

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR LA BACTERIA NATIVA  
*Gluconacetobacter medellinensis***

**Margarita Lucía Castro Riascos**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA  
ESCUELA DE INGENIERÍAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
MEDELLÍN  
2015**

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR LA BACTERIA NATIVA  
*Gluconacetobacter medellinensis***

Estudiante:

Margarita Lucía Castro Riascos, Ing. Agroindustrial.  
Para optar al título de Magister en Biotecnología

---

Cristina Isabel Castro Herazo, Ing. Químico

Ph D

Director

---

Mabel Milena Taborda, Ing. Químico

MSc

Co- director



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
MEDELLÍN  
2015**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

Firma

Nombre

Jurado

---

Firma

Nombre

Jurado

## Declaración de originalidad

---

Medellín, 18 de junio de. 2015

Fecha

Margarita Lucía Castro Riascos

“Declaro que esta tesis no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Artículo 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma

---

Margarita L. Castro R.

cc. 34.317.738

## Dedicatoria

---

A mi familia...  
En memoria de Piri.

---

## AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer inmensamente a Dios por todas las oportunidades que ha puesto en mi vida, por regalarme una familia maravillosa llena de problemas y defectos que logramos superar día a día para fortalecernos más como personas y convertirlos en virtudes y valores sobre los cuales vivimos felices.

Gracias a mi adorada madre por alcahuetear todas mis ocurrencias y por su apoyo incondicional, por ser mi fortaleza y mi ejemplo a seguir, porque yo sé que con cada triunfo logrado por nosotros, tus hijos, tu eres la mujer más feliz y orgullosa del mundo.

A mi tía piri, porque sin su apoyo este sueño que ahora se convierte en realidad no hubiera sido posible y porque sé que desde el cielo seguirá cuidándome y apoyándome en todos mis proyectos. A mis hermanos por su gran amor y por estar ahí en los momentos más difíciles y en los más alegres de mi vida, porque son mis mejores y verdaderos amigos.....de los incondicionales.

A mi directora Cristina por tenerme tanta paciencia, por su gran dedicación y por brindarme la maravillosa oportunidad de trabajar en su equipo. A mi co-directora Mabel por sus acertados consejos, su gran disposición y su invaluable apoyo durante el tiempo que duró mi maestría.

A sí mismo, quisiera agradecer de manera especial al profesor Robin Zuluaga por ofrecerme desinteresadamente su tiempo y sus valiosos comentarios y sugerencias.

A todo el personal del laboratorio de microbiología en especial a María Eugenia, Gloria Mercedes, Isabel y Lina que me brindaron su compañía, sus conocimientos, su tiempo y su ayuda siempre que lo necesité.

A mis compañeros del laboratorio Angelica, las Dianas, Cocksito y Marlon por hacer más sencillos y amenos mis días de arduo trabajo, por su colaboración y agradable

compañía. A mi amigo Nolber por no dejarme flaquear en los momentos difíciles de este proceso y por creer en mí.

Infinitas gracias a Dios por haberlos puesto a todos en mi camino, en el lugar y momento apropiados.....me ayudaron a lograr este gran sueño que hoy me abre puertas profesionalmente!

---

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	3
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 Celulosa .....	4
3.2 Celulosa bacteriana (CB) .....	6
3.3 Propiedades de la celulosa bacteriana (CB) .....	8
3.4 Aplicaciones de la celulosa bacteriana.....	9
3.5 Microorganismos productores de celulosa bacteriana .....	11
3.5.1 <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> .....	13
3.6 Biosíntesis de celulosa bacteriana .....	14
3.7 Medio y condiciones de cultivo para la producción de celulosa bacteriana.....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Establecimiento del protocolo para la cuantificación de biomasa de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> producida durante una fermentación líquida .....	21
4.2 Determinación de la cinética de crecimiento de la bacteria <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> .....	24
4.3 Determinación de la fuente de carbono y su concentración para la producción de celulosa bacteriana por <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> .....	24
4.4 Evaluación del consumo de la fuente de nitrógeno y carbono durante la producción de celulosa bacteriana en medio Hestrin & Schramm.....	25



4.5 Caracterización morfológica de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> y de las membranas de celulosa que sintetiza en cada uno de los medios evaluados.....	26
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
5.1 Establecimiento del protocolo para la cuantificación de biomasa de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> producida durante una fermentación líquida.....	28
5.2 Determinación de la cinética de crecimiento del microorganismo <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> .....	31
5.3 Determinación de la fuente de carbono y su concentración para la producción de celulosa bacteriana por <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> .....	40
5.4 Evaluación del consumo de la fuente de carbono y nitrógeno durante la producción de celulosa bacteriana en medio HS.....	45
5.5 Caracterización morfológica de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> y de las membranas de celulosa que sintetiza en cada uno de los medios evaluados.....	50
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Estructura molecular de la celulosa .....5

**Figura 2.** Formación de celulosa a partir de bacterias.....7

**Figura 3.** Morfología macroscópica de celulosa a partir de bacterias en medio estático y en medio agitado .....7

**Figura 4.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la bacteria *Gluconacetobacter medellinensis* .....14

**Figura 5.** Rutas metabólicas para sintetizar celulosa .....15

**Figura 6.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con glucosa al 2%.....30

**Figura 7.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con fructosa al 2%.....30

**Figura 8.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con sacarosa al 2%.....31

**Figura 9.** Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis* utilizando glucosa, fructosa y sacarosa al 2 % como fuente de carbono.....32

**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *luconacetobacter. medellinensis* en Hestrin & Schramm con glucosa(a), fructosa(b) y sacarosa(c) al 2 % modeladas .....36

**Figura 11.** Parámetros de crecimiento de un microorganismo.....37

**Figura 12.** Peso seco de membranas (g/L) después de 8 días de fermentación...41

<b>Figura 13.</b> Medias de celulosa producida en g/L .....	44
<b>Figura 14.</b> Peso seco de membranas (g) con diferentes fuentes de carbono.....	44
<b>Figura 15.</b> Consumo de fuente de nitrógeno (N) durante la fermentación.....	46
<b>Figura 16.</b> Consumo de fuente de carbono (mg/ml) durante la fermentación.....	47
<b>Figura 17.</b> Concentración de fuentes de carbono a medida de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> consume sacarosa.....	48
<b>Figura 18.</b> Rendimiento de producto con cada fuente de carbono (F.C) durante el tiempo de fermentación.....	49
<b>Figura 19.</b> Morfología de bacilos encontrados en las membranas después de 8 días de fermentación.....	51
<b>Figura 20.</b> Micrografías de SEM de membranas de CB obtenidas en medio Hestrin & Schramm con glucosa 2% <b>(a)</b> fructosa 2% <b>(b)</b> sacarosa 2% <b>(c)</b> e incubadas durante 8 días.....	52
<b>Figura 21.</b> Porosidad de membranas de CB.....	53

---

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Aplicaciones de la celulosa bacteriana .....9

**Tabla 2.** Diferentes cepas productoras de celulosa .....12

**Tabla 3.** Medio Hestrin-Schramm (HS).....22

**Tabla 4.** Validación de protocolo para cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* .....29

**Tabla 5.** Resultados estadísticos de los modelos matemáticos aplicados a 3 muestras realizadas en medio con glucosa al 2% .....34

**Tabla 6.** Resultados estadísticos de los modelos matemáticos aplicados a 3 muestras realizadas en medio con fructosa al 2% .....34

**Tabla 7.** Resultados estadísticos de los modelos matemáticos aplicados a 3 muestras realizadas en medio con sacarosa al 2% .....35

**Tabla 8.** Variables obtenidas con cada una de las simulaciones realizadas en los medios de cultivo analizados .....38

**Tabla 9.** Resumen Estadístico para producción de celulosa g/L a partir de medio Hestrin-Schramm con glucosa, fructosa y sacarosa 2% respectivamente.....42

**Tabla 10.** ANOVA para glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente..... 43

**Tabla 11.** Longitud de bacilos encontrados en las membranas después de 8 días de fermentación.....51

**LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Protocolo para determinar el contenido de nitrógeno en los medios mediante la prueba Biuret .....66

**Anexo 2.** Protocolo para la cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* .....67

**Anexo 3.** Metodología para realizar curvas de crecimiento .....72

**Anexo 4.** Resultados estadísticos arrojados por la ecuación de Gompertz A2D, Richards 2D y Logística en cada uno de los medios evaluados .....74

### RESUMEN

La celulosa bacteriana es un polímero obtenido por fermentación con microorganismos de diferentes géneros, de los cuales el más eficiente que se ha encontrado hasta el momento es *Gluconacetobacter xylinum*. Este polímero presenta excelentes propiedades fisicoquímicas que lo hacen atractivo para diferentes aplicaciones, sin embargo, su rendimiento es bajo para pensar en producirlo a gran escala y por tal motivo se hace necesario desarrollar alternativas que permitan incrementar su producción. Entre las alternativas se encuentran, utilizar diferentes sustratos, inductores y recientemente nuevas especies productoras.

Para el caso de nuevas especies productoras, es importante encontrar las principales variables que intervienen en la síntesis de la celulosa. Por tal motivo en esta investigación se determinaron las condiciones requeridas en el medio de cultivo para la producción de celulosa bacteriana por la cepa recientemente aislada *Gluconacetobacter medellinensis*. Se partió de un medio de cultivo comercial (Hestrin–Schramm – HS) al cual se le varió la fuente de carbono por glucosa, fructosa y sacarosa en concentraciones de 1, 2 y 3 % y se determinó la cinética de consumo de carbono y nitrógeno durante la producción de celulosa en diferentes tiempos de fermentación. El efecto de estas condiciones, se evaluó sobre la cantidad de celulosa producida en peso seco.

Partiendo del hecho de que el tipo y la concentración de la fuente de carbono tienen una influencia crucial en el crecimiento del microorganismo y por lo tanto en la producción de CB, en esta investigación se determinó que *G. medellinensis* presentó una mayor afinidad por la glucosa, ya que con esta fuente de carbono se obtuvo mayor crecimiento expresado en UFC/mL, seguida de la sacarosa y la

fructosa. Con la glucosa se obtuvo la mayor producción de biomasa  $6,47 \times 10^9$  UFC/ml, el tiempo de duplicación del microorganismo fue también el mayor 6,16 h y por lo tanto los bacilos alcanzaron un mayor crecimiento 1,39  $\mu\text{m}$ , además con glucosa al 2% se obtuvo la mayor cantidad del polímero 3,1 g/L. Así mismo, se estableció un protocolo para determinar la cinética de crecimiento de este microorganismo y en las curvas obtenidas se encontró que la velocidad específica de crecimiento fue menor en el medio con glucosa ( $0,11 \text{ h}^{-1}$ ), lo cual puede incidir directamente en que la densidad de las nanocintas de celulosa en las membranas sea menor, porque hay menos generación de nodos por área durante la división celular, que en el caso de la fructosa y la sacarosa.

**Palabras claves:** Celulosa bacteriana, *Gluconacetobacter medellinensis* fermentación estática, membranas de celulosa.

---

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a polymer obtained through fermentation with different microorganism strains, the most efficient is the *Gluconacetobacter xylinum*. This polymer contains excellent physical and chemical properties that make it attractive for different applications. However, its efficiency is low to produce BC at large scale and is necessary to develop alternatives that allows increase its yield. Such as using different substrates, inducers and, more recently, new productive species.

In case of new productive species, it is paramount to find the main variables that intervene in cellulose synthesis. For this reason, in this study, the growth conditions required in culture medium for BC production by *Gluconacetobacter medellinensis* were determined. The starting point was a commercial culture (Hestrin–Schramm – HS) whose carbon source was varied by glucose, fructose, and saccharose in 1, 2 and 3% concentrations, and the carbon and nitrogen consumption kinetics was determined during the cellulose production in those different types of fermentation. The effect of these conditions on the amount of cellulose produced in dry weight was assessed.

Considering the fact that the type and concentration of the carbon source have a crucial influence in microorganism growth and therefore in the production of BC, this study determined that *G. medellinensis* presented greater affinity for glucose, since with this carbon source a higher growth defined in CFU/mL was obtained, followed by saccharose and fructose. With glucose, the highest biomass production was obtained ( $6,47 \times 10^9$  CFU/mL), the duplication time of the microorganism was also the highest (6,16 h) and hence the bacillus reached a higher growth (1,39  $\mu$ m). Furthermore, with 2% glucose the greatest amount of BC p was attained (3,1 g/L). Besides, a protocol to determine the kinetics of this microorganism growth was established. In the obtained curves it was found that the specific growth speed was



lower in the glucose medium ( $0,11 \text{ h}^{-1}$ ), which may directly influence the fact that the cellulose nanoribbons density in the membrane is lower as there its number of of nodes per area generated during cell division than in the case of fructose and saccharose.

**Key words:** bacterial cellulose, *Gluconacetobacter medellinensis*, static fermentation, cellulose membranes.

### 1. INTRODUCCIÓN

La celulosa es el biopolímero más abundante en el mundo, anualmente se producen  $10^{11}$  toneladas y puede ser producida por plantas, algunas algas y algunos hongos y bacterias. Por su disponibilidad, la más usada es la de origen vegetal que se extrae mediante el uso de tratamientos químicos para eliminar otros componentes como lignina y hemicelulosa, los cuales se encuentran adheridos naturalmente al polímero y al ser removidos incrementan el costo de obtención de la celulosa además de generar cargas contaminantes al ambiente (Chavez *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 1991; Ping & Brown, 1996).

Debido a estas razones, la celulosa de origen bacteriano (CB) ha ganado importancia ya que presenta la misma estructura química que la celulosa vegetal pero a diferencia de ésta es químicamente pura, presenta un mayor grado de cristalinidad y mejores propiedades mecánicas (Chawla *et al.*, 2009; Stanislaw *et al.*, 2005). En este sentido, la CB es atractiva para diferentes industrias, como las de alimentos, biomédica, cosmética y de empaques, entre otras (Staiger *et al.*, 2007; Ślusarska *et al.*, 2008; Chawla *et al.*, 2009).

La CB se ha obtenido tradicionalmente por cepas aisladas de frutas y verduras en descomposición, alimentos fermentados y vinagre, entre otros; entre ellas *Gluconacetobacter xylinum* se considera, hasta el momento, la especie bacteriana más eficiente y por lo tanto es la más estudiada para la producción de CB (Trovatti *et al.*, 2011). Estas bacterias son estrictamente aerobias y son capaces de generar celulosa como un producto extracelular en medios estáticos (interface aire-medio) o agitados, a temperaturas entre 25 y 30 °C y pH entre 4 y 7 (Iguchi *et al.* 2000). Son capaces de utilizar como fuentes de carbono azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, manitol y sorbitol, entre otros (Chawla *et al.*, 2009; Bielecki *et al.*, 2005).

Es así como en los últimos años, diferentes investigadores se han preocupado en encontrar cepas bacterianas capaces de producir celulosa o en modificar las existentes para aumentar la producción de la misma (Trovatti *et al.*, 2011; Kurosumi *et al.*, 2009); sin embargo, la búsqueda de cepas y alternativas que permitan aumentar la disponibilidad de la CB y por tanto incrementar su uso a nivel industrial aún es un reto para la biotecnología.

En Medellín, Colombia, el Grupo de Investigación sobre Nuevos Materiales (GINUMA) de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) ha venido estudiando recientemente una cepa nativa llamada *Gluconacetobacter medellinensis*, la cual fue aislada a partir de un vinagre de frutas encontrado en la plaza minorista de la ciudad (Castro, 2012; Castro *et al.*, 2012). Esta cepa abre nuevas perspectivas al estudio de la síntesis de CB debido a su capacidad de producir celulosa a pH ácidos menores a 4 (Castro, 2012) donde otras especies bacterianas, hasta ahora encontradas y estudiadas, inhiben su metabolismo celular y por lo tanto la producción de celulosa es interrumpida (Gromet & Hestrin, 1963; Hestrin & Schramm, 1954; Klemm *et al.*, 2001).

Debido a la importancia y perspectivas de estudio de *G. medellinensis*, en esta investigación se valida un protocolo para la cuantificación de su concentración en una fermentación líquida, que permita evaluar su crecimiento en tres diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) y relacionarlas directamente con las rutas metabólicas del microorganismo, ya que este comportamiento metabólico se relaciona con la cantidad de celulosa producida por el microorganismo en cada una de las fuentes de carbono analizadas y con su estructura morfológica y por lo tanto se puede determinar las condiciones de cultivo necesarias para obtener mayores rendimientos y mejores características funcionales (dependiendo de las necesidades) de CB.

## **Objetivos de la Investigación**

---

## 2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de cultivo para la producción de celulosa bacteriana (CB) por la cepa nativa *Gluconacetobacter medellinensis*, empleando un medio de cultivo de composición definida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo para la cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* producida durante una fermentación líquida.
- Determinar la cinética de crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis* en un medio de cultivo de composición definida.
- Establecer la fuente de carbono y su concentración para la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter medellinensis*.
- Evaluar el consumo de la fuente de carbono y nitrógeno durante la producción de celulosa bacteriana en medio HS modificado.
- Caracterizar morfológicamente las membranas de celulosa obtenidas con las diferentes fuentes de carbono.

**Revisión Bibliográfica**

---

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

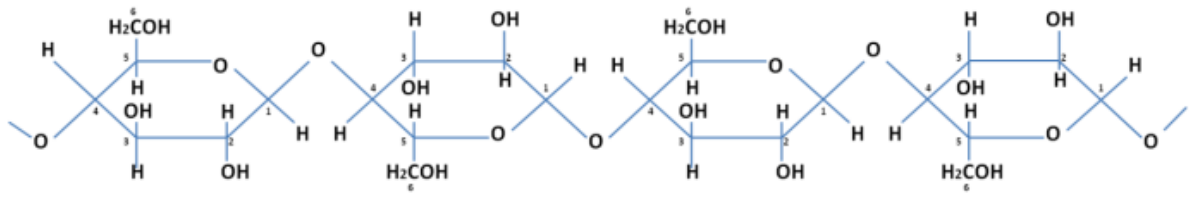
La tendencia mundial está encaminada a la protección y conservación del medio ambiente y al cuidado de la salud de los consumidores (El-Saied *et al.*, 2004). Es por esto que en los últimos años se vienen desarrollando materias primas biodegradables y de origen natural como alternativa para muchas aplicaciones industriales. En este sentido, el interés en el uso de polímeros de origen biológico como alternativa a los provenientes del petróleo ha incrementado considerablemente año tras año, como es el caso en particular de la celulosa (Ross *et al.*, 1991).

#### 3.1 CELULOSA

La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la tierra con un estimado de  $10^{11}$  t por año, es el principal componente estructural de las plantas (dependiendo del tipo de planta puede constituir hasta el 50 % de la biomasa vegetal) y de algunos animales (*Tunicidae*), además, puede ser producida por hongos (*Dictyostelium*) y bacterias (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) (Cheng *et al.*, 2006; El-Saied *et al.*, 2004; Williamson, 2002; Zhang, 2006; Zuluaga *et al.*, 2007; Chavez *et al.*, 2004; Retegi *et al.*, 2010).

La celulosa es un homopolímero lineal de alto peso molecular formado por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(1-4) glucosídicos (Figura 1) (Souza *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006). Su composición elemental (43,6 - 45% carbono, 6 - 6,5% hidrógeno y el remanente oxígeno) fue determinada por Payén en 1838 y a partir de entonces se concluyó su fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , donde “n” es el número de unidades de glucosa que se repiten en la cadena de celulosa comúnmente conocido como grado de polimerización (DP). Dependiendo del origen y los métodos de extracción es posible obtener celulosa con DP desde 10.000 hasta 300. Cada

unidad de glucosa presenta tres grupos hidroxilo (uno primario y dos secundarios) que son capaces de interactuar formando puentes de hidrógeno intra e intermoleculares con cadenas de celulosa adyacentes y por lo tanto son los responsables de la formación de la estructura supramolecular y del comportamiento físico, morfológico y químico de la celulosa (Castro, 2012; Chavez *et al.*, 2004; Zuluaga *et al.*, 2007; Chavez *et al.*, 2004; Retegi *et al.*, 2010).



**Figura 21.** Estructura molecular de la celulosa (adaptada de Castro, 2012).

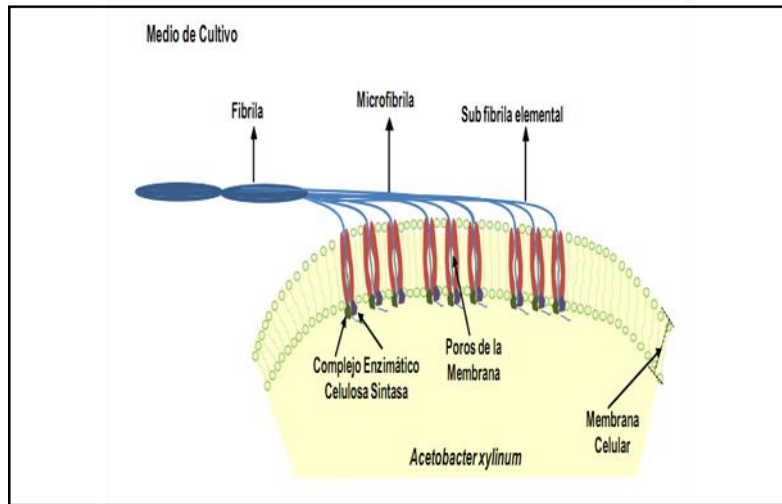
Además de las características antes mencionadas la celulosa es renovable, requiere un bajo consumo de energía para su biosíntesis, no es abrasiva, y presenta buenas propiedades mecánicas que la han llevado a ser utilizada como materia prima en la fabricación de materiales de construcción, refuerzo en materiales compuestos, fabricación de papel, producción de diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos, como aditivo para pinturas, cuero, textiles, en la industria plástica, cosmética y de alimentos (Chavez *et al.*, 2004; Cheng 2006; Zuluaga *et al.*, 2007).

