

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE
CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO *Gluconacetobacter medellinensis***

CARLA MARÍA ENCISO MARTÍNEZ, I.Q. MSc.

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA CONVENIO UPB-UCO

Medellín

2015

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE
CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO *Gluconacetobacter medellinensis***

Carla María Enciso Martínez

Trabajo de grado para optar al título de Maestría en Biotecnología

Cristina Castro Herazo, I.Q, PhD
Directora

Mabel Milena Torres Taborda, I.Q, MSc.
Co-directora



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA CONVENIO UCO-UPB

Medellín

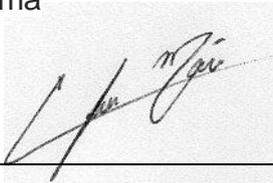
2015

26 de marzo de 2015

Carla María Enciso Martínez

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

Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carla Enciso', is written over a light gray rectangular background. The signature is cursive and somewhat stylized.

Carla María Enciso Martínez

CE: 431239

A la memoria de...

Aquel amor que ayudo a que todo salga bien...

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quisiera agradecer a Dios por protegerme durante toda esta trayectoria y darme el valor y las fuerzas para superar los obstáculos a través de este tiempo.

A mis padres por haberme brindado la confianza y el apoyo que en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor incondicional, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, enseñándome a no rendirme ante nada y mirar siempre hacia delante. A mis hermanas, las cuales con su apoyo, su alegría y cariño me han hecho siempre sonreír.

A mi directora PhD Cristina Castro Herazo, por la orientación, ayuda, su paciencia y amistad que me brindo, el cual me permitió aprender mucho más de lo esperado en este proyecto.

A mi co-directora MSc Mabel Milena Torres, por sus clases, asesorías y su apoyo para poder culminar este proyecto.

A la Universidad Pontificia Bolivariana y al PhD Robin Zuluaga Gallego por haberme brindado el material necesario y el laboratorio para trabajar.

A esa persona tan importante que me ha hecho ver que con amor todo es posible y que me devolvió la fe en que los milagros existen...

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. CELULOSA	5
2.2. CELULOSA BACTERIANA	6
2.2.1. Aplicaciones	8
2.2.2. Características	10
2.2.3. Condiciones de cultivo y medios de producción	10
2.2.4. Biosíntesis	13
2.3. INDUCTORES	14
2.4. <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	21
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	23
3.1. EVALUACIÓN DE DIVERSOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA	24
3.1.1. Fermentación	25
3.1.2. Tratamiento de la membrana de CB	26
3.1.3. Cuantificación de la CB	27
3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE LOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA	28
3.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN LOS MEDIOS MODIFICADOS CON LOS INDUCTORES	28
3.3.1. Cinética de crecimiento de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	28
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA CELULOSA	30
3.4.1. Morfología	30
3.4.2. Análisis de las características químicas	30
3.4.3. Difracción de rayos X	31
3.4.4. Viscosimetría	31
3.4.5. Pruebas de tracción	32
4. RESULTADOS	33

4.1. FASE 1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA.....	34
4.2. FASE 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE LOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA.....	41
4.3. FASE 3. ESTABLECIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN LOS MEDIOS MODIFICADOS CON LOS INDUCTORES	45
4.4. FASE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA CELULOSA	53
4.4.1. Morfología.....	53
4.4.2. Análisis de las características químicas.....	54
4.4.3. Difracción de rayos X.....	56
4.4.4. Viscosimetría.....	57
4.4.5. Pruebas de tracción	58
5. CONCLUSIONES	60
6. RECOMENDACIONES PARA PRÓXIMOS ESTUDIOS	64
7. BIBLIOGRAFÍA.....	66
8. ANEXOS.....	75
ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	76
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN	77
ANEXO 3. ESTADÍSTICA DE RESULTADOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura molecular de la celulosa, mostrando la numeración de los átomos de carbono en la glucosa	5
Figura 2 Cultivo líquido de bacterias del género <i>Gluconacetobacter</i>	8
Figura 3 Tamaño y organización de las microfibrillas de (5000x) (a) Celulosa bacteriana proveniente de una cepa del género <i>Acetobacter</i> (b) celulosa vegetal proveniente de madera.....	10
Figura 4 Imagen SEM de la CB después de (a) 7 días de fermentación (b) 14 días de fermentación.	13
Figura 5 Ruta bioquímica del metabolismo del carbono de <i>A. xylinum</i>	15
Figura 6 Imagen de microscopía electrónica de barrido de la película producida por <i>G. medellinensis</i> en medio HS.....	21
Figura 7 Diagrama de las fases para la metodología de la evaluación del efecto de inductores en la producción de celulosa bacteriana empleando <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	24
Figura 8 Frasco de vidrio utilizado para la experimentación.....	26
Figura 9 Viscosímetro capilar para la determinación del índice de viscosidad según la Alternativa A.....	31
Figura 10 Fotografía de la membrana de CB obtenida al 1% (P/V).....	35
Figura 11 Gráfico de la evaluación de producción de celulosa bacteriana según el inductor empleado.	36
Figura 12 Variación del pH en los inductores estudiados.	38
Figura 13 Porcentaje de humedad de las membranas obtenidas con el medio HS y con el medio modificado al 1 % de concentración del inductor.....	39

Figura 14 Membranas obtenidas en los medios modificados con etanol a diferentes concentraciones: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1 %, (d) 2 %, (e) 4 %, (f) 6 %, (g) 8 % y (h) 10 % (P/V).....	41
Figura 15 Membranas obtenidas en los medios modificados con ácido acético a diferentes concentraciones: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1 %, (d) 2 %, (e) 4 %, (f) 6 %, (g) 8 % y (h) 10 % (P/V).....	42
Figura 16 Gráfico de la producción de CB utilizando etanol y ácido acético como inductores a diferentes concentraciones	43
Figura 17 Gráficos de modelos de producción de biomasa, consumo de sustrato y producción de CB.....	46
Figura 18 Gráfico de producción de CB a través del tiempo	49
Figura 19 Grafico de comparación de los modelos de la concentración de biomasa y concentración de sustrato a través del tiempo.....	48
Figura 20 Gráfico de comparación de la concentración de biomasa vs la producción de CB para el blanco (HS), medio modificado con etanol (ET) y medio modificado con ácido acético (AA)	52
Figura 21 Imágenes de SEM de una membrana de celulosa producida por (a) blanco HS, (b) medio modificado con etanol y (c) medio modificado con ácido acético.....	54
Figura 22 Espectro FTIR de las membranas de CB obtenidas por <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	55
Figura 23 Espectro de difracción de rayos X (DRX) recogidos de las membranas de CB a partir del blanco HS, medio modificado con etanol y medio modificado con ácido acético.....	56
Figura 24 Gráfica de grado de polimerización de las membranas obtenidas con respecto a los inductores utilizados y el blanco.	57

Figura 25	Gráfico de Resistencia máxima en las membranas obtenidas	58
Figura 26	Gráfico del Módulo de Young para las muestras	59
Figura 27	Curva de calibración de concentración vs absorbancia.....	77
Figura 28	curva de calibración de concentración de glucosa vs absorbancia .	78
Figura 29	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para producción de CB81	
Figura 30	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para pH	83
Figura 31	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para Humedad	85
Figura 32	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la concentración del etanol en el medio	87
Figura 33	Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la concentración del ácido acético en el medio	89
Figura 34	Gráfica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio HS.....	100
Figura 35	Gráfica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio modificado con etanol.	104
Figura 36	Gráfica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio modificado con ácido acético.	108
Figura 37	Gráfico para cálculo de rendimiento biomasa/sustrato	111
Figura 38	Gráfico para cálculo de rendimiento CB/sustrato	111

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Tipo de CB según los microorganismos productores	7
Tabla 2 Algunas de las nuevas aplicaciones de la CB.....	9
Tabla 3 Sustratos utilizados como fuente de carbono para la producción de CB.	11
Tabla 4 Inductores empleados para la producción de CB	16
Tabla 5 Composición del medio de cultivo Hestrin-Schramm	25
Tabla 6 Inductores utilizados para la evaluación de la primera fase y abreviaturas utilizadas para su reconocimiento.	25
Tabla 7 Cantidad de celulosa bacteriana sintetizada por <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> en el medio de cultivo HS modificado con diferentes inductores	35
Tabla 8 Resultados obtenidos del estudio de la producción de CB utilizando etanol y ácido acético como inductores a diferentes concentraciones.	42
Tabla 9 Rendimientos de la producción de biomasa vs sustrato consumido para el blanco (HS), el medio adicionado con etanol (ET) y el medio adicionado con ácido acético (AA).....	50
Tabla 10 Rendimientos de la producción de CB vs sustrato consumido para el blanco (HS), el medio adicionado con etanol (ET) y el medio adicionado con ácido acético (AA).....	51
Tabla 11 Promedio del diámetro de las fibras de las membranas obtenidas. ..	53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	76
ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN	77
ANEXO 3. ESTADÍSTICA DE RESULTADOS.....	79
FASE 1. Evaluación de diferentes inductores en la producción de celulosa bacteriana.....	79
FASE 2. Determinación de las condiciones de concentración de los inductores en la producción de la celulosa bacteriana.....	85
FASE 3. Establecimiento de la cinética de crecimiento bacteriano y de producción de celulosa bacteriana en los medios modificados con los inductores.....	89

ABREVIATURAS

AA	Medio modificado con ácido acético
AC	Medio modificado con ácido cítrico
AL	Medio modificado con ácido láctico
AM	Medio modificado con ácido málico
AO	Medio modificado con ácido oxálico
AS	Medio modificado con ácido succínico
ATP	Adenosín trifosfato
CB	Celulosa Bacteriana
Cel-	Células mutantes no productoras de CB
CM	Celulosa Microbiana
CSL	Licor de maíz
CV	Celulosa Vegetal
DP	Grado de polimerización
DRX	Difracción de rayos X
ET	Medio modificado con etanol
Fru	Fructosa
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GINUMA	Grupo de Investigación sobre Nuevos Materiales
GK	Glucoquinasa
HS	Medio Hestrim – Schramm
SEM	Microscopía electrónica de barrido
sln	Solución
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs)
TGA	Análisis termogravimétrico
UDP	Uridina difosfato

RESUMEN

En los últimos años se ha puesto gran interés en la búsqueda de alternativas para la celulosa vegetal (CV), siendo una de ellas la celulosa bacteriana (CB). Uno de los principales retos ha sido introducir al mercado la CB a un precio competitivo comparándola con la CV y con una calidad igual o superior. Se ha observado que una manera de aumentar la producción de CB es utilizando diversos inductores.

En este proyecto se evaluaron siete inductores (seis ácidos orgánicos y el etanol) a una concentración de 1,0 % (P/V) sobre la producción de CB utilizando la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*, en donde se observó que la mayor producción se dio para el etanol y el ácido acético obteniendo 2,69 y 2,06 veces más que el blanco HS, respectivamente. A partir de estos resultados se evaluó el efecto de la concentración de estos dos inductores sobre la producción de CB, en donde se observó que para ambos la mayor producción se dio a 0,1 % (P/V).

Además de esto, se realizó un estudio de la cinética de producción de biomasa y producción de CB, donde se observó que a diferencia de lo expuesto en la literatura, la CB se produce como metabolito secundario para la cepa utilizada y se vio un incremento no solo en la producción de CB sino también en la producción de biomasa para los medios modificados, siendo mayor para el etanol.

Posterior a esto, se realizó una caracterización física y estructural de las membranas obtenidas en presencia de los inductores, donde se observó que no se presentan cambios en la estructura química y cristalina del material durante su síntesis en los medios modificados. En cuanto a las características físicas, las imágenes de SEM mostraron una mayor densidad de nanocintas en el medio de etanol seguido por el ácido acético y una disminución en la distancia entre nodos en la red interconectada de nanocintas en ambos casos. Así mismo, también se presentó una disminución en el número de unidades de glucosa polimerizadas (DP) por el microorganismo en los medios modificados. Este cambio en el DP también podría justificar la ligera disminución en el módulo de Young estimado a partir de los ensayos mecánicos. No se presentan cambios en la máxima resistencia, lo cual permite concluir que la calidad de la CB no se afectó durante su síntesis en los medios modificados con los inductores.

PALABRAS CLAVE:

Gluconacetobacter medellinensis; celulosa bacteriana; inductores; biosíntesis; ruta metabólica; cinética bacteriana.

1.INTRODUCCIÓN

La celulosa, el biopolímero más abundante en la tierra, es producida por plantas, animales y microorganismos. La celulosa aislada de plantas es comúnmente conocida como celulosa vegetal (CV) y se extrae principalmente de los árboles por lo que es la de mayor disponibilidad (Chávez Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004).

El mercado de la celulosa ha sido fluctuante, en los últimos años se ha visto un incremento en la demanda de productos a base de celulosa, lo que ha dado como resultado su escasez y por tanto un aumento del precio de la misma (Higson, 2011). Desde 1998 al 2009 se ha observado un incremento del 24 % en la producción de la CV, esto impuso una presión negativa en el balance ecológico a nivel mundial, causando deforestación y aumentando problemas medioambientales (Dayal et al., 2013)

A partir del incremento del precio y la demanda de CV, se ha puesto gran interés en la búsqueda de alternativas para la producción de celulosa, como la celulosa de origen bacteriano (CB) (Higson, 2011). Weyerhaeuser, productora de celulosa en USA, y la empresa Ajinomoto, empresa de insumos para la industria alimentaria en Japón, comenzaron con la comercialización de la CB como *Bacterial Cellulose Celluton®* y *Bacterial Cellulose*, respectivamente. Para el 2003 la CB registró un precio de €20/kg (aproximadamente \$ 25.80 USD/kg), que comparándolo con el precio de la CV llega a ser hasta 9 veces más costosa. (*Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe*, 2005).

El principal reto es introducir al mercado la CB con un precio competitivo, comparado con el de la CV; esto se ve influenciado principalmente por la baja eficiencia y los altos costos de la materia prima para la producción de la CB (Sani & Dahman, 2009; *Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe*, 2005).

La mejora de la eficiencia es un tema de alto interés, ya que es una tarea difícil, especialmente por los subproductos producidos en el proceso metabólico de biosíntesis de la CB, los cuales hacen que se disminuya su producción (Fontana et al., 1991; Hutchens et al., 2014; Toda et al., 1997). Se ha visto en estudios, que cambios en las condiciones del cultivo pueden ayudar a mejorar el crecimiento microbiano y, por lo tanto, mejorar la producción de metabolitos primarios y secundarios, estos cambios pueden utilizarse para la evaluación de la producción de CB (Li et al., 2012). El aumento en la producción de CB puede lograrse modificando la ruta metabólica del microorganismo con el uso de diferentes inductores químicos (Fontana et al., 1991) los cuales ayudan con el incremento de la producción de diversas maneras como son: aumentando el metabolismo energético, reduciendo la formación de subproductos metabólicos

o bien aumentando la viscosidad del medio en fermentaciones con agitación (Bae, Sugano, & Shoda, 2004; Li et al., 2012).

En los últimos años se ha estudiado el efecto de diversos inductores en la producción de CB, principalmente para la cepa *Gluconacetobacter. xilinum*, tal es el caso del uso del ácido acético, el cual en una investigación realizada por Toda y colaboradores, muestra un incremento de la producción de CB de hasta 4 veces más comparado con un cultivo sin el inductor (Toda et al., 1997) o bien al adicionar ácido láctico, se muestra un incremento de producción de 4 – 5 veces más que en un cultivo sin el inductor (Matsouka et al., 1996). Algunas sustancias con alto contenido en xantinas han ayudado a la producción de CB aumentándola más de 25 veces (Fontana et al., 1991) y con la vitamina C se han alcanzado rendimiento de 1,52 veces más comparado con el blanco (Keshk, 2014), entre muchos otros inductores.

Ya que *Gluconacetobacter medellinensis* es una cepa recientemente reclasificada, con la cual se ha estudiado en los últimos años las condiciones de cultivo, sustratos y medios de cultivo para la producción de CB, se hace necesario realizar un análisis del efecto de diversos inductores sobre la producción de CB, esto con miras a incrementar la producción. Por lo que en esta investigación se realizó el estudio del efecto de diversos inductores químicos, en un cultivo estático con la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*; esto con el objetivo de buscar el aumento de la producción de la CB.

2.MARCO TEÓRICO

2.1. CELULOSA

La celulosa es un polímero sólido, no termoplástico, biodegradable, no tóxico, insoluble en agua y en la mayoría de solventes orgánicos (Haynes, 1953; Wertz et al., 2010).

Es un polímero lineal compuesto de unidades de D-anhidroglucopiranosas unidas entre sí por enlaces β -1,4-glucosídicos (Figura 1). La composición elemental de la celulosa fue determinada por primera vez por Payen en 1838, siendo la siguiente: 44 – 45 % de carbono, 6,0 – 6,5 % de hidrógeno y el remanente de oxígeno. Con esto se concluyó que la celulosa es una cadena molecular larga de unidades repetitivas de glucosa con la siguiente fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Haynes, 1953; Krässig, 1993; Wertz et al., 2010).

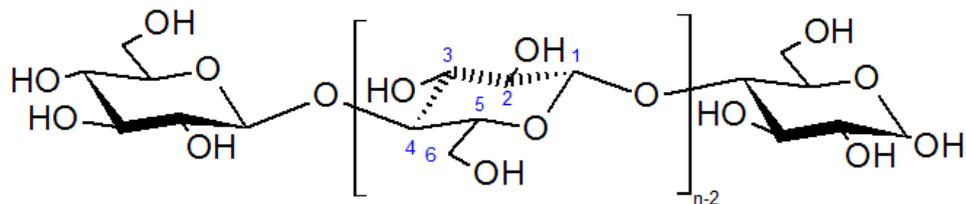


Figura 1 Estructura molecular de la celulosa, mostrando la numeración de los átomos de carbono en la glucosa, adaptada de (Wertz et al., 2010)

Cada molécula de glucosa que forma la celulosa se encuentra conformada de la siguiente manera: un carbono C1 al cual se encuentran unidos dos oxígenos, subsecuentemente de C2 y C3 los cuales están ligados con un grupo hidroxilo cada uno, un C4 unido a un átomo de oxígeno y un grupo hidroximetil el cual está unido al C5 (Figura 1). El C1 es un centro de acetal a lo largo de toda la cadena, excepto en el extremo de la derecha, donde se trata de un centro de hemiacetal con propiedades reductoras; razón por la cual la molécula de celulosa tiene un extremo reductor, el cual contiene un hemiacetal no sustituido, y un extremo no reductor que contiene un grupo hidroxilo adicional en el C4 (Dumitriu, 2004; Wertz et al., 2010).

Se han identificado cuatro polimorfismos para la celulosa: I, II, III y IV; cada uno de ellos puede ser identificado por su patrón de difracción de rayos-X característico y pueden transformarse de un polimorfismo a otro de manera reversible o irreversible por diversos tratamientos, ya sean químicos, físicos y/o térmicos; la estructura de la celulosa I, llamada también celulosa nativa, es la que se encuentra en mayor proporción en la naturaleza, y coexiste como la mezcla de dos formas cristalinas, I_α y I_β (Carreño, 2011; Castro Herazo, 2012; Dumitriu, 2004; Krässig, 1993).

La celulosa II es conocida como celulosa regenerada, ya que usualmente proviene de un tratamiento irreversible de mercerización o regeneración de la celulosa I, lo que la hace termodinámicamente más estable que la celulosa I (Castro Herazo, 2012; Dumitriu, 2004).

La celulosa puede ser sintetizada por plantas, algas como *Valonia* y *Microdictyon*, animales pertenecientes a la familia *Ascita* y algunos microorganismos (Castro et al., 2012; Dayal et al., 2013; Dumitriu, 2004).

La celulosa vegetal (CV) ha sido la de mayor producción hasta el momento; se extrae principalmente de árboles, aunque también es extraída de otras fuentes de fibras lignocelulósicas como la paja, el bagazo de caña de azúcar, algodón, entre otras. La CV imparte resistencia, soporte mecánico y flexibilidad a la membrana celular vegetal. Comúnmente la CV se encuentra en combinación con lignina y hemicelulosa, las cuales en el proceso de remoción presentan problemas medioambientales y generan diferentes tamaños de fibras (Chávez Pacheco et al., 2004; Dumitriu, 2004; El-Saied et al., 1991; Wertz et al., 2010).

Una alternativa a la CV ha sido la celulosa bacteriana (CB), la cual tiene la misma estructura molecular y polimérica que la CV, pero con propiedades únicas, como una alta cristalinidad, grado de polimerización, altas propiedades mecánicas, alta pureza (libre de lignina y hemicelulosa) y gran capacidad de absorción del agua (Brown, 1991; Chawla et al., 2009).

