BC obtenida. El índice de cristalinidad fue del 70 % con pesos moleculares alrededor de 200 kDa para cada una de las muestras celulósicas. En cuanto al aspecto morfológico superficial no se observaron microfibrillas como tal; sin embargo, se apreciaron diferencias las cuales se atribuyeron a las condiciones del método de purificación más que a las características de la estructura química de la BC.

IX. PERSPECTIVAS

Para mejorar la producción de celulosa será necesario evaluar el efecto de la aireación, ya que, como se mostró anteriormente; este parámetro es sumamente importante en la producción de este biopolímero.

El medio de cultivo fue vital en la producción de este biopolímero; sin embargo, existen reportes en los que usa un medio de cultivo diferente al desarrollado por Schramm y Hestrin en 1953 o al que modifican con la adición de sales.

El pH, también resultó importante ya que se ha reportado que la producción de BC se lleva a cabo a pHs entre 4 y 6; sin embargo, al no tener control sobre el pH durante la fermentación se pudieron haber producido metabolitos como el ácido glucónico, limitando así la disponibilidad de la glucosa para su polimerización a celulosa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carreño L., Caiceo L., Martínez C. (2012), "Técnicas de fermentación y aplicaciones de la BC: una revisión", *Ingeniería y Ciencia*, 8(16): 307-335.
2. Chávez-Pacheco J., Martínez-Yee S., Contreras-Zentella M. (2004), Escamilla-Marván E., "BC en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones", *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1):18-25.
3. Chawla P., Bajaj, Survase S. and Singhal R. (2009), "Microbial Cellulose: Fermentative production and applications", *Food Technol. Biotechnol.*,47 (2): 107-124.
4. Contreras H., Trujillo H., Arias G., Perez J., Delgado E. (2010), "Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: Aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros", *e- Gnosis*, 8: 1-13.
5. Dayal M., Goswami N., Sahai A., Jain V. (2013), "Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623", *Carbohydr Polym*, 94: 12-16.
6. Dudman, W. F. (1959), "Cellulose Production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp.", *J. gen. Microbiol*, 21: 312-326.
7. Esa F., Masrinda S., Abd Rahman N. (2014), "Overview of bacterial cellulose production and application", *Agricultures and Agricultural science procedia*, 2: 113-119.
8. Jaramillo L. Ruben, Perna M. Olga, Benito-Revollo P. Adrian, Arrieta M. Carlos, Escamilla M. Edgardo (2013). "Effect Of Different Concentrations Of Fructose On Bacterial Cellulose Production In Static Culture", *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 5(1):116-130.
9. Jaramillo L. Ruben, Tobio Wladimir J., Escamilla J.(2012), "Effect Of sucrose in production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* in static culture", *Rev. Rev. MVZ Córdoba.* 17(2):3004-3013.
10. Keshk S. and Sameshima K. (2005), "Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production", *African J. of Biotechnol*, 4 (6): 478-482.
11. Khajavi R., Jahangirian E., Sattari M. (2011), "Crystalline structure of microbial cellulose compared with native and regenerated cellulose", *Int. J. Polymer. Mater.*, Vol 60: 1178-1192.
12. Lestari P., Elfrida N., Suryani A., Suryadi Y. (2013), "Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-waste", *Jordan J. Biol Sciences*, 7(1): 75-80.