Debido a su disponibilidad la más utilizada es la celulosa de origen vegetal (CV), la cual se encuentra acompañada de otros componentes como hemicelulosas, ligninas y ceras que deben ser eliminados con tratamientos químicos y mecánicos. Estos tratamientos deterioran la fibra y adicionalmente, ocasionan descargas contaminantes para el medio ambiente. Por tal motivo en los últimos años se ha venido estudiando la celulosa de origen bacteriano como fuente alternativa a la de origen vegetal (Stanislaw *et al.*, 2005; El-Saied *et al.*, 2004).

### 3.2 CELULOSA BACTERIANA (CB)

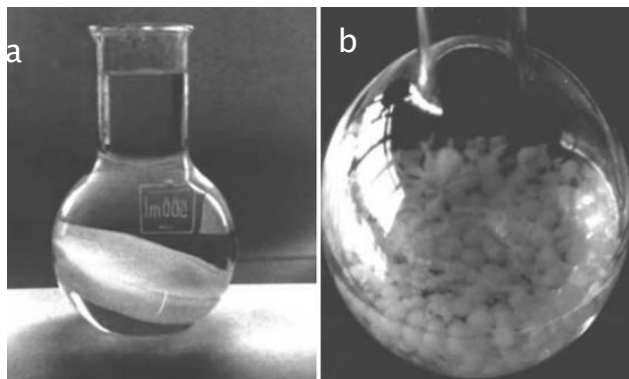
La CB fue identificada por primera vez en Europa en el año de 1886 por A. J. Brown durante la fermentación del mosto de cerveza para la producción de vinagre, donde se observó que la sustancia conocida como “*vinegar plant*” tenía la misma estructura molecular y polimérica que la celulosa de origen vegetal, pero a diferencia de ésta es químicamente pura (libre de lignina y hemicelulosa) y presenta diferente estructura morfológica y cristalina (Brown, 1886; Chawla *et al.*, 2009; Castro, 2012).

Como se observa en la Figura 2, las bacterias forman la celulosa como un producto extracelular, el cual es extruido al exterior de la célula por poros presentes en su membrana celular. A través de cada poro la bacteria extruye las cadenas poliméricas que se unen formando subfibrillas (10-15 cadenas). Estas subfibrillas se ensamblan formando nanofibrillas (3-4 nm de espesor) que a su vez se unen para formar una cinta con un ancho de entre 40 y 60 nm. Debido a esta estructura supramolecular, la celulosa es un polímero semicristalino que dependiendo del método de extracción puede tener 6 formas polimórficas. En su estado original o “nativo” ésta presenta polimorfismo I con una mezcla de dos alomorfismos I $\alpha$  y I $\beta$  y la relación I $\alpha$ /I $\beta$  varía con el origen, de tal forma que la CV es rica en el alomorfismo I $\beta$ , mientras que la CB es rica en el alomorfismo I $\alpha$  (Chavez *et al.*, 2004).



**Figura 22.** Formación de celulosa a partir de bacterias (adaptada de Carreño, 2011)

Las cintas de CB conforman una red durante la división celular, para la cual, antes de la mitosis la bacteria duplica el número de poros de tal forma que las células hijas presenten el mismo número y por tanto generan cintas del mismo ancho. Con la división se genera un nodo en la cinta lo que da como resultado una densa red que finalmente constituye la membrana macroscópica que se observa en la superficie de los medios de cultivo líquidos (Figura 3a) (Stanislaw *et al.*, 2005; Budhiono *et al.*, 2000; El-Saied *et al.*, 2004).





**Figura 23.** Morfología macroscópica de celulosa a partir de bacterias en medio estático (a) y en medio agitado (b) (adaptada de Stanislaw *et al.*, 2005)

Como se observa en la Figura 3, la morfología macroscópica de la CB depende de las condiciones de cultivo, en un medio estático la bacteria acumula la celulosa en forma de membrana en la interfase aire/líquido, mientras que en un medio agitado se forman gránulos irregulares (Jonas *et al.*, 1998; El-Saied *et al.*, 2004; Stanislaw *et al.*, 2005).

Diferentes autores han especulado sobre la razón por la cual algunos microorganismos producen celulosa, unos consideran que la bacteria produce la película para mantenerse en una posición cercana a la superficie del medio de cultivo y así obtener el oxígeno que necesitan para su metabolismo, otros asumen que lo hacen para protegerse de los rayos ultravioleta y otros prefieren afirmar que la celulosa es una barrera contra otros microorganismos (Budhiono *et al.*, 2000).

### **3.3 PROPIEDADES DE LA CELULOSA BACTERIANA (CB)**

El mecanismo de síntesis de la CB le confiere una pureza superior a la presente en cualquier fuente vegetal, por lo cual tiene características importantes como una alta cristalinidad (aprox. 80%), resistencia mecánica, moldeabilidad, estabilidad y durabilidad, es inerte metabólicamente y no es tóxica ni provoca reacción alérgica al contacto (Bielecki *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2009; Castro, 2012; Chavez *et al.*, 2004).

La celulosa bacteriana es insoluble en la mayoría de los solventes comunes, es biodegradable, tiene un alto grado de polimerización (entre 2.000 y 6.000 y en algunos casos alcanza hasta 20.000), es más homogénea y 200 veces más

acequible superficialmente que la vegetal, por lo tanto su capacidad de alojar agua es 100 veces su peso seco (Bielecki *et al.*, 2005; El-Saied *et al.*, 2004).

Sin embargo, todas estas propiedades y la cantidad de celulosa bacteriana producida pueden ser modificadas y/o varían durante su síntesis debido a las condiciones del cultivo y a la cepa utilizada para su producción (Bielecki *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2009; Castro, 2012; Chavez *et al.*, 2004).

### 3.4 APLICACIONES DE LA CELULOSA BACTERIANA (CB)

La celulosa bacteriana tiene características de pureza y propiedades fisicoquímicas únicas que la hacen interesante como materia prima para diferentes industrias (Tabla 1) y en aplicaciones donde normalmente es utilizada la celulosa de origen vegetal (El Saied, 2004). No obstante, la producción de celulosa bacteriana es limitada a nivel industrial debido al alto costo de las fuentes de carbono para su producción a gran escala (Caicedo, 2001; Chawla *et al.*, 2009).

**Tabla 12.** Aplicaciones de la celulosa bacteriana (adaptada de Castro, 2012)

Sector	Aplicación	Referencia
Alimentos	Espesante, estabilizante, reductor de calorías, fibra dietaria (celulosa edible).	El-Saied <i>et al.</i> , 2004.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad.	Iguchi <i>et al.</i> , 2000.
Minería y Refinería	Material para absorción de toxinas y acetites.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.

Textil	Piel y textiles artificiales, material de alta absorción acuosa.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.
--------	--	--------------------------------

**Continuación Tabla 1.** Aplicaciones de la celulosa bacteriana (adaptada de Castro, 2012)

Sector	Aplicación	Referencia
Turismo y deportes Cosméticos	Ropa deportiva y equipo de acampar. Estabilizador de emulsiones, acondicionadores y cremas.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.
Componentes de audio	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos o audífonos.	El-Saied <i>et al.</i> , 2004.
Medicina y farmacia	Piel artificial, tratamiento de heridas, regeneración de tejidos, implantes dentales, implantes de arterias, suplantación vasos sanguíneos y uretras artificiales.	Backdahi <i>et al.</i> , 2008; Trovatti <i>et al.</i> , 2011
Investigación	Inmovilización de proteínas, resinas para cromatografía.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.
Industria mecánica	Partes de carros, aviones, sellado de grietas en cohetes	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.
Industria forestal	Sustituto de la madera artificial.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.
Materiales	Material reforzante en compuestos, propiedades de barrera, empaques para alimentos.	Chawla <i>et al.</i> , 2009.
Tratamiento de aguas	Purificación de aguas residuales, ultrafiltración de aguas.	Bielecki <i>et al.</i> , 2005.

Maquiladora	Componente de partes y refacciones	El-Saied <i>et al.</i> , 2004.
-------------	------------------------------------	--------------------------------

Uno de los usos más conocidos de la CB es como materia prima para la fabricación de un postre llamado “Nata de coco”, el cual se fabrica principalmente en Filipinas e Indonesia mediante una fermentación usando como sustrato el agua de coco. Una vez se obtienen las membranas se cortan en cubos que son inmersos en un almíbar de azúcar (Budhiono *et al.*, 2000). Esta Nata es exportada principalmente a países asiáticos donde se consume como una bebida saludable ya que existen reportes que muestran que este producto reduce el colesterol en la sangre, disminuye el riesgo de cáncer, arterosclerosis y trombosis coronaria (El Saied, 2004).

### 3.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULOSA BACTERIANA

La celulosa se produce principalmente por bacterias Gram-negativas del género *Gluconacetobacter*; estas bacterias son estrictamente aerobias y generan la CB como un producto extracelular en la interfase aire-medio (Chavez *et al.*, 2004; Stanislaw *et al.*, 2005; Budhiono *et al.*, 2000). En la actualidad se han reportado numerosas especies de microorganismos cuyo metabolismo celular produce celulosa con características estructurales diferentes en cada caso (Tabla 2) (El-Saied *et al.*, 2004).

La especie más estudiada, hasta ahora, para la producción de celulosa es *Gluconacetobacter xylinum* debido a que tiene una mayor capacidad de producción en comparación a otras reportadas (Tabla 2), su hábitat natural son las frutas y vegetales en proceso de descomposición. Sin embargo, recientemente en Medellín Colombia se ha venido estudiando una cepa bacteriana nativa productora de CB llamada *Gluconacetobacter medellinensis* (Castro, 2012).

**Tabla 13.** Diferentes especies productoras de celulosa (adaptada de Castro *et al.*, 2012).

<b>Género</b>	<b>Especies</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencias</b>
<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefaciens</i>		Méndez <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>		Méndez <i>et al.</i> , 2004
<i>Rizhobium</i>	<i>leguminosurum</i>		Méndez <i>et al.</i> , 2004
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>xylinum</i>	Mosto de cerveza	Brown 1886
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>intermedius</i>	Bebida de kambucha, vinagre de sidra, vinagre de alcohol	Boesch <i>et al.</i> , 1998
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>oboediens</i>	Claro	Cleenwerck <i>et al.</i> , 2009
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>hansenii</i>	Vinagre	Gosselé <i>et al.</i> , 1983
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>europaeus</i>	Fermentación industrial de vinagre	Sievers <i>et al.</i> , 1992
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>swingsii</i>	Jugo de manzana orgánico	Dellaglio <i>et al.</i> , 2005
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>rhaeticus</i>	Jugo de manzana orgánico	Dellaglio <i>et al.</i> 2005
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>nataicola</i>	Nata de coco	Lindiyanti <i>et al.</i> , 2006

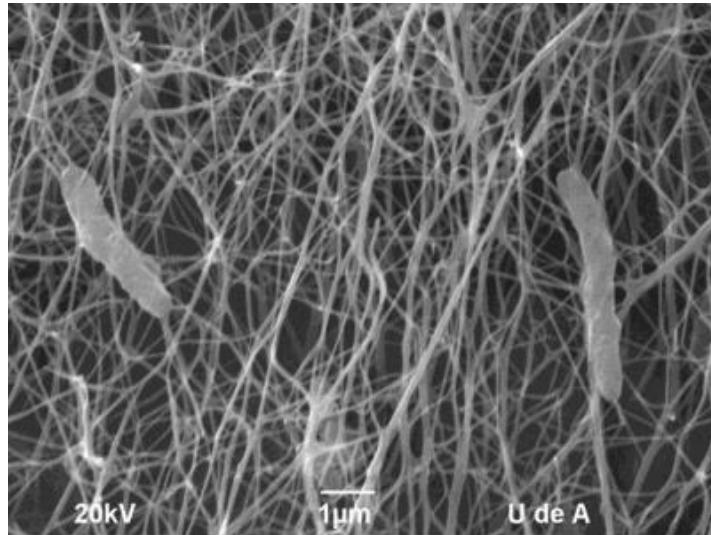
Dependiendo del tipo de microorganismo, las condiciones para la producción de celulosa bacteriana varían, por tanto variables como la fuente de carbono, tiempo de producción, pH y temperatura deben ser determinadas para cada caso (Chawla *et al.*, 2009, Gromet *et al.*,1962).

La cepa ID13488 fue caracterizada fenotípica y genotípicamente por Castro 2012 para ser identificada como una especie del género de las *Gluconacetobacter* (*G.*) a la cual se dio el nombre de *Gluconacetobacter medellinensis*. Dicha especie fue aislada de un vinagre casero adquirido en la Central minorista de la ciudad de Medellín, Antioquia y es capaz de producir celulosa a bajos pH, favoreciendo el reciclado del medio del cultivo. En general, se ha reportado que *G. medellinensis* tiene características similares a las de otras especies del género *Gluconacetobacter* utilizadas para la producción de CB (Castro, 2012).

### **3.5.1 *Gluconacetobacter medellinensis***

Esta bacteria es un bacilo Gram-negativo, con aproximadamente 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 4) y se presenta de forma individual, en parejas o en cadenas, son oxidasa negativos y catalasa positivos (Castro, 2012). Las colonias formadas por este microorganismo son de color beige, redondas, ásperas y opacas.

La producción de celulosa a partir de este microorganismo ha sido probada en varios medios de cultivo, utilizando como fuente de carbono azúcares como D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, etanol, maltosa, sorbitol, D-manitol, galactosa y celobiosa donde se ha confirmado que alcanza producciones de CB similares a las reportadas con otras bacterias del mismo género (Castro, 2012; Castro *et al.*, 2013).



**Figura 24.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la bacteria *Gluconacetobacter medellinensis* (Castro, 2012)

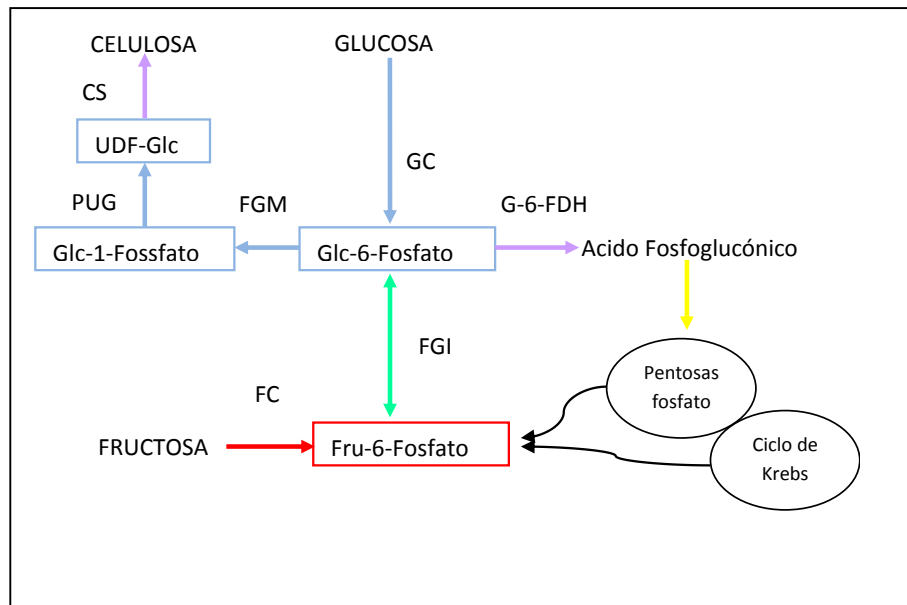
Esta cepa ha alcanzado su máxima producción (4,5 g/L) en un medio ácido (pH 3,5) donde normalmente otras especies inhiben su crecimiento y el proceso de producción de CB disminuye o se detiene completamente. Este tipo de características son altamente deseables en procesos de fermentación a nivel industrial para la producción de CB, ya que el medio de cultivo se puede reutilizar después de recolectar asépticamente la celulosa y así optimizar el consumo de recursos.

### **3.6 BIOSÍNTESIS DE CELULOSA BACTERIANA**

El creciente interés económico sobre las bacterias productoras de celulosa, ha abierto diferentes perspectivas en la identificación de los mecanismos moleculares que se utilizan en la biosíntesis del polímero, esta es la herramienta principal para desarrollar estrategias que permitan la optimización de la producción de celulosa para aplicaciones industriales.

Para la biosíntesis de CB existen dos vías anfibólicas importantes: el ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. El primero participa en la oxidación de carbohidratos mientras que el segundo oxida ácidos orgánicos y compuestos relacionados (Chavez *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 1991).

La ruta metabólica para la síntesis de CB (Figura 5) a partir de glucosa consiste en lo siguiente: la glucosa es transportada a través de la membrana bacteriana por la glucosa permeasa (GP) y es fosforilada por la enzima glucocinasa (GC) para formar glucosa-6- fosfato. La glucosa-6- fosfato es isomerizada por la fosfo-glucomutasa (FGM) a glucosa-1-fosfato, la cual es transformada a glucosa uridina-5'-difosfato (UDF-Glc) por la pirofosforilasa uridíndifosfo-glucasa (PUG). La UDF-Glc es el sustrato de la enzima celulosa sintasa (CS) que es considerada la subunidad catalítica de la biosíntesis de celulosa, siendo entonces la enzima más importante de este proceso y se encuentra ubicada en la membrana citoplasmática y es codificada en el operón *bcs* (síntesis de celulosa bacterial) en el cromosoma de todas las bacterias productoras de celulosa estudiadas (Sanchez *et al.*, 2002; Römling, 2002; El-Saied *et al.*, 2004).



**Figura 25.** Rutas metabólicas para sintetizar celulosa (adaptada de Chavez *et al.*, 2004)



La CS tiene un peso molecular aproximado entre 400 – 500 kDa y se encuentra asociada con la proteína de unión diguanil-monofosfato cíclico c-di-GMP, la cual tiene afinidad por el ácido 2',5' c-di-GMP que es un activador alostérico reversible que regula la actividad de la CS (Römling, 2002). El análisis de la localización celular de la CS y la c-di-GMP sugiere que ambas proteínas se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática que está en contacto con otras dos proteínas aún no identificadas, las cuales forman poros que se encuentran organizados a lo largo del eje longitudinal de la bacteria a través de los cuales las cadenas nascentes de celulosa emergen (sub-fibrillas) (Goelzer *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2002; El-Saied *et al.*, 2004, Römling, 2002).

La reacción global de la síntesis de CB implica el gasto de dos enlaces de alta energía por cada residuo de glucosa añadido al polímero (proceso energéticamente costoso), lo cual consume hasta un 10% del ATP generado por el metabolismo. Este aporte energético, necesario para la síntesis proviene del metabolismo aerobio, por lo cual la cadena respiratoria juega un papel importante en la síntesis de celulosa (Chavez *et al.*, 2004).

La bacteria también es capaz de convertir hexosas fosfato, como la fructosa (Figura 5), a Glucosa – 6- fosfato a través de la acción de la enzima Fructoquinasa (FK) que la transforma en Fructosa – 6- fosfato y posteriormente la Fosfoglucoisomerasa (FGI) la transforma en glucosa- 6- fosfato para iniciar el proceso de producción de glucosa.

Todo el proceso de biosíntesis de celulosa se presenta en las poblaciones bacterianas en crecimiento y por tanto la producción de celulosa y de biomasa son directamente proporcionales (Ross *et al.*, 1991), obedecen a una misma reacción de primer orden y las constantes de velocidad de los dos procesos son totalmente idénticas. Mientras que con respecto al grado de polimerización (DP) de la celulosa, se conoce que aumenta casi linealmente con el tiempo y es inversamente proporcional al tiempo de generación de las bacterias, es decir que la iniciación de

la cadena de celulosa se lleva a cabo en la división celular y crece hasta que la bacteria muere o se multiplica, provocando un determinado grado de polimerización para cada bacteria y para cada sustrato donde ésta crezca (Marx *et al.*,1976).

### **3.7 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA**

La composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales que se proporcionen al microorganismo para su crecimiento son determinantes en la cantidad y calidad de la celulosa que sintetice (Ruka *et al.*,2012).