2.2. CELULOSA BACTERIANA

La producción de celulosa de una bacteria fue reportada por primera vez por A.J. Brown (1886), el cual observó la formación de una membrana gelatinosa, blanca y translúcida, en presencia de oxígeno y glucosa; esta bacteria fue nombrada como *Acetobacter xylinum*, actualmente conocida como *Gluconacetobacter xylinum*. En su investigación, Brown encontró que la fórmula molecular de la CB ((C₆H₁₀O₅)_n) es la misma que para la CV, además que mostraba características similares a esta última, por lo que llegó a la conclusión que la membrana formada era celulosa (Brown, 1886; Gama et al., 2013).

La celulosa bacteriana (CB) es un exopolisacárido producido en su mayoría por bacterias Gram-negativas del género *Gluconacetobacter*, aunque también es producida por especies del género *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea* y *Salmonella*. Las características estructurales de la CB se ven influenciadas en gran parte por la cepa productora, en la Tabla 1 se muestran algunos de los tipos de estructura de CB según los microorganismos (Chávez Pacheco et al., 2004; Chawla et al., 2009; Sheykhnazari et al., 2011).

Tabla 1 Tipo de CB según los microorganismos productores (Jonas & Farahc, 1998; Sheykhnazari et al., 2011)

Organismo (género)	Tipo de fibrillas de celulosa producida
<i>Acetobacter / Gluconacetobacter</i>	Película extracelular compuesta de cintas de celulosa
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas de celulosa
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas de celulosa
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas cortas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas de celulosa
<i>Pseudomonas</i>	Fibrillas no distintivas
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas cortas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No definida

La formación de la CB se da sobre la superficie de los medios líquidos y sólidos en forma de una película o membrana después de transcurrido un día de incubación, en este tiempo las bacterias aumentan su población consumiendo el oxígeno disuelto en el medio (Carreño et al., 2012). La CB tiene diversas funciones que dependen de la especie; generalmente las bacterias la producen como mecanismo de flotación, permitiendo a las bacterias permanecer en la interface aire-líquido para obtener con mayor facilidad el oxígeno y los nutrientes, ya que la concentración de los nutrientes en la membrana es mayor que en el medio líquido, esto por las propiedades de absorción de la CB. Las bacterias que se encuentran en la membrana (Figura 2) son las que producen la CB, mientras que las que se encuentran en el seno del medio permanecerán en estado de latencia. Otra de las funciones de la CB es ser una barrera física, para proteger a la bacteria de la radiación UV (Chávez Pacheco et al., 2004; Mamlouk & Gullo, 2013).

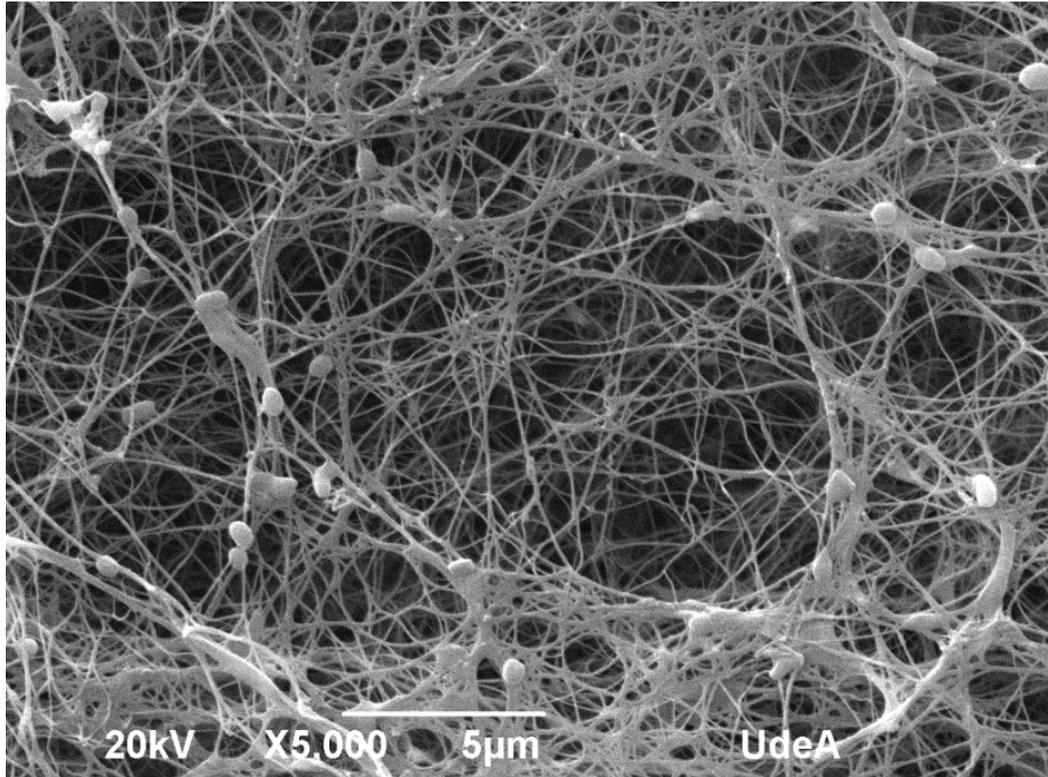


Figura 2 Membrana de CB de bacterias del genero *Gluconacetobacter*

2.2.1. Aplicaciones

La celulosa y sus derivados son unos de los principales materiales en la industria. Debido a las propiedades que posee, la CB es un material atractivo para diversas aplicaciones, las cuales varían dependiendo de las propiedades que posea (Dumitriu, 2004; Higson, 2011).

Entre las industrias en donde la CB es utilizada está la farmacéutica, médica, cosmética, alimenticia, la industria del papel, entre otras. (Chawla et al., 2009). Algunas de las aplicaciones que se han ido desarrollando en los últimos años se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2 Algunas de las nuevas aplicaciones de la CB

Industria	Aplicación	Referencia
Alimenticia	Nata de coco	(Budhiono, Rosidi, Taher, & Iguchi, 1999)
	Aditivo alimenticio (espesante, estabilizante)	(Chawla et al., 2009)
	Ingrediente para la preparación de alimentos como galletas con alto contenido en fibra dietaria.	(Feng & Guang, 2010)
Cosmética	Biopelícula con astaxantina, como mascarilla para el blanqueamiento y cuidado de la piel	(Chunyan & Zhong Yuguang, 2013)
Médica	Apósito médico compuesto de CB y quitosano.	(Shen & Lai, 2013)
	Apósito antimicrobiano compuesto de nanofibras de CB recubiertas de nano-partículas de plata	(Wan & Guhados, 2013)
	Injerto óseo para animales fabricado de un material compuesto con CB.	(Hutchens et al., 2014)
	Tubo a base de CB sustituto de vasos sanguíneos.	(Shiru, Weihua, Yuanyuan, & Fei, 2009)
Papelera	Adición de CB para proporcionar al papel una seguridad anti-falsificado, para el uso de títulos, billetes, etc.	(Liu, Marks, Tours, Jianmei, & Yankui, 2013)
Embalaje	Uso de CB como material de embalaje de bolsas de hielo para terapia física.	(Chunyan Zhong, 2013)
	Material de envase comestible para alimentos, a base de CB.	(Jiazhou, Yuping, Ronglin, Xin, & Dongqing, 2011)
	Tripa a base de CB para el envasado de embutidos cárnicos.	(Shiru et al., 2009)
Electrónica	Fabricación de diafragmas de alta fidelidad acústica	(Masaru Uryu & Noboru kurihara, 1993)

2.2.2. Características

La CB ha ido tomando mayor atención ya que comparada con la CV tiene una pureza mayor, un alto índice de cristalinidad y mayor capacidad de retención de agua, además de que es un material biodegradable, renovable y biocompatible (Shi et al., 2014; Zhong et al., 2013)

Una de las características principales de la CB obtenida es el tamaño de las nanocintas que la componen, las cuales por su método de síntesis, son de tamaño homogéneas, viéndose en el microscopio 100 veces más finas que las de la CV (Figura 3a), mientras que en la CV por su método de obtención, se tienen cintas con una gran dispersión de tamaños (Figura 3b) esto hace de la CB un material altamente poroso el cual permite la transferencia de sustancias y al mismo tiempo sirve como una eficiente barrera física contra agentes externos (Castro Herazo, 2012; Shi et al., 2014)

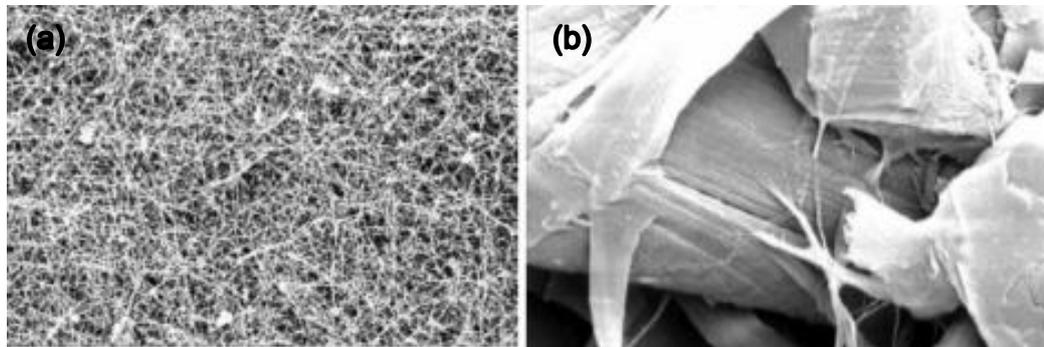


Figura 3 Tamaño y organización de las microfibrillas de (5000x) (a) Celulosa bacteriana proveniente de una cepa del género *Acetobacter* (b) celulosa vegetal proveniente de madera (Tomado de Chawla et al., 2009).

Además de esto, la CB tiene un mayor grado de polimerización (longitud de cadena) comparado con la CV, con valores de 800 a 10.000 unidades y 300 a 1.700 unidades, respectivamente, afectando en las propiedades mecánicas de la membrana (Heinze & Petzold-Welcke, 2012; Ul-Islam, Ha, Khan, & Park, 2013).

2.2.3. Condiciones de cultivo y medios de producción

Las condiciones de cultivo y los medios de cultivo utilizados afectan de manera directa la producción de celulosa bacteriana y sus propiedades, ya que los microorganismos responden de diversas maneras a los cambios ambientales (Chawla et al., 2009; Ruka, Simon, & Dean, 2012).

La tasa de producción de la celulosa es proporcional a la tasa de crecimiento celular y el rendimiento dependerá de la fuente de carbono, la cual puede ser fructosa, glucosa, sacarosa, entre otras (Mamlouk & Gullo, 2013).

Los medios de cultivo utilizados habitualmente para la investigación y producción de CB han sido de composición definida, como el medio Hestrim – Schramm (HS), cuya fuente de carbono es la glucosa. Se han realizado estudios para observar la producción de CB en diferentes fuentes de carbono como la fructosa, glucosa, galactosa, glicerol, inositol, lactosa, maltosa, metanol, ribosa, sorbosa, almidón, manitol y algunos ácidos orgánicos como el ácido succínico o el ácido málico, esto con el objetivo de sustituir los componentes del medio HS (Ruka et al., 2012).

Estos medios tienen la desventaja de utilizar reactivos generalmente de grado analítico, lo que lleva a que se incrementen los costos de producción. Una manera de reducir estos costos es el uso de residuos agroindustriales y/o subproductos como fuente de carbono (Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe, 2005), aunque estos residuos requieren una dilución y suplementación nutricional. En la Tabla 3 se muestran algunos de los sustratos que han sido utilizados como fuente de carbono.

Tabla 3 Sustratos utilizados como fuente de carbono para la producción de CB.

SUSTRATO	REFERENCIA
<i>Helianthus tuberosus</i> (alcachofa de Jerusalén)	(Hong, 2011)
Extracto de harina de soya	(Qiu & Netravali, 2013)
Paja de trigo	(Hong, 2012)
Solución de leche de coco (20 – 80 %)	(Chunyan, 2013)
Extracto de cáscara de la uva	(Carreira et al., 2011)
Suero de queso	(Carreira et al., 2011)
Residuos de la industria textil a base de algodón	(Hong et al., 2012)
Melazas como de remolacha o caña de azúcar	(Keshk & Sameshima, 2006)

Continuación de la Tabla 3 Sustratos utilizados como fuente de carbono para la producción de CB.

SUSTRATO	REFERENCIA
Jugos de frutas como de naranja, piña, uva, manzana, etc.	(Arteaga, 2014; Kurosumi et al., 2009)
Cascarilla de la cereza del café	(Rani & Appaiah, 2011b)
CSL-Fructuosa	(Naritomi, Kouda, Yano, & Yoshinaga, 1998b)
Polvo hidrolizado de Konjac	(Hong & Qiu, 2008a)

Existen diferentes tipos de fermentación para la producción de CB, estático y agitado, la morfología de la CB obtenida va a depender del tipo de fermentación utilizado, ya que en cultivos estáticos se ha visto que la CB se obtiene en forma de membrana, mientras que en fermentaciones con agitación la CB se obtiene en forma de pellets o aglomeraciones amorfas, siendo el más estudiado la fermentación de tipo estático, ya que en este la tendencia a que las células mueran a Cel^- (células no productoras de CB) es menor (Carreño et al., 2012; Kouda, Yano, & Yoshinaga, 1997; Krystynowicz et al., 2002).

Entre los parámetros de mayor interés en una fermentación estática se encuentran el tiempo de fermentación, pH, temperatura, volumen y el área de superficie de cultivo (Chawla et al., 2009; Ruka et al., 2012).

El tiempo de fermentación es de vital importancia ya que en estudios realizados por Ruka y colaboradores (2012), se observó una formación de CB significativa después de 14 días de incubación, esto puede deberse a que la película de celulosa llega a ser suficientemente gruesa de modo que las células bacterianas están privadas de oxígeno y, por lo tanto, son incapaces de crecer activamente después de este tiempo (Ruka et al., 2012). Además de esto, el tiempo de fermentación influye en las características de la membrana de CB obtenida; Sheykhnazari y colaboradores (2011), observaron que al aumentar el tiempo se incrementa el número de nanocintas ramificadas entrecruzadas entre sí (Figura 4) y disminuye el índice de cristalinidad (Sheykhnazari et al., 2011).

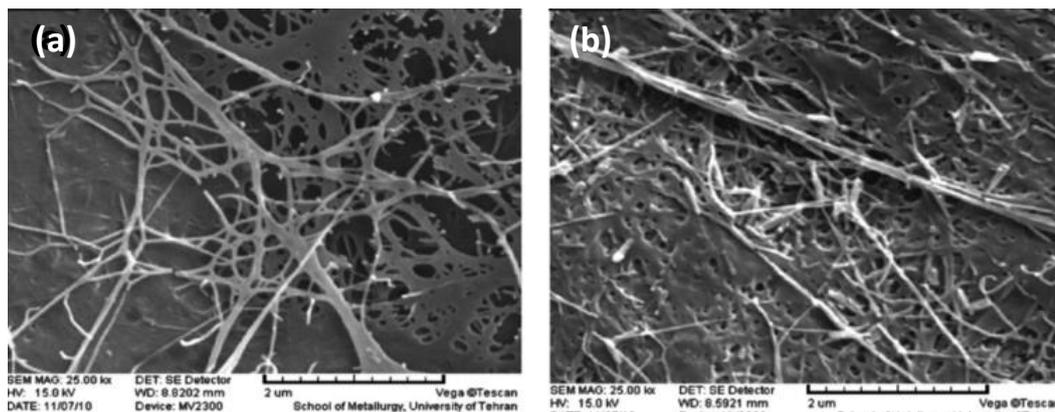


Figura 4 Imagen SEM de la CB después de (a) 7 días de fermentación (b) 14 días de fermentación (Tomada de Sheykhnazari et al., 2011).

El pH óptimo para el crecimiento y la producción de CB depende de la cepa bacteriana. Para la mayoría de bacterias acéticas el pH óptimo para la producción de CB se encuentra entre 4.0 - 6.0, por debajo de este parámetro la producción decrece por inhibición del microorganismo (Bielecky et al., 2005; Chawla et al., 2009; Mamlouk & Gullo, 2013).

La temperatura es un parámetro que afecta tanto al crecimiento celular como a la producción de CB; en la mayoría de las investigaciones, la máxima producción de CB se alcanza a una temperatura entre 28 y 30 °C, aunque se han reportado casos de bacterias acéticas que se reconocen como termotolerantes, las cuales crecen a temperaturas de 37 – 40 °C, produciendo membranas de CB (Adachi et al., 1997; Mamlouk & Gullo, 2013; Ndoye et al., 2006; Wertz et al., 2010)

El área de superficie de cultivo está ligado a la producción de CB, esto se observó en un estudio realizado por Ruka y colaboradores (2012), encontrando que bajo condiciones estáticas cuanto mayor sea el área de superficie del medio de cultivo mayor será la cantidad de celulosa producida (Ruka et al., 2012).

2.2.4. Biosíntesis

La bacteria *Gluconacetobacter xylinum* ha servido como modelo para el estudio de la producción de la CB, no solo dándole enfoques fisiológicos o morfológicos, si no también identificando los precursores intracelulares y realizando el aislamiento de algunas de las enzimas; lo que ha llevado a una descripción detallada de la biosíntesis de la CB para este microorganismo (Ross et al., 1991; Saxena & Brown, 2001; Zhong et al., 2013).

En la ruta para el metabolismo del carbono en *G. xylinum* operan varias vías importantes: el ciclo de las pentosas fosfato, la cual corresponde a la oxidación

de carbohidratos; el ciclo de los ácidos tricarbónicos (por sus siglas en inglés, TCA) o ciclo de Krebs, el cual corresponde a la oxidación de los ácidos orgánicos; y la ruta de biosíntesis de la CB (Ross et al., 1991)

La ruta de la biosíntesis de la CB dependerá de la fuente de carbono utilizada. Para el caso de la glucosa se han caracterizado cuatro pasos básicos: (1) la fosforilación de la glucosa por medio de la glucoquinasa (GK); (2) isomerización de la glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato por medio de la enzima fosfoglucomutasa (PGM); (3) síntesis de uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) a partir de la glucosa-1-fosfato por medio de la enzima UDP-glucosa-pirofosforilasa (UGP); (4) por último ocurre la síntesis de la celulosa a partir de UDP-glucosa por medio de la enzima celulosa sintasa (CS) (Figura 5) (Gama et al., 2013; Li et al., 2012; Wertz et al., 2010; Saxena & Brown, 2001).

La ruta bioquímica del metabolismo del carbono de *A. xylinum* (**Figura 5**) contiene un gran número de subproductos, se ha encontrado que alrededor del 50% de la glucosa del medio termina como celulosa, esto por la cantidad de subproductos como ácido glucónico, subproducto causante del descenso del pH (Chávez Pacheco et al., 2004; Gama et al., 2013; Li et al., 2012), por lo que mejorar la producción de CB es una tarea difícil. El aumento de la producción de CB y reducción de los subproductos se puede dar con la ayuda de inductores, los cuales pueden promover bloqueos dentro de la ruta (Brown & Saxena, 2000; Li et al., 2012).

2.3. INDUCTORES

Se han estudiado diversas estrategias para lograr una mayor eficiencia en la producción de la CB, una de ellas es aumentando el metabolismo energético y/o reduciendo la formación de subproductos metabólicos, esto se logra a través de la regulación de las rutas metabólicas o aumentando la viscosidad del medio, para fermentaciones con agitación, con la ayuda de inductores, los cuales por ser una suplementación que se requiere en cantidades pequeñas no incrementan de forma apreciable el costo de la formulación (Fontana et al., 1991; Shi et al., 2014).

Se han realizado varios estudios de inductores para diversos microorganismos productores de CB, en la (Tabla 4) se muestran algunos de los inductores estudiados y los efectos en la producción de CB.