-
13. Lin D., López-Sánchez P., Li R., Li Z. (2013), "Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source", *Biores. Technol.*, 151: 113-119.
 14. Masaoka S., Ohe T., Sakota N. (1992), "Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*", *J. Ferment. Bioeng.*, 75(1): 18-23.
 15. McCormick C., Callais P., and Hutchinson B. (1985), "Solution Studies of Cellulose in Lithium Chloride and N,N- Dimethylacetamide" *Macromol.* 18: 2394-2401.
 16. Mikkelsen D., Flanagan B., dykes G., Gidley M. (2008), "Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524" *J. Appl. Microbiol.*
 17. Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars" . *Anal. Chem.*, 426-428.
 18. Mohammadkazemi F., Azin M., Ashori A. (2014), "Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media", *Carbohydr. Polym.*, 117: 518-523.
 19. Mohite Bhavna V., Patil Satish V. (2014), "Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529", *Carbohydr Polym.*, 106: 132-141.
 20. Peterson L. (1977), "A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable", *Anal. Biochem.*, 83: 36-356.
 21. Phisalaphong M., and Jatupaiboon N. (2008), "Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose–chitosan film", *Carbohydr. Polym.*, 74: 482-488.
 22. Poyrazoglu E. and Biyik H. (2011), "Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5", *African J. Biotechnol.*, 10 (27): 5346-5354.
 23. Ramana K. V., Tomar A. and Singh L. (2000) "Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 245-248.
 24. Rani, Mahadevaswamy Usha, Navin K. Rastogi, and K. A. Anu Appaiah (2011) "Statistical Optimization of Medium Composition for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 Using Coffee Cherry Husk Extract – an Agro-Industry Waste", *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21(7): 739–745
 25. Schramm M., Hestrin S. (1953), "Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*", Vol 56.
 26. Hestrin S., Schramm M. (1954), "Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*", Vol 58.

-
27. Schult T., Hjerde T., Optun O., Kleppe P. and Moe S. (2002), "Characterization of cellulose by SEC-MALLS", *Cellulose* 9: 149-158.
 28. Shoda M., Sugano Y. (2005), "Recent Advances in Bacterial Cellulose Production", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 10: 1-8.
 29. Suwanposri A., Yukphan P., Yamada Y., and Ochaikul D. (2013), "Identification and biocellulose production of *Gluconacetobacter* strains isolated from tropical fruits in Thailand", *Maeno Int. Sci. Tchneol*, 7(1): 70-82.
 30. Trovatti E., Serafim L., S.R. Freire C., J.D. Silvestre A., Pascoal C. (2011), "*Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory", *Carbohydr. Polym.*, 86: 1417-1420.
 31. Ummartyotin S., Juntaro J., Manuspiya H. (2012), "Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display", *Ind. Crops and Products*, 35:92-97.
 32. Wanichapichart P., Kaewnopparat S., Buaking K., Puthai W. (2002), "Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*", *J. Sci. Technol.*, 24: 855-862.
 33. Watanabe K., Tabuchi M., Morinaga Y., Yoshinaga F. (1998), "Structutral features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture", *Cellulose*, 5: 187-200.
 34. Winsor Charles (1931), "The Gompertz curve as a growth curve", *Proceedings of the National Academy of Science*, 18: 1-8.
 35. Wook J, Kook Y, Kwan J., Ryang Y., Sam Y.(1999), "Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture", *J. Biosci. Bioeng.*, 88(2): 183-188.
 36. Yamada Y. and Yukphan P. (2008), "Genera and species in acetic acid bacteria", *Int.J. Food Microbiol.*, 125: 15-24.
 37. Yoshinaga F., Tonouchi N., Watanabe K. (1997), "Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its applications as a new industrial material", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(2): 219-224.
 38. Zeng X., Small D., Wan W. (2011 A), "Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup", *Carbohydr. Polym.*, 85:506-513.
 39. Zeng X., Lui J., Chen J. (2011 B) "Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose", *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 38 (19): 93-1999.

XI. ANEXOS

XI.1. Metodología para el análisis de glucosa y curva patrón.

A) Se pesaron y disolvieron los reactivos de la Tabla 7, posteriormente se aforaron a 100 mL.

Tabla 7. Composición de la solución de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS).

REACTIVO	CANTIDAD (grs.)
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	1
NaOH	1
Na ₂ SO ₃ Anhidro	0.05
C ₆ H ₆ O	0.02