Los medios de cultivo comúnmente utilizados para producir CB requieren principalmente de una fuente de carbono, fuente de nitrógeno y sales que amortiguan los cambios de pH (El-Saied *et al.*,2008; Chavez *et al.*,2004; Nguyen *et al.*,2008; Ramana *et al.*, 2000). Por tal motivo, los investigadores deben evaluar estas condiciones para cada especie. Por ejemplo, para *G. xylinum* (la más referenciada y utilizada mundialmente) se han probado diferentes fuentes de carbono sobre la producción de celulosa encontrando los mejores resultados cuando se utiliza sacarosa, glucosa, fructosa o manitol; de los cuales se reporta que con la fructosa se obtienen menores rendimientos, mientras que la glucosa es considerada la principal fuente de carbono para la producción de celulosa en comparación con los otros tres azúcares mencionados anteriormente (El-Saied *et al.*,2004). Con la sacarosa se han reportado bajos rendimientos durante los primeros cuatro días de la fermentación en comparación con la glucosa, debido a que la sacarosa es un disacárido compuesto por dos hexosas (glucosa y fructosa) que se debe desdoblar antes de iniciar la síntesis de la celulosa; sin embargo después del quinto día, aproximadamente, los niveles de producción de CB son mayores (El-Saied *et al.*,2008; Nguyen *et al.*, 2008; Ramana *et al.*, 2000; Ruka *et al.*, 2012;

Hutchens *et al.*, 2007; Keshk *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Masaoka *et al.*, 1993; Mikkelsen *et al.*, 2009; Pourramezan *et al.*, 2009).

Por otro lado, el extracto de levadura es la fuente de nitrógeno de mayor empleo debido a que reporta las mejores productividades de celulosa, siendo también utilizadas otras como la peptona, polipeptona, triptona, licor de maíz y sulfato de amonio (Chavez *et al.*, 2004; Carreño, 2011; Castro, 2012; Chawla *et al.*, 2009; El-Saied *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2008).

Uno de los medios más utilizados actualmente para la producción de celulosa es el establecido por Hestrin y Schramm (HS) en 1954, con el cual se obtuvieron rendimientos de producción altos en comparación con otros utilizados por diferentes investigadores a partir de *Gluconacetobacter xylinum*. Este medio está compuesto por: glucosa 2% (p/v), peptona 0,5%, extracto de levadura 0,5%, fosfato disódico 0,27%, ácido cítrico 0,115% y tiene pH 6,0 (Hestrim 1954).

Recientemente, algunos autores, también han empleado residuos agroindustriales como medios de cultivo obteniéndose aumentos en la producción de celulosa con respecto al uso de glucosa como única fuente de carbono; este aumento se atribuye a la cantidad de micro- y macro- nutrientes adicionales presentes en los residuos (Keshk *et al.*, 2005; Araya *et al.*, 2010).

También es importante mencionar que factores ambientales como la temperatura pueden afectar el grado de polimerización (DP) y la capacidad higroscópica (CH) de la celulosa. La CB sintetizada a 30°C presenta menor DP (10.000 aproximadamente) y mayor CH (164%) en comparación con el polímero sintetizado a 25°C y a 35°C (El-Saied, 2004), por lo tanto la fermentación debe llevarse a cabo dentro del rango de temperatura óptima para cada cepa bacteriana en específico. El rango de temperatura más utilizado y reportado para la producción de CB es de 28 a 30°C (Chavez *et al.*, 2004; Carreño, 2011; Ślusarska *et al.*, 2008; Ruka *et al.*, 2012).

El pH del medio de cultivo, también es otro factor ambiental que influye en la producción de celulosa debido a que se ha reportado que puede afectar la capacidad de retención de agua del polímero y además juega un papel importante en la prevención de contaminación del medio de cultivo. Los valores de pH iniciales más utilizados varían entre 4 y 7, siendo el pH óptimo dependiente de cada cepa bacteriana (Chavez *et al.*, 2004; El-Saied *et al.*,2004). A medida que ocurre la fermentación, el valor del pH inicial va disminuyendo debido a la conversión de glucosa en ácido glucónico hasta que finalmente se inhibe el metabolismo del microorganismo y por lo tanto se interrumpe la producción de celulosa; para las especies del género *Gluconacetobacter* esto ocurre generalmente cuando se alcanzan pH menores de 4 (Gromet *et al.*, 1963; Klemm *et al.*, 2001; Ruka *et al.*, 2012; Chavez *et al.*, 2004).

El cultivo para la producción de celulosa se puede realizar en condiciones estáticas o agitadas y dependiendo de esto varía el tiempo de fermentación requerido. El método estático es el más empleado para la obtención de CB a nivel de laboratorio, donde el polímero crece en forma de películas; mientras que el método agitado es el más estudiado a nivel industrial y biotecnológico por producir una mayor transferencia de oxígeno que favorece la producción de celulosa, sin embargo presenta inconvenientes como inducir en la célula la pérdida de la capacidad productora de celulosa, aumentar la mutabilidad del microorganismo y disminuir la resistencia mecánica, el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa (Caicedo, 2001; Carreño, 2011; Chawla *et al.*,2009; Ruka *et al.*,2012; Watanabe *et al.*,1998; Cheng *et al.*,2009; Czaja *et al.*,2004).

La productividad de celulosa en un medio estático depende además del área superficial del medio y de la concentración inicial de biomasa inoculada. Se conoce que a mayor área superficial mayor es la producción de celulosa, pero existe una relación (área interfacial/volumen de medio) límite a partir de la cual la cantidad de polímero producido por unidad de área comienza a descender. Por tal motivo algunos investigadores describen que existe una relación lineal entre el espesor

relativo de la película, definido como altura de película húmeda/altura del líquido, y el área por unidad de volumen del medio, encontrando una relación área-volumen de  $0,8 \text{ cm}^{-1}$  para no afectar el rendimiento de celulosa (Caicedo, 2001).

Posterior a la obtención de las membranas de CB se requiere un tratamiento alcalino para retirar residuos de medio y las células bacterianas adheridas a la red tridimensional de la celulosa (Araya *et al.*, 2010). Dentro de los métodos más utilizados para la remoción de estas impurezas se encuentra la inmersión de la CB en soluciones de hidróxidos (sodio o potasio), cloruro de sodio o hipoclorito, peróxido de hidrógeno, ácidos diluidos o solventes orgánicos durante 14 o hasta 24 h y una temperatura entre  $25\text{-}65^{\circ}\text{C}$  (Bielecki *et al.*, 2005; Ruka *et al.*, 2012; Ślusarska *et al.*, 2008).

### 4. MATERIALES Y METODOS

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada se establece la necesidad de conocer los requerimientos para la producción de celulosa del microorganismo *G. medellinensis*, recientemente clasificado. A continuación se presenta la descripción de la metodología utilizada.

#### 4.1 ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE *Gluconacetobacter medellinensis* PRODUCIDA DURANTE UNA FERMENTACIÓN LÍQUIDA

La cepa bacteriana *Gluconacetobacter medellinensis* utilizada en esta investigación fue aislada y caracterizada por el Grupo de Investigación sobre Nuevos Materiales (GINUMA) de la Universidad Pontificia Bolivariana sede Medellín en el año 2012. Esta fue aislada a partir de un vinagre de frutas disponible comercialmente en la Plaza Minorista de la ciudad de Medellín. El microorganismo fue aislado y conservado por liofilización, usando como medio crioprotector skim milk, para garantizar la disponibilidad de la bacteria durante la investigación; una cantidad pequeña de microorganismos se mantuvo en nevera (4-6°C) para trabajos diarios.

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) en la síntesis de celulosa por *G.medellinensis* se prepararon tres medios de cultivo mediante la modificación de un medio estándar Hestrin-Schramm (HS) (Tabla 3), con pH 3,6 incubado a una temperatura de 28°C, siguiendo los parámetros establecidos por Castro (2012).

**Tabla 14.** Medio Hestrin-Schramm (HS)

<b>NUTRIENTE</b>	<b>PORCENTAJE (% p/v)</b>
Glucosa, fructosa o sacarosa	2
Extracto de levadura	0,5
Peptona	0,5
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,275

Para la cuantificación de biomasa en cada uno de los medios se estableció un protocolo el cual es descrito a continuación.

Inicialmente, se realizó una siembra en estrías del microorganismo en medio HS a pH 5 con bacto-agar al 2,5% y se incubó durante 72 h a 28°C, siguiendo la metodología de Castro 2012 para aislar colonias.

Cuando se observaron las colonias en las cajas de Petri, se recolectaron y se lavaron en agua destilada estéril centrifugándolas a 3000 rpm por 10 min.

Las colonias lavadas se resuspendieron en agua estéril ajustándose al patrón 0,5 de la escala de Mac Farland que corresponde a una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml, la cual se corroboró por recuento en placa. Este preinóculo se mantuvo en agitación para asegurar homogeneidad en la inoculación y fue utilizado para establecer las curvas de crecimiento para los tres medios.

Los medios de cultivo fueron inoculados con un 10% de preinóculo e incubados a 28°C durante 100 h a una agitación de 50 rpm para asegurar mayor disponibilidad de células en el medio ya que no hay formación de membrana. Se tomaron muestras (3,5 ml) de cada medio cada 10 h para cuantificar las células presentes. La cantidad de células se determinó por densidad óptica y número de células viables (UFC) como sigue:

Densidad óptica: se tomaron 3 ml de la muestra extraída cada 10 h, se adicionó 3,3% de celulasa (Celucast - Novozymes) al volumen de la muestra y se incubaron a 50 °C en baño maría durante dos horas para degradar la celulosa y realizar las lecturas de absorbancia (A) a 640 nm mediante lectura en un nano Drop Thermoscientific, siguiendo la metodología utilizada por Tahara *et al.*, 1997. Este procedimiento se repitió cada 10 horas hasta alcanzar un tiempo total de 100 horas y con estos datos se obtuvieron las curvas de crecimiento del *G. medellinensis* para cada uno de los medios de cultivo preparados.

Para obtener las curvas de crecimiento de *G. medellinensis* por conteo de células viables (UFC) se tomó una muestra de 0,5 ml de las muestras extraídas cada 10 h. Cada una de estas muestras se llevaron a tubos de ensayo con 3,5 ml de medio HS a pH 3,6 y 1 ml de celulasa al 20 % (dilución  $10^{-1}$ ). Se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , las cuales se dejaron en agitación durante 2 h a 30 °C. Estas muestras fueron sembradas por extensión en caja de petri con bacto-agar, preparado y solidificado previamente, usando asas digralsky estériles. Se realizaron siembras por triplicado en cada muestra.

Los procesos de recuento de células por absorbancia y por UFC se repitieron tres veces y los datos obtenidos se promediaron para realizar las curvas de crecimiento de *G. medellinensis* en cada uno de los medios de cultivo preparados.

El propocolo establecido fue validado tomando 10 muestras de cada uno de los tres medios preparados con glucosa 2%, a las cuales se les realizaron los procedimientos descritos anteriormente para conteo de células por absorbancia y por UFC.



#### **4.2 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA *Gluconacetobacter medellinensis***

Se realizaron modelamientos para describir matemáticamente el crecimiento de *G. medellinensis* bajo condiciones ambientales específicas mediante la utilización del software online para ajuste de curvas y superficies [zunzun](http://zunzun.com) ([http://zunzun.com Online Curve And SurfaceFitting](http://zunzun.com)). Para escoger el modelamiento adecuado en cada caso, se compararon los resultados estadísticos de los modelos sigmoidales Gompertz, Logistic y Richards que lograron describir las curvas de crecimiento.

Estas ecuaciones permitieron determinar el tiempo en el que se inicia y finaliza la fase exponencial de crecimiento de *G. medellinensis* en cada uno de los medios, la máxima producción de biomasa ( $N_{max}$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y tiempo de duplicación del microorganismo ( $t_d$ ).

#### **4.3 DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO Y SU CONCENTRACIÓN ADECUADA, PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA POR *Gluconacetobacter medellinensis***

Las fermentaciones se realizaron en medios de cultivo líquidos, en condiciones estáticas, utilizando frascos de vidrio con un área de 48 cm<sup>2</sup> y un volumen de 60 cm<sup>3</sup> para lograr la relación de 0,8 cm<sup>-1</sup> propuesta por Caidedo, 2001 para no afectar el rendimiento de la celulosa. Se utilizó un pH de 3,6 en el medio y una temperatura de 28°C siguiendo los parámetros propuestos por Castro 2012. Se utilizaron los nutrientes establecidos en el medio estándar HS variando la fuente de carbono (glucosa, fructosa o sacarosa) en concentraciones de 1%, 2% y 3%,

respectivamente basada en la planteada por Hestrin-Schramm (2% p/v). Los ensayos se realizaron por triplicado y la variable respuesta para este análisis fue la cantidad de celulosa producida (g/L de medio) en un tiempo de 15 días, para lo cual se recolectaron las membranas y se lavaron con una solución de KOH 5% p/p durante 14 h, al cabo del cual se lavaron con agua destilada hasta que alcanzaron un pH neutro y posteriormente se secaron a 100 °C en un horno de convección forzada, hasta que alcanzaron un peso constante.

Para determinar el tipo de azúcar y la concentración adecuada para el crecimiento del *G. medellinensis* bajo las condiciones de fermentación establecidas anteriormente, se utilizó un diseño de experimentos completamente al azar, aplicando ANOVA de clasificación simple mediante el programa de análisis estadístico STATGRAPHICS Centurión.

#### **4.4 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN MEDIO HS**

Para medir el consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno por *G. medellinensis* se prepararon medios de cultivo con cada una de las fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y fructosa) en concentración de 2% y las mismas condiciones de pH, temperatura y concentración de inóculo utilizadas durante el desarrollo de la investigación. Estas fermentaciones se mantuvieron durante 15 días y se tomaron tres muestras de cada uno de los medios cada tres días, para un total de 54 muestras (18 con cada fuente de carbono).

El análisis del consumo de la fuente de carbono se realizó utilizando un equipo HPLC Shimadzu con una bomba LC20AD, un auto muestreador SIL20A HT, un horno CTO2oA y un detector de índice de refracción RID10A., para el cual fue

necesario filtrar las muestras utilizando un filtro de de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  de polietersulfona (PES). Para la cromatografía se utilizó ácido sulfúrico 0,005N como fase móvil, una columna ION exclusión 300 mm x 7,8 mm, un flujo de 0,6 ml/min y una temperatura de 30 °C.

Para el análisis del consumo de la fuente de nitrógeno asociado a proteínas, se utilizó la prueba colorimétrica de Biuret, para la cual se preparó 1 L de la solución estándar de Biuret y 10 mL de la solución estándar BSA y se siguió el protocolo descrito en el Anexo 1.

#### **4.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *Gluconacetobacter medellinensis* Y DE LAS MEMBRANAS DE CELULOSA QUE SINTENTIZA EN CADA UNO DE LOS MEDIOS EVALUADOS**

Para analizar la morfología de los bacilos presentes dentro de las membranas de celulosa, formadas durante 15 días de fermentación en los medios HS líquidos con cada una de las fuentes de carbono analizadas y con condiciones ambientales iguales a las utilizadas durante todo el desarrollo de la investigación (pH, temperatura, concentración de inóculo), se extrajeron las membranas de CB y se depositaron en un porta objetos, se les realizó una tinción de Gram para asegurar la presencia de los bacilos en la placa y finalmente se revistieron con oro/paladio usando un equipo de bombardeo iónico durante 5 min para ser caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Adicionalmente, las membranas extraídas se lavaron con una solución acuosa al 5 % (p/p) de KOH durante 14 h a una temperatura promedio de 28 °C, para remover los componentes del medio y bacterias que se encuentren adheridos. Posteriormente se sometieron a lavados sucesivos con agua hasta alcanzar pH neutro y finalmente las membranas de celulosa obtenidas fueron congeladas con

nitrógeno líquido, se almacenaron en un congelador a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, se secaron por liofilización y luego se revistieron con oro/paladio usando un equipo de bombardeo iónico durante 5 min, para ser caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para el análisis de las imágenes arrojadas por el SEM se utilizó un programa de procesamiento digital de imágenes llamado "ImageJ", el cual permitió medir la longitud promedio de los bacilos encontrados dentro de las membranas obtenidas con cada una de las fuentes de carbono y mediante el uso de la herramienta de procesos binarios (dentro de ImageJ) se determinó la porosidad de las membranas de CB.

### 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos durante la investigación para determinar las condiciones de cultivo requeridas por la cepa nativa *G. medellinensis* para su adecuado crecimiento. Se estableció el protocolo para cuantificar la biomasa de este microorganismo y se obtuvieron las curvas de calibración y de crecimiento en tres fuentes de carbono: glucosa, fructosa y sacarosa. Se cuantificó la producción del polímero para las tres fuentes de carbono y se evaluó el efecto de éstas y de la fuente de nitrógeno en la producción de celulosa en peso seco. Finalmente, las membranas obtenidas se caracterizaron con análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

#### 5.1 ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE *Gluconacetobacter medellinensis* PRODUCIDA DURANTE UNA FERMENTACIÓN LÍQUIDA

Utilizando la metodología descrita por Tahara *et al.*, 1997, se planteó un protocolo para la cuantificación de biomasa de *G. medellinensis* (Anexo 2), se midió absorbancia y se hizo conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio HS con cada una de las fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) al 2 %.

Dicho protocolo se validó utilizando una fermentación líquida (medio HS con glucosa al 2 %) de 15 días de incubación, pH inicial de 3,6 y una temperatura de 28 °C, se tomaron 10 muestras y se les adicionó celulosa en las concentraciones y condiciones descritas en el protocolo (Anexo 2), para finalmente medir la densidad

óptica en espectrofotómetro a 600 nm y hacer la siembra por extensión en cajas de petri con bacto-agar utilizando asas digralsky, este proceso se realizó para tres tiempos diferentes con miras a establecer su reproducibilidad, los resultados se evidencian en la Tabla 4.

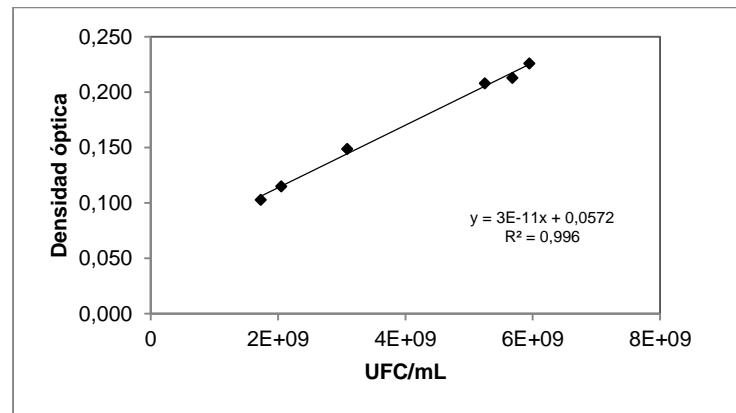
**Tabla 15.** Validación de protocolo para cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis*

Muestras	Unidades Formadoras de Colonias en placa (UFC)			Absorbancia		
	1	2	3	1	2	3
1	229	No*	230	0,549	0,546	0,487
2	210	185	186	0,549	0,600	0,495
3	299	210	No*	0,505	0,562	0,530
4	239	193	190	0,580	0,498	0,56
5	256	250	199	0,542	0,535	0,524
6	299	213	245	0,515	0,572	0,564
7	231	201	196	0,500	0,572	0,531
8	260	233	208	0,512	0,540	0,520
9	249	229	216	0,550	0,566	0,518
10	253	210	215	0,598	0,567	0,500
<b>Desvst</b>	25	20	19	0,033	0,046	0,025
<b>Media</b>	249	212	208	0,540	0,564	0,520
<b>Coef. Var</b>	10	9	9	6	8	5

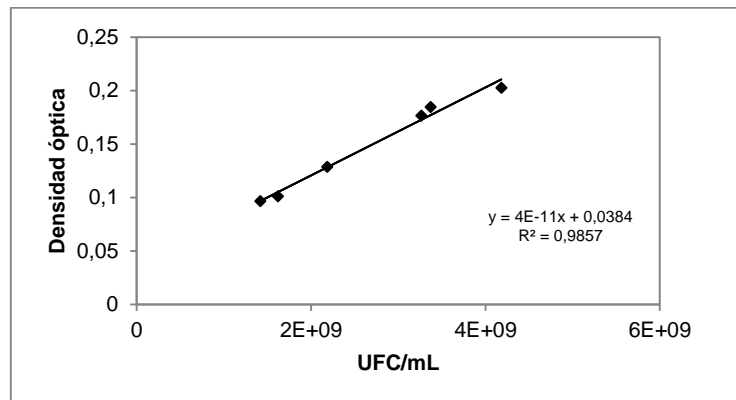
\* Contaminaciones

Según la Tabla 4, los resultados de absorbancia y UFC obtenidos con cada una de las diez muestras tienen una precisión aceptable ya que los coeficientes de variación están por debajo de 10% (Díaz, 2009). Además, las medias para cada una de las tres réplicas realizadas, presentaron bajas desviaciones estándar. Con lo cual se validó la eficiencia y confiabilidad del protocolo establecido (Anexo 2) para cuantificar biomasa de *G. medellinensis* mediante el conteo de células viables (UFC) y de espectrofotometría (absorbancia).