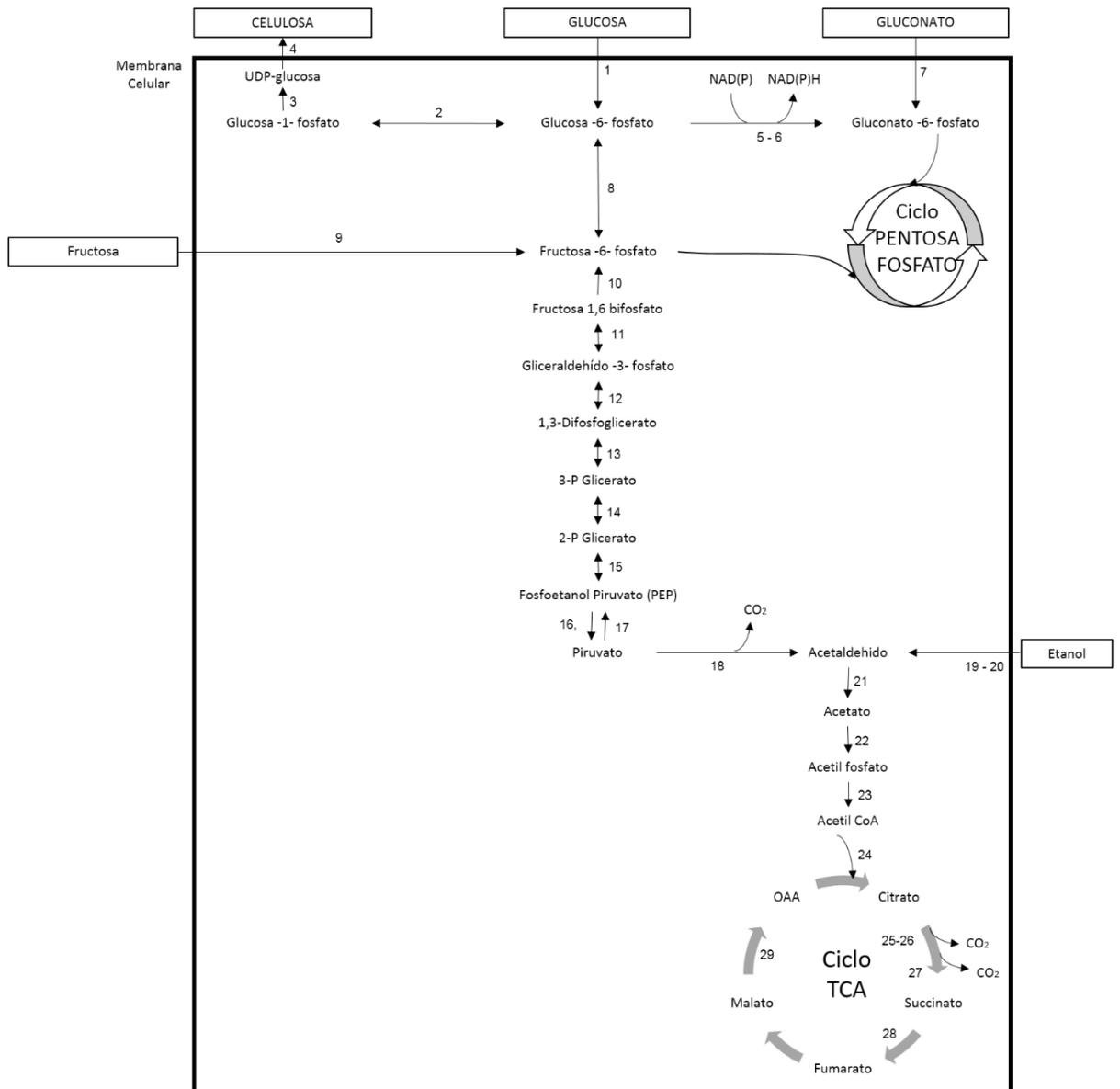


Figura 5 Ruta bioquímica del metabolismo del carbono de *A. xylinum* donde: (1) Glucoquinasa, (2) Fosfoglucumutasa, (3) UDP-glucosa-pirofosforilasa (UGP), (4) Celulosa sintasa, (5) Glucosa-6-Pi-deshidrogenasa (NAD), (6) Glucosa-6-Pi-deshidrogenasa (NADH), (7) Gluconoquinasa, (8) Fosfoglucoisomerasa, (9) Fructoquinasa, (10) Fructosa difosfatasa, (11) Aldolasa, (12) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, (13) Fosfoglicerato quinasa (ATP), (14) Fosfoglicerato mutasa, (15) Enolasa, (16) Piruvato quinasa, (17) Piruvato fosfato diquinasa (ATP), (18) Piruvato descarboxilasa, (19) Alcohol deshidrogenasa (NAD), (20) Alcohol oxidasa, (21) Glicerol-P-deshidrogenasa, (22) Acetoquinasa, (23) Fosfotransnasilasa, (24) Citrato sintasa, (25) Isocitrato deshidrogenasa (NAD), (26) Isocitrato deshidrogenasa (NADH), (27) α -cetoglutarato deshidrogenasa (NAD), (28) Succinato deshidrogenasa (FAD), (29) Malato deshidrogenasa (FAD). Adaptado de (Gama et al., 2013; Ross et al., 1991)

Tabla 4 Inductores empleados para la producción de CB

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR	MICROORGANISMO	MEDIO	TIPO DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ALCANZADA	REFERENCIA
Etanol	4 - 10 g/l	<i>Acetobacter xylinum</i> subsp. <i>Sucrofermentans</i>	Medio de CSL-Fru	Continuo	Adicionando 4 - 10 g/l de etanol al medio se mejoró la producción de CB. También se encontró que 10 g/l de etanol es la concentración donde se alcanza una mayor producción de CB, incluso mayor que al adicionar lactato. Al adicionar más de 15 g/l de etanol se disminuye la producción de CB, esto a causa de que se incrementa el acetato residual, lo que genera una inhibición del crecimiento celular.	(Naritomi et al., 1998a)
	2,00%	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	BM	Batch	El etanol funciona como fuente de energía para la generación de ATP en las etapas tempranas de la fermentación, dando como resultado la disminución de la producción de glicerol, uno de los mayores subproductos que bajan el rendimiento de producción de la CB.	(Li et al., 2012)
Etanol y Ácido acético	1,5 % etanol 1,0 % ácido acético	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	CCH (Coffee cherry husk)	Batch con agitación	Se estudió el efecto de la suplementación con etanol y ácido acético al medio de cultivo de CCH y se observó que la producción de CB se incrementa 1,7 veces más que sin estos suplementos (6,9 g/L)	(Rani & Appaiah, 2011b)
Ácido acético	20 g/l	<i>Acetobacter xylinum</i>	GPY	Batch	La producción de CB se incrementó hasta 4 veces (0,19 g CB/g glucosa) al realizar la fermentación con ácido acético, comparándola con la fermentación sin ácido acético (0,03 g CB/ g glucosa).	(Toda et al., 1997)

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR	MICROORGANISMO	MEDIO	TIPO DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ALCANZADA	REFERENCIA
Ácido Láctico	4,5 - 12,5 g/l	<i>Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans</i>	Medio CSL-Fru	Continuo	Se demostró que utilizando un cultivo en continuo y una suplementación de lactato, la producción de CB se incrementó. También se encontró que a concentraciones de lactato mayores a 20 g/l, la tasa de producción de CB disminuyó. Concluyendo que el lactato estimula el crecimiento celular durante las fases de crecimiento tempranas.	(Naritomi et al., 1998b)
	0,15% v/v	<i>Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans</i>	4% P/V fructosa 0,1% P/V KH ₂ PO ₄ 0,025% P/V MgSO ₄ .7H ₂ O 1% v/v sln de sales 1% v/v sln de vitaminas	Batch agitado	Se demostró que al adicionar el lactato se estimula el crecimiento celular y por lo tanto se incrementa la producción de CB 4-5 veces más que sin ácido láctico.	(Matsouka et al., 1996)
Aminoácidos	Aminoácidos		0,005% P/V		Se realizaron dos pruebas, la primera se basó en la composición de aminoácidos contenido en el CSL y la segunda se utilizó únicamente metionina y se comparó con un blanco. Con esto se encontró que con los aminoácidos se incrementa la producción de CB hasta 10 veces más que en el blanco; al agregar únicamente la metionina se obtuvieron resultados similares, llegando a la conclusión de que la metionina es el aminoácido esencial para alcanzar una alta producción de CB.	
Metionina			0,24% P/V fuente de nitrógeno			
Ácido ascórbico (Vitamina C)	0,50%	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Medio Hestrin Scrhamm (HS)	Batch sin agitación	La presencia de Vitamina C en el medio HS incrementó la producción de CB, alcanzando un aumento del rendimiento de 1,52. Ya que se disminuye la producción de ácido glucónico en la fermentación, el cual inhibe la célula.	(Keshk, 2014)

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR	MICROORGANISMO	MEDIO	TIPO DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ALCANZADA	REFERENCIA
Citrato de sodio	2,00%	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	BM	Batch	La suplementación de citrato de sodio da como resultado la reducción de subproductos como el ácido acético y ácido pirúvico, dando como resultado una mayor producción de la CB.	(Li et al., 2012)
Cafeína	0,6 %	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio a base de glucosa y etanol	Batch	La suplementación con cafeína resulto en una obtención 5 veces mayor al blanco. Esto puede ser debido a que la cafeína actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa.	(Fontana et al., 1991)
Teofilina	0,6 %	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio a base de glucosa y etanol	Batch	Al agregar teofilina al medio se obtuvo 3.9 veces más de CB que en el blanco, actuando de la misma manera que la cafeína.	(Fontana et al., 1991)
Sustancias con alto contenido de xantinas (infusiones)	0,12 % infusión	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio a base de glucosa y etanol	Batch	La mayor producción de CB se obtuvo con la <i>Camellia sinensis</i> (35,3 g) en un tiempo de cultivo de 7 días y con <i>Paulina cupana</i> (32,7 g) con un tiempo de fermentación de 5 días. Para <i>Coffea arabica</i> se obtuvo 14 g; <i>Theobroma cacao</i> 11,6 g; <i>Kola nítida</i> 8,6 g y para <i>Ilex paraguayensis</i> 7,5 g. Con esto se llega a la conclusión de que se ve un incremento considerable al compararlo con el medio sin suplementación (1,2 g).	(Fontana et al., 1991)
Ca²⁺	-	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>xylinus</i> (ATCC 23 770)	Polvo hidrolizado de Konjac	Batch	Se obtuvo 1,5 veces más de CB al adicionar Ca ²⁺ que en la muestra sin Ca ²⁺ .	(Hong & Qiu 2008)
Metanol	1 - 5 % (v/v)	<i>Acetobacter xylinum</i> 186	HS	Batch	Se encontró que la concentración a la que se produjo una mayor cantidad de CB para el metanol fue de 1,0 %, siendo una	(Lu et al., 2011)

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR	MICROORGANISMO	MEDIO	TIPO DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ALCANZADA	REFERENCIA
Glicerol	1 - 5 % (v/v)				<p>producción 21,8% mayor que el blanco, para el glicerol con una concentración del 3,0 % se incrementó la producción de la CB en un 27,4 %, para el manitol se alcanzó un incremento del 47,3 % al utilizar una concentración de 4,0 %, para el etilenglicol se incrementó 24,1% con una concentración del 0,5 %, para el n-Propanol al 0,5 % se obtuvo un 13.4 % más que el blanco y para el n-Butanol se alcanzó un incremento del 56,0 % a una concentración del 0,5 %, siendo este último el que alcanzó un mayor incremento.</p> <p>Además de esto, se observó que el incremento se da en la última etapa de fermentación.</p>	
Manitol	1 - 5 % (v/v)					
Etilenglicol	0,5 – 2,5 % (v/v)					
n-Butanol	0,5 – 2,5 % (v/v)					
n-Propanol	0,5 – 2,5 % (v/v)					
Agar	0,2 – 1,0 % (P/V)	<i>Acetobacter xylinum</i> BPR 2001	Medio de CSL-Fru	Batch agitado	La producción de CB mejora al adicionar agar (12,8 g/l), comparándola con el blanco (8 g/l). Esto es debido al incremento de viscosidad y de células libres.	(Bae et al., 2004)
	0,2 % (P/V)	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio de CSL-Fru	Batch agitado	En este estudio se encontró que al adicionar agar al medio de cultivo en una concentración del 0,2% se aumentó la producción de CB 3.35 veces más que al compararla con el blanco.	(Cheng, Catchmark, & Demirci, 2009a)
Alginato de sodio	0,02 – 0,10 %	<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	Glucosa 1,8 % Sacarosa 2,1 % CSL 2,0 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4 % KH ₂ PO ₄ 0,2 % MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,04%	Batch agitado	Al adicionar 0.04 % (P/V) de alginato de sodio se alcanzó una producción de 6,0 g/L de CB, el cual comparado con el blanco (3,7 g/L) fue 1,62 veces mayor. También se observó que la morfología de la celulosa cambio y mostró una	(Zhou, Sun, Hu, Li, & Yang, 2007)

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR	MICROORGANISMO	MEDIO	TIPO DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ALCANZADA	REFERENCIA
					cristalinidad 1,3 veces menor al blanco	
	0,2 - 0,5 % (P/V)	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio de CSL-Fru	Batch agitado	La concentración utilizada de alginato de sodio para este estudio tuvo un efecto negativo en la producción de CB.	(Cheng et al., 2009a)
Micropartículas (tierras diatomeas, sílica gel, arena de mar)	Se optimizó	<i>Acetobacter sp.</i>	-	Batch agitado	La producción de CB en los medios con micropartículas se triplicó de 1,1 – 3,6 g/l. Se cree que esto es debido al desarrollo de una biopelícula limitante de oxígeno en estas partículas.	(Vandamme et al., 1998)
Carboximetil-celulosa (CMC)	0 – 1,0 % (P/V)	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio de CSL-Fru	Batch agitado	Al adicionar 0,5 % (P/V) de CMC se obtuvo una concentración de 7,2 g/L, la cual comparándola con el blanco fue 5.37 veces mayor, también se encontró que la concentración óptima para el CMC es del 0,8%, alcanzando 6,3 veces más que el blanco. En este mismo estudio se encontró también que mientras mayor sea la concentración de CMC menor será la cristalinidad, obteniendo para el blanco una cristalinidad del 85% y para una concentración de CMC del 0,8% de 80%, así como el tamaño de cristal de 5,2 para el blanco y 4,0 para el 0,8% de CMC.	(Cheng et al., 2009a)
Celulosa microcristalina (AVICEL)	0,2 – 0,4 % (P/V)	<i>Acetobacter xylinum</i>	Medio de CSL-Fru	Batch agitado	La concentración a la que se obtuvo mayor producción de CB fue al 0,4% de AVICEL, la cual al compararla con el blanco se obtuvo 3,26 veces más, 4,37 g/L y 1,34 g/L respectivamente.	(Cheng et al., 2009a)

2.4. *Gluconacetobacter medellinensis*

La CB es producida en su mayoría por bacterias Gram-negativas del género *Gluconacetobacter*; estas bacterias son estrictamente aerobias y generan la CB como un producto extracelular. Hasta el momento, la especie más estudiada en la producción de CB ha sido *Gluconacetobacter xylinum*, esto debido a sus altos rendimientos, comparados con otras especies, aunque actualmente se han venido estudiando nuevas especies productoras de CB (Nguyen et al., 2008; Bielecky et al., 2005; Chávez Pacheco et al., 2004; Ramana et al., 2000; Ross et al., 1991).

En Medellín, Colombia, se reclasificó una nueva cepa productora de CB llamada *Gluconacetobacter medellinensis*, anteriormente clasificada incorrectamente por K. Kondo como *Acetobacter subsp. sucrofermentans xylinum*. Esta cepa fue aislada de un vinagre casero proveniente de la Central Minorista en dicha ciudad (Castro et al., 2013).

La cepa *Gluconacetobacter medellinensis* es una bacteria Gram-negativa y estrictamente aerobia. Tiene forma de bacilos de aproximadamente 3,1 μm de largo y 0,6 μm de ancho. Es una bacteria oxidasa negativa y catalasa positiva. En agar a base de glucosa, extracto de levadura, etanol y ácido acético (GYAE) se formaron colonias de color beige, con forma redonda, ásperas y opacas. Pasados tres días de incubación en medio HS produce una película de CB (Figura 6) (Castro et al., 2013).

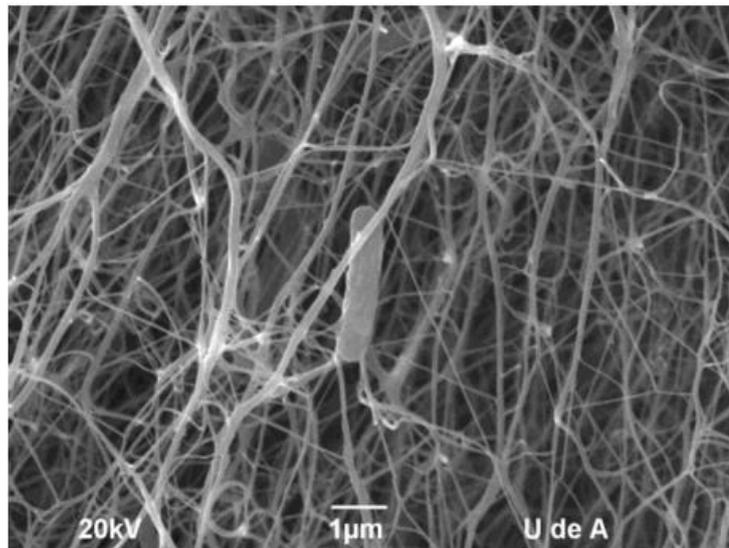


Figura 6 Imagen de microscopía electrónica de barrido de la película producida por *G. medellinensis* en medio HS. Tomada de (Castro Herazo, 2012)

Esta bacteria es capaz de producir la membrana de CB a partir de D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, etanol, maltosa, sorbitol, D-manitol, galactosa y

celobiosa; obteniendo una mayor producción a partir de D-glucosa (Castro et al., 2012).

Se ha reportado que esta especie es capaz de producir CB a pH ácidos de 3.5 – 3.7 con altos rendimientos y características similares a la CB de otras especies del género *Gluconacetobacter*- Este pH ácido al que el microorganismo es capaz de crecer y producir CB ayuda a disminuir el grado de contaminaciones por otros microorganismos (Castro et al., 2012).

3.MATERIALES Y METODOLOGÍA

En este proyecto se realizó la evaluación del efecto de inductores en la biosíntesis de CB en un medio de cultivo de composición definida. Para la selección de los inductores a evaluar primero se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos.

En esta investigación se utilizó la cepa bacteriana *Gluconacetobacter medellinensis*, la cual fue aislada y caracterizada anteriormente en el Grupo de Investigación Sobre Nuevos Materiales (GINUMA) de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) de Medellín, Colombia; a partir de vinagre casero proveniente de la plaza minorista de dicha ciudad.

Para garantizar la disponibilidad y edad del cultivo durante la investigación, el microorganismo se conservó crio-preservado en viales de 2 ml con glicerol a una concentración de 8×10^{12} bacterias/ml.

Este proyecto se realizó en cuatro fases, ver Figura 7:

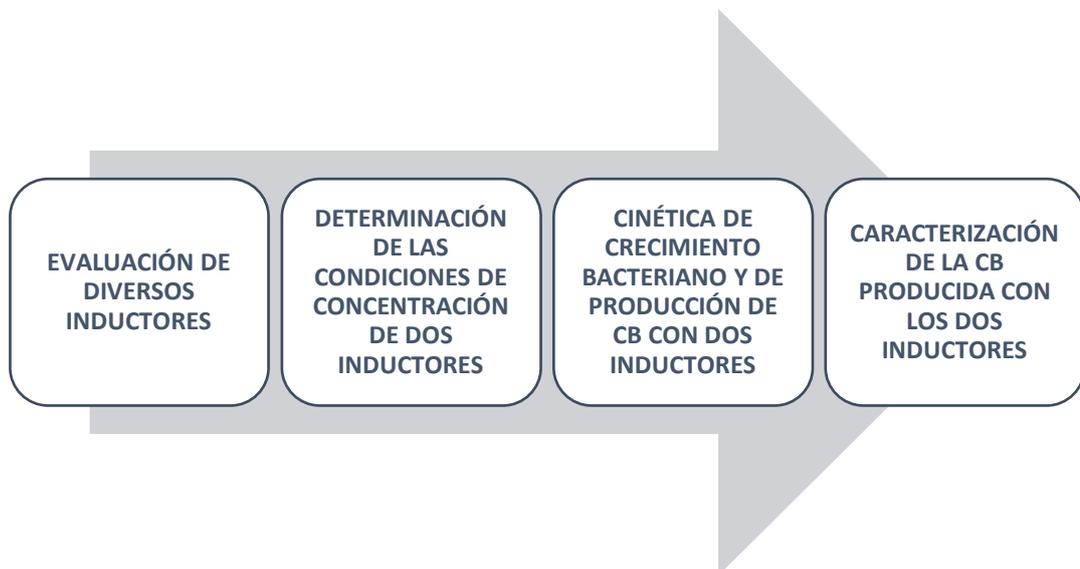


Figura 7 Diagrama de las fases para la metodología de la evaluación del efecto de inductores en la producción de celulosa bacteriana empleando *Gluconacetobacter medellinensis*.

3.1. EVALUACIÓN DE DIVERSOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

En esta primera fase se realizó la evaluación de los inductores previamente establecidos desde la bibliografía, en la producción de celulosa bacteriana utilizando la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*. Para esto se utilizó un medio de composición definida HS (Hestrin – Schramm) cuya composición se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5 Composición del medio de cultivo Hestrin-Schramm (Hestrin & Schramm, 1954)

Nutriente	% P/V
Glucosa	2,00
Peptona	0,50
Extracto de levadura	0,50
Fosfato ácido di-sódico (Na ₂ HPO ₄)	0,27

El medio de cultivo HS fue modificado al adicionar cada inductor de manera separada, y se preparó además un blanco, de tal forma que fue posible conocer el efecto que se tuvo en la producción de CB al añadir cada inductor. Para cada inductor se realizaron seis repeticiones.