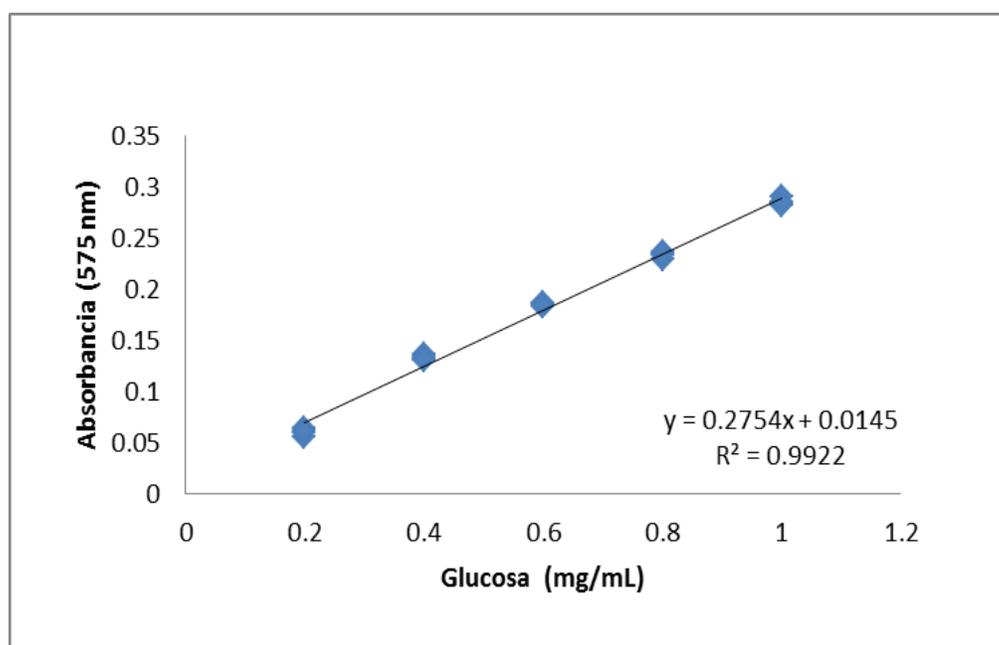


Figura 26. Curva patrón para el análisis de glucosa por el método de DNS.

XI. 2. Metodología para lowry-peterson y curva patrón de seroalbúmina (BSA)

Reactivo A

- A) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio: Se disolvieron 25g de carbonato de sodio, 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 250 mL de agua destilada.
- B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25g de SDS fueron disueltos en 250 mL de agua destilada.
- C) Solución de hidróxido de sodio: Se disolvieron 8g de NaOH en 250 mL de agua destilada.

Se mezclan las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L.

Reactivo B

Se diluyó 1:1 el reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, éste debe prepararse en el momento del análisis y conservarse fuera del alcance de la luz.

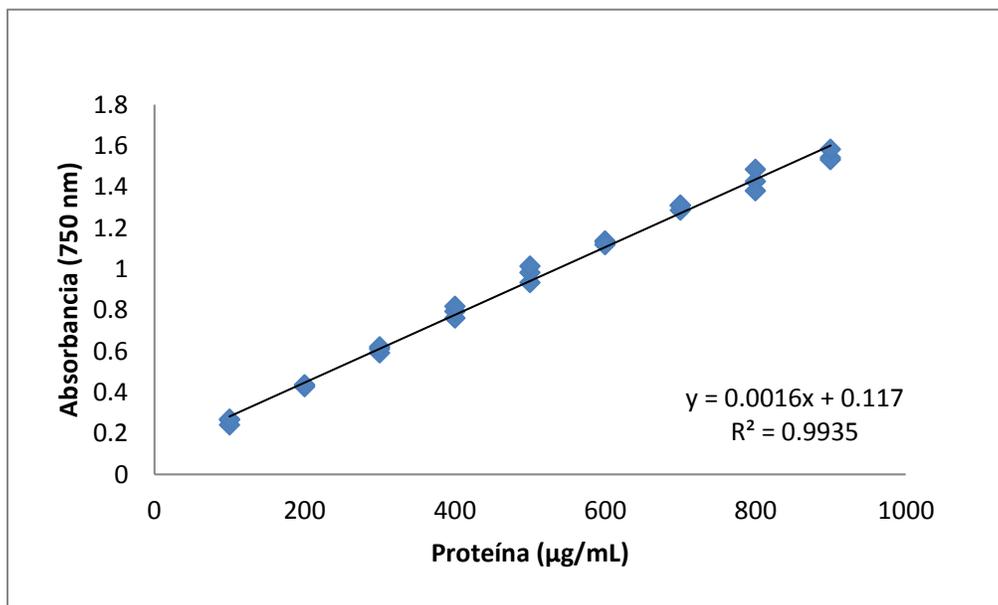


Figura 27. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry- Peterson (Peterson, 1977).