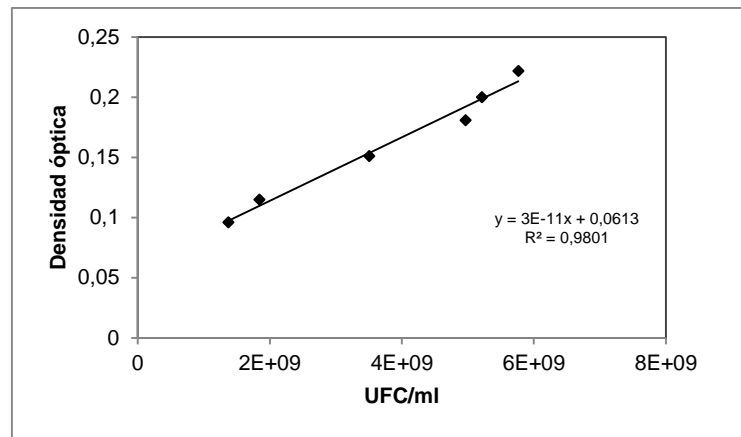
Para establecer la curva de calibración con cada una de las fuentes de carbono se tomaron tres muestras de una fermentación líquida con 8 días de incubación, pH inicial de 3,6, temperatura de 28 °C y  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de concentración inicial, utilizando el protocolo validado. Se realizaron 6 diluciones seriadas a cada una de estas muestras y se correlacionaron los datos de absorbancia y el número de UFC determinadas para el medio con glucosa, fructosa y sacarosa al 2 %, obteniéndose así las curvas de calibración para cada una de las fuentes de carbono (Figuras 6, 7 y 8) permitiendo cuantificar la cantidad de biomasa (UFC/mL) en cualquier momento de la fermentación.



**Figura 26.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con glucosa al 2%



**Figura 27.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con fructosa al 2%



**Figura 28.** Curva de calibración para cuantificación de biomasa en medio Hestrin & Schramm con sacarosa al 2%

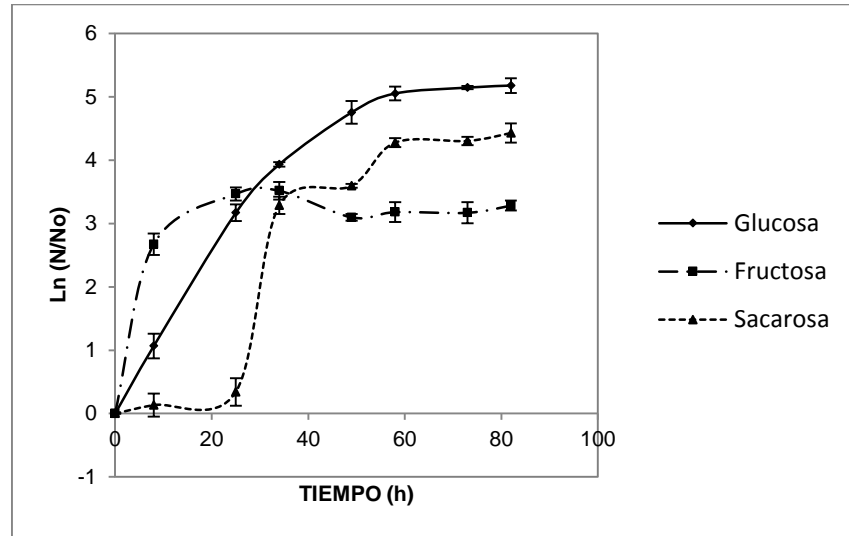
Estas curvas de calibración tienen un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0,996, 0,985 y 0,980 para glucosa 2%, fructosa 2% y sacarosa 2%, respectivamente, los cuales tienen un buen ajuste ya que son mayores a 0,9 (Urribarri *et al*, 2004). Lo anterior indica que el método de correlación propuesto es válido para la cuantificación de *Gluconacetobacter medellinensis* en cada una de las fuentes de carbono, bajo las condiciones descritas en el Anexo 2.

## 5.2 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO *Gluconacetobacter medellinensis*

Con las curvas de calibración obtenidas anteriormente y la metodología planteada en el Anexo 3 para realizar las curvas de crecimiento de *G. medellinensis*, se midió el número de UFC/mL(N) en el tiempo y se realizaron las gráficas en sistemas de coordenadas normalizadas con el número de UFC/mL inicial ( $N_0$ ) para una mejor identificación de las fases de crecimiento celular, tal como lo propone Zwietering *et al.*, 1990.



Dichas curvas de crecimiento se obtuvieron utilizando medio comercial HS con tres diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) a una concentración de 2%, las cuales se muestran a continuación en la Figura 9.



**Figura 29.** Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis* utilizando glucosa, fructosa y sacarosa 2 % como fuente de carbono

En esta Figura se observa que en los medios con glucosa y fructosa el microorganismo inicia su crecimiento sin presentar una fase de adaptación clara que indique retraso en el inicio de la fase exponencial, mientras que en el medio con sacarosa si presenta una fase de adaptación de 25 h, lo cual indica que en este sustrato posiblemente se requiera una hidrólisis del azúcar antes de empezar a ser consumido, tal como lo plantea El-Saied *et al.*, 2008.

De igual manera, en la Figura 9 se observa que el microorganismo en glucosa alcanza un crecimiento máximo a las 58 h con  $6,46 \times 10^9$  UFC/mL, mientras que en el medio con fructosa se alcanza a las 25 h con  $8,9 \times 10^7$  UFC/mL y en sacarosa este mayor crecimiento se obtuvo a las 58 h con  $4,42 \times 10^8$  UFC/mL, por tanto la fase exponencial para la sacarosa duró aproximadamente 33 horas.

Estos resultados demuestran que el microorganismo *G. medellinensis* presentó una mayor afinidad por la glucosa, ya que con esta fuente de carbono se obtuvo mayor crecimiento expresado en UFC/mL, seguida de la sacarosa y la fructosa. Adicionalmente, el microorganismo mostró un comportamiento de menor adaptación al inicio de la fermentación cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono, lo cual es desfavorable cuando se pretende escalar el proceso a nivel industrial debido a que es tiempo sin producción del metabolito de interés. En este sentido la mejor fuente de carbono para el crecimiento de *G. medellinensis* fue la glucosa.

Ruka *et al.*, 2012 encontraron en su trabajo de investigación comportamientos similares con el microorganismo *G. xylinus*, en donde la glucosa y la sacarosa fueron los azúcares con los que se obtuvieron los mayores rendimientos de obtención de biomasa de *G. xylinus*. También encontraron que al comparar el crecimiento celular del microorganismo en glucosa y fructosa, a pesar de ser estructuralmente similares, la glucosa tuvo mayor rendimiento debido a que la bacteria no utiliza tan eficientemente la fructosa.

Lo anterior puede estar relacionado con el uso más eficiente de la glucosa en el proceso de glucólisis, para la obtención de energía en la ruta de las pentosas fosfato. La glucosa es convertida directamente en una fase oxidativa (presencia de oxígeno) a glucosa-6-fosfato obtenida mediante la fosforilación de la glucosa libre, obteniéndose NADPH y finalmente la pentosa ribulosa-5-fosfato necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Así mismo, se genera piruvato que pasará al ciclo de Krebs y otros intermediarios de 6 y 3 carbonos como la fructosa que podrían ser utilizados en otros procesos celulares. En el caso de la fructosa se requieren pasos adicionales en los que la hexosa es fosforilada a fructosa-6-fosfato en una fase no oxidativa, para poder ser utilizada para la glucólisis, estos pasos adicionales hacen más costoso, energéticamente hablando el metabolismo para este microorganismo (Benziman *et al.*,1972).

Las curvas de crecimiento del microorganismo, obtenidas anteriormente, se ajustaron mediante funciones sigmoidales encontradas con ayuda del software online para ajuste de datos ZunZun (<http://zunzun.com Online Curve And SurfaceFitting>), con el objetivo de modelizar el crecimiento microbiano en cada una de las fuentes de carbono analizadas en esta investigación y a partir de esto, determinar la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) en la fase exponencial y el tiempo de generación de *G. medellinensis* en las condiciones de cultivo evaluadas.

Se encontró que los tres modelamientos matemáticos con mayor ajuste a los datos registrados fueron los de Gompertz, Richards y Logístico, ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente. Estos modelos pertenecen al grupo de las funciones sigmoidales y son unos de los más conocidos y empleados para determinar crecimientos microbianos (M. Zwietering *et al.* 1990; Ginovart *et al.*, 2002; Narushin *et al.*, 2003 & Khamis *et al.*, 2005).

El modelo Gompertz  $y = a * \exp(-\exp(b - cx))$  **Ecuación 1**

El modelo de Richards  $y = 1,0 / (a + b * e^{(-c*x)})^d$  **Ecuación 2**

El modelo Logístico  $y = a / (1,0 + b * \exp(-cx))$  **Ecuación 3**

Los parámetros a, b y c asociados en cada uno de las ecuaciones tienen un significado biológico. Los valores de dichos parámetros para los tres modelos se muestran en la Tabla 5, donde “a” es la cantidad inicial de microorganismos viables (UFC/ml), “b” indica una velocidad de crecimiento relativa a la velocidad de crecimiento máxima, “c” es la diferencia entre el número inicial de microorganismos y el recuento máximo que se puede alcanzar en el medio y “d” (modelo de Richards) es un parámetro de ajuste y no tiene ningún significado biológico. Los parámetros obtenidos en esta investigación para cada uno de los medios, se encuentran en el Anexo 4

**Tabla 16.** Estimaciones de parámetros (a,b,c t d), coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y prueba de ajuste (F) para los modelos de crecimiento ajustados de *Gluconacetobacter medellinensis* en cada uno de los medios

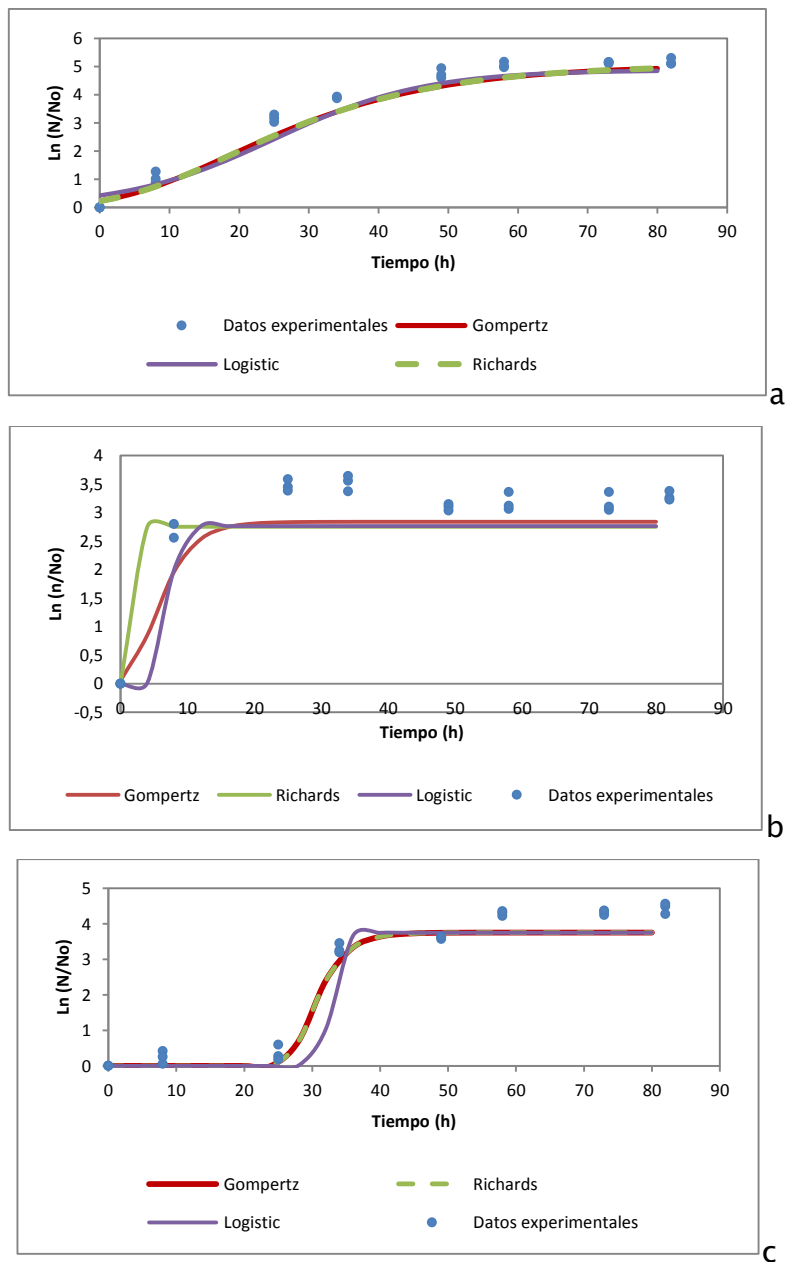
GLUCOSA						
Coef. Estadísticos	$R^2$	F	a	b	c	d
Gompertz	97 %	276	5,057	1,132	0,060	
Richards	97 %	175	0,999	1,407 E-04	-0,060	2,203 E04
Logístico	95 %	196	4,77	10,46	0,093	

FRUCTOSA						
Coef. Estadísticos	$R^2$	F	a	b	c	d
Gompertz	82 %	47	2,837	1,366	0,295	
Richards	77 %	22	0,993	9,309 E-02	-1,013 E03	1,502 E02
Logístico	78 %	40	2,761	8,451 E04	1,538	

SACAROSA						
Coef. Estadísticos	$R^2$	F	a	b	c	d
Gompertz	97 %	350	3,755	9,796	0,331	
Richards	97 %	222	0,999	3,906	-0,331	4,605 E03
Logístico	97 %	346	3,750	5,4 E16	1,173	

En la literatura consultada sobre criterios para la selección de modelamientos matemáticos que describan de manera adecuada los crecimientos bacterianos en general, no existe un consenso único que permita decidir cuál es el ideal en cada caso. Por tal motivo, se emplearon los parámetros estadísticos obtenidos como guía para la selección, se encontró que no existe una diferencia en el ajuste ( $R^2$ ) realizado con cada uno de los modelos, mientras que al observar los resultados de la prueba de ajuste (F) el modelo matemático que presenta los mayores valores fue el de Gompertz.

La Figura 10 se muestra gráficamente el comportamiento de los datos obtenidos y los modelos para cada uno de los medios evaluados, donde se puede apreciar su ajuste.

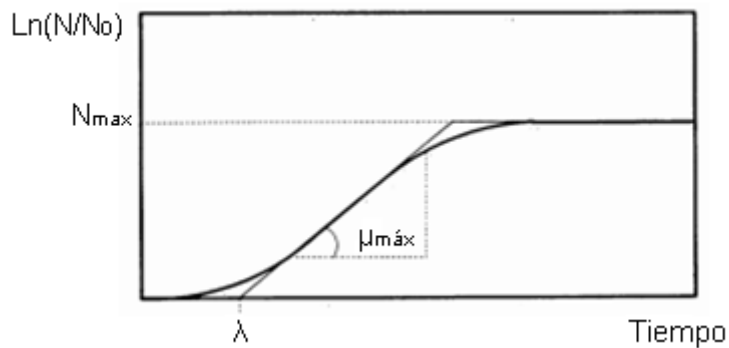


**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis* en Hestrin & Schramm con glucosa(a), fructosa(b) y sacarosa(c) al 2 % modeladas

Algunos autores como Zwietering *et al.*, 1990 han comparado también los modelos de Gompertz, Richard y Logístico en el crecimiento de bacterias, encontrando que todos los modelos se ajustan bien a los datos experimentales, aunque concluyeron que el modelo de Gompertz fue suficiente para describir la curva de crecimiento bacteriano, debido en parte a su simplicidad y facilidad de ajuste.

Con base en la simplicidad encontrada por dichos autores y a los mejores resultados de la prueba de ajuste (F) obtenidos, se considera que el modelo de Gompertz es el mejor para modelar y predecir el crecimiento de *G. medellinensis*.

Zwietering *et al.*, 1990, proponen una reparametrización de la ecuación del modelo de Gompertz (Figura 11 y Ecuación 4) con la cual se puede determinar la máxima producción de biomasa ( $N_{\text{máx}}$ ), el inicio de la fase exponencial ( $\lambda$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) del microorganismo. Los resultados obtenidos para *G. medellinensis* son presentados en la Tabla 8.



**Figura 11.** Parámetros de crecimiento de un microorganismo (adaptada de Zwietering *et al.*, 1990)

$$\ln(N/N_0) = N_{max} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} * e}{N_{max}}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \text{ Ecuación 4}$$

Donde:

$$N_{max} = 10^a * N_0 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\lambda = \frac{(b-1)}{c} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\mu_{max} = \frac{ac}{e} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad \text{Ecuación 8}$$

**Tabla 17.** Variables obtenidas con cada una de las simulaciones realizadas en los medios de cultivo analizados

	<b>N<sub>máx</sub> (UFC/mL)</b>	<b>λ (h)</b>	<b>μ<sub>max</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>td (h)</b>
<b>Glucosa</b>	6,47 x 10 <sup>9</sup>	2,18	0,11	6,16
<b>Fructosa</b>	5,91 x 10 <sup>7</sup>	1,24	0,31	2,24
<b>Sacarosa</b>	4,86 x 10 <sup>8</sup>	26,54	0,45	1,51

De acuerdo a la Tabla 8, la cantidad de biomasa máxima producida en cada medio para glucosa, fructosa y sacarosa fue de 6,47 x 10<sup>9</sup>, 5,91 x 10<sup>7</sup> y 4,86 x 10<sup>8</sup> UFC/ml, respectivamente, lo cual corrobora que con la glucosa se obtiene mayor cantidad de microorganismos. Con estos valores de N<sub>máx</sub>, que indican la finalización de la etapa exponencial, se estableció que para glucosa, fructosa y sacarosa se tiene una duración de la fase exponencial de 56, 29 y 32 h, respectivamente.

De igual manera en la Tabla 8, se observa que la duración de la fase de latencia en cada medio ( $\lambda$ ) fueron de 2,18, 1,24 y 26,54 h para glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente.

Es importante señalar que para la sacarosa se observa una fase de adaptación entre 25 - 26 h, confirmando que el disacárido requiere una hidrólisis previa a glucosa y fructosa para que posteriormente estos monosacáridos puedan atravesar la membrana celular y así ser metabolizados por *G. medellinensis* como se había explicado anteriormente. Contrario a lo que sucede cuando el sustrato es glucosa o fructosa, puesto que estas son transportadas a través de la membrana celular e incorporadas dentro de la ruta biosintética de la celulosa de forma directa (Ross *et al.*, 1991; Oikawa *et al.*, 1995; Ruka *et al.*, 2012 & Mikkelsen *et al.*, 2008).

Las velocidades específicas de crecimiento del microorganismo ( $\mu_{max}$ ), establecidas en cada uno de los medios de cultivo con glucosa, fructosa y sacarosa, fueron de 0,11, 0,31 y 0,45 h<sup>-1</sup> respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de los resultados obtenidos por diferentes autores con algunas cepas de *Gluconacetobacter* (Alvarez *et al.*, 2013; Mikkelsen *et al.*, 2009; Pecoro *et al.*, 2008 & Stanislaw 2005), los cuales oscilan entre 0.7 y 0.1 h<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos de  $\mu_{max}$ , para esta investigación, indican que *G. medellinensis*, además de presentar un periodo de adaptación mucho más largo en el medio de cultivo con sacarosa, presentó también una velocidad de crecimiento mayor durante su etapa exponencial y por lo tanto un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) más corto (1,51 h), como lo muestra la Tabla 8. De igual manera se estableció que el microorganismo presenta la menor  $\mu_{max}$  en el medio de cultivo con glucosa donde el  $t_d$  es mayor (6,16 h) con respecto a los otros dos medios evaluados.

Alrededor de este tema se encuentran diferentes resultados que varían dependiendo de las condiciones del medio de cultivo, en algunos casos se ha generado mayor cantidad de microorganismos (UFC/ml) en fructosa y sacarosa que en glucosa (Mikkelsen *et al.*, 2009) y en otros, los resultados son similares a los

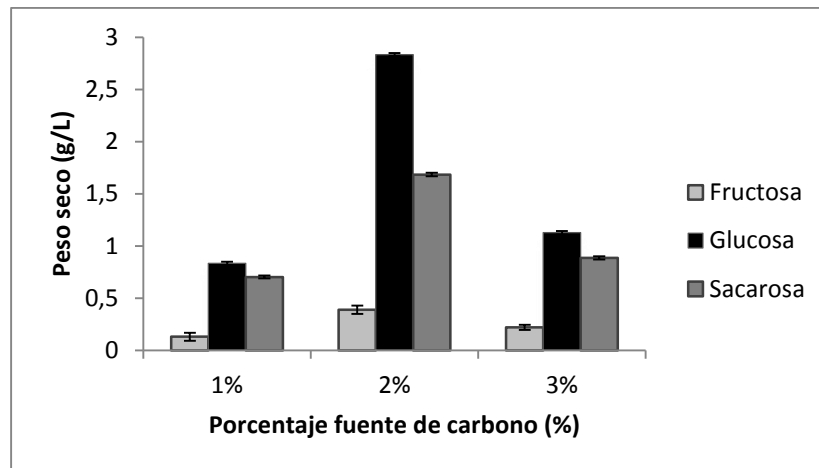


nuestros, la mayor cantidad de biomasa se obtuvo a partir de glucosa (Brown *et al.*, 1976; Carreño, 2011 & Keshk *et al.*, 2005). Para *G. medellinensis*, bajo las condiciones descritas anteriormente, el mayor crecimiento microbiano generó utilizando glucosa como fuente de carbono.