3.1.1. Fermentación

Para la fermentación se preparó el medio de cultivo HS, al cual se le añadió el inductor a estudiar en una concentración del 1,0% (Tabla 6); para el caso del etanol, este fue añadido posterior a la esterilización, esto para evitar su pérdida por evaporación.

Tabla 6 Inductores utilizados para la evaluación de la primera fase y abreviaturas utilizadas para su reconocimiento.

Medio	Abreviatura	Concentración de inductor (%P/V)
Hestrin – Schramm (Blanco)	HS	0,0
HS + Etanol	ET	1,0
HS + Ácido acético	AA	1,0
HS + Ácido cítrico	AC	1,0
HS + Ácido láctico	AL	1,0
HS + Ácido málico	AM	1,0
HS + Ácido oxálico	AO	1,0
HS + Ácido succínico	AS	1,0

Posterior a esto, se ajustó el pH utilizando ácido clorhídrico (HCl) o Hidróxido de Sodio (NaOH). De acuerdo a estudios preliminares del microorganismo realizados por el GINUMA, el pH óptimo para la producción de CB con la bacteria *Gluconacetobacter medellinensis* es de 3,60 – 3,70; por lo que fue ajustado dentro de este rango según la metodología descrita por Castro y colaboradores, 2011 (Castro et al., 2011).

Para asegurar un volumen y una superficie de cultivo constantes, se utilizaron frascos de vidrio como los mostrados en la Figura 8 y se colocaron 100 mL de medio modificado según el inductor, los recipientes fueron tapados con una membrana porosa para permitir el intercambio gaseoso.

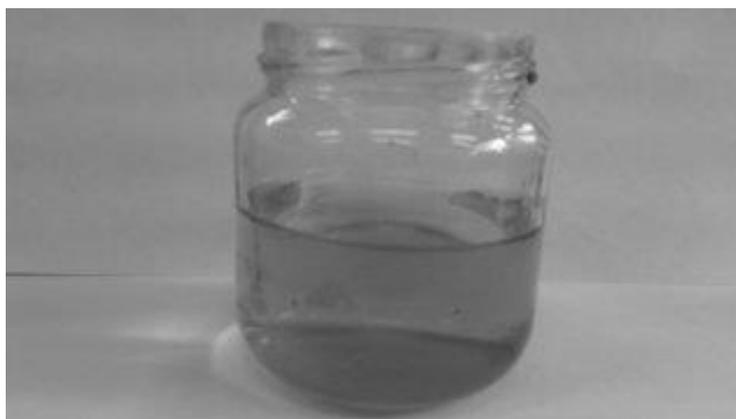


Figura 8 Frasco de vidrio utilizado para la experimentación

Los frascos fueron esterilizados en una autoclave a una temperatura de 123 – 127 °C y una presión entre 15 – 20 psi, durante 15 min. Una vez que los frascos fueron esterilizados, estos se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente (≈ 28 °C) para posteriormente realizar la inoculación.

Para la inoculación se utilizó medio de cultivo HS, el cual fue previamente esterilizado. El preinóculo se preparó agregando la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* crio-preservada hasta obtener una concentración de 6×10^6 bacterias/ml.

Cada frasco fue inoculado con 10% (v/v) del volumen del medio (10 ml). Los medios inoculados fueron incubados a 28°C durante 13 d en una incubadora. Para cada prueba se realizaron seis repeticiones y se comparó con un blanco correspondiente al medio HS sin modificar.

3.1.2. Tratamiento de la membrana de CB

Las membranas de CB producidas en la interface gas – líquido fueron retiradas manualmente y posteriormente purificadas por sucesivos lavados con agua destilada, esto para retirar el exceso de microorganismos y medio de cultivo de la membrana. Después de esto, las membranas fueron colocadas en una solución de KOH al 5 % durante un periodo de 14 h, esto para inactivar los microorganismos adheridos y retirar los componentes del medio de cultivo (Castro et al., 2011).

Una vez transcurrido el tiempo, las membranas de CB se retiraron de la solución de KOH y fueron lavadas con agua destilada a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un pH neutro (7,0) (Castro et al., 2011).

3.1.3. Cuantificación de la CB

Cada membrana de CB se cuantificó por métodos gravimétricos de manera separada. Para esto se utilizó frascos de cristal los cuales fueron previamente marcados y se colocaron en un horno de convección forzada durante 2 h a 105 °C previamente a su pesada. Posterior a esto, se pesó cada frasco y se obtuvo el dato de peso de frasco (PF).

Las membranas de CB se secaron ligeramente con toallas de papel para retirar el exceso de agua adherida a las membranas y se colocaron en los frascos marcados y pesados previamente. Se pesó cada una de las membranas y se obtuvo el peso de cada membrana de CB que correspondió al peso húmedo (PH).

Posterior a esto, se colocó cada membrana en un horno de convección forzada a 60 °C por 48 h seguido por un secado a 105 °C durante 2 h con esto se estableció el peso seco (PS) + el peso de frasco (PF) de cada una de las membranas obtenidas.

La cuantificación de la cantidad de celulosa bacteriana se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad de CB} = PS - PF$$

Además de esto, se realizó una medición del pH al final de las fermentaciones de cada medio, de acuerdo a la metodología descrita por Castro y colaboradores, 2011 (Castro et al., 2011).

Para el cálculo de la cantidad de agua presente en las membranas obtenidas (% Humedad), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{P_{\text{humedo}} - P_{\text{seco}}}{P_{\text{humedo}}}$$

Los dos medios de cultivos modificados con los inductores que correspondieron a los de mayor cuantificación de CB se seleccionaron para la evaluación en la Fase 2.

3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE LOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA

En esta fase se realizó la evaluación de diferentes concentraciones de los dos inductores que propiciaron una mayor producción de CB en la Fase 1; cada prueba se realizó por quintuplicado.

Para esto se modificó el medio HS adicionando cada uno de los inductores seleccionados a concentraciones de 0, 0.1, 1, 2, 4, 6, 8 y 10%. La preparación de los medios, las condiciones de la fermentación, el tratamiento de las membranas de CB y la cuantificación de la celulosa obtenida fueron realizadas de acuerdo a lo expuesto en la Fase 1.

La concentración a la que se produjo la mayor cantidad de celulosa bacteriana para cada uno de los inductores se seleccionó para establecer la cinética de producción de celulosa y la caracterización de la membrana.

3.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN LOS MEDIOS MODIFICADOS CON LOS INDUCTORES

En esta fase se estableció la cinética de crecimiento del microorganismo y la producción de la celulosa bacteriana.

3.3.1. Cinética de crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis*

Para la cinética de crecimiento bacteriano se analizó la producción de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* en los medios modificados con los inductores a las concentraciones seleccionadas en la Fase 2.

El crecimiento celular se monitoreó en función de la turbidez. Para esto se preparó el medio HS modificado con las concentraciones de mayor producción de celulosa para cada inductor elegidas en la Fase 2 y un blanco HS, las fermentaciones se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en la Fase 1 por triplicado y durante un periodo de 13 días para cada medio.

Cada 24 h se tomó muestra, la cual se preparó homogenizando en licuadora el contenido de todo un frasco (membrana y el medio de cultivo), una vez homogenizado, se tomó 1 mL de la muestra, la cual se

trató con 1 mL de celulasa Celluclast 1.5L y 8 mL de buffer de acetato de sodio pH 5 durante 1 h, para degradar la celulosa y evitar su interferencia en la medida de turbidez (Arteaga Valencia, 2014). Una vez transcurrido el tiempo se realizaron las diluciones necesarias tomando 1 mL de la muestra tratada y 9 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia (A) a 640 nm en un espectrófotometro UV-Vis. Para establecer la concentración de la biomasa se empleó una curva de calibración (Anexo 2)

3.3.2. Cinética de producción de CB

La cinética de la producción de celulosa bacteriana se estableció a partir del seguimiento de las fuentes de carbono (azúcares reductores) y la producción de celulosa en las fermentaciones modificadas con cada uno de los inductores seleccionados. Este procedimiento se realizó por triplicado durante un periodo de 13 días.

Para esto se preparó el medio HS modificado con las concentraciones de mayor producción de celulosa para cada inductor elegidas en la Fase 2 y un blanco HS, las fermentaciones se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en la Fase 1. Las fermentaciones se siguieron en el tiempo tomando muestras cada 24 h.

La cuantificación de la producción de CB se realizó de la siguiente manera: para las muestras iniciales en las que la membrana de celulosa no estaba visible aun, se retiraron 25 mL de medio y se dispusieron en tubos Falcom previamente pesados siguiendo el procedimiento expuesto en el punto 3.1.3 para obtener el peso del tubo (PT). Los tubos con la muestra se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 min. Pasado el tiempo se tomó una muestra de 10 mL del sobrenadante y se colocó en tubos Falcom de 15 mL para posteriormente realizar la cuantificación de las fuentes de carbono (azúcares reductores). El sedimento se trató siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.1.2 para la purificación de la celulosa, cada lavado se realizó centrifugando el tubo con el sedimento tratado a 9000 rpm durante 10 min y descartando el sobrenadante. Posteriormente se procedió a seguir lo expuesto en el punto 3.1.3 para la cuantificación de CB.

Para las muestras con una membrana de celulosa visible, ésta fue retirada del frasco y se siguieron los pasos descritos en los puntos 3.1.2 y 3.1.3 para el tratamiento de la membrana. Del medio restante se tomó una muestra de 10 mL en tubos Falcom de 15 mL para posteriormente realizar la cuantificación de las fuentes de carbono (azúcares reductores).

La determinación de azúcares reductores en el sobrenadante se realizó por colorimetría empleando el ácido dinitrosalicílico (DNS, por sus siglas en inglés), el cual se preparó según el ANEXO 1. La concentración se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm y empleando una curva de calibración previamente establecida para glucosa (ver Anexo 2) (Arteaga Valencia, 2014).

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA CELULOSA

En esta fase se realizó una caracterización de las membranas de celulosa obtenidas de los medios modificados con los inductores a las concentraciones seleccionadas en la Fase 2.

Para las pruebas se realizó la fermentación siguiendo los pasos expuestos en la sección 3.1.1, las membranas fueron tratadas siguiendo los pasos de la sección 3.1.2.

3.4.1. Morfología

La morfología de la membrana de celulosa se realizó mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM), con esto se pudo observar la distribución de las nanocintas generadas por el microorganismo dentro de la membrana.

Para esta prueba la membrana húmeda fue cortada a la mitad y se sometió a un proceso de congelamiento con nitrógeno líquido, posteriormente se liofilizó. La muestra fue revestida con oro/paladio usando un equipo de recubrimiento por bombardeo de iones y se observó en un microscopio Jeol JSM 5910 LV operado a 20 kV (Castro et al., 2011).

3.4.2. Análisis de las características químicas.

Para esta prueba se realizó una espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Las membranas previamente secas de celulosa fueron sometidas a una temperatura de 100 °C durante 2 h para eliminar la humedad. Los espectros FTIR se registraron en un espectrómetro Nicolet 6700 con ATR en un rango de 4000-400 cm⁻¹ con cristal de diamante. Los espectros se recogieron a una resolución de 4 cm⁻¹ y una acumulación de 64 barridos (Castro et al., 2011).

3.4.3. Difracción de rayos X.

El análisis de difracción por rayos X se utiliza para la determinación de la estructura de los cristales y los enlaces, y de esta manera determinar el índice de cristalinidad y el tamaño del cristal (Dumitriu, 1998).

Para esta prueba las películas se secaron a 60 °C por 48 h seguido por un secado a 105 °C durante 2 h. Una vez que las películas de celulosa estuvieron secas, se irradiaron con rayos X utilizando un equipo Panalytical X'Pert Pro MPD, el cual fue operado a una longitud de onda de radiación de Ni-filtro CuK α 1 ($\lambda=0.15406$ nm) a un voltaje de 45 kV y una emisión de filamento de 40 mA. Los datos se recogieron en el modo reflexión en un rango 2θ de 10-30 ° con un paso de 0,013. Los barridos fueron de 56,58 s por paso (Castro et al., 2011).

3.4.4. Viscosimetría

El grado de polimerización se estableció por técnicas de viscosimetría siguiendo la norma Española UNE 57-039-92.

Para esta prueba la membrana de CB seca (60 °C por 48 h seguido por un secado a 105 °C durante 2 h) se rasgó en pequeños pedazos, se pesaron 60 mg de la muestra y se llevaron a un recipiente con 25 mL de agua desionizada y unos trozos de cobre, se tapó el frasco y se colocó en agitación durante 1 semana para que la muestra se hidratara. Pasado el tiempo se le agregó 25 mL de una solución de cuprietilendiamina, se taparon los frascos con tapones de hule, se desplazó el aire remanente con N₂ gaseoso y se colocó nuevamente en agitación durante 3 hr (Castro Herazo, 2012). Para la determinación de los tiempos de efusión, se utilizó un viscosímetro capilar el cual estaba provisto de una camisa exterior conectada a un baño termostático a 25 °C (Figura 9).

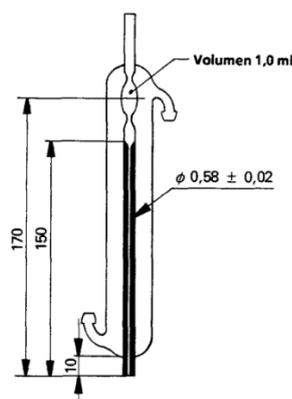


Figura 9 Viscosímetro capilar para la determinación del índice de viscosidad según la Alternativa A. (Tomada de AENOR, 1992)

La muestra de membrana preparada se introdujo en el viscosímetro por succión, se dejó fluir la muestra y se cronometró el tiempo de recorrido de la muestra desde que el menisco se encontró en la señal superior hasta la señal inferior. Para este ensayo se efectuaron 7 determinaciones de cada muestra y se realizaron por duplicado.

3.4.5. Pruebas de tracción

Para estas pruebas se utilizaron ocho probetas por muestra las cuales correspondieron a las recomendaciones de la norma estándar ASTM D-1708, se pegaron las membranas y se procedió a realizar la prueba. La resistencia a tracción máxima y el módulo de Young (MY) se determinaron con una máquina universal de ensayos Instron, como lo menciona la norma estándar ASTM D-882, utilizando una celda de carga de 200 N, una velocidad de 5 mm/min y una distancia entre mordazas de 22 mm (ASTM D1708).

4.RESULTADOS

4.1. FASE 1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

A partir de la revisión bibliográfica se encontró que para microorganismos pertenecientes al género *Gluconacetobacter*, la producción de CB es estimulada, mayormente, cuando el medio de cultivo se modifica con ácidos orgánicos o etanol (Kim, Kim, Wee, Park, & Ryu, 2006). Los ácidos orgánicos que mayor respuesta han tenido son los que participan en el ciclo de Krebs, como por ejemplo el ácido acético, con el cual se ha observado en estudios realizados por Rani y colaboradores (2011) que incrementó 1,7 veces más la producción de CB (Rani & Appaiah, 2011a; Toda et al., 1997) y para el ácido láctico se reportó que estimulaba el crecimiento celular y, por lo tanto, la producción 4,5 veces más que el blanco (Naritomi et al., 1998b).

Por esta razón, en esta fase se investigó el efecto de siete (7) inductores sobre la producción de celulosa bacteriana en la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* y se comparó con un blanco HS, la cuantificación de la CB se determinó después de 13 días de fermentación en cultivos estáticos a una temperatura de 28 °C.

Los inductores estudiados fueron el ácido acético, etanol, ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico, ácido málico y ácido oxálico, a una concentración de 1,0 % (P/V).

En la Figura 10 se presentan fotografías de las membranas obtenidas luego de la fermentación en los medios modificados con los diferentes inductores, donde es posible apreciar que se obtuvieron diferencias en el espesor de estas cuando se comparan con el blanco HS (Figura 10a). Se observó un mayor espesor en las membranas del etanol (Figura 10b) y el ácido acético (Figura 10c), mientras que con el ácido láctico (Figura 10d), el ácido cítrico (Figura 10e) y el ácido succínico (Figura 10f) el espesor de la membrana no cambió al compararlo con en blanco. En el caso del ácido málico (Figura 10g) se observó una disminución y en el ácido oxálico una inhibición en la producción de CB (Figura 10 h).

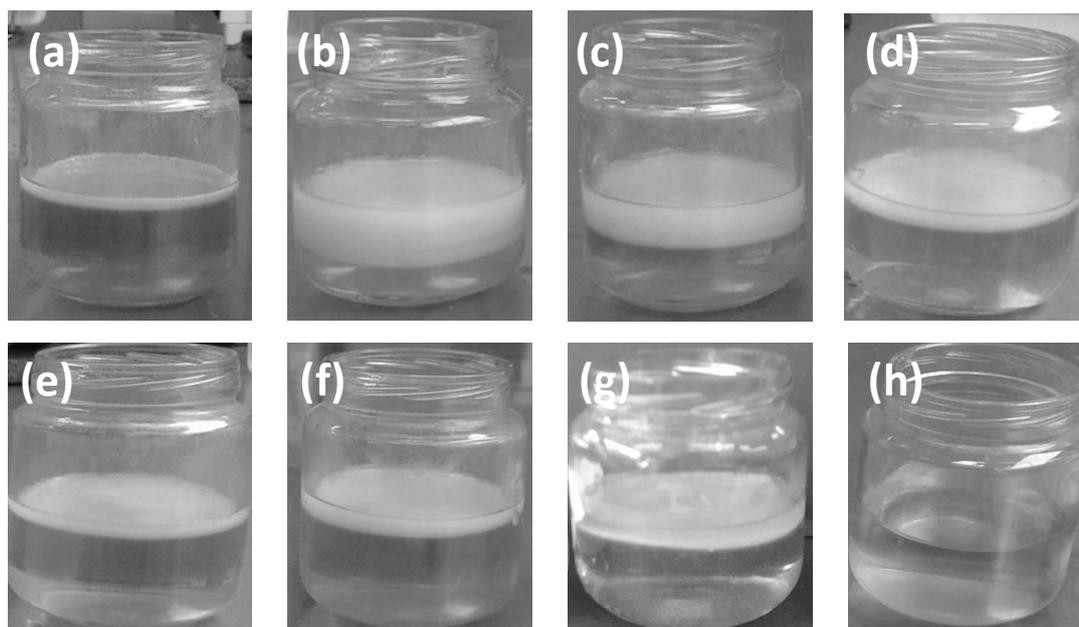


Figura 10 Fotografía de la membrana de CB obtenida para (a) blanco, (b) adicionada con etanol, (c) ácido acético, (d) ácido láctico, (e) ácido cítrico, (f) ácido succínico, (g) ácido málico y (h) ácido oxálico al 1% (P/V)

Los resultados obtenidos de la cantidad de la CB en peso seco (WS) se muestran en la Tabla 7, la estadística para la obtención de los resultados se muestra en el ANEXO 3.FASE 1.

Tabla 7 Cantidad de celulosa bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter medellinensis* en el medio de cultivo HS modificado con diferentes inductores

Grupos	CB producida (g/L)
Blanco (HS)	1,0175 ± 0,0082
Ácido acético	2,0980 ± 0,0146
Ácido láctico	1,6143 ± 0,0271
Ácido succínico	1,6187 ± 0,0454
Ácido cítrico	1,6580 ± 0,0113
Ácido oxálico	0,0000 ± 0,0000
Ácido málico	0,5047 ± 0,0087
Etanol	2,7428 ± 0,0155

Como se puede observar en la Figura 11, se obtuvo una producción de CB de 1,0175 g/L para el blanco y se comparó con la concentración obtenida de diversos inductores. Se presentó un incremento en la producción de CB al adicionar una concentración del 1,0 % (P/V) de ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico y etanol, obteniendo 2,0980 g/L, 1,6143 g/L, 1,6187 g/L, 1,6580 g/L y 2,7428 g/L, respectivamente. En este sentido, la producción aumentó para el etanol y el ácido acético 2.69 y 2.06 veces más que el blanco, respectivamente y para el caso del ácido láctico, cítrico y succínico la producción aumentó 1.60 veces en todos los casos. Por otro lado, para el ácido málico y ácido oxálico se observó un efecto negativo, ya que con el primero se disminuyó la producción de CB obteniendo 0,5047 g/L y en el caso del ácido oxálico se observó una inhibición. El Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para producción de CB en donde se observan las diferencias significativas entre los grupos de los inductores se muestran en el ANEXO 3.FASE 1.