XI.3. Técnica para determinación de peso molecular mediante viscosidad intrínseca

Se prepararon diferentes diluciones, como se muestra en la Tabla 8:

Tabla 8. Diluciones de BC para determinar viscosidad.

SOLUCIÓN DE CELULOSA (mL)	DISOLVENTE (DMA + 9% LiCl) (mL)
1.25	8.75
2.5	7.5
5.0	5.0
7.5	2.5
10	0

Para llevar a cabo la técnica se utilizó un viscosímetro OSTWALD el cual se lavó con la solución disolvente antes de comenzar las determinaciones.

El bulbo inferior del viscosímetro se llenó con la muestra empezando con la de menor concentración. La muestra se subió hasta el bulbo superior con una propipeta, llenándolo completamente hasta tener la solución por encima de la marca.

Se introdujo el viscosímetro en un baño de agua a temperatura constante de 25 °C. Se soltó la propipeta y se tomó el tiempo en que tardó la solución en bajar desde la marca superior del bulbo hasta la marca inferior. Se registró el valor y se repitió tres veces. Esta metodología se siguió con cada una de las diluciones preparadas intercalando un lavado con la solución disolvente (Fig. 2).

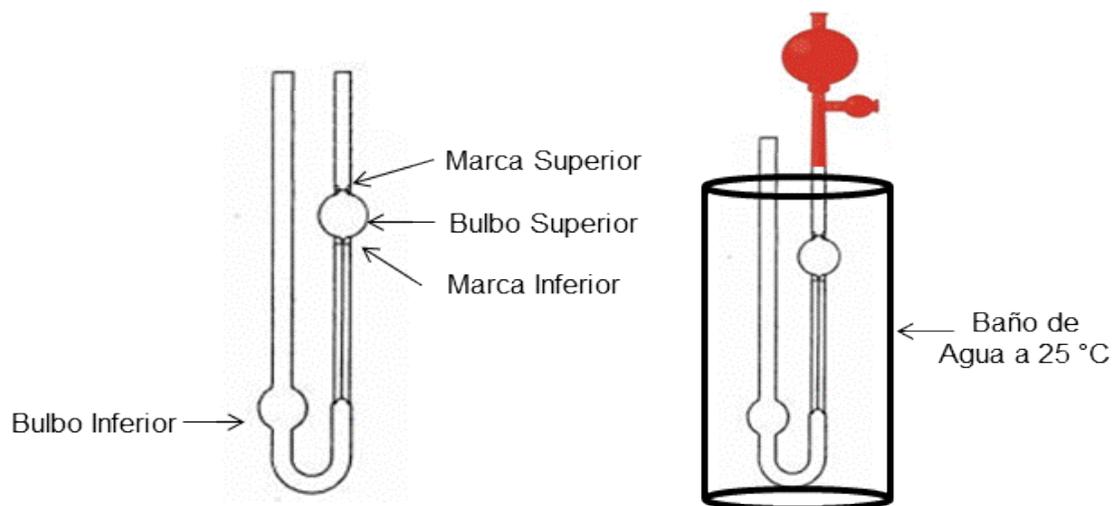


Figura 28. Técnica para determinación de peso molecular.

XI.4. Análisis estadístico: Concentración de proteína.

Analysis of Variance Report

Análisis ANOVA de la concentración de proteína soluble producida al utilizar la relación C/N 7.1 en función del tiempo.

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term	Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: PROTEIN	S	26	S	Yes	S	S+sA
S		2		No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)							
A: PROTEIN		26	32247.04	1240.271	15.13	0.063820	0.562023
S		2	164	82			
Total (Adjusted)		28	32411.04				
Total		29					