### **5.3 DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO Y SU CONCENTRACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA POR *Gluconacetobacter medellinensis***

La producción de celulosa bacteriana (CB) por *G. medellinensis* se evaluó mediante el uso del medio de cultivo comercial HS enriquecido con diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa) en concentraciones de 1, 2 y 3 % (p/v). La CB producida por 1 L de medio se determinó después de 8 días de incubación en cultivos estáticos a 28 °C y un pH de 3,6.

El efecto de la concentración de cada una de las fuentes de carbono sobre la producción de celulosa bacteriana a partir de la cepa nativa *Gluconacetobacter medellinensis* en condiciones estáticas se observa en la Figura 12, donde los mayores rendimientos en unidades de peso seco de las membranas sobre volumen del medio fueron de  $2,8 \pm 0,039$ ,  $0,39 \pm 0,013$  y  $1,77 \pm 0,017$  g/L obtenidos utilizando una concentración 2 % con glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente. Adicionalmente se observa una clara diferencia en la producción de CB a partir de glucosa como fuente de carbono, en comparación con el peso seco de las membranas obtenidas a partir de fructosa y sacarosa, concluyendo que el microorganismo es más eficiente en un medio de cultivo que contenga glucosa como fuente de carbono reafirmando lo establecido por Castro 2012 donde la mayor producción de celulosa (3 g/L) a partir de esta especie bacteriana, se obtuvo en el medio de cultivo rico en glucosa, seguido de sacarosa (2 g/L) y fructosa (0,4 g/L).



**Figura 12.** Peso seco de membranas (g/L) después de 15 días de fermentación

A pesar de que la glucosa y la fructosa tienen una estructura muy similar y utilizan la misma ruta metabólica para la producción de celulosa, la producción de ésta fue muy diferente obteniendo hasta 86% más de producción con la glucosa que con la fructosa en concentraciones de 2%. Esto puede ser debido a que el microorganismo debe utilizar una isomerasa que convierta la fructosa en glucosa antes de que inicie la polimerización y por lo tanto retrasa la utilización del sustrato, obteniéndose una producción menor de CB como lo plantean otros autores (Moosavi-Nasav *et al.*, 2011; Goelzer *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2002; El-Saied *et al.*, 2004, Römling 2002).

Para determinar la variabilidad de los pesos (g/L) de las membranas obtenidas con cada una de las fuentes de carbono se utilizó un diseño completamente aleatorio (DCA) unifactorial con niveles fijos utilizando el ANOVA de clasificación simple y analizando las medias.

El diseño base se realizó para cada uno de los azúcares de manera independiente (glucosa, fructosa y sacarosa), para cada uno se emplearon tres niveles, para un

total de 36 corridas por diseño. La variable respuesta del diseño fue la producción de celulosa (g/L).

Las Tablas 9a, 9b y 9c muestran el resumen estadístico para glucosa, fructosa y sacarosa, donde se pueden comparar las medias de cada uno de los tres niveles evaluados mediante los valores de celulosa (g/L) obtenidos para cada uno.

**Tabla 18.** Resumen Estadístico para producción de celulosa g/L a partir de medio Hestrin-Schramm con glucosa, fructosa y sacarosa al 2%.

a.

Concentración glucosa	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media	(s agrupada)
G 1%	12	0,837217	0,0841434	10,0504%	0,837217	0,042957
G 2%	12	2,84304	1,224888	7,91012%	2,84304	0,042957
G 3%	12	1,13014	0,0936812	8,28933%	1,13014	0,042957
Total	36	1,60347	0,908742	56,6736%	1,60347	

b.

Concentración fructosa	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media	(s agrupada)
F 1%	12	0,1300008	0,0139668	10,743%	0,137217	0,0069737
F 2%	12	0,39	0,0321727	8,24941%	0,39	0,0069737
F 3%	12	0,220408	0,0228175	10,3524%	0,220408	0,0069737
Total	36	0,246806	0,111787	45,2937%	0,246806	

c.

Concentración sacarosa	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media	(s agrupada)
S 1%	12	0,704992	0,0655231	9,29416%	0,704992	0,0659183
S 2%	12	1,80333	0,380014	21,0741%	1,80333	0,0659183
S 3%	12	0,890683	0,0877996	9,85756%	0,890683	0,0659183
Total	36	1,133	0,53494	47,2145%	1,133	

Estos resúmenes estadísticos muestran que la desviación estándar de los datos en su distribución respecto a su media aritmética, es baja en cada una de los tres niveles de concentración de glucosa, fructosa y sacarosa evaluados. Además los

coeficientes de variación tampoco indican una dispersión muy alta de los pesos secos de las membranas, por lo tanto se puede asegurar que la metodología utilizada para obtener los datos de los rendimientos en la producción de celulosa fue confiable, tal como lo reporta Jaramillo *et al*, 2012.

Las Tablas 10a, 10b y 10c de ANOVA para glucosa, fructosa y sacarosa permiten corroborar que hay variabilidad entre los pesos de las membranas obtenidas con cada una de las concentraciones evaluadas de glucosa, fructosa y sacarosa debido a que el valor de F es muy grande y P es menor a 0,05, rechazando la hipótesis nula de que todas las medias son iguales ( $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_q$ ) (Díaz, 2009).

**Tabla 19.** ANOVA para glucosa(a), fructosa(b) y sacarosa(c) respectivamente.

a.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	28,1727	2	14,0863	636,13	0,0000
Intra grupos	0,73074	33	0,0221436		
Total (Corr.)	28,9034	35			

b.

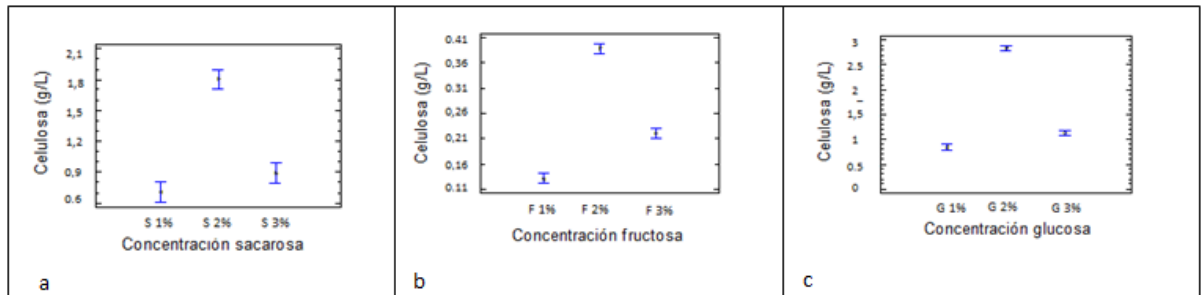
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,418117	2	0,209058	358,22	0,0000
Intra grupos	0,0192587	33	0,000583597		
Total (Corr.)	0,437375	35			

c.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,29493	2	4,14746	79,54	0,0000
Intra grupos	1,72071	33	0,0521427		
Total (Corr.)	10,0156	35			

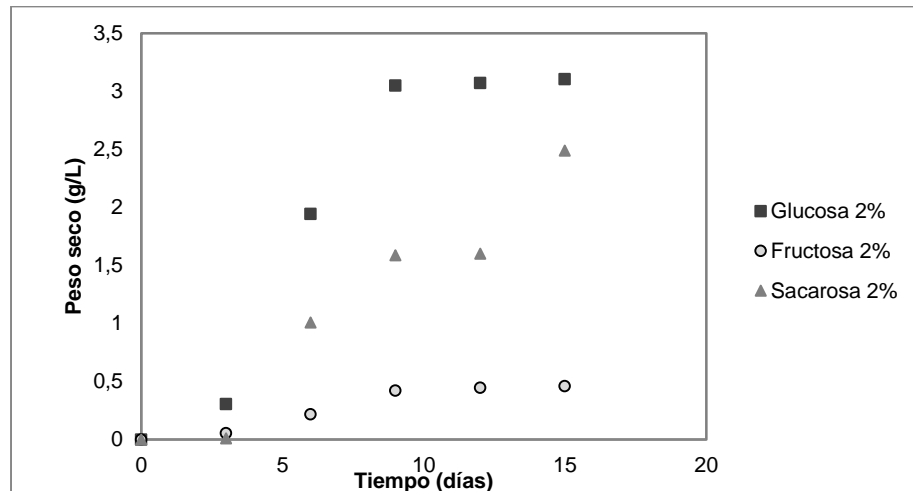
En la Figura 13 se observan las medias de celulosa (g/L) producida en los medios de cultivo HS con cada una de las concentraciones de las fuentes de carbono

evaluadas en esta investigación, encontrándose que los mayores rendimientos para cada una, fueron de 1,77, 0,39 y 2,8 g/L con una concentración de 2%.



**Figura 13.** Medias de celulosa producida en g/L

Con los datos obtenidos, acerca de las concentraciones adecuadas de cada una de las fuentes de carbono, se evaluó el efecto de cada una de estas concentraciones en el tiempo sobre la producción de celulosa bacteriana a partir de la cepa nativa *Gluconacetobacter medellinensis* (Figura 14).



**Figura 14.** Peso seco de membranas (g) con diferentes fuentes de carbono

Se observa en la Figura 14 que a partir del día 3 todos los medios de cultivo ya presentan producción de membranas de celulosa, sin embargo, los pesos de las membranas obtenidas en medio con glucosa 2% son mayores en comparación con los obtenidos utilizando fructosa y sacarosa durante los primeros 9 días de la

fermentación. Luego de ese tiempo el peso de las membranas producidas con glucosa 2% se mantiene prácticamente constante, mientras que con sacarosa 2% aún se observa una tendencia a seguir aumentando, indicando que para alcanzar valores en producción similares a la glucosa, es necesario un tiempo mayor de fermentación.

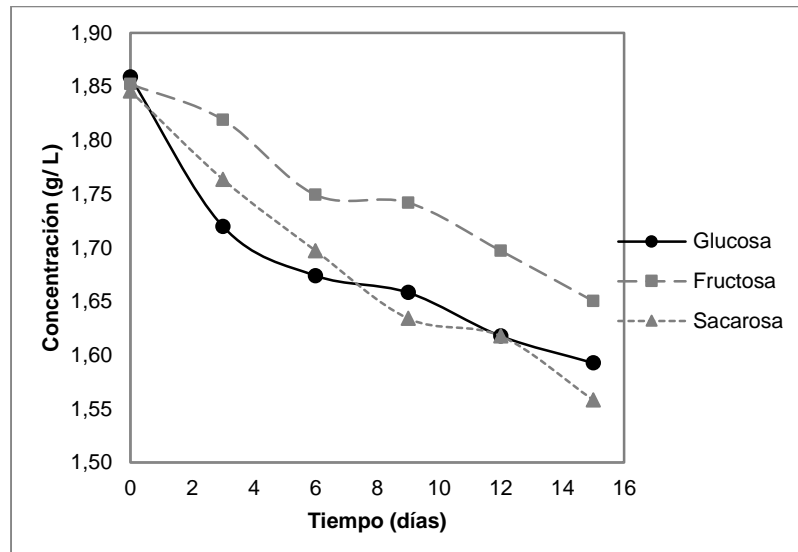
Castro, 2012 encontró en su disertación doctoral que a partir del día 8 de fermentación con glucosa al 2% la gráfica de producción de celulosa presenta una meseta, indicando que el microorganismo disminuye su velocidad de producción debido a que la disponibilidad de oxígeno en el medio es menor y por lo tanto solo las bacterias situadas cerca de la superficie están disponibles para dividirse y producir la CB, además el agotamiento de la fuente de carbono también puede ser una causa posible para explicar este hecho.

Para *G. medellinensis* la glucosa en una concentración del 2% como fuente de carbono, presentó los mayores rendimientos de producción de celulosa (3,1 g/L) durante los 15 días de fermentación, lo cual ha sido observado y analizado por autores como Masaoka, Ohe & Sakota, 1993 y Klemm, Shumann, Udhardt, & Marsch, 2001 para *G. xylinum*. Estos investigadores han reportado que la glucosa actúa no solo como una fuente de energía sino también como un precursor ideal para la polimerización de la celulosa y por lo tanto es común su uso como fuente de carbono para la producción de celulosa por cepas del género *Gluconacetobacter*.

#### **5.4 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN MEDIO HS**

Para la determinación de la concentración de la fuente de nitrógeno ( $C_N$ - ppm), se evaluó la concentración de proteína en los medios remanentes del ensayo presentado en el numeral 5.3, En la Figura 15 se presenta su consumo iniciando en el día 0 (inoculación) y cada tres días durante los 15 días de fermentación. para esto se empleó una curva de calibración obtenida como se describe en el Anexo 1. En

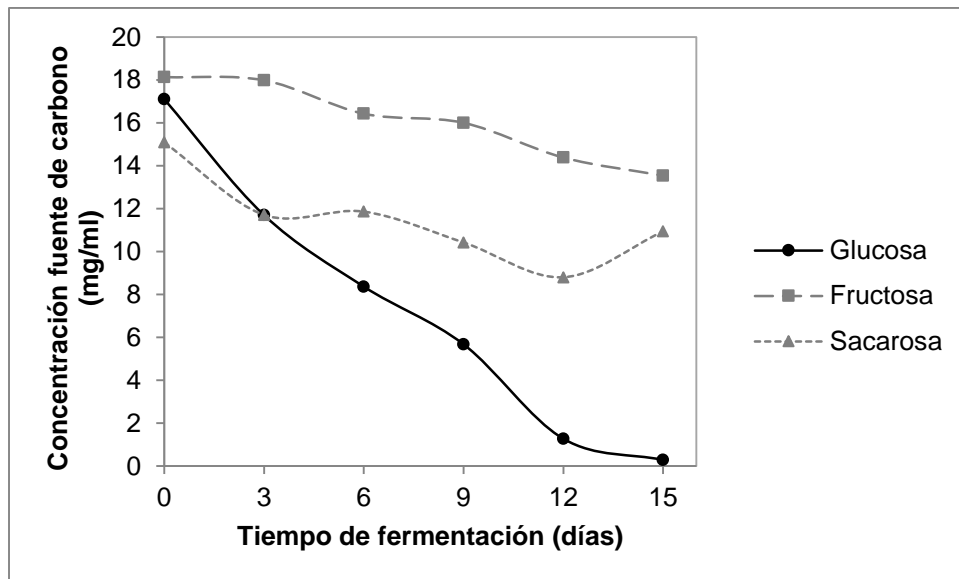
los medios de cultivo con glucosa y sacarosa hay mayor consumo de nitrógeno proteínico, lo cual indica una mayor actividad metabólica del microorganismo por afinidad con dichas fuentes de carbono como lo reporta Mikkelsen *et al.*, 2009.



**Figura 305.** Consumo de fuente de nitrógeno ( $C_N$ ) durante la fermentación

En el caso del consumo de la fuente de carbono (Figura 16), determinado mediante HPLC a los volúmenes de los remanentes de los medios utilizados durante las fermentaciones, se observa que el consumo de glucosa a los 15 días es casi completo.

Lo anterior es coherente con la producción de celulosa bacteriana obtenida (Figura 14) ya que a partir del día 9 no se observa un incremento en el peso de las membranas debido a la poca disponibilidad de oxígeno y de la fuente de carbono para efectuar su metabolismo y transformarla hasta Uridín difosfato- glucosa (intermediario de la biosíntesis de celulosa) (Benziman, 1972; Mazover & Benziman, 1973). Estos resultados también han sido reportados por Castro *et al.*, 2012 donde el consumo de la glucosa durante la fermentación es casi total después de 15 días y se relaciona directamente con la cantidad de CB producida.



**Figura 16.** Consumo de fuente de carbono (mg/ml) durante la fermentación

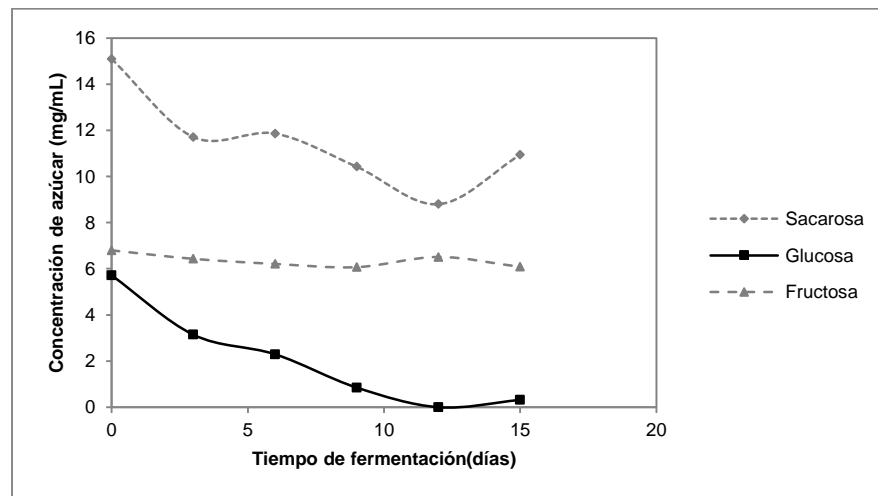
Lo anterior está relacionado con lo encontrado por Mikkelsen y sus colaboradores (2009) para *G. xylinum*, donde se plantea que de acuerdo a la ruta metabólica del microorganismo, las diferentes fuentes de carbono pueden ser utilizadas con mayor o menor eficiencia en la obtención de subproductos o en las necesidades energéticas de crecimiento microbiano.

Posiblemente en la presente investigación el microorganismo cultivado en sacarosa y fructosa dirige su metabolismo hacia el aumento de su población, antes de producir celulosa, mientras que en la glucosa el microorganismo puede utilizarla para ambos fines de manera directa.

Adicionalmente en la Figura 16 se observa que el consumo de fructosa y sacarosa fue menor (5 mg/mL aproximadamente) comparado con el consumo de glucosa (17 mg/mL), mostrando una baja afinidad y/o facilidad del microorganismo para metabolizar estos azúcares. Estos resultados explican la baja producción de celulosa que se obtuvo con fructosa 2% (0,4 g/L), sin embargo, no ocurre lo mismo con la sacarosa 2% donde se observó una mayor producción de CB (2,5 g/L), cercana a la obtenida con glucosa 2% (3,1 g/L).



Lo anterior puede explicarse debido a que, para sintetizar CB a partir de sacarosa, es necesario que el microorganismo realice primero una hidrólisis y por tal motivo no se evidencia un consumo alto de sacarosa como tal si no que el microorganismo utiliza la glucosa que tiene disponible a medida que avanza dicha hidólisis, como se observa en la Figura 17. Autores como Tonouchi *et al.*, 1998, han reportado resultados similares con *G. xylinum*, donde identificaron que el microorganismo no sintetiza invertasa (enzima capaz de convertir la sacarosa en glucosa+ fructosa) y por ello toma un tiempo desarrollar la ruta metabólica para consumir la sacarosa hasta que, por acción de otra enzima llamada levansacarasa, se dá el proceso de hidrólisis que conlleva a la producción de CB.



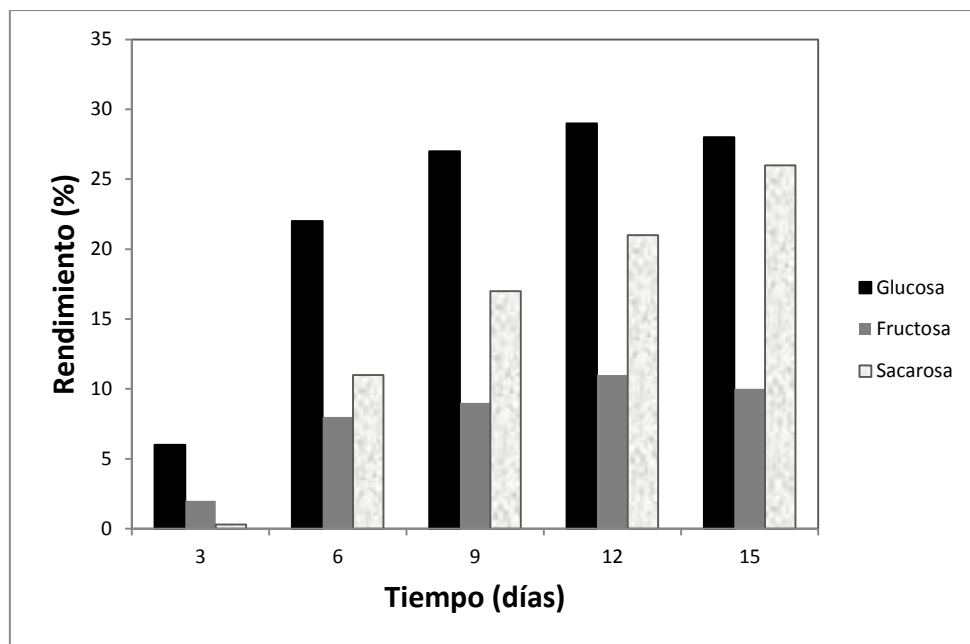
**Figura 17.** Concentración de fuentes de carbono a medida que *Gluconacetobacter medellinensis* consume sacarosa

En esta figura se observa que a medida que se produce la hidrólisis de la sacarosa y hay disponibilidad de glucosa y fructosa en el medio, la utilización de la fructosa es menor debido al efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de la fructoquinasa (Ross *et al*, 1991).