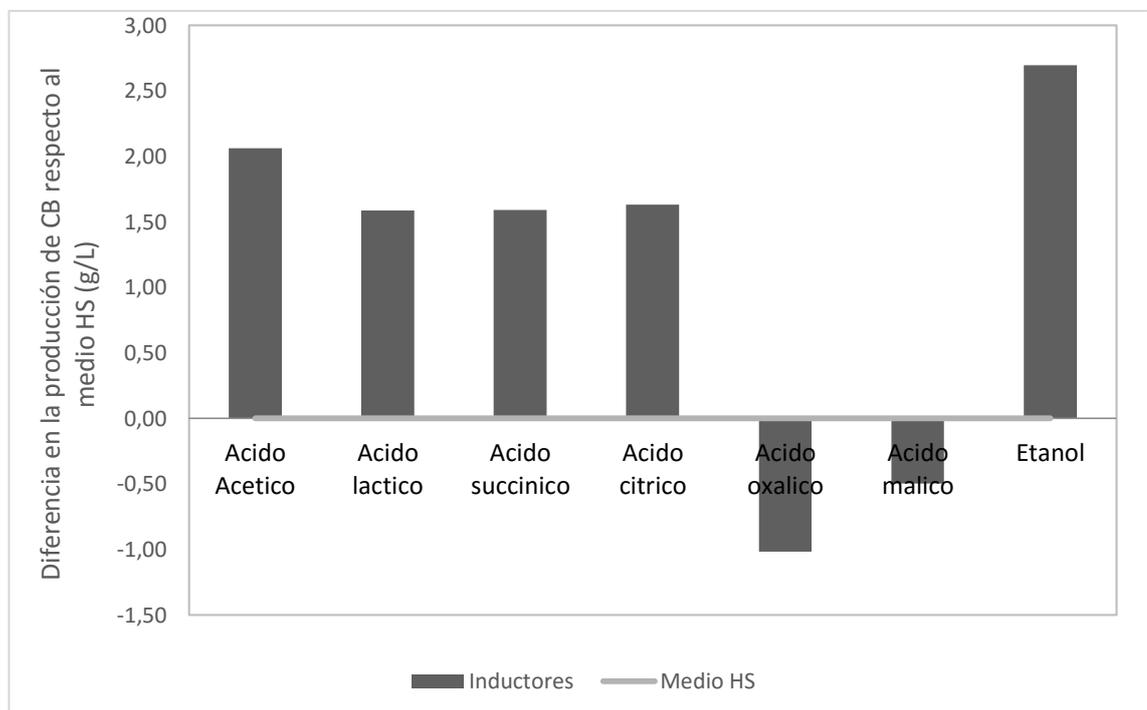


Figura 11 Gráfico de la evaluación del incremento o disminución de la producción de celulosa bacteriana según el inductor empleado comparada con el blanco.

El aumento de la producción de CB en el etanol, ácido acético, láctico, cítrico y succínico, puede deberse a que se ha encontrado que estos inductores (los cuales se encuentran en la vía del TCA) estimulan el crecimiento celular, dando lugar a un incremento en la producción de CB. Ya que pueden funcionar como productores de energía (ATP) la cual inhibe la función de la enzima glucosa-

fosfato-deshidrogenasa, enzima responsable de la producción del ácido glucónico (Figura 5) subproducto que causa el descenso del pH en el medio y compite con la producción de CB por el sustrato (Gama et al., 2013; Hutchens et al., 2014; Matsouka et al., 1996; Toda et al., 1997).

En el caso del ácido málico y oxálico la disminución en la producción de CB podría ser debido a que la concentración utilizada (1,0 % P/V) en esta evaluación puede llegar a ser tóxico para la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*, ya que se ha reportado que este tipo de ácidos tienen una capacidad biocida para diferentes microorganismos (Francis J. Hart, 2000).

Además de la cuantificación de producción de CB, se midió la variación de pH con los diferentes inductores utilizados en el medio de cultivo al inicio y final de la fermentación (

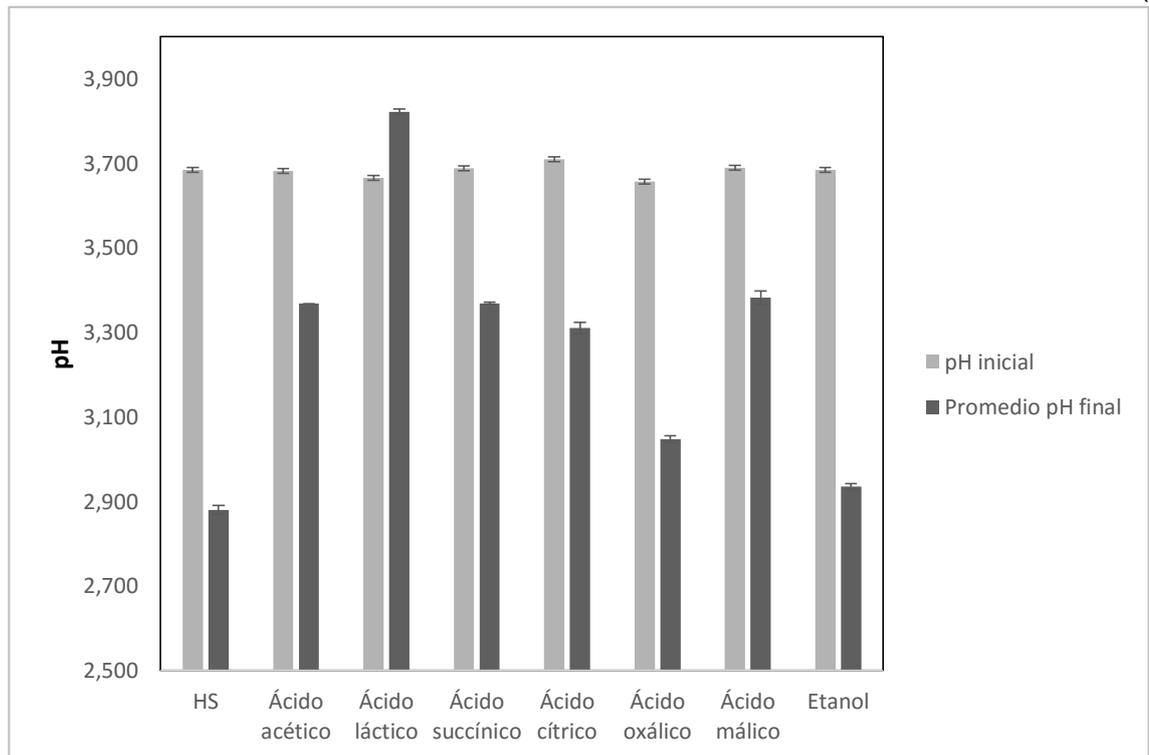


Figura 12), observando que la adición de etanol como inductor al medio de cultivo genera una disminución del pH al final de la fermentación, esté cambio en el pH concuerda con un estudio realizado por Li y colaboradores (2012) acerca de la producción de CB con etanol como inductor, en el cual se llega a la conclusión de que el equilibrio en el pH depende de la producción de ATP, una mayor producción de ATP se relaciona con una disminución del pH del medio final (Li et al., 2012). Además, se observó que la variación de pH para la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* con medios de cultivo modificados con inductores no está relacionada con la producción de la CB, ya que en los medios como el etanol se incrementó la producción de manera significativa al

compararlo con el blanco, aun cuando la variación de pH final fue baja, teniendo para el etanol un pH final de 2,936 y para el HS de 2,880 (ANEXO 3.FASE 1). Esto concuerda con lo demostrado anteriormente por Castro y colaboradores (2012) para este microorganismo, *Gluconacetobacter medellinensis* es una especie resistente a ácidos para la cual su mayor producción se da a pH por debajo de 4, valor en el que las demás especies de su género han inhibido su producción (Castro et al., 2012). El Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para pH en donde se observan las diferencias significativas del pH final se muestran en el ANEXO 3.FASE 1

En la Figura 12 también se observó que entre el ácido acético, succínico y málico no hubo diferencia significativa en el cambio del pH al final, aun cuando si se tuvieron diferencias significativas en la producción de CB, lo que ayuda a soportar lo mencionado en el párrafo anterior, para este microorganismos los cambios en pH no tienen un efecto directo en la producción de CB 3,5 – 3.7 (Castro et al., 2011).

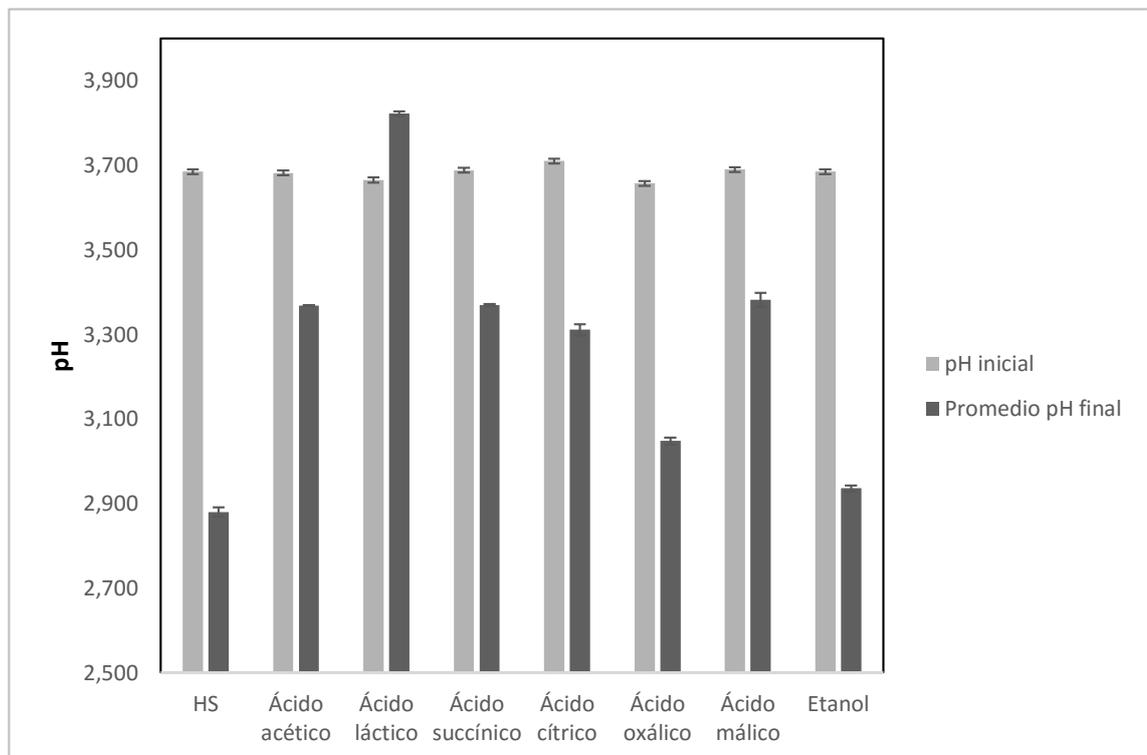


Figura 12 Variación del pH en los inductores estudiados.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de humedad de las membranas obtenidas, esto utilizando la ecuación descrita en el punto 3.1.2. Los resultados

obtenidos se muestran en la Figura 13, en la cual se observó que al compararlo con el blanco se tuvo una diferencia significativa de mayor absorción de agua en el ácido acético, etanol, ácido láctico y ácido málico, y no se tuvo diferencias significativas con el ácido succínico y ácido cítrico al compararlo con el blanco. El Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para Humedad en donde se observan las diferencias significativas entre los datos obtenidos se muestran en el ANEXO 3.FASE 1

Con esto se pudo observar que la adición de etanol y ácido acético ayuda a que las membranas absorban mayor contenido de humedad, lo cual ayuda a tener una mayor producción con estos inductores, ya que una de las principales funciones de la síntesis de la celulosa es proveer una matriz superficial firme, la cual permita al microorganismo estar cerca a la fase gaseosa y, además, de proveerse de los nutrientes del medio líquido, generando condiciones más favorables para la producción de células viables, lo cual a su vez incrementa la producción de CB (Carreño et al., 2012), por lo que al tener una mayor capacidad de alojar el medio de cultivo en la membrana se dan mejores condiciones para que la producción de CB se incremente.

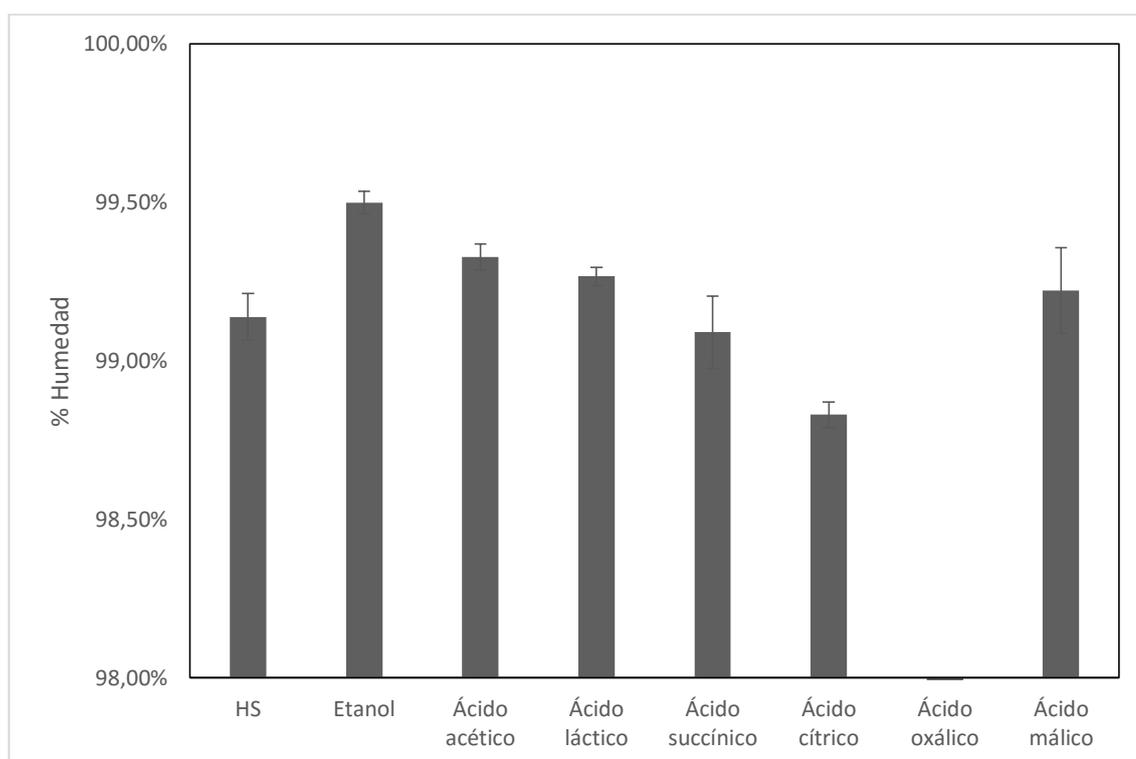


Figura 13 Porcentaje de humedad de las membranas obtenidas con el medio HS y con el medio modificado al 1 % de concentración del inductor.

A partir de los resultados obtenidos en esta fase, la mayor producción de CB para una concentración del 1,0 % (P/V) se dio para el etanol y el ácido acético,

por tanto, se eligieron estos inductores para el estudio de la determinación de las concentraciones en la que estos producen mayor cantidad de CB.

4.2. FASE 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE LOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA

En esta fase se evaluó el efecto de la concentración de los dos inductores con mayor producción de CB de la Fase 1, etanol y ácido acético, para conocer la concentración en la cual se da una mayor producción de CB.

Las pruebas se realizaron a las siguientes concentraciones: 0, 0.1, 1, 2, 4, 6, 8 y 10% (P/V).

Las fotografías de las membranas obtenidas en el medio modificado con etanol se muestran en la Figura 14, en donde se observó que a partir del 8 % (P/V) de concentración de etanol se da una inhibición en la producción de CB.

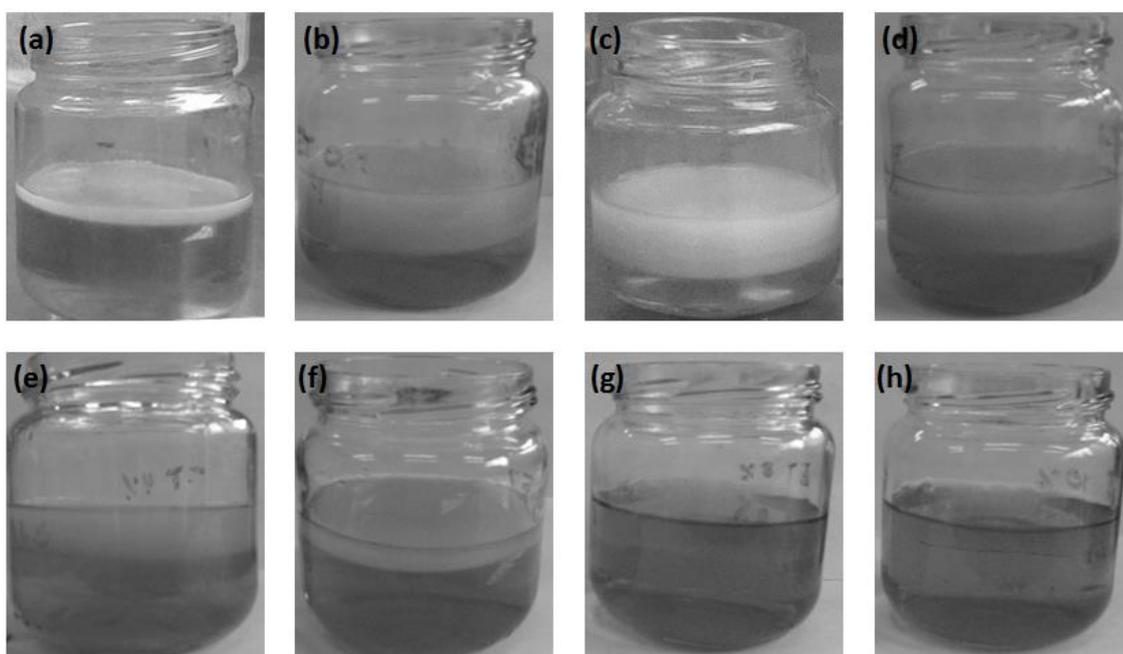


Figura 14 Membranas obtenidas en los medios modificados con etanol a diferentes concentraciones: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1 %, (d) 2 %, (e) 4 %, (f) 6 %, (g) 8 % y (h) 10 % (P/V).

Para el caso del medio modificado con ácido acético, se observó que a partir de una concentración del 4 % (P/V) se da una inhibición en la producción de CB, como se muestran en la Figura 15.

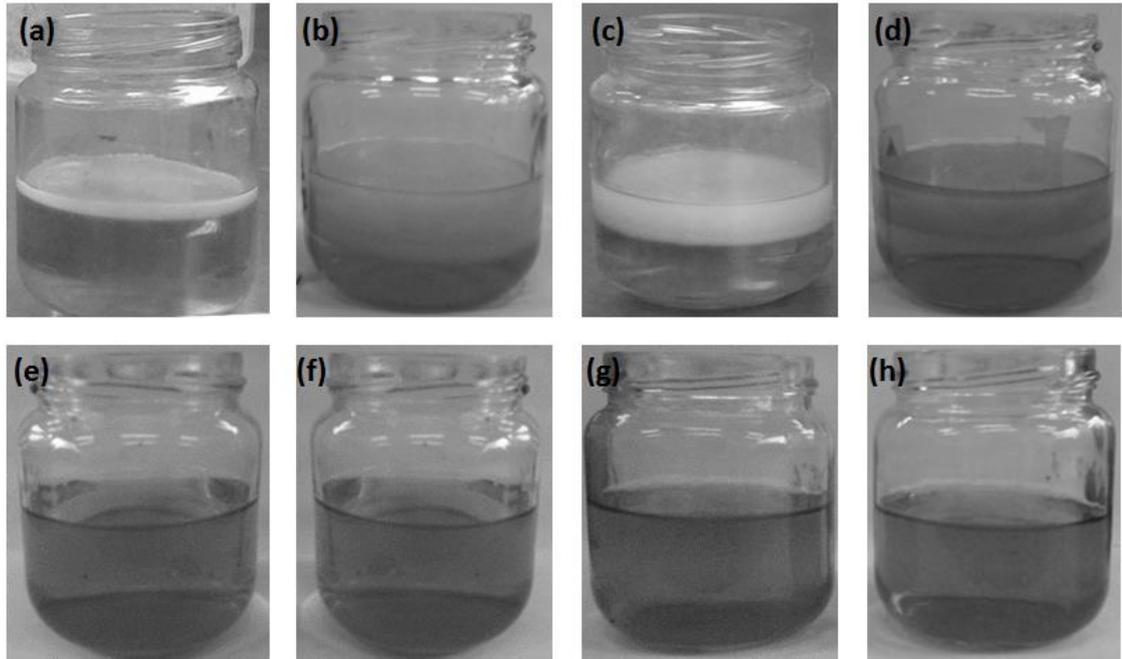


Figura 15 Membranas obtenidas en los medios modificados con ácido acético a diferentes concentraciones: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1 %, (d) 2 %, (e) 4 %, (f) 6 %, (g) 8 % y (h) 10 % (P/V).