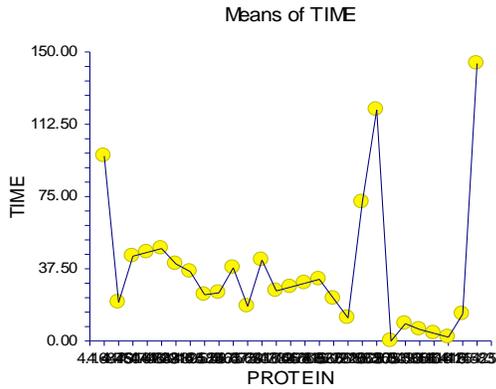
* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	29	35.58621		36.96296
A: PROTEIN				
4.16875	1	96	9.055386	59.03704
4.447916667	1	20	9.055386	-16.96296
4.460416667	1	44	9.055386	7.037037
4.470833333	1	46	9.055386	9.037037
4.472916667	1	48	9.055386	11.03704
4.48125	1	40	9.055386	3.037037
4.489583333	1	36	9.055386	-0.962963
4.525	1	24	9.055386	-12.96296
4.5875	2	25	6.403124	-11.96296
4.6375	1	38	9.055386	1.037037
4.672916667	1	18	9.055386	-18.96296
4.683333333	1	42	9.055386	5.037037
4.7125	1	26	9.055386	-10.96296
4.766666667	1	28	9.055386	-8.962963
4.7875	1	30	9.055386	-6.962963
4.816666667	1	32	9.055386	-4.962963
4.822916667	1	22	9.055386	-14.96296
5.027083333	1	12	9.055386	-24.96296
5.20625	1	72	9.055386	35.03704
5.2875	1	120	9.055386	83.03704
5.308333333	1	0	9.055386	-36.96296
5.341666667	2	9	6.403124	-27.96296
5.385416667	1	6	9.055386	-30.96296
5.410416667	1	4	9.055386	-32.96296
5.4125	1	2	9.055386	-34.96296
5.414583333	1	14	9.055386	-22.96296
5.425	1	144	9.055386	107.037

Analysis of Variance Report

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: TIME
Term A: PROTEIN

Alpha=0.050 Error Term=S DF=2 MSE=82 Critical Value=17.8871

Group	Count	Mean	Different From Groups
5.308333333	1	0	
5.4125	1	2	
5.410416667	1	4	
5.385416667	1	6	
5.341666667	2	9	
5.027083333	1	12	
5.414583333	1	14	
4.672916667	1	18	
4.447916667	1	20	
4.822916667	1	22	
4.525	1	24	
4.5875	2	25	
4.7125	1	26	
4.766666667	1	28	
4.7875	1	30	
4.816666667	1	32	
4.489583333	1	36	
4.6375	1	38	
4.48125	1	40	
4.683333333	1	42	
4.460416667	1	44	
4.470833333	1	46	
4.472916667	1	48	
5.20625	1	72	
4.16875	1	96	
5.2875	1	120	
5.425	1	144	

Notes: This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

XI.5. Análisis estadístico: Productividad de celulosa.

Analysis of Variance Report

Análisis ANOVA de las productividades obtenidas con las relaciones C/N 3.5, 7.1, 14.2 y 21.2 en función del tiempo.

Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term	Denominator	Expected Mean Square
Term		Fixed?	Term	
A: RELACION	3	Yes	S	S+sA
S	108	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

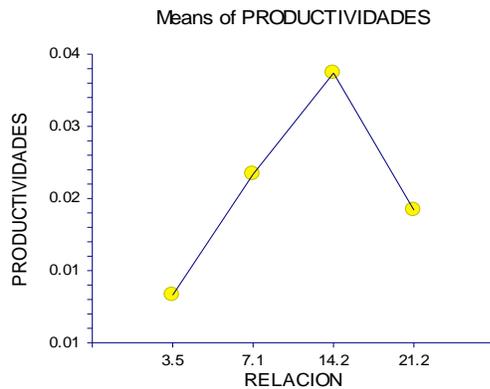
Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
Term						
A: RELACION	3	7.677275E-03	2.559092E-03	14.90	0.000000*	0.999968
S	108	1.854823E-02	1.717429E-04			
Total (Adjusted)	111	2.622551E-02				
Total	112					

* Term significant at alpha = 0.05

Term	Count	Mean	Error	Effect
All	112	2.107589E-02		2.107589E-02
A: RELACION				
3.5	28	0.00995	2.476625E-03	-1.112589E-02
7.1	28	2.253214E-02	2.476625E-03	1.45625E-03
14.2	28	3.303571E-02	2.476625E-03	1.195982E-02
21.2	28	1.878572E-02	2.476625E-03	-2.290179E-03