Adicionalmente, para analizar el rendimiento (%) de la producción de celulosa con cada una de las fuentes de carbono durante los 15 días de fermentación, se determinó el coeficiente de rendimiento observado para la producción de celulosa

frente al consumo de la fuente de carbono en gramos  $Y_{(p/s)}$  mediante la Ecuación 9, donde  $\Delta P$  es la cantidad de celulosa producida y  $\Delta S$  es la cantidad de fuente de carbono consumida en el tiempo. En la Figura 18 se presentan los resultados en el tiempo para las diferentes fuentes de carbono.

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \text{ Ecuación 9}$$



**Figura 18.** Rendimiento de producto con cada fuente de carbono (F.C) durante el tiempo de fermentación

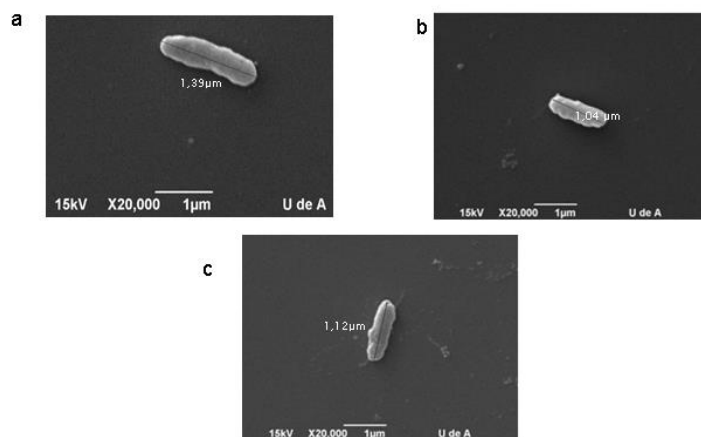
En la Figura 18 se observa un mayor rendimiento en la producción en gramos de celulosa seca obtenida a partir de glucosa 2%, debido a que el consumo de dicha fuente de carbono es más rápido en comparación con el consumo de las otras dos fuentes de carbono utilizadas, como se observó en la Figura 15. Estos resultados corroboran los análisis planteados anteriormente, donde se encontró que las membranas recolectadas desde el medio de cultivo con glucosa al 2% tuvieron los mayores pesos secos. Sin embargo, también se plantea la posibilidad de utilizar sacarosa al 2% como fuente de carbono para la obtención de membranas de celulosa de mayor peso (después de 15 días), teniendo en cuenta que para alcanzar

y mejorar los rendimientos obtenidos con glucosa es necesario mayor tiempo de fermentación, lo cual sería importante evaluar para un escalamiento de la producción.

### **5.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *Gluconacetobacter medellinensis* Y DE LAS MEMBRANAS DE CELULOSA QUE SINTENTIZA EN CADA UNO DE LOS MEDIOS EVALUADOS**

Las membranas se recolectaron después de 15 días de incubación y se frotaron sobre portaobjetos para fijar células incrustadas dentro de dichas membranas. Posteriormente se lavaron las membranas, con KOH al 5%, se liofilizaron y se congelaron a -80 °C para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido donde se obtuvieron micrografías de los bacilos y de la morfología de las nanocintas sintetizadas por *G. medellinensis* en cada uno de los medios, ya que se ha reportado que pueden existir cambios en morfología debido a la fuente de carbono utilizada. En adición, estas medidas son un factor crítico que determinan las propiedades estructurales y funcionales de la CB (Brown, Williston & Richardson, 1976).

En la Figura 19 se observan imágenes de los bacilos encontrados en cada uno de los medios evaluados. Los promedios de tamaños para cada medio se presentan en la tabla 12 determinándose que el tamaño celular de los bacilos cultivados con glucosa al 2% es mayor que en los encontrados en sacarosa y fructosa. Lo cual coincide con los datos obtenidos anteriormente sobre la  $\mu_{max}$  y el  $t_d$ , debido a que entre más largo sea el tiempo de duplicación mayor es el tamaño de las células (Ruka *et al.*, 2012).



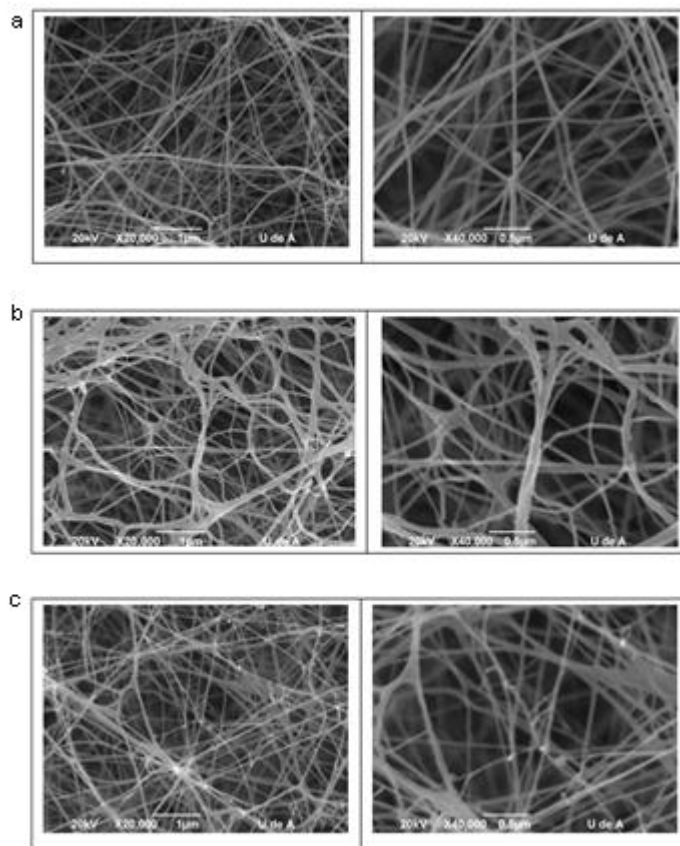
**Figura 19.** Morfología de bacilos encontrados en las membranas después de 15 días de fermentación. Glucosa (a), fructosa (b) y sacarosa (c)

Estos tamaños no variaron representativamente entre si, lo cual se demuestra con el coeficiente de variación (Tabla 11) que en los tres casos no fue mayor a 10, por tal motivo se puede asumir un valor promedio para determinar la longitud aproximada de los bacilos después de quince días de fermentación en medio HS con las tres fuentes de carbono utilizadas.

**Tabla 11.** Longitud de bacilos encontrados en las membranas después de 15 días de fermentación

MUESTRA	GLUCOSA (μm)	FRUCTOSA (μm)	SACAROSA (μm)
1	1,64	1,16	1,07
2	1,28	0,83	1,25
3	1,31	1,18	1,04
4	1,27	1,08	1,06
5	1,55	0,95	1,19
6	1,19	1,10	1,23
7	1,30	1,09	1,14
8	1,41	0,91	1,03
9	1,43	1,18	1,00
10	1,53	1,07	1,26
<b>Media</b>	1,39	1,04	1,12
<b>Desv</b>	0,14	0,12	0,10
<b>Coef var</b>	9,52	8,72	10,88

En las micrografías que se muestran en la Figura 20 se pueden observar cada una de las redes conformadas por las nanofibrillas sintetizadas por *G. medellinensis* a partir de las diferentes fuentes de carbono utilizadas en esta investigación. En la Figura 20a se observa una red menos densa de microfibrillas a partir de glucosa al 2%, cuando se comparan con la Figura 20b de la fructosa al 2% y la Figura 20c de la sacarosa al 2%.

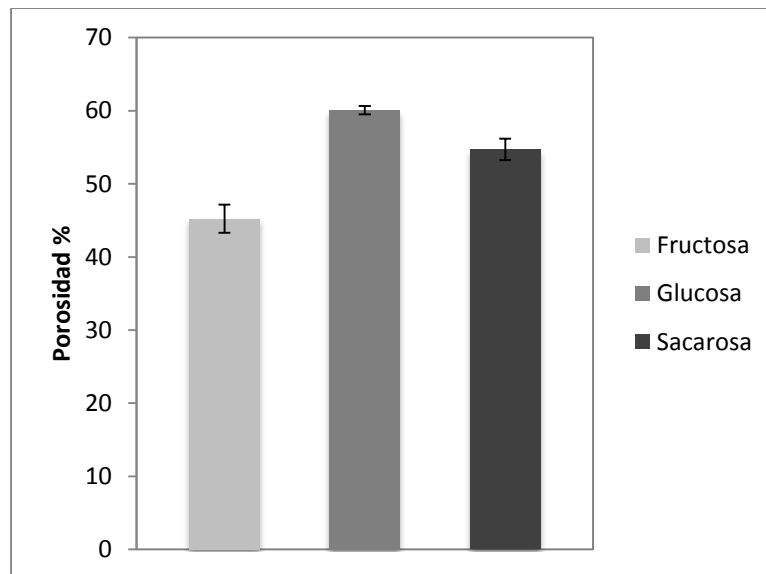


**Figura 20.** Micrografías de SEM de membranas de CB obtenidas en medio Hestrin & Schramm con glucosa 2% **(a)** fructosa 2% **(b)** sacarosa 2% **(c)** e incubadas durante 8 días

Utilizando el programa de análisis de imagen “imageJ” fue posible determinar la porosidad de cada una de las imágenes presentadas en la Figura 20. Los resultados

se presentan en la Figura 21, donde se corroboran los resultados observados con las micrografías de SEM, ya que se observa que las membranas obtenidas a partir de fructosa son menos porosas porque hay mayor cantidad de microfibrillas entrecruzadas entre si formando una red más densa. Por su parte la glucosa presenta el mayor porcentaje de porosidad y a su vez la menor densidad visual de microfibrillas seguida de la sacarosa (Ruka *et al.*, 2012).

Lo anterior se relaciona con el tiempo de duplicación del microorganismo, a medida que este se duplica se crea un nodo en la red de tal forma que a mayor tiempo de duplicación existirán menor cantidad de nodos por tanto la red es menos densa. Como el microorganismo creciendo en glucosa presenta mayor tiempo de duplicación entonces la red de las membranas en esta fuente de carbono es menos densa, influyendo en las propiedades físico-mecánicas y funcionales de dicha membrana.



**Figura 21.** Porosidad de membranas

### 6. CONCLUSIONES

En esta investigación, la producción de membranas de celulosa por *Gluconacetobacter medellinensis* fue realizada en un medio de cultivo HS en condición estática a temperatura ambiente y pH 3.6, en presencia de diferentes fuentes de carbono como son glucosa, fructosa y sacarosa.

Las conclusiones que se obtuvieron después de realizar dicho proceso de investigación fueron:

- *G. medellinensis* mostró mayor afinidad por la glucosa como fuente de carbono, ya que con ésta se evidenció la mayor producción de biomasa ( $6,47 \times 10^9$  UFC/mL) en las curvas de crecimiento.
- *G. medellinensis* mostró una etapa de adaptación mayor en el medio de cultivo con sacarosa, lo cual es desfavorable cuando se pretende escalar el proceso ya que en esta etapa no hay producción del metabolito de interés.
- En la curva de crecimiento del microorganismo en medio con sacarosa se observa que, una vez que inicia la etapa exponencial, la velocidad específica de crecimiento del microorganismo es mayor que con los otros dos azúcares y por lo tanto el tiempo de duplicación es más corto, lo cual influye directamente en las características morfológicas de la membrana
- Los resultados de los pesos secos de las membranas obtenidas después de una fermentación de 8 días indicaron una mayor producción de CB a partir de glucosa al 2% con un valor de 2,8 g/L.
- Las membranas obtenidas después de 15 días de fermentación con glucosa al 2% presentaron mayor contenido de peso seco, sin embargo a partir del 9 día muestra una producción de CB constante, mientras que con sacarosa se observa una tendencia al aumento de la masa de CB producida incluso hasta el día 15.

- En el medio de cultivo con glucosa al 2% se observa mayor consumo de la fuente de nitrógeno proteínico y consumo total de la fuente de carbono después de 15 días de fermentación, lo cual indica que el microorganismo consume fácilmente este sustrato y por lo tanto produce mayor cantidad de metabolito.
- Los bacilos encontrados en las membranas recolectadas a partir del medio de cultivo con glucosa al 2 % después de 15 días de fermentación presentaron mayor tamaño en comparación a los encontrados en las membranas obtenidas con fructosa y sacarosa.
- La porosidad de las membranas obtenidas a partir de medio de cultivo con glucosa fue mayor que las obtenidas con fructosa y sacarosa, lo cual está estrechamente relacionado con el tiempo de duplicación del microorganismo.



## 7. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones que se obtuvieron en esta investigación, se plantean algunas recomendaciones para dar continuidad a los avances a partir de *G. medellinensis*:

- En este tipo de procesos biotecnológicos se debe buscar que la etapa exponencial sea más larga para que haya mayor producción de celulosa y por lo tanto sea más eficiente, lo cual se puede realizar mediante el manejo de las variables al inicio y durante la fermentación y/o ensayando nuevos sustratos.
- Al evaluar el tipo de sustrato adecuado para la producción de celulosa, es necesario definir las características morfológicas requeridas dependiendo del uso final para el que se requieran.
- Es importante analizar, en futuros trabajos, la producción de celulosa en sacarosa como fuente de carbono después de 15 días de fermentación ya que el microorganismo *G. medellinensis* presentó tendencias a seguir produciendo el polímero después de este tiempo.

### 10.REFERENCIAS

**Almeida, Wosiacki, Dos santos, Serenata & Zanlorensi. 2008.** *Crescimento do acetobacter xylinum (atcc 23769) e a produção de celulose bacteriana.* Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, 2, 95-103

**Alvarez, Heidi y Durán Jhon. 2013.** *Aplicación de un proceso fed-batch para la bioconversión de glicerol a dihidroxiacetona mediante fermentación con gluconobacter oxydans.* Universidad de Cartagena. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico.

**Araya, Rojas & Velasquez. 2010.** *Síntesis de ácido láctico, a traves de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de piña, para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico.* Revista Iberoamericana de polímeros, 11, 407-416.

**Astley, Chanliaud, Donald & Gidley.2003.***Tensile deformation of bacterial cellulose composites.* International Journal of Biological Macromolecules, 32.

**Benziman, M., Rivertz B. 1972.** *Factors affecting hexose phosphorylation in acetobacter xylinum.* Journal of bacteriology, 1972, Vol 111 No 2, pp. 325-333.

**Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz & Kalinowska. 2005.** *Bacterianacellulose.*In: A. Steinbuchel (Ed), *Biotechnology of Polymer: From Synthesis to Patents*, Wiley-VCH, Verlag GmbH, Munster, Germany, pp. 381-434

**Borzani W. & Souza S. J. 1995.** *Mechanism of the film thickness increasing during thebacterian production of cellulose on non-agitated liquid media.* Biotechnology Letters, 17, 1271-1272.

**Brown. 1886.** *On an acetic ferment which forms cellulose.* Journal of the Chemical Society, 49, 432-439.

**Brown, Saxena & Kudlicka. 1996.** *Cellulose biosynthesis in higher plants.* Trends in plant science. Vol.1.

**Brown, R. M., Willison, J. H. M., & Richardson, C. L. 1976.** *Cellulose biosynthesis in Acetobacterxylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73, 4565-4569.

**Budhiono, Iguchi & Yamakana. 2000.** *Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts.* Journal of materials science, 35, 261-270.

**Caicedo. 2001.** *Factores para escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática.* Revista Colombiana de química. Vol.30, pp. 155-162.

**Carreño. 2011.** *Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana.* Universidad Nacional de Colombia. Bogotá- Colombia : s.n., Tesis doctoral.

**Castro. 2012.** *Desarrollo de materiales compuestos auto-ensamblados de celulosa bacteriana/alcohol polivinílico durante la biosíntesis de la celulosa bacteriana.* Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín-Colombia, Tesis Doctoral.

**Castro; Cleenwerck; Trecka; De Vos; Zuluaga; Putatux; Caro; Aguirre and Gañán. 2013.** *Gluconacetobacter medellensis sp. nov., a novel cellulose-producing bacterium isolated from homemade fruit vinegar and reclassified specie of Gluconacetobacter xylinum.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 1119–1125.

**Castro, C; Zuluaga, R; Álvarez, C; Putaux, J; Caro, G; Rojas, O; Iñaki, J & Gañán, P. 2012.** *Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of*

*Gluconacetobacter* genus. Medellín : s.n. Carbohydrate Polymers, Vol. 89, pp. 1033-1037.

**Chavez, Martínez, Contreras y Escamilla. 2004.** *Celulosa bacteriana en Gluconacetobacter xylinum, Biosíntesis y aplicaciones.* Revista Especializada en ciencias químico-biológicas, 7, 18-25.

**Chawla, Bajaj, Survase & Singhal. 2009.** *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications.* Food Technology Biotechnology, 47,107-124. ISSN 1330-9862.

**Cheng, DeVallance, Wang & Wang. 2006.** *Advances in composite materials for medicine and nanotechnology.* Advanced Cellulosic Nanocomposite Materials.pp. 547-564.

**De Wulf, P., Joris, K., & Vandamme, E.J. 1996.** *Improved cellulose formation by an Acetobacter xylinum mutant limited in (keto) gluconate synthesis.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 67, 376-380.

**Dudman, W. 1.959.** *Cellulose production by Acetobacter acetigenum and other Acetobacter spp.* Journal of General Microbiology., vol. 21, pp. 312 - 326.

**El-Saied, Basta & Gobran. 2004.** *Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and application),* Vol. 43, pp. 797-820.

**El-Saied, El-Diwany, Basta, Atwa & El-Ghwas. 2008.** *Production and characterization of economical bacterial cellulose.* BioResources, Vol. 3, pp. 1196-1217

**El-Saied, Basta & Gobran. 2004.** *Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and application),* Vol. 43, pp. 797-820.

- El-Saied, El-Diwany, Basta, Atwa & El-Ghwas. 2008.** *Production and characterization of economical bacterial cellulose.* BioResources, Vol. 3, pp. 1196-1217.
- Fujikawa, H; Kai, A and Morozumi, S. 2004.** *A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures.* Journal Food Microbiology 21. pp. 501 - 509.
- Ginovart, M.; López, D.; Valls, J. and Silbert, M. 2002.** *Simulation modelling of bacterial growth in yogurt.* International Journal of Food Microbiology 73. pp.415-425, 2002
- Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., & Peijs, T. 2011.** *Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process.* Bioresource Technology, 75, 18-22.
- Goelzer, Faria, Vitorino, Sierakowski & Tischer. 2009.** *Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from Acetobacter xylinum from processed rice bark.* Material science and engineering, Vol. 29, p. 546.
- Gromet-& Hestrin. 1963.** *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum VI. Growth on citric acid-cycle Intermediates.* Journal of bacteriology, Vol. 85. 284 -292
- Heo and Son. 2002.** *Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by Acetobacter sp. A9 in shaking cultures.* Biotechnology Applications Biochemical; Vol 36, pp.41-45.
- Hestrin & Schramm. 1954.** *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose.* Biochemical Journal, Vol. 58, pp. 345-352.

**Hutchens, Leon, O'Neill & Evans. 2007.** *Statistical analysis of optimal culture conditions for Gluconacetobacter hansenii cellulose production.* Letters in Applied Microbiology, Vol. 44, pp. 175-180. doi:10.1111/j.1472.

**Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. 2000.** *Review: Bacteriana cellulose a masterpiece of nature's arts.* Journal of Materials Science, 35, 261-270.

**Imai, T., & Sugiyama, J. 1998.** *Nanodomains of  $\alpha$  and  $\beta$  Cellulose in Algal Microfibrils.* Macromolecules, 31, 6275–6279.

**Jaramillo, Tobio y Escamilla. 2012.** *Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por Gluconacetobacter xylinus en cultivo estático.* Rev.MVZ Córdoba 17(2):3004-3013.

**Jonas & Farah. 1998.** *Production and application of microbial cellulose.* Biodegradable polymers and macromolecules, Vol. 59, pp. 101-106.

**Jung, J.; Park, J.; Chang, H. 2005.** *Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter hansenii in an agitated culture without living non-cellulose producing cells.* Enzyme and Microbial Technology., vol. 37, pp. 347 - 354.