Los resultados de la producción de CB en medios modificados con diferentes concentraciones de etanol y de ácido acético se muestran en la Tabla 8, el análisis estadístico de los resultados de la tabla, se muestran en el ANEXO 3.FASE 2.

Tabla 8 Resultados obtenidos del estudio de la producción de CB utilizando etanol y ácido acético como inductores a diferentes concentraciones.

Concentración (%) (P/V)	CB obtenida con etanol (g/L)	CB obtenida con ácido acético (g/L)
0	0,9946 ± 0,0081	0,9946 ± 0,0081
0,1	3,1960 ± 0,0268	3,5634 ± 0,0142
1	2,6972 ± 0,0147	2,0598 ± 0,0149
2	3,0294 ± 0,0172	1,0972 ± 0,0090
4	1,5504 ± 0,0059	0,0000 ± 0,0000
6	0,6864 ± 0,0168	0,0000 ± 0,0000
8	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000
10	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000

En la figura 16 se observa que para el etanol se presenta un aumento en la producción de CB a concentraciones entre 0,1 % y 4,0 % (P/V), presentándose un máximo de producción de CB al 0,1 % (P/V), para una concentración del 6,0 % se vio una disminución de la producción de CB y a concentraciones mayores del 8 % esta se inhibió. La disminución en la producción observada después de la concentración del 6,0 % (P/V), puede deberse a que el flujo metabólico del ciclo de TCA disminuye al acumularse el acetato generado a partir del etanol (ver ruta metabólica Figura 5), dando como resultado una menor producción de metabolitos precursores de ATP necesaria para la síntesis celular, disminuyendo la concentración de la biomasa hasta llegar a una inhibición (Sarkar et al., 2010).

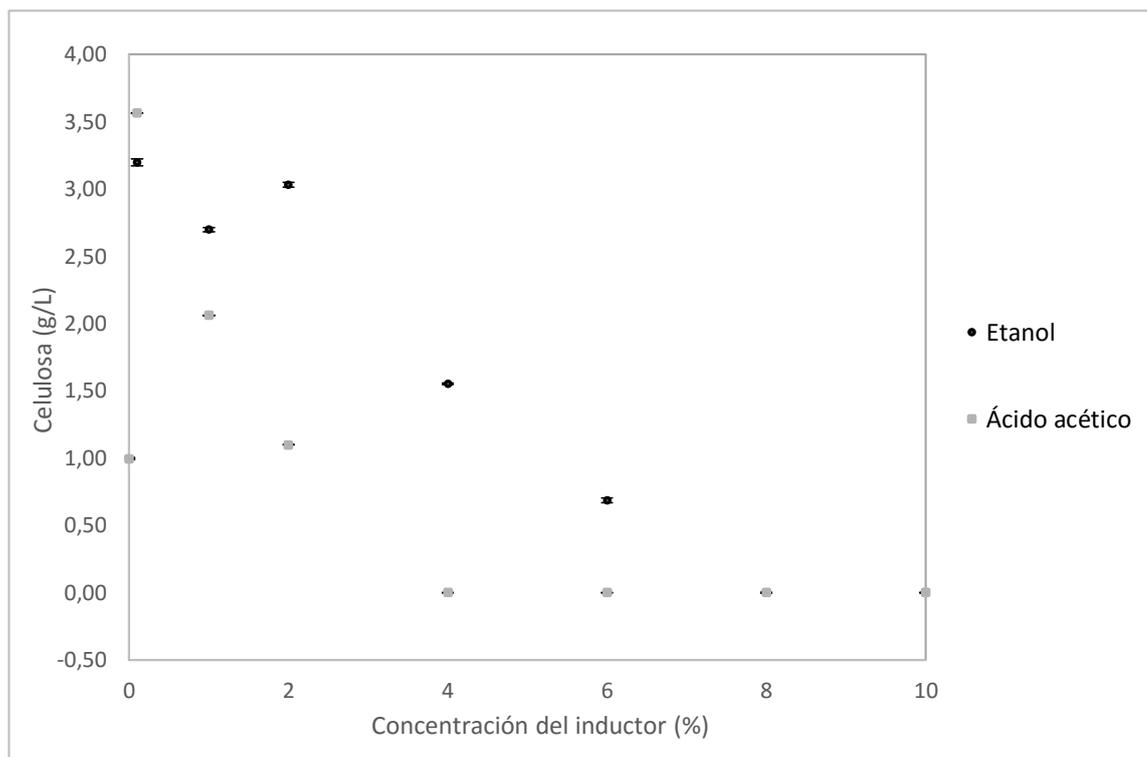


Figura 16 Gráfico de la producción de CB utilizando etanol y ácido acético como inductores a diferentes concentraciones

En los medios modificados con ácido acético se observó un aumento en la producción de CB a concentraciones entre el 0,1 y 2,0 % (PV), presentándose un máximo de producción de CB al 0,1 % (P/V) y se vio una inhibición en concentraciones mayores a 4,0 %. Esto concuerda con el trabajo de Yang et al., 2014, en donde observó que al adicionar este inductor en la cepa *Gluconacetobacter xylinus* se mejoraba la producción de CB, en donde se explicaba que este incremento era debido a que se aumentó la tasa de consumo del sustrato, hasta una concentración del inductor en el cual este valor disminuía (Yang et al., 2014).

Además de esto, se observó que la cepa resiste una concentración más alta del etanol al compararlo con el ácido acético, esto puede deberse a que la cepa del género *Gluconacetobacter* puede utilizar el etanol como fuente de carbono para la producción de CB (Castro et al., 2013; Hong et al., 2012; Sarkar et al., 2010), aunque esta relación de la concentración del inductor con la producción de la celulosa bacteriana aún no ha sido ampliamente clarificada en la literatura (Yunoki, Osada, & Kono, 2004)

A partir de los resultados obtenidos en esta fase se seleccionó la concentración del 0,1 % (P/V) de inductor como concentración idónea para ambos compuestos, ya que a esta concentración se obtuvo la mayor producción de CB con la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*.

4.3. FASE 3. ESTABLECIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN LOS MEDIOS MODIFICADOS CON LOS INDUCTORES

En esta fase se estudió la cinética de crecimiento bacteriano, la producción de CB por la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* y los azúcares reductores durante un periodo de 13 días, con las condiciones descritas en el punto 3.1.1, en los medios modificados con etanol y ácido acético a una concentración del 0,1 % (P/V) y se comparó con el blanco HS. El crecimiento celular se monitoreó en función de la turbidez, la producción de CB mediante métodos gravimétricos y el consumo de sustrato se cuantificó mediante la determinación de azúcares reductores con la reacción con el DNS.

Se ha encontrado en la literatura que aun cuando hay un alto interés en la CB, los estudios de la cinética de la producción de CB, crecimiento bacteriano y consumo de sustrato en medios de cultivo estáticos son escasos (Jaramillo et. al, 2012)

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, en la cual se observó que se tiene un comportamiento muy similar en el crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de CB en los tres medios (blanco, modificado con ácido acético y con etanol).

Con el objetivo de encontrar un modelo que explicara el comportamiento del crecimiento bacteriano de la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* en los tres medios, se utilizó el Modelo Monomolecular (Modelo Mitscherlich), esto porque se encontró con la ayuda del programa SimFit que es el que mejor se ajustó al crecimiento de la cepa en este estudio, este modelo se expresa con la siguiente ecuación:

$$y = A(1 - B * \exp(-kt))$$

en donde A, B y k son constantes calculadas por el programa SimFit y t corresponde al tiempo. Los modelos matemáticos son capaces de describir el comportamiento del microorganismo mostrando su fase de latencia y velocidad máxima de crecimiento (Arteaga Valencia, 2014; Zwietering et al, 1990)

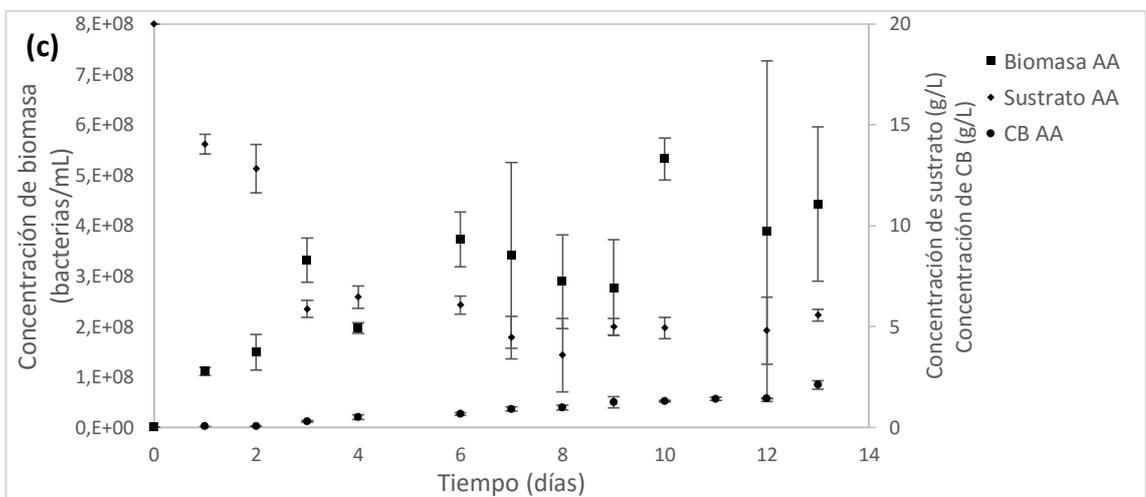
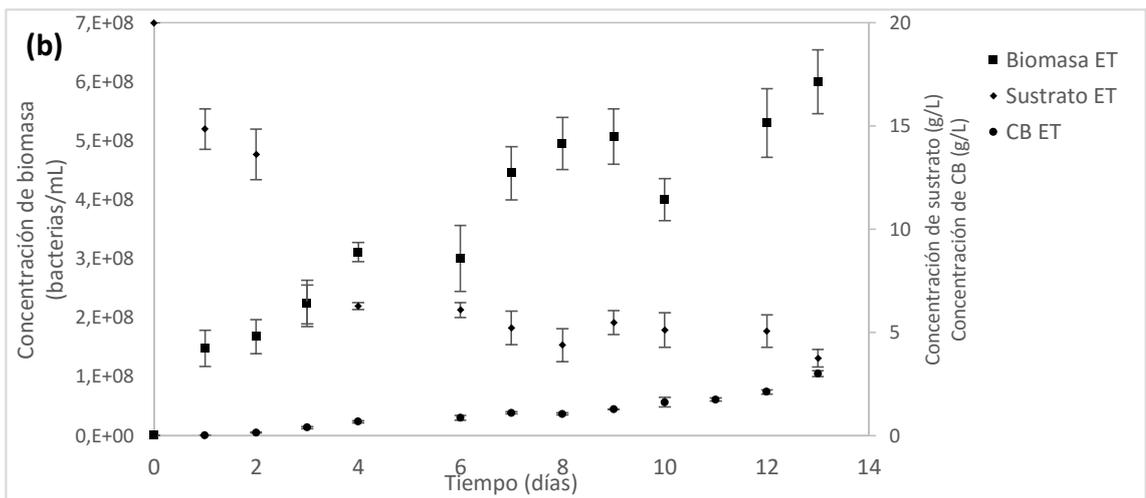
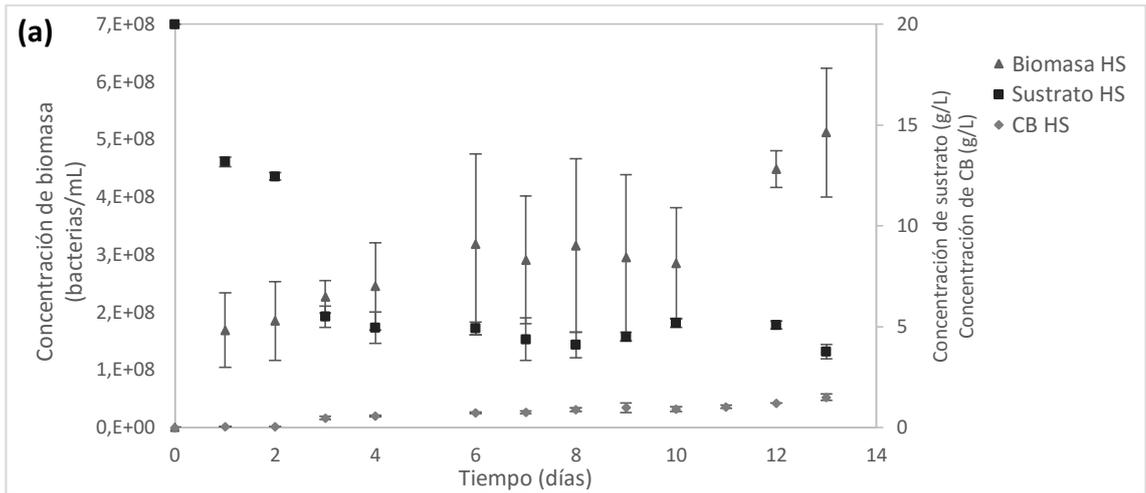


Figura 17 Gráficos de producción de biomasa, consumo de sustrato y producción de CB para (a) medio HS (blanco), (b) medio modificado con etanol y (c) medio modificado con ácido acético.

La velocidad máxima de crecimiento observada fue calculada con ayuda del programa SimFit (ANEXO 3.FASE 3) al encontrar el modelo. Para el blanco (HS) se encontró que la velocidad máxima de crecimiento observada (μ_{max}) fue de $15,01 \text{ h}^{-1}$, para el medio modificado con ácido acético fue de $9,65 \text{ h}^{-1}$ y para el etanol fue $10,52 \text{ h}^{-1}$, esto cuando el microorganismo se encuentra en la parte inicial de la fase exponencial. En el medio HS se observó una mayor velocidad de crecimiento, lo que trae como consecuencia, para este microorganismo, que se llegue más rápido a la fase estacionaria, y por tanto en este caso, se tendrán menos microorganismos disponibles para la producción de celulosa al compararlo con el ácido acético y el etanol.

En la Figura 18; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los modelos del consumo de sustrato vs los modelos de la producción de biomasa, en la cual se observó que el consumo de sustrato (glucosa) para los tres casos fue relativamente igual. En cuanto a la producción de biomasa no se observó una fase de latencia representativa para los tres medios, además de esto, para el blanco (HS) la fase exponencial de crecimiento llegó a su fin en el día 2, mientras que para los medios modificados con etanol y ácido acético la fase exponencial llega a su término en el día 3, lo que sugiere que al adicionar los inductores a una concentración del 0,1 % (P/V) no solo ayuda a aumentar la producción de la CB, como se observa en la Figura 19, sino también a que la producción de biomasa se incremente, alargando la fase exponencial de crecimiento de este microorganismo, esto puede deberse a que se ha encontrado en la literatura que el etanol funciona como fuente de energía para la producción de ATP en el proceso de la producción de CB, dando como resultado un abundante flujo de G6P en la ruta metabólica del microorganismo (Figura 5) debido a la inhibición de la enzima G6PDH (Li et al., 2012), mientras que el ácido acético es catabolizado causando un incremento en el pH del medio y contraatacando la producción de ácido glucónico (Zeng, Small, & Wan, 2011), uno de los principales subproductos en la producción de CB (Figura 5).

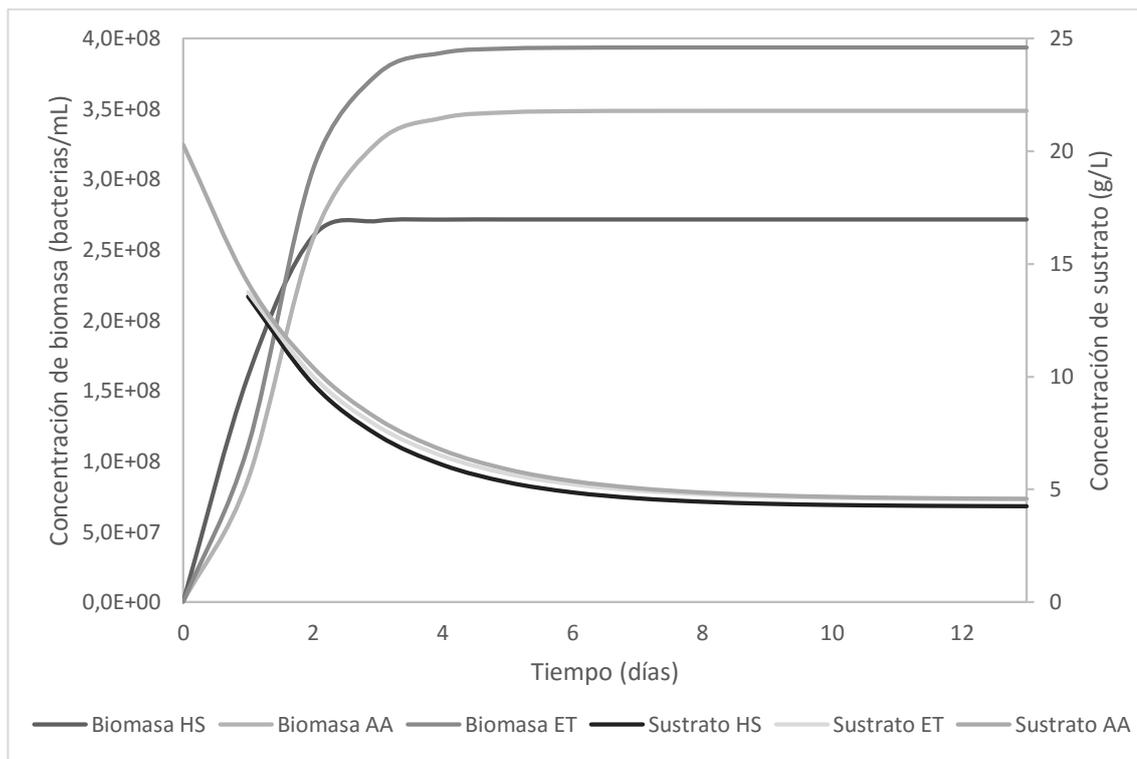


Figura 18 Gráfico de comparación de los modelos de la concentración de biomasa y concentración de sustrato a través del tiempo para los tres medios.

Además de esto se observó en la Figura 18 que el crecimiento celular fue mayor para el medio modificado con etanol, siendo 1,45 veces más que el blanco y 1,13 veces más que el medio modificado con ácido acético, siguiéndole el medio modificado con ácido acético, el cual fue 1,28 veces mayor que el blanco, esto puede deberse a que en estudios realizados por Li y colaboradores, (2012), Rani y colaboradores (2011), Naritomi y colaboradores (1998) y Matsouka y colaboradores (1996), se encontró que estos inductores estimulan el crecimiento celular de la cepa, funcionando como productores de energía, dando como resultado el incremento en la velocidad de crecimiento celular y producción de CB (Li et al., 2012; Matsouka et al., 1996; Naritomi et al., 1998a; Rani & Appaiah, 2011a).

El mismo aumento se observó en la producción de CB (Figura 19) en donde fue 1,99 veces mayor para el medio modificado con etanol con respecto al blanco y 1,42 veces mayor con respecto al medio modificado con ácido acético, lo que sugiere que el etanol a esta concentración ayuda al crecimiento celular de la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*, además de estimular la producción de CB, esto puede deberse a en estudios realizados por Park y colaboradores (2003) se encontró que el etanol previene la producción de células Cel⁻ (células mutantes no productoras de CB) (Park et. al, 2003; Rani et. al, 2011b), y para el caso del ácido acético se incrementó 1,41 veces más que el blanco, esto

puede deberse a que se ha encontrado en la literatura que este inductor ayuda a la producción de CB, contraatacando la producción de ácido glucónico (Zeng et. al, 2011), uno de los principales subproductos en la producción de CB.