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PRODUCTIVIDADES
Term A: RELACION

Alpha=0.050 Error Term=S DF=108 MSE=1.717429E-04 Critical Value=3.6904

Group	Count	Mean	Different From Groups
3.5	28	0.00995	7.1, 14.2
21.2	28	1.878572E-02	14.2
7.1	28	2.253214E-02	3.5, 14.2
14.2	28	3.303571E-02	3.5, 21.2, 7.1

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

XI.6. Análisis estadístico: Producción de celulosa.

Analysis of Variance Report

Análisis ANOVA de las producción de celulosa obtenida con las diferentes concentraciones de glucosa en función del tiempo.

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: CONCENTRACION	S	3	Yes	S	S+sA
S		96	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

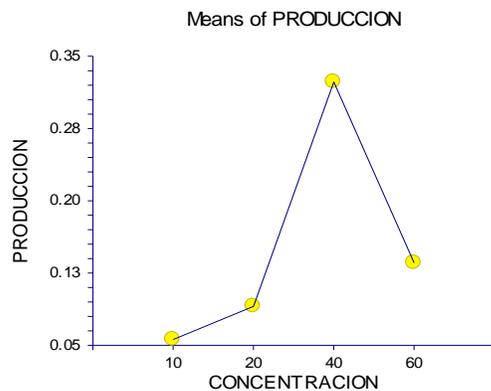
Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)							
A: CONCENTRACION		3	1.231357	0.4104523	24.62	0.000000*	1.000000
S		96	1.600784	1.667483E-02			
Total (Adjusted)		99	2.83214				
Total		100					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	100	0.1538167		0.151292
A: CONCENTRACION				
10	29	5.597701E-02	2.397903E-02	-9.531499E-02
20	29	0.0904023	2.397903E-02	-0.0608897
40	29	0.3232759	2.397903E-02	0.1719839
60	13	0.1355128	3.581451E-02	-1.577918E-02

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PRODUCCION
Term A: CONCENTRACION

Alpha=0.050 Error Term=S DF=96 MSE=1.667483E-02 Critical Value=3.6976

Group	Count	Mean	Different From Groups
10	29	5.597701E-02	40
20	29	0.0904023	40
60	13	0.1355128	40
40	29	0.3232759	10, 20, 60

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

XI.7. Análisis estadístico: pH

Analysis of Variance Report

Análisis ANOVA del pH evaluado en cada una de las relaciones empleadas en función del tiempo.

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term	Denominator	Expected Mean Square
	A: CONCENTRACION	3	Yes	S	S+sA
	S	16	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

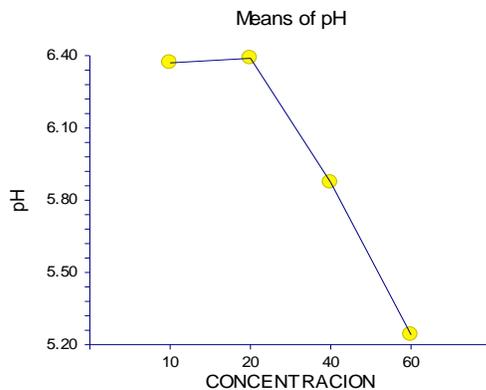
Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)							
	A: CONCENTRACION	3	4.381994	1.460665	4.93	0.013035*	0.824347
	S	16	4.74327	0.2964544			
	Total (Adjusted)	19	9.125264				
	Total	20					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	20	5.96825		5.96825
A: CONCENTRACION				
10	5	6.37	0.2434972	0.40175
20	5	6.389	0.2434972	0.42075
40	5	5.873	0.2434972	-0.09525
60	5	5.241	0.2434972	-0.72725

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: pH

Term A: CONCENTRACION

Alpha=0.050 Error Term=S DF=16 MSE=0.2964544 Critical Value=4.0461

Group	Count	Mean	Different From Groups
60	5	5.241	10, 20
40	5	5.873	
10	5	6.37	60
20	5	6.389	60

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.