**Khamis, A.; Ismail, Z.; Haron, K and Tarmizi, A. 2005.** *Nonlinear Growth Models for Modeling Oil Palm Yield Growth.* Journal of Mathematics and Statistics 1 (3): 225-233, 2005

**Keshk & Sameshima. 2005.** *Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production.* African Journal of Biotechnology, Vol. 4, pp. 478-482.

**Kim, Wee, Park & Ryu. 2006.** *Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar.* Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 131, pp. 705-715.

**Kiyoshi Toda, Asakurab, Fukaya, Entani & Kawamura. 1997.** *Cellulose production by acetic acid-resistant Acetobacter xylinum.* Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 84.

**Klasson, Glausen & Gaddy. 1984.** *Continuous fermentation for the production of acid citric from glucose..* Appl. biochem. Biotechnol, Vol. 20.

**Klemm, Shumann, Udhardt, & Marsch. 2001.** *Bacteriana synthesized cellulose – Artificial blood vessels for microsurgery.* Progress in polymer science, Vol. 26, pp. 1561-1603.

**Klemm, Shumann, Udhardt, & Marsch. 2001.** Progress in Polymer Science, Vol. 26, pp. 1561-1603.

**Kurosumi, Sasaki, Yamashita, Nakamura. 2009.** *Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacteriana cellulose by Acetobacter xylinum NBRC 13693.* Carbohydrate Polymers, Vol. 76, p. 333.

**Lynd, Weimer, van Zyl & Pretoriu. 2002.** *Microbial Cellulose Utilization.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 66, pp. 506-577.

**Marx-Figini, M & Pion, B. 1976.** *Kinetic investigation on biosynthesis of Bacterial cellulose.* Makromoleculare Chemie, Vol. 177, pp. 1013-1020.

**Masaoka, Ohe & Sakota. 1993.** *Production of cellulose from Acetobacter xylinum.* Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 75, pp. 18–22.

**Mazover & Benziman. 1973.** *The glucose dehydrogenase activity of the NAD-linked glucose 6-phosphate dehydrogenase from Acetobacter xylinum.* Vol. 36, pp.203-206.

**Mikkelsen, Flanagan, Dykes & Gidley. 2009.** *Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinum strain ATCC 53524.* Journal of Applied Microbiology, Vol. 107, pp. 576-583. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x.

**Morello, Granato & Eckel. 2002.** *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care*. 7. s.l. : McGraw-Hill.

**Mormino. 2003.** *Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 62.

**Narushin, V & Tacma, C. 2003.** *Sigmoid model for the evaluation for growth and production curves in laying hens*. Biosystems Engineering, Vol. 84, pp. 343 – 348. doi: 10.1016/S1537-5110(02)00286-6.

**Nguyen, Flanagan, Gidley & Dykes. 2008.** *Characterization of Cellulose Production by a Gluconacetobacter xylinus Strain from Kombuch*. Springer Science+Business Media. Vol. 57, pp. 449-453. DOI 10.1007/s00284-008-9228-3

**T. Oikawa, T. Ohtori, M. Ameyama.** *Production of cellulose from D. mannitol by Acetobacterxylinum KU - 1*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol 59 no. 2, pp 331 - 332, 1995. Referenciado en 310

**Owen. 1991.** *Biología de la fermentación*. s.l. : Acribia S.A, 1991.

**Park, S.T., Song, T.S., & Kim, Y.M. 1999.** *Effect of gluconic acid on the production of cellulose in Acetobacter xylinum BRC5*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 683-686.

**Pecoro, E., Manzani, D., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. 2008.** *Bacteriana cellulose from Gluconacetobacter xylinus: Preparation, properties and applications*. In: M. N.

**Pourramezan, Roayaei & Qezelbash. 2009.** *Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by Acetobacter sp. 4B-2*. Biotechnology, Vol. 8, pp. 150-154.

**Ramana, Tomar & Singh. 2000.** *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter xylinum*. World J. Microbiology Biotechnology, Vol. 16, pp. 245-248.



**Ross, Mayer & Benziman. 1991.** *Biochemistry of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum: Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. New York: Marcel Dekker: In: Haigler CH, Weiner PJ, editors.

**Roukas, T y Kotzekidou, P. 1998.** *Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized Lactobacillus casei and Lactococcuslactis cells using fedbatch culture*. Enzyme and Microbial Technology. 22: 199–204.

**Ruka, Simon & Dean. 2012.** *Altering the growth conditions of Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield*. Carbohydrate polymers, Vol. 89, pp. 613-622.

**Sanchez y Martinez. 2002.** *Avances y nuevas perspectivas en celulosa*. Revista de plásticos modernos, Vol. 84, pp. 706-717.

**Scionti. 2010.** *Mechanical Properties of Bacterial*. Suiza : s.n., 2010.

**Shirk H., &Greathouse G. 1952.** *Infrared spectra of bacteriana cellulose*. Analytical Chemistry, 24, 1774-1775.

**Souza & Borsali. 2004.** *Cellulose mycrocrystals: structure, properties and aplications*. Vol. 25, pp. 771-787.

**Staiger, Piao, Dean & Gostomski. 2007.** *Bacterial cellulose networks for reinforcement of polylactide*. 16th International conference on composite materials.

**Stanislaw, Krystynowicz, Turkiewicz& Kalinowska. 2005.** *Bacterial cellulose*. pp. 381-434.

**Ślusarska,Presler& Danielewicz. 2008.** *Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from Acetobacter xylinum Culture for Application in Papermaking*. Fibres & Textiles, Vol. 16, pp. 108-111.

**Tahara, Tabuchi, Watanabe, Yano, Morinaga & Yoshinaga. 1997.***Degree of polimerization of cellulose from Acetobacter xylinum BPR2001 decreased by*

*cellulased produced by the strain.* Japan society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, Vol. 61, pp. 1862-1865.

**Toda, Asakura, Fukaya, Entani & Kawamura. 1997.** *Cellulose production by acetic acid-resistant Acetobacter xylinum.* Journal of fermentation and Bioengineering, Vol. 84, pp. 228-231.

**Trovatti, Serafim, Freire, Silvestre & Pascoal. 2011.** *Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory.* Carbohydrate Polymers, Vol. 86, pp. 1417-1420.

**Urribarri, Lauris; Vielma, Alex; Páez, Gisela; Ferrer, Jose; Mámol, Zulay y Ramones, Eduardo. 2004.** *Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando Lactobacillus helveticus en cultivo continuo.* Revista Científica. Universidad del Zulia. Vol. XIV, No. 4, pp. 297 - 302.

**Vandamme, E.; De Baets, S.; Vanbaelen, A.; Joris, K. & De Wulf, P. 1998.** *Improved production of bacterial cellulose and its application potential.* Polymer Degradation and stability, Vol. 59, pp. 93-99.

**Velasco, H. 2007.** *El metabolismo estructurado de Gluconacetobacter entanii Modelamiento y experimentación.* Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis Doctoral.

**Yamanaka, S., Ishihara, M., & Sugiyama, J. 2000.** *Structural modification of bacterial cellulose.* Cellulose, 7, 213-225.

**Zwietering, M; Jongenburger, F; Rombouts, F and Van TRiet, K. 1990.** *Modeling of the bacterial growth curve.* Journal Applied and environmental Microbiology. Vol 56, No. 6, pp. 1875 - 1881.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Protocolo para determinar el contenido de nitrógeno proteínico en los medios mediante la prueba de “Biuret”

Solución estándar de Biuret (reactivo **A**): (1 litro)


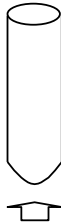

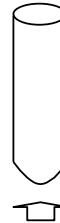


Preparación del reactivo A para la solución estándar de Biuret

Reactivos	Cantidad
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (Carlo Erba)	1.5 g
EDTA (MOL LABS)	6.0 g
KI (Carlo Erba)	1.0 g
Na(OH) (2.5N) (merck)	300 ml

- Solución Estándar BSA (reactivo **B**): Albúmina suero bovino (10g/l →10ml)

Una vez listos los reactivos, se procedió a preparar las soluciones que se muestran a continuación con el fin de construir la curva de calibración:

Procedimiento elaboración curva de calibración BIURET

					
8 mL de A 2 mL de B 0 mL de H <sub>2</sub> O	8 mL de A 1.6 mL de B 0.4 mL de H <sub>2</sub> O	8 mL de A 1.2 mL de B 0.8 mL de H <sub>2</sub> O	8 mL de A 0.8 mL de B 1.2 mL de H <sub>2</sub> O	8 mL de A 0.4 mL de B 1.6 mL de H <sub>2</sub> O	BLANCO 8 mL de A 0 mL de B 2 mL de H <sub>2</sub> O

- Una vez se prepararon las soluciones anteriores, se mezclaron bien y se dejaron reposar por 30 minutos.
- Se leyó en el espectrofotómetro (Shimadzu) (a una  $\lambda = 540 \text{ nm}$ )
- Se realizó la curva Absorbancia Vs. Concentración.

**Anexo 2.** Protocolo para cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis*

<p><b>OBJETIVO</b></p> <p>✓ Establecer un protocolo para la cuantificación de biomasa de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> producida durante una fermentación líquida.</p>		
<p><b>ALCANCE</b></p> <p>✓ Este protocolo se aplica para cuantificación de biomasa de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> en cualquier medio de crecimiento que se establezca para su crecimiento, ha sido validado para asegurar que las lecturas son confiables y representan el valor aproximado del número de células en cada etapa de la fermentación.</p>		
<p><b>EQUIPOS</b></p> <p>✓ Balanza analítica</p> <p>✓ pH metro</p> <p>✓ Autoclave</p> <p>✓ Centrifuga</p> <p>✓ Baño maría</p> <p>✓ Shaker</p> <p>✓ Espectrofotometro/ Nanodrop</p> <p>✓ Plancha de agitación</p> <p>✓ Cámara de flujo laminar</p> <p>✓ Vórtex</p> <p>✓ Micropipetas</p>	<p><b>MATERIALES</b></p> <p>✓ Espátulas</p> <p>✓ Erlenmeyers</p> <p>✓ Beakers</p> <p>✓ Agitadores</p> <p>✓ Asas digralsky</p> <p>✓ Mecheros</p> <p>✓ Tubos eppendorf</p> <p>✓ Cajas de petri</p> <p>✓ Papel craft</p> <p>✓ Cinta de enmascarar</p> <p>✓ Papel film</p> <p>✓ Papel aluminio</p>	<p><b>INSUMOS</b></p> <p>✓ Bactoagar</p> <p>✓ Extracto de levadura</p> <p>✓ Peptona</p> <p>✓ Glucosa, sacarosa, fructosa</p> <p>✓ Ácido cítrico</p> <p>✓ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p> <p>✓ Agua destilada</p> <p>✓ Alcohol</p> <p>✓ Hipoclorito</p> <p>✓ Patrón de Mac-Farland</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Marcador indeleble</li> <li>✓ Tubos de ensayo</li> <li>✓ Puntas estériles</li> <li>✓ Encendedor/ fósforos</li> </ul>	
<p><b>VARIABLES A CONTROLAR</b></p> <p>Temperatura</p> <p>Tiempo</p> <p>pH</p> <p>Concentración del inóculo</p>		
<p><b>ASPECTOS A TENER EN CUENTA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mantener asepsia en lugar de trabajo, manos e implementos de trabajo para evitar contaminaciones.</li> <li>✓ Preparar materiales e insumos antes de iniciar el proceso.</li> <li>✓ En caso de no tener disponibilidad para realizar las lecturas de absorbancia inmediatamente se toma la muestra, es necesario congelarla hasta el momento de la lectura.</li> </ul>		
<p><b>DESCRIPCION DEL PROCESO</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realizar siembra en estrías del microorganismo en medio HS a pH 5 con bacto-agar al 2.5%.</li> <li>2. Incubar durante 72 h a 28°C.</li> <li>3. Esterilizar agua destilada a 121 °C durante 15 min, dejar enfriar hasta temperatura ambiente.</li> <li>4. En un ambiente aséptico, extraer las colonias incubadas durante 72 h y lavarlas en agua destilada estéril centrifugándolas a 3000 rpm por 10 min.</li> </ol>		

5. Las colonias lavadas se pasan al agua estéril hasta alcanzar una turbidez de  $10^5$  en la escala de Mac Farland. Este preinóculo se mantiene en agitación para asegurar homogeneidad en la inoculación.
6. Inocular el medio preparado, esterilizado y enfriado previamente; utilizando 10 % del preinóculo.
7. Incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación a 100 rpm.

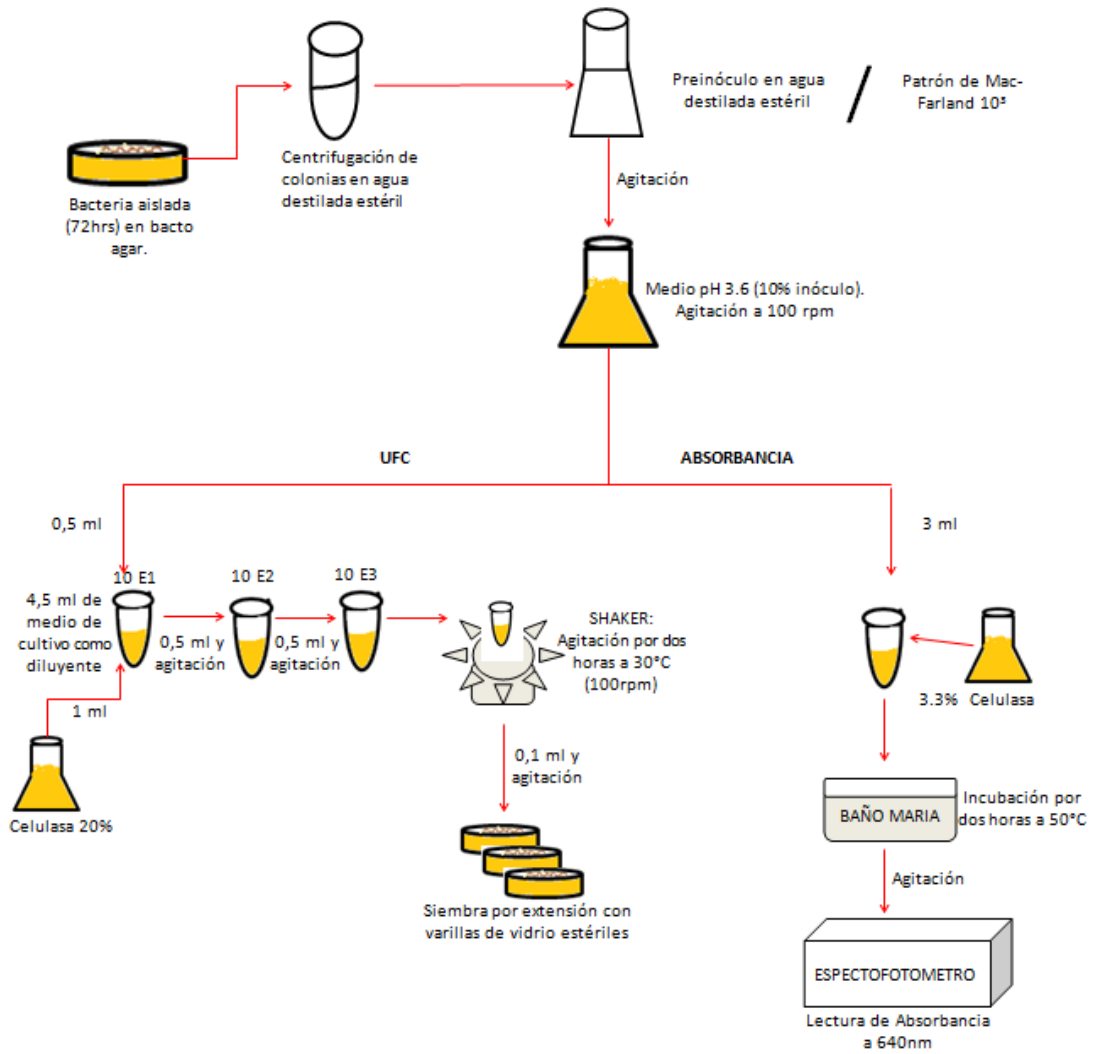
**Protocolo para cuantificación de biomasa por densidad óptica:**

1. Tomar muestra del medio y adicionar 3.3 % de celulasa (Celuclast 1.5 L, Novozymes) e incubar a  $50^{\circ}\text{C}$  en baño maría durante dos horas.
2. Realizar las lecturas de absorbancia a 600 nm.

**Protocolo para cuantificación de biomasa por células viables (UFC):**

1. Tomar una muestra del medio y diluirla hasta llegar a la dilución definida para el conteo adecuado de células, teniendo en cuenta que al tubo donde se realiza la primera dilución se le reemplaza 1 ml de diluyente por 1 ml de celulasa al 20%. Dejar en agitación durante 2 h y después realizar la siembra por extensión en cajas de petri.

# DIAGRAMA DEL PROCESO



FORMATO PARA REPORTE DE DO Y UFC					
Hora	Rep.	DO	Recuento de UFC/0.1ml		
			Dln4	Dln5	Dln6
0	1				
	2				
	3				
10	1				
	2				
	3				
20	1				
	2				
	3				
30	1				
	2				
	3				
40	1				
	2				
	3				
50	1				
	2				
	3				
60	1				
	2				
	3				
70	1				
	2				
	3				
80	1				
	2				
	3				
90	1				
	2				
	3				
100	1				
	2				
	3				



### **Anexo 3. Metodología para realizar curvas de crecimiento**

Con las curvas de calibración obtenidas a partir del protocolo establecido para el conteo de células por absorbancia y por UFC se toman muestras de las fermentaciones líquidas y se sigue el siguiente procedimiento:

1. Realizar siembra en estrías del microorganismo en medio HS a pH 5 con bacto-agar al 2.5%.
2. Incubar durante 72 h a 28°C.
3. Esterilizar agua destilada a 121 °C durante 15 min, dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
4. En un ambiente aséptico, extraer las colonias incubadas durante 72 h y lavarlas en agua destilada estéril centrifugándolas a 3000 rpm por 10 min.
5. Las colonias lavadas se pasan al agua estéril hasta alcanzar una turbidez de  $10^5$  en la escala de Mac Farland. Este preinóculo se mantiene en agitación para asegurar homogeneidad en la inoculación.
6. Inocular el medio preparado, esterilizado y enfriado previamente; utilizando 10 % del preinóculo.
7. Incubar a 28°C en agitación a 100 rpm.
8. Aplicar el protocolo para para la cuantificación de biomasa por densidad óptica:
  - Tomar 3 ml de muestra del medio de la solución madre (blanco), antes de inocularla, y adicionar 3.3 % de celulasa (Celuclast 1.5 L, Novozymes).
  - Tomar muestras de 3ml en tubos eppendorf una vez se haya inoculado la solución madre.
  - Después de 10 h tomar nuevamente muestras de 3 ml y adicionar 3.3% de celulasa e incubar a 50°C en baño maría durante dos horas.
  - Realizar las lecturas de absorbancia a 600 nm.

- Repetir el procedimiento cada 10 horas cuando se tomen las muestras, hasta alcanzar un tiempo de 100 h.

**Tiempo de la prueba:** 7 días

**Día 1, 2 y 3:** Repicar cepa

**Día 3, 4, 5, 6 y 7:** toma de muestras cada 10 h durante 100h.

Si se requiere aplicar el protocolo de cuantificación de biomasa por densidad óptica para obtener curvas de crecimiento, el proceso es el siguiente:

1. Tomar una muestra de 0.5 mL una vez se haya inoculado el medio y agregarla a un tubo de ensayo con 4.5 mL de medio HS a pH 3.6 (diluyente) (dilución  $10^{-1}$ ), agitar muy bien con vórtex y extraer nuevamente 0.5 ml de este tubo de ensayo para agregarlo a otro tubo de ensayo con 4.5 ml de diluyente (dilución  $10^{-2}$ ) y así sucesivamente hasta llegar a una dilución de  $10^{-4}$  durante las 20 primeras horas de incubación del medio y después hasta una dilución de  $10^{-5}$ .
2. Se extrae 0.1 ml de la última dilución realizada y se siembra por extensión en caja de petri con bacto-agar, preparado y solidificado previamente, usando asas de Digralsky estériles. Realizar siembras por triplicado en cada muestra.
3. A partir de la segunda muestra (hora 10), se repite el paso 1 y 2 pero al primer tubo de ensayo (diluyente) se le extrae 1 ml de medio y se reemplaza con 1 ml de celulosa al 20%. Dejar en agitación durante 2 h y después realizar la siembra por extensión en cajas de petri.