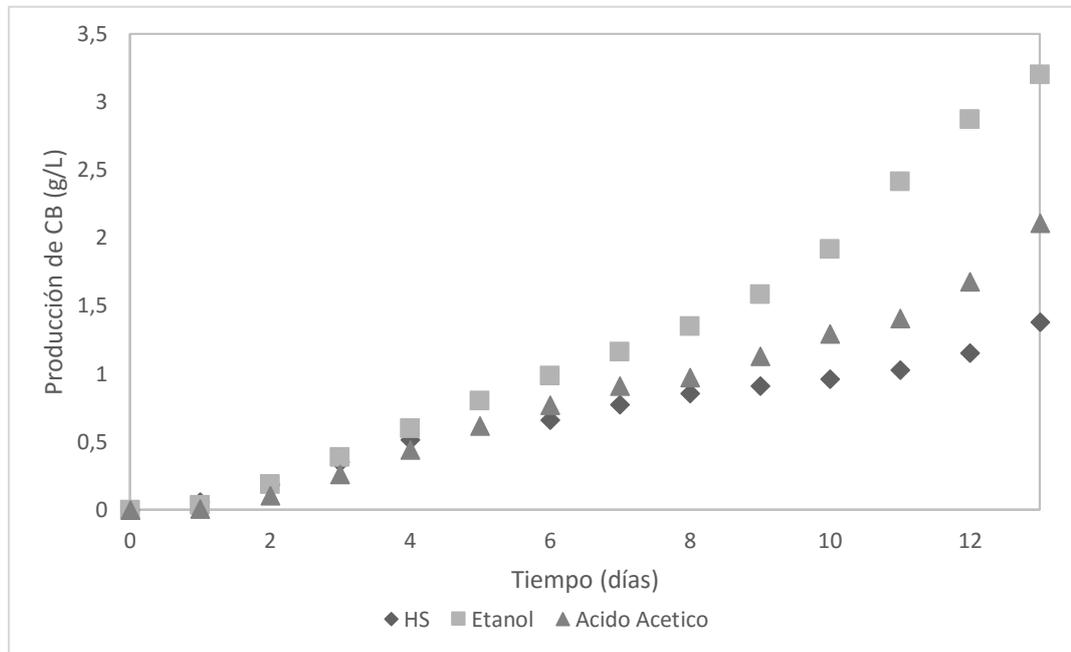


Figura 19 Gráfico de producción de CB a través del tiempo.

Por otro lado, se evaluaron los rendimientos de producción de biomasa y celulosa bacteriana, para los tres casos se pudo observar que el rendimiento varía a través del tiempo, por lo que no fue posible calcular el rendimiento teórico, esto se comprueba cuando al graficar los datos para el cálculo de rendimientos, el comportamiento no es lineal, (ver ANEXO 3.FASE 3. Gráficas para el cálculo de rendimientos), lo que significa que el rendimiento teórico será diferente al rendimiento observado. Para la determinación del rendimiento observado se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$Y_{xs} = \frac{\text{biomasa producido}}{\text{g sustrato consumido}}$$

$$Y_{ps} = \frac{\text{g producto obtenido}}{\text{g de sustrato consumido}}$$

Los resultados de los rendimientos de la producción de biomasa vs el sustrato consumido (Y_{xs}) para el blanco y los medios adicionados con etanol y ácido acético, se muestran en la Tabla 9, en donde se observó que el rendimiento del etanol y del ácido acético fue siempre mayor al compararlo con el blanco, esto

quiere decir que se produjo mayor cantidad de biomasa por gramo de sustrato consumido.

Tabla 9 Rendimientos de la producción de biomasa vs sustrato consumido para el blanco (HS), el medio adicionado con etanol (ET) y el medio adicionado con ácido acético (AA)

Tiempo (días)	HS	ET	AA
0	2,976E+04	3,097E+04	3,045E+04
1	1,187E+07	8,085E+06	6,182E+06
2	2,688E+07	3,067E+07	2,476E+07
3	3,659E+07	4,808E+07	4,015E+07
4	4,470E+07	6,015E+07	5,100E+07
5	5,120E+07	6,894E+07	5,901E+07
6	5,594E+07	7,519E+07	6,487E+07
7	5,912E+07	7,941E+07	6,897E+07
8	6,116E+07	8,214E+07	7,171E+07
9	6,241E+07	8,385E+07	7,349E+07
10	6,316E+07	8,491E+07	7,462E+07
11	6,361E+07	8,555E+07	7,533E+07
12	6,387E+07	8,593E+07	7,577E+07
13	6,403E+07	8,616E+07	7,604E+07

Los resultados de los rendimientos de la producción de CB vs el sustrato consumido (Y_{ps}) para el blanco y los medios adicionados con etanol y ácido acético, se muestran en la Tabla 10, en donde se pudo observar que para los tres medios el rendimiento los primeros dos días fue similar, posterior a esto se vio un incremento para el HS y el ET superior al compararlo con el AA, hasta el día 7 donde el aumento del rendimiento en el ET y el AA fue superior al compararlo con el HS, obteniendo una mayor producción de CB, por gramo de sustrato consumido, lo que sugiere que el etanol y el ácido acético aprovechan de una mejor manera el sustrato en la producción de CB (Park et al., 2003).

Tabla 10 Rendimientos de la producción de CB vs sustrato consumido para el blanco (HS), el medio adicionado con etanol (ET) y el medio adicionado con ácido acético (AA)

Tiempo (días)	HS	ET	AA
0	0,000	0,000	0,000
1	0,003	0,003	0,003
2	0,005	0,019	0,005
3	0,064	0,050	0,036
4	0,094	0,092	0,075
6	0,151	0,153	0,124
7	0,164	0,199	0,180
8	0,200	0,242	0,200
9	0,225	0,287	0,262
10	0,213	0,342	0,277
11	0,240	0,417	0,304
12	0,285	0,527	0,311
13	0,353	0,628	0,459

Por otro lado, en la Figura 18 se muestra la concentración de biomasa (bacterias/mL) por cantidad de CB producida (g/L), en donde se puede observar que la CB se produce como metabolito secundario, esto porque para los tres casos se observa que la producción de CB comienza a incrementar una vez que la producción de biomasa se mantiene constante.

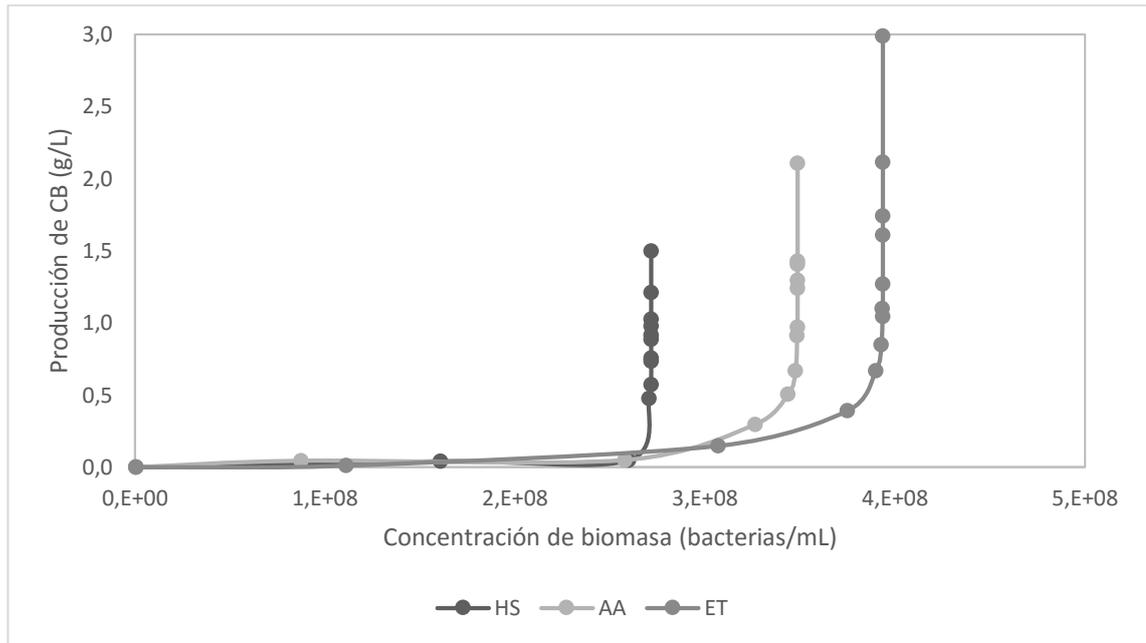


Figura 18 Gráfico de comparación de la concentración de biomasa vs la producción de CB para el blanco (HS), medio modificado con etanol (ET) y medio modificado con ácido acético (AA)

Con este estudio se observó que la producción de CB aumenta cuando los niveles de biomasa y sustrato se vuelven constantes, esto sugiere que para la producción de CB puede que no solo se utilice la glucosa como sustrato, sino también otros subproductos que se tengan en el medio incluso que unos sean potenciados para la producción de celulosa mientras que otros son utilizados en la producción de energía para el metabolismo (Jaramillo et al., 2012).

De cualquier manera, para realizar un análisis completo de la cinética de crecimiento y producción de CB es necesario un estudio exhaustivo de los flujos metabólicos y hacer un seguimiento de todos subproductos que se encuentran en el medio (Budhiono et al., 1999), para de esta manera conocer un poco más a profundidad el metabolismo de *Gluconacetobater medellinensis* en medio HS y en medios modificados con inductores.

4.4. FASE 4. CARACTERIZACIÓN DE LA CELULOSA

En esta fase se realizó una caracterización de las membranas de celulosa obtenidas de los medios modificados con los inductores a una concentración de 0,1 % (P/V), las pruebas realizadas fueron las siguientes:

4.4.1. Morfología

La morfología de la membrana de celulosa se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con esto se observó la distribución, densidad de nanocintas y tamaño de las nanocintas de las membranas obtenidas.

Las membranas de CB consisten en una red de nanocintas densamente organizadas en forma tridimensional, en donde los nodos son generados cuando el microorganismo se divide. En la Figura 19 se pudo observar cómo las nanocintas de las membranas obtenidas en los tres medios estudiados se distribuyen de manera uniforme y orientadas al azar.

La variación de la densidad de nanocintas se notó claramente, observando una menor densidad de las nanocintas en la membrana obtenida a partir del medio HS (Figura 19a), comparándola con el medio modificado con ácido acético (Figura 19c) y observando una mayor densidad de fibrillas para la membrana obtenida a partir del medio modificado con etanol (Figura 19b), al compararla con las otras dos membranas. Así mismo, se observa que dicha densidad está relacionada con la distancia entre nodos.

Además de esto, se observó que el tamaño de nanocintas fue mayor para el ácido acético (Figura 19c), seguido del etanol y siendo las de menor tamaño las del blanco HS. Esto se puede corroborar con la Tabla 11, en la cual se da el promedio del diámetro de las fibrillas de las membranas obtenidas.

Tabla 11 Promedio del diámetro de las fibras de las membranas obtenidas.

Blanco HS (nm)	Etanol (nm)	Ácido acético (nm)
53,98 ± 8,66	59,94 ± 13,61	65,97 ± 7,66

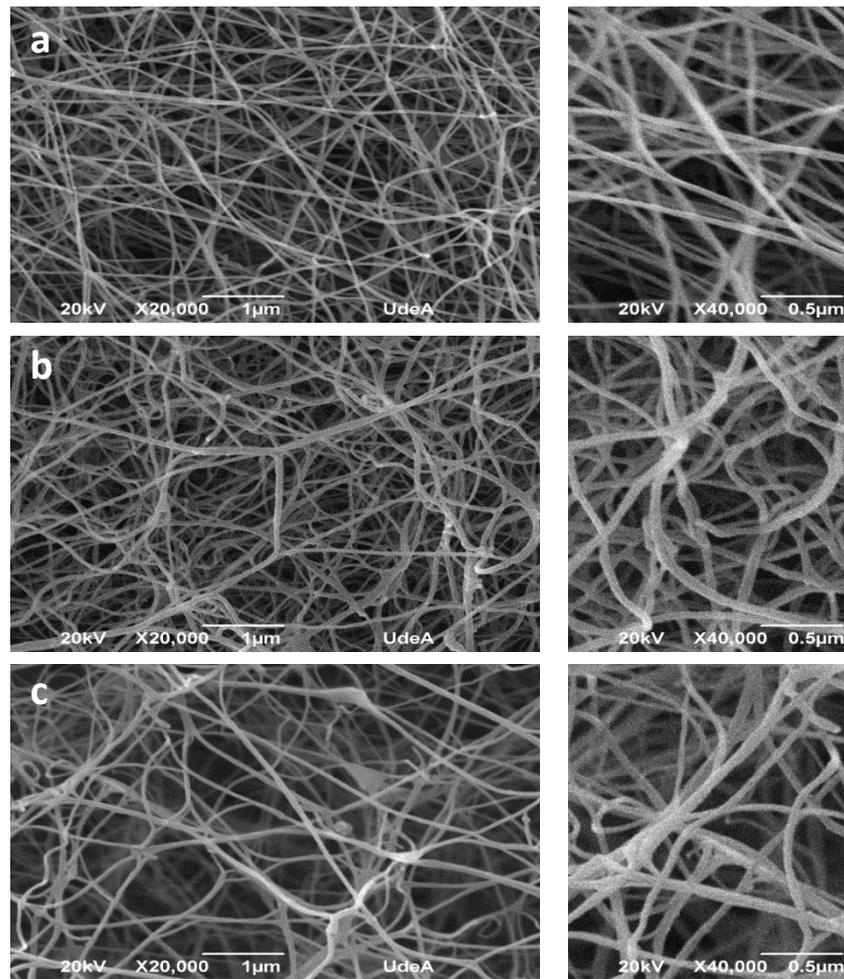


Figura 19 Imágenes de SEM de una membrana de celulosa producida por (a) blanco HS, (b) medio modificado con etanol y (c) medio modificado con ácido acético.

Con estos resultados se encontró que al adicionar un inductor al medio de cultivo, la densidad y tamaño de fibrilla se ve afectado.

4.4.2. Análisis de las características químicas.

Esta prueba se realizó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Este análisis es una herramienta útil para establecer las variaciones en la estructura química de la CB debido a la síntesis en los medios modificados con los diferentes inductores. (Dumitriu, 2004; Zuluaga et al., 2009)

En la Figura 20 se muestran los espectros FTIR obtenidos del medio HS (blanco) y los medios modificados con etanol y ácido acético, es posible observar que no se presentan cambios significativos en los espectros debido a la presencia de los inductores al compararlos con el blanco.

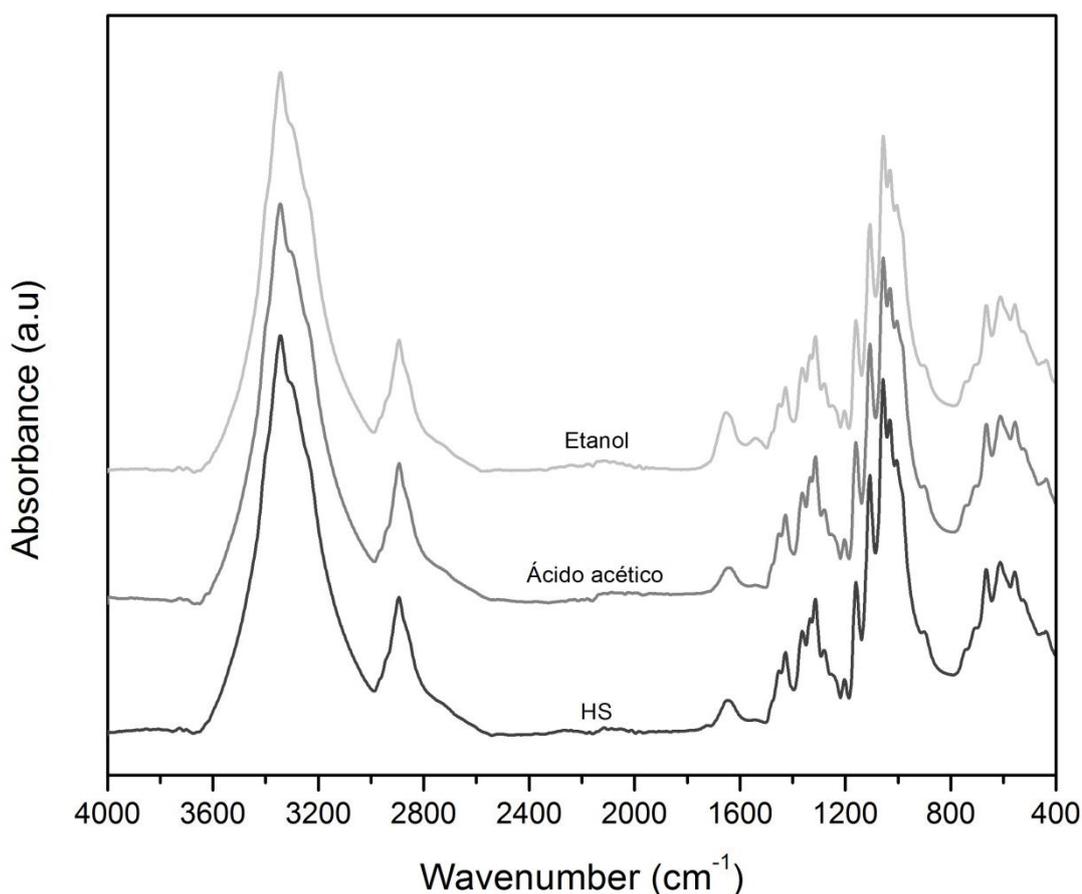


Figura 20 Espectro FTIR de las membranas de CB obtenidas por *Gluconacetobacter medellinensis* en el medio HS blanco, medio modificado con ácido acético y medio modificado con etanol.

Además, los espectros presentan las bandas características de celulosa tipo I o nativa, con bandas fuertes a 1429 y 1111 cm^{-1} asignadas a la flexión simétrica del CH_2 y al estiramiento del enlace C-O, respectivamente, y una banda débil y ancha centrada en 897 cm^{-1} , típica del enlace β -1,4 entre moléculas de glucosa. Otras bandas en 1375 cm^{-1} (flexión C-H), 1335 cm^{-1} (flexión de los O-H en el plano), 1315 cm^{-1} (vibración CH_2), 1277 cm^{-1} (flexión C-H) y 1225 cm^{-1} (O-H en el plano) indica la presencia de regiones cristalinas dentro de la estructura; además de esto, se observan las bandas 3240 y 750 cm^{-1} correspondientes al alomorfismo I_α y bandas a 3270 y 710 cm^{-1} asignadas al alomorfismo I_β (Castro et al., 2011).

Esto indica que la estructura química de la CB obtenida no varía al utilizar ácido acético y etanol como inductores a una concentración del 0,1 % (P/V) durante su síntesis, además de que las bandas presentes en estos espectros son típicas de los registrados para la CB por otros autores (Castro Herazo, 2012).

4.4.3. Difracción de rayos X.

El análisis de difracción por rayos X se utiliza para la determinación de los posibles cambios en estructura cristalina de la CB debido a la síntesis en los medios modificados.

En la Figura 21 se muestran los espectros DRX de las membranas de CB a partir del blanco HS, medio modificado con etanol y ácido acético, en donde no se muestran cambios en los espectros al compararlos entre ellos.

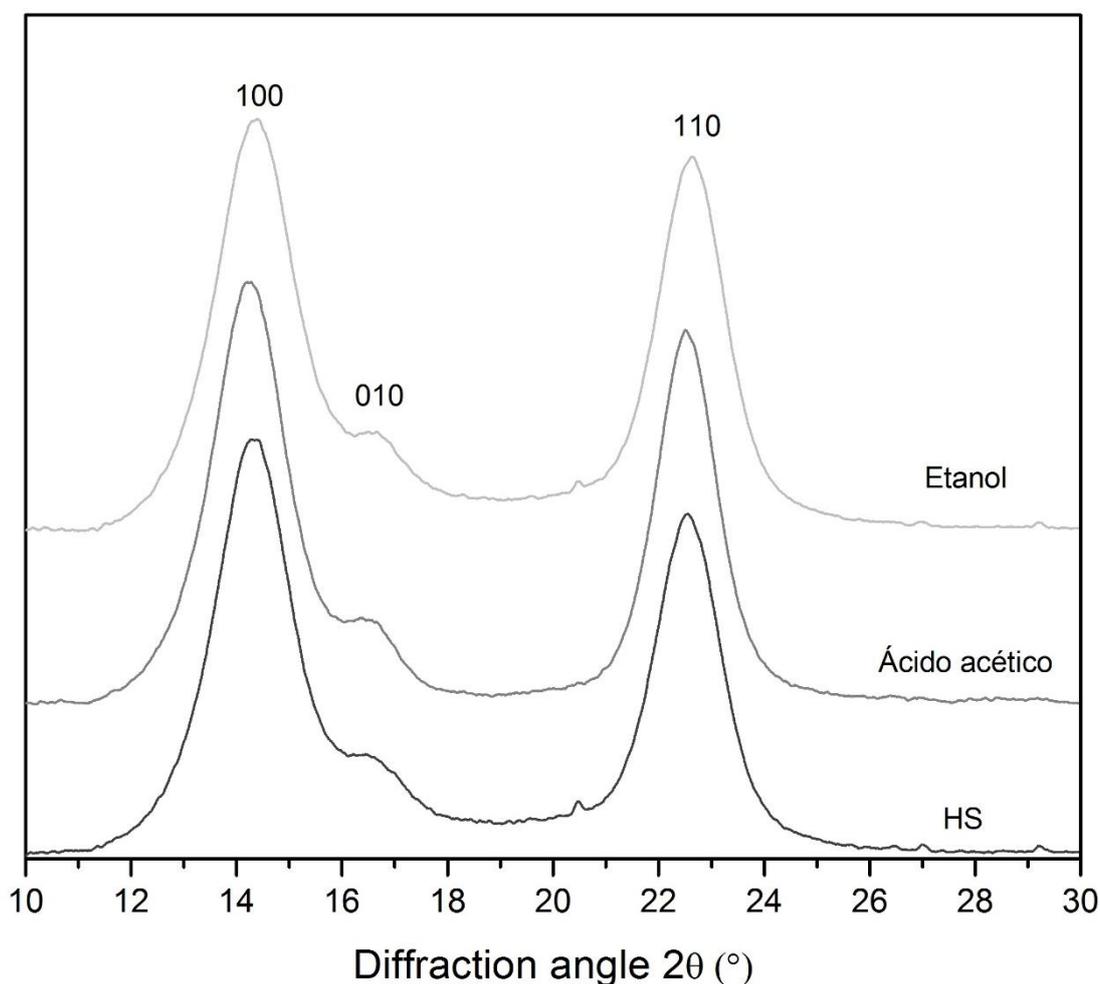


Figura 21 Espectro de difracción de rayos X (DRX) recogidos de las membranas de CB a partir del blanco HS, medio modificado con etanol y medio modificado con ácido acético. La indexación corresponde a la sugerida por Sugiyama y colaboradores, (1991) (Sugiyama et. al, 1991).