**Tiempo de la prueba:** 10 días

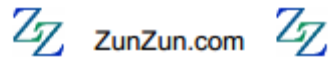
**Día 1, 2 y 3:** Repicar cepa

**Día 3, 4, 5, 6 y 7:** toma de muestras cada 10 h durante 100h.

**Día 6, 7, 8, 9, 10:** conteo de UFC por caja de petri después de 72 h de incubación.

nexo 4. Resultados estadísticos arrojados por la ecuación de Gompertz A2D, Richards 2D y Logística en cada uno de los medios de cultivo evaluados

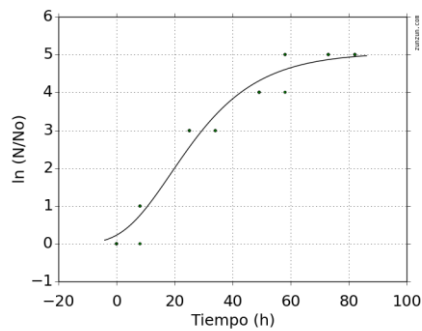
a. **Glucosa**



Gompertz A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$



Coefficients

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 2.7848428536920133E+00

a = 5.0569372282101446E+00  
b = 1.1317039387417962E+00  
c = 6.0388308949882001E-02

Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from [scipy.odr.odrpack](http://www.scipy.org/Cookbook/OLS) and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

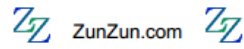
Degrees of freedom (error): 20  
 Degrees of freedom (regression): 2  
 Chi-squared: 2.78484285369  
 R-squared: 0.96504847148  
 R-squared adjusted: 0.96155318628  
 Model F-statistic: 276.11052001  
 Model F-statistic p-value: 2.77555756156e-15  
 Model log-likelihood: -8.3556044075  
 AIC: 0.987443861521  
 BIC: 1.13555180273  
 Root Mean Squared Error (RMSE): 0.347965693817

a = 5.0569372282101446E+00  
 std err: 3.64230E-02  
 t-stat: 2.64972E+01  
 p-stat: 0.00000E+00  
 95% confidence intervals: [4.65884E+00, 5.45504E+00]

b = 1.1317039387417962E+00  
 std err: 2.54949E-02  
 t-stat: 7.08771E+00  
 p-stat: 7.17690E-07  
 95% confidence intervals: [7.98635E-01, 1.46477E+00]

c = 6.0388308949882001E-02  
 std err: 6.60516E-05  
 t-stat: 7.43038E+00  
 p-stat: 3.57877E-07  
 95% confidence intervals: [4.34352E-02, 7.73414E-02]

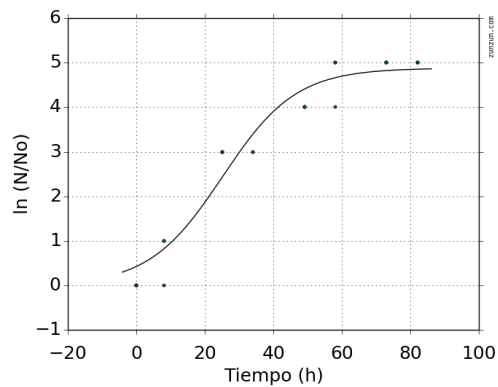
Coefficient Covariance Matrix  
 [ 0.26158003 -0.08434196 -0.0082541 ]  
 [-0.08434196 0.18309785 0.00754632]  
 [-0.0082541 0.00754632 0.00047436]



Logistic A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$



Coefficients

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 3.9025726987806442E+00

a = 4.8770579446235480E+00  
b = 1.0460988759332611E+01  
c = 9.3476474065331272E-02

Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from `scipy.odr.odrpack` and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

Degrees of freedom (error): 20  
Degrees of freedom (regression): 2  
Chi-squared: 3.90257269878  
R-squared: 0.951370959144  
R-squared adjusted: 0.946508055058  
Model F-statistic: 195.638437936  
Model F-statistic p-value: 7.394085344e-14  
Model log-likelihood: -12.2362168036  
AIC: 1.3248884177  
BIC: 1.47299635891  
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.411918770949

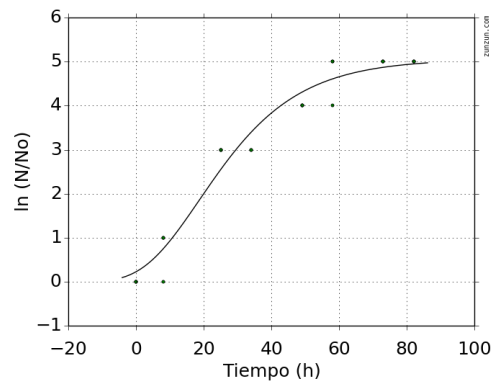
a = 4.8770579446235480E+00  
std err: 3.01701E-02  
t-stat: 2.80782E+01  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [4.51474E+00, 5.23938E+00]  
b = 1.0460988759332611E+01  
std err: 1.35077E+01  
t-stat: 2.84631E+00  
p-stat: 9.97856E-03  
95% confidence intervals: [2.79448E+00, 1.81275E+01]  
c = 9.3476474065331272E-02  
std err: 2.11599E-04  
t-stat: 6.42607E+00  
p-stat: 2.87561E-06  
95% confidence intervals: [6.31331E-02, 1.23820E-01]

Coefficient Covariance Matrix  
[ 0.15461666 -0.89406198 -0.00720977]  
[-0.89406198 69.22473084 0.2390351 ]  
[-0.00720977 0.2390351 0.00108441]

Richards

Equation Family: Sigmoidal

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)^d})$$



Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from [scipy.odr.odrpack](http://www.scipy.org/Cookbook/OLS) and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
 LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

Coefficients

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)^d})$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 2.7848908094434419E+00

a = 9.9992643154822858E-01  
 b = 1.4072273221952343E-04  
 c = -6.0379761837216744E-02  
 d = 2.2030064781594017E+04

```

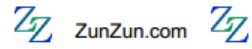
Degrees of freedom (error): 19
Degrees of freedom (regression): 3
Chi-squared: 2.78489080944
R-squared: 0.965048367745
R-squared adjusted: 0.959529688968
Model F-statistic: 174.869458203
Model F-statistic p-value: 5.17363929475e-14
Model log-likelihood: -8.35580243892
AIC: 1.07441760338
BIC: 1.27189485833
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.347968689836

a = 9.9992643154822858E-01
  std err: 2.95560E-12
  t-stat: 5.81628E+05
  p-stat: 0.00000E+00
  95% confidence intervals: [9.99923E-01, 9.99930E-01]
b = 1.4072273221952343E-04
  std err: 5.04630E-10
  t-stat: 6.26438E+00
  p-stat: 5.14563E-06
  95% confidence intervals: [9.37051E-05, 1.87740E-04]
c = -6.0379761837216744E-02
  std err: 6.60316E-05
  t-stat: -7.43046E+00
  p-stat: 4.93028E-07
  95% confidence intervals: [-7.73876E-02, -4.33719E-02]
d = 2.2030064781594017E+04
  std err: 0.00000E+00
  t-stat: INF
  p-stat: 0.00000E+00
  95% confidence intervals: [2.20301E+04, 2.20301E+04]

Coefficient Covariance Matrix
[ 2.12259510e-11  1.06877520e-10 -7.43471011e-08  0.00000000e+00]
[ 1.06877520e-10  3.62405274e-09 -1.06140641e-06  0.00000000e+00]
[ -7.43471011e-08 -1.06140641e-06  4.74213040e-04  0.00000000e+00]
[ 0. 0. 0. 0.]

```

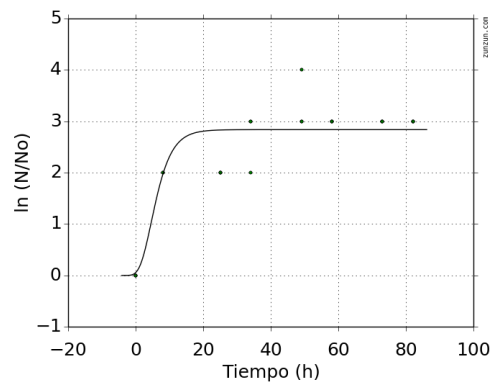
## b. Fructosa



Gompertz A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$



### Coefficients

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 4.4777308937455675E+00

a = 2.8376088532369743E+00  
b = 1.3666369410941699E+00  
c = 2.9551091947154678E-01

### Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from [scipy.odr.odrpack](http://www.scipy.org/Cookbook/OLS) and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.



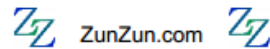
Degrees of freedom (error): 20  
 Degrees of freedom (regression): 2  
 Chi-squared: 4.47773089375  
 R-squared: 0.82429031506  
 R-squared adjusted: 0.806719346566  
 Model F-statistic: 46.9120592494  
 Model F-statistic p-value: 2.80515588535e-08  
 Model log-likelihood: -13.8172416241  
 AIC: 1.46236883688  
 BIC: 1.61047677809  
 Root Mean Squared Error (RMSE): 0.441230044197

a = 2.8376088532369743E+00  
 std err: 1.25501E-02  
 t-stat: 2.53297E+01  
 p-stat: 0.00000E+00  
 95% confidence intervals: [2.60392E+00, 3.07129E+00]

b = 1.3666369410941699E+00  
 std err: 1.53094E+00  
 t-stat: 1.10452E+00  
 p-stat: 2.82478E-01  
 95% confidence intervals: [-1.21435E+00, 3.94762E+00]

c = 2.9551091947154678E-01  
 std err: 2.75111E-02  
 t-stat: 1.78164E+00  
 p-stat: 9.00003E-02  
 95% confidence intervals: [-5.04768E-02, 6.41499E-01]

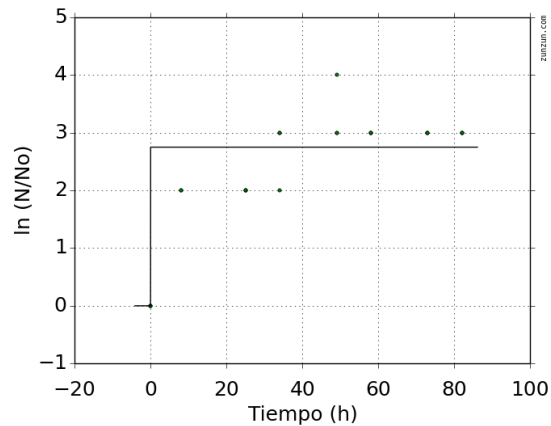
Coefficient Covariance Matrix  
 [ 0.0560554 -0.01318908 -0.00880435]  
 [-0.01318908 6.83800697 0.85566087]  
 [-0.00880435 0.85566087 0.12287965]



Richards

Equation Family: Sigmoidal

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)})^d$$



Coefficients

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)} )^d$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 5.74999999999999964E+00

a = 9.9329191608592904E-01  
b = 9.3099375050164940E+02  
c = -1.0132190641748966E+03  
d = 1.5029689051995501E+02

Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from [scipy.odr.odrpack](http://www.scipy.org/Cookbook/OLS) and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

Degrees of freedom (error): 19  
Degrees of freedom (regression): 3  
Chi-squared: 5.75  
R-squared: 0.774317406143  
R-squared adjusted: 0.738683312377  
Model F-statistic: 21.7296786389  
Model F-statistic p-value: 2.32533708944e-06  
Model log-likelihood: -16.6932011108  
AIC: 1.79940879225  
BIC: 1.99688604719  
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.5

a = 9.9329191608592904E-01  
std err: 8.73926E-08  
t-stat: 3.36000E+03  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [9.92673E-01, 9.93911E-01]  
b = 9.3099375050164940E+02  
std err: 0.00000E+00  
t-stat: INF  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [9.30994E+02, 9.30994E+02]  
c = -1.0132190641748966E+03  
std err: 0.00000E+00  
t-stat: -INF  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [-1.01322E+03, -1.01322E+03]  
d = 1.5029689051995501E+02  
std err: 0.00000E+00  
t-stat: INF  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [1.50297E+02, 1.50297E+02]

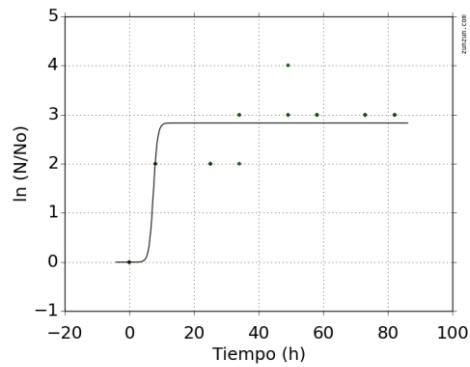
Coefficient Covariance Matrix

```
[ 2.88775607e-07  0.00000000e+00  0.00000000e+00  0.00000000e+00]
[ 0.  0.  0.  0.]
[ 0.  0.  0.  0.]
[ 0.  0.  0.  0.]
```

Logistic A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$



Coefficients

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 5.8095238127084139E+00

a = 2.7619044668938084E+00

b = 8.4515348370433698E+04

c = 1.5387211972908972E+00

Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from [scipy.odr.odrpack](http://www.scipy.org/Cookbook/OLS) and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>

LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

```

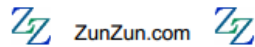
Degrees of freedom (error): 23
Degrees of freedom (regression): 2
Chi-squared: 5.80952381271
R-squared: 0.77787114835
R-squared adjusted: 0.75855596033
Model F-statistic: 40.2717528118
Model F-statistic p-value: 3.061661491e-08
Model log-likelihood: -17.4106287673
AIC: 1.57004836672
BIC: 1.71521335187
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.472697814217

a = 2.7619044668938084E+00
  std err: 1.20280E-02
  t-stat: 2.31833E+01
  p-stat: 0.00000E+00
  95% confidence intervals: [2.53503E+00, 2.98878E+00]
b = 8.4515348370433698E-04
  std err: 5.63167E+17
  t-stat: 1.12620E-04
  p-stat: 9.99911E+01
  95% confidence intervals: [-1.55233E+09, 1.55250E+09]
c = 1.5387211972908972E+00
  std err: 1.23193E+06
  t-stat: 1.38633E-03
  p-stat: 9.99906E-01
  95% confidence intervals: [-2.29451E+03, 2.29759E+03]

Coefficient Covariance Matrix
[ 4.76190476e-02  1.45717841e+03  -5.65730379e-03]
[ 1.45717841e+03  2.22958688e+18  3.29760740e+12]
[ -5.65730379e-03  3.29760740e+12  4.87723302e-06]

```

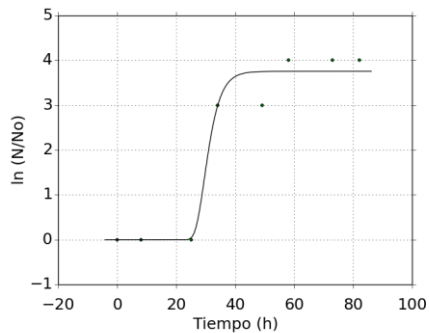
### c. Sacarosa



Gompertz A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$



Coefficients

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 2.2293793720686108E+00

a = 3.7551465191498266E+00  
b = 9.7961012752090006E+00  
c = 3.3131964438661221E-01

Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from `scipy.odr.odrpack` and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

Degrees of freedom (error): 21  
Degrees of freedom (regression): 2  
Chi-squared: 2.22937937207  
R-squared: 0.970864603727  
R-squared adjusted: 0.968089804082  
Model F-statistic: 349.886380253  
Model F-statistic p-value: 1.11022302463e-16  
Model log-likelihood: -5.53855769171  
AIC: 0.711546474309  
BIC: 0.858803203103  
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.30477993236

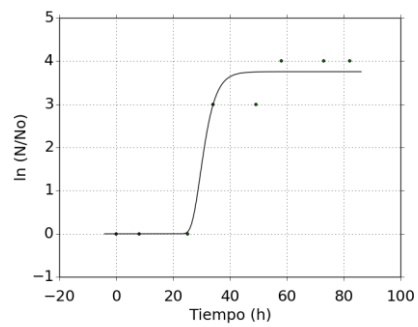
a = 3.7551465191498266E+00  
std err: 1.25273E-02  
t-stat: 3.35504E+01  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [3.52238E+00, 3.98791E+00]  
b = 9.7961012752090006E+00  
std err: 2.23478E+01  
t-stat: 2.07222E+00  
p-stat: 5.07483E-02  
95% confidence intervals: [-3.49631E-02, 1.96272E+01]  
c = 3.3131964438661221E-01  
std err: 2.00507E-02  
t-stat: 2.33982E+00  
p-stat: 2.92496E-02  
95% confidence intervals: [3.68452E-02, 6.25794E-01]

Coefficient Covariance Matrix  
[ 0.08428791 -0.36237881 -0.01361394]  
[ -0.36237881 150.36368571 4.49251121]  
[-0.01361394 4.49251121 0.13490777]

Richards

Equation Family: Sigmoidal

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)^d})$$



Coefficients

$$y = 1.0 / (a + b * e^{(c*x)^d})$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 2.2293991741317356E+00

- a = 9.9971272139434575E-01
- b = 3.9060870041262277E+00
- c = -3.3136527456749021E-01
- d = 4.6050492357376806E+03

#### Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from `scipy.odr.odrpack` and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

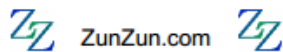
If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

Degrees of freedom (error): 20  
Degrees of freedom (regression): 3  
Chi-squared: 2.22939917413  
R-squared: 0.970864299183  
R-squared adjusted: 0.96649394406  
Model F-statistic: 222.147690968  
Model F-statistic p-value: 1.55431223448e-15  
Model log-likelihood: -5.53866427909  
AIC: 0.794888689924  
BIC: 0.991230994982  
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.304781285934

a = 9.9971272139434575E-01  
std err: 3.46023E-05  
t-stat: 1.69951E+02  
p-stat: 0.00000E+00  
95% confidence intervals: [9.87442E-01, 1.01198E+00]  
b = 3.9060870041262277E+00  
std err: 6.08126E+03  
t-stat: 5.00893E-02  
p-stat: 9.60548E-01  
95% confidence intervals: [-1.58762E+02, 1.66575E+02]  
c = -3.3136527456749021E-01  
std err: 2.14732E-02  
t-stat: -2.26130E+00  
p-stat: 3.50397E-02  
95% confidence intervals: [-6.37037E-01, -2.56939E-02]  
d = 4.6050492357376806E+03  
std err: 8.88265E+09  
t-stat: 4.88611E-02  
p-stat: 9.61515E-01  
95% confidence intervals: [-1.91992E+05, 2.01203E+05]

#### Coefficient Covariance Matrix

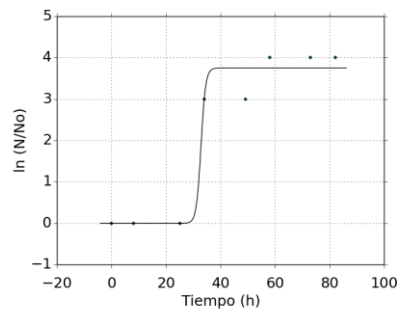
```
[ 2.17292849e-04 -2.79715437e+00 -1.26752901e-03  3.48147916e+03]
[-2.79715437e+00  3.81885838e+04 -3.15290913e-01 -4.48157457e+07]
[-1.26752901e-03 -3.15290913e-01  1.34845465e-01 -2.03095962e+04]
[ 3.48147916e+03 -4.48157457e+07 -2.03095962e+04  5.57805412e+10]
```



Logistic A

Equation Family: Sigmoidal

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$



Coefficients

$$y = a / (1.0 + b \cdot \exp(-cx))$$

Fitting target of lowest sum of squared absolute error = 2.2500003539953721E+00

a = 3.7500017208833043E+00

b = 5.4000576962541408E+16

c = 1.1739428413278485E+00



#### Coefficient and Fit Statistics

Most statistics from `scipy.odr.odrpack` and <http://www.scipy.org/Cookbook/OLS>  
LL, AIC and BIC from <http://stackoverflow.com/questions/7458391/python-multiple-linear-regression-using-ols-code-with-specific-data>

If you entered coefficient bounds. Parameter statistics may not be valid for parameter values at or near the bounds.

```
Degrees of freedom (error): 21
Degrees of freedom (regression): 2
Chi-squared: 2.250000354
R-squared: 0.970588231411
R-squared adjusted: 0.967787110593
Model F-statistic: 346.49995287
Model F-statistic p-value: 1.11022302463e-16
Model log-likelihood: -5.64904331531
AIC: 0.720753609609
BIC: 0.868010338402
Root Mean Squared Error (RMSE): 0.306186241934

a = 3.7500017208833043E+00
    std err: 8.92857E-03
    t-stat: 3.96863E+01
    p-stat: 0.00000E+00
    95% confidence intervals: [3.55350E+00, 3.94651E+00]
b = 5.4000576962541408E+16
    std err: 9.93529E+39
    t-stat: 5.41762E-04
    p-stat: 9.99573E-01
    95% confidence intervals: [-2.07233E+20, 2.07341E+20]
c = 1.1739428413278485E+00
    std err: 2.94731E+03
    t-stat: 2.16239E-02
    p-stat: 9.82952E-01
    95% confidence intervals: [-1.11727E+02, 1.14074E+02]

Coefficient Covariance Matrix
[ 8.33333406e-02 -2.57268341e+16 -1.72802410e-02]
[ -2.57268341e+16 9.27293421e+40 5.05056546e+22]
[ -1.72802410e-02 5.05056546e+22 2.75082425e+04]
```