En el espectro DRX se muestran los 3 picos principales ubicados en 14,1, 16,1 y 22 °, los cuales corresponden a los planos cristalográficos (100), (010) y (110) respectivamente, el cual es característico de la celulosa tipo I o nativa. Los

picos anchos indican que la celulosa es un polímero semicristalino el cual está conformado por zonas cristalinas y amorfas (Castro et al., 2011).

En esta prueba se muestra que no hubo cambios en la estructura cristalina debido a la modificación de los medios con los inductores (ácido acético y etanol)

4.4.4. Viscosimetría

En la Figura 22 se presentan los valores obtenidos para el grado de polimerización de las membranas obtenidas del medio HS (blanco) y los medios modificados con etanol y ácido acético a una concentración de 0,1 %(P/V). En la que se observó que los grados de polimerización disminuyen al utilizar el etanol y el ácido acético como inductores, lo que significa que las cadenas de celulosa son más largas para el medio HS, con un grado de polimerización mayor a 5000, mientras que para el etanol y el ácido acético se obtuvo un grado de polimerización de 3181 y 3649, respectivamente.

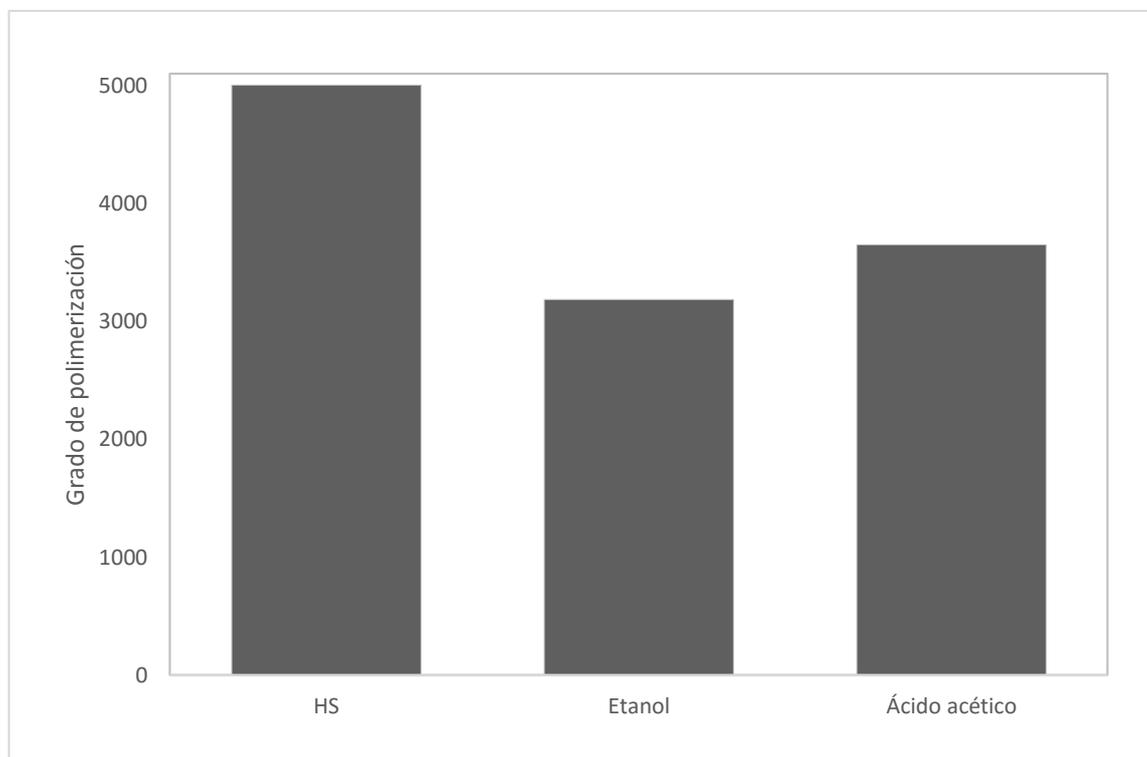


Figura 22 Gráfica de grado de polimerización de las membranas obtenidas con respecto a los inductores utilizados y el blanco.

Esto podría estar relacionado con las características de la red observada en la imagen SEM (Figura 19), en la cual se observa que existe una menor distancia entre nodos en el caso del etanol, seguido del ácido acético, por lo tanto, un

menor número de unidades de glucosa polimerizadas cuando se comparan con el HS (Okajima, Matsuda, & Kamide, 1991).

4.4.5. Pruebas de tracción

Para las pruebas de tracción, en la Figura 23 se observó que no se encontraron diferencias en la máxima resistencia al comparar el blanco con los medios modificados con ácido acético y etanol, los cuales están dentro de los rangos mostrados en la literatura (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000).

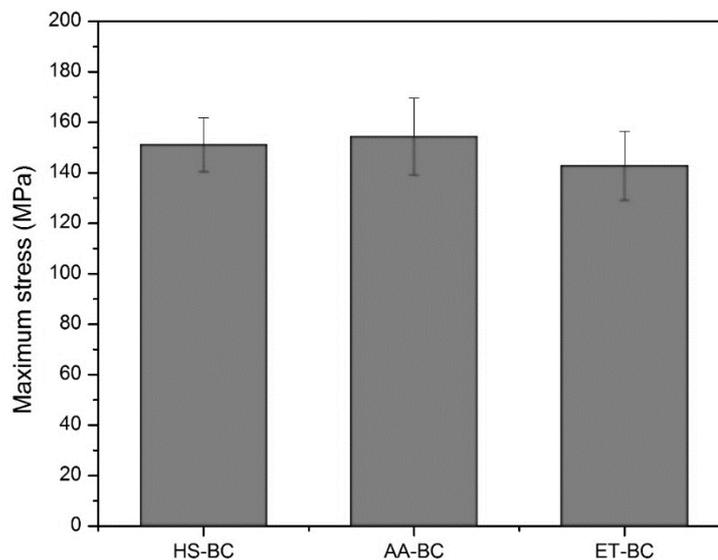


Figura 23 Gráfico de Resistencia máxima en las membranas obtenidas del blanco (HS-BC), medio modificado con etanol (ET-BC) y ácido acético (AA-BC)

Además de esto, en la Figura 24 se observó una ligera disminución en el módulo de Young para los medios modificados con los inductores al compararlo con el blanco HS, lo que posiblemente puede estar relacionado con la disminución en el grado de polimerización observada por la técnica de viscosimetría (Cheng, Catchmark, & Demirci, 2009b).

De la caracterización de la CB es posible concluir que su características físicas, químicas y mecánicas no se ven afectadas por la presencia del inductor, por tanto es posible utilizar ácido acético y etanol para aumentar la producción de la CB sin afectar la calidad de la nacocelulosa obtenida,

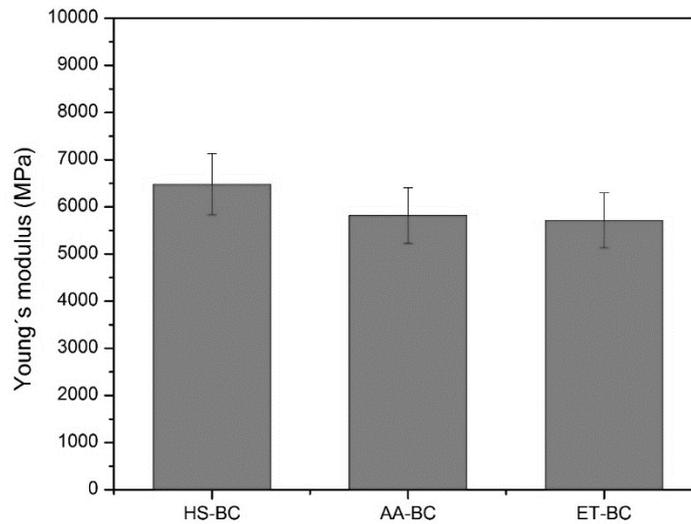


Figura 24 Gráfico del Módulo de Young para las muestras blanco HS-BC, el medio modificado con ácido acético (AA-BC) y medio modificado con etanol (ET-BC)

De la caracterización de la CB es posible concluir que su características físicas, químicas y mecánicas no se ven afectadas por la presencia del inductor, por tanto es posible utilizar ácido acético y etanol para aumentar la producción de la CB sin afectar la calidad de la nanocelulosa obtenida,

5.CONCLUSIONES

- Dentro de los inductores estudiados (ácido acético, succínico, láctico, cítrico, málico, oxálico y etanol) se encontró que los que mayor aumento generan en la producción de CB a la concentración de 1,0 % (P/V) para la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*, a un pH de 3,6 – 3,7 y una temperatura de fermentación de 28 °C son el etanol y el ácido acético, esto puede deberse a que se ha encontrado que estos inductores pueden funcionar como productores de energía (ATP) la cual inhibe la función de la enzima glucosa-fosfato-deshidrogenasa, enzima responsable de la producción del ácido glucónico.
- La variación de pH inicial y final en el medio, para la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* con medios de cultivo modificados con inductores no está relacionada con la producción de la CB. Para el etanol, se produjo un aumento de la producción de CB a pesar de que se presentó una mayor disminución en el pH final. Para otros microorganismos productores de celulosa pertenecientes a este mismo género una disminución en el pH trae consigo una inhibición de la capacidad productora.
- El contenido de humedad de la membrana obtenida variará dependiendo del inductor utilizado y la concentración del inductor, obteniéndose un mayor porcentaje de humedad para el etanol y el ácido acético a una concentración del 1,0 % (P/V). Al tener mayor capacidad de absorción de agua, presenta mayor difusión de los componentes del medio de cultivo dentro de la membrana.
- En el estudio de la concentración de los dos inductores elegidos como los más adecuados en la Fase 1, se encontró que la producción de CB se ve inhibida a concentraciones mayores al 8 % (P/V) de etanol y 4 % (P/V) de ácido acético, a un pH de 3,6 – 3,7 y una temperatura de fermentación de 28 °C.
- La concentración idónea del etanol y del ácido acético para la producción de CB de *Gluconacetobacter medellinensis* a un pH de 3,6 – 3,7 y una temperatura de fermentación de 28 °C en el medio es del 0,1 % (P/V).
- El comportamiento del crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de CB en los tres medios no varía, pudiendo utilizar el mismo modelo para los tres medios con un grado de ajuste del 95% aproximadamente.

- La producción de la CB en los tres medios se vio más clara una vez que la fase exponencial del crecimiento bacteriano ha llegado a su fin y el consumo de sustrato se torna constante, al segundo día para el blanco y al tercer día para los medios modificados con etanol y ácido acético.
- El etanol y el ácido acético a una concentración del 0,1 % (P/V) estimula el crecimiento celular de la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* para las condiciones propuestas de crecimiento.
- Dentro del modelo utilizado no se observó una fase de latencia representativa para ninguno de los tres medios, además de esto la velocidad máxima de crecimiento para los tres medios se observó cuando el microorganismo se encuentra en la parte inicial de la fase exponencial.
- La velocidad de consumo de la glucosa para los tres medios (blanco, modificado con etanol y modificado con ácido acético) no tuvo variación representativa.
- La adición de etanol a una concentración del 0,1 % (P/V) para las condiciones propuestas, estimula la producción de la CB hasta dos veces más que el blanco y 1,42 veces más que el ácido acético.
- La adición de ácido acético a una concentración del 0,1 % (P/V) para las condiciones propuestas, estimula la producción de la CB hasta 1,44 veces más que el blanco.
- Los rendimientos del sustrato-biomasa, sustrato-producción de CB y biomasa-producción de CB son variables a través del tiempo, además de esto, se encontró que la CB se produce como metabolito secundario para este microorganismo, contrario a lo que se había dicho en la literatura anteriormente para otros microorganismos.
- En las imágenes SEM se pudo observar que las fibrillas de las membranas obtenidas en los tres medios estudiados se distribuyen de una manera uniforme y orientada al azar. Además, se observó una menor densidad de fibrillas para el blanco y la de mayor densidad fue la membrana obtenida del medio modificado con etanol. El tamaño de las fibrillas fue mayor para el ácido acético y las de menor tamaño fueron las de la membrana obtenida del blanco, encontrando que al adicionar estos inductores a una concentración del 0,1 % (P/V) la densidad y tamaño de fibrilla se ven afectados.

- En los espectros FTIR no se presentaron cambios significativos debido a los inductores al 0,1 %(P/V) en el medio, al compararlos con el blanco HS, lo que significa que la estructura química no varía, además de que las bandas presentes son las típicas de las registradas para la CB.
- El grado de polimerización de las membranas obtenidas varían al adicionar los inductores, siendo menor para el etanol, siguiendo del ácido acético, esto se encuentra ligado a su vez con la distancia observada entre los nodos.
- No hay variaciones considerables en las pruebas mecánicas entre las membranas obtenidas con el blanco HS y los medios modificados con etanol y ácido acético.
- Las características físicas, mecánicas y estructurales de la CB obtenida en los medios modificados se mantiene, lo que permite concluir que su calidad no se ve afectada.

6.RECOMENDACIONES PARA PRÓXIMOS ESTUDIOS

- 6.1. Es recomendable investigar la concentración idónea para los otros inductores estudiados en la Fase 1, para de esta manera conocer si son aplicables a la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* a una concentración menor.
- 6.2. Es necesario realizar un análisis completo de la cinética de crecimiento y producción de CB que incluya un estudio exhaustivo de los subproductos que se encuentran en el medio a través del tiempo, la tasa de difusión y consumo del oxígeno, entre otros parámetros, para de esta manera conocer un poco más a profundidad el metabolismo de *Gluconacetobater medellinensis* en medio HS y como este se afecta en los medios modificados con inductores.
- 6.3. Es recomendable evaluar la mutación de las células a Cel^- en los medios modificados con los inductores.
- 6.4. Evaluar diferentes condiciones de fermentación para el ácido acético y el etanol a concentraciones del 0,1 % (P/V) para evaluar la posibilidad de mejorar la producción de la CB obtenida con estos inductores.
- 6.5. Es necesario complementar los estudios del grado de polimerización por cromatografía de permeación gel, siendo este el método más exacto encontrado en la literatura para su determinación y comparación con la CV.

7.BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. Determinación del índice de viscosidad límite de celulosa en disoluciones diluidas. Parte 1: Método de la cuprietilendiamina (CED) (1992). Madrid, España: Secretaría del CTN ASPAPEL.
- Arteaga Valencia, L. J. (2014). Evaluación de residuos agroindustriales como sustrato para la producción de celulosa bacteriana empleando *Gluconacetobacter medellinensis*. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.
- ASTM D1708. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens.
- Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(1), 33–8. doi:10.1016/S1389-1723(04)70162-0
- Bielecky, S., Krystynowicz, A., & Czaja, W. (2005). A method for the production of Bacterial Cellulose. WO.
- Brown, A. J. (1886). On an Acetic Ferment which forms Cellulose. *Journal of the Chemical Society*, 49, 432–439. doi:10.1039/CT8864900432
- Brown Jr, R. M., & Saxena, I. M. (2000). Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 57–67. doi:10.1016/S0981-9428(00)00168-6
- Brown, R. M. (1991). Advances in Cellulose Biosynthesis. *Polymers from Biobased Materials*.
- Budhiono, a., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 40(2), 137–143. doi:10.1016/S0144-8617(99)00050-8
- Carreira, P., Mendes, J. a S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, 102(15), 7354–60. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.081
- Carreño, D. (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.
- Carreño, D., Caicedo, L., & Martínez, C. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería Y Ciencia*, 8(16), 307–335.

- Castro, C., Cleenwerck, I., Trcek, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., ... Gañán, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 3), 1119–1125. doi:10.1099/ijs.0.043414-0
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J.-L., Caro, G., Rojas, O. J., ... Gañán, P. (2012). Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1033–1037. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.045
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I., & Gañán, P. (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96–102. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.072
- Castro Herazo, C. I. (2012). *Desarrollo de materiales compuestos auto-ensamblados de celulosa bacteriana/alcohol polivinilico durante la biosintesis de la celulosa bacteriana*. Universidad Pontificia Bolivariana.
- Chávez Pacheco, J. L., Martínez Yee, S., Contreras Zentella, M., & Escamilla Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, Espana Y Portugal*, 7(1), 18–25.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009a). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose*, 16(6), 1033–1045. doi:10.1007/s10570-009-9346-5
- Cheng, K.-C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009b). Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering*, 3, 12. doi:10.1186/1754-1611-3-12
- Chunyan, Z. (2013). Culture medium for producing bacterial cellulose through fermentation. China.
- Chunyan, Z., & Zhong Yuguang. (2013). Astaxanthin-containing bacterial cellulose membrane product. China.
- Dayal, M. S., Goswami, N., Sahai, A., Jain, V., Mathur, G., & Mathur, A. (2013). Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose

- production from *Acetobacter aceti* MTCC 2623. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 12–6. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.018
- Dumitriu, S. (1998). *Polysaccharides, structural diversity and functional versatility* (First). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Dumitriu, S. (2004). *Polysaccharides, structural diversity and functional versatility* (second). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- El-Saied, H., El-Diwany, A., Basta, A. H., & Atwa, N. A. (2008). Production and characterization of economical bacterial cellulose. *Bioresources*, 3(4), 1196–1217.
- Feng, H., & Guang, Y. (2010). High-dietary-fiber biscuit containing bacterial cellulose and preparation method thereof. China.
- Fontana, J. D., Franco, V. C., de Souza, S. J., Lyra, I. N., & de Souza, A. M. (1991). Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29(1), 341–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1929372>
- Francis J. Hart. (2000). Bactericidal composition for treating infectious or pathogenic bacterial diseases or conditions in warm blooded animals comprising oxalic acid and/or oxalate in amount less than lethal dosage, with carrier and diluent. USA.
- Gama, M., Gatenholm, P., & Klemm, D. (2013). *Bacterial NanoCellulose A Sophisticated Multifunctional Material*. (M. Gama, P. Gatenholm, & D. Klemm, Eds.) (pp. 1 – 273). New York, USA: CRC Press.
- Haynes, W. (1953). *Cellulose: the chemical that grows* (p. 386). New York, USA: Doubleday.
- Heinze, T., & Petzold-Welcke, K. (2012). *Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials*. (Y. Habibi & L. A. Lucia, Eds.) (First, pp. 1 – 407). John Wiley and Sons, Inc.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum* 2. Preparation of Frezze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352.
- Higson, A. (2011). Cellulose. *Renewable Chemicals Factsheet*, 44(0).
- Hong, F. (2011). Method for preparing bacterial cellulose by taking Jerusalem artichoke as carbon source. China.

- Hong, F. (2012). Method for preparing bacterial cellulose by using wheat straw. China.
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S., Yang, G., & Jönsson, L. J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology*, *104*, 503–8. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.028
- Hong, F., & Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate Polymers*, *72*(3), 545–549. doi:10.1016/j.carbpol.2007.09.015
- Hutchens, S. A., Woodward, J., Evans, B., & O'Neill, H. M. (2014). Method of tissue repair using a composite material. United States.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, a. (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, *35*, 261–270. doi:10.1023/A:1004775229149
- Jaramillo, R. L., Tobio, J., & Escamilla, M. (2012). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. *Revista MVZ Cordoba*, *17*(2), 3004–3013.
- Jiazhou, L., Yuping, X., Ronglin, H., Xin, Z., & Dongqing, Z. (2011). Bacterial cellulose edible packaging product and production method thereof. China.
- Jonas, R., & Farahc, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 101–106.
- Keshk, S. (2014). Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 98–100. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.060
- Keshk, S., & Sameshima, K. (2006). Influence of liginosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(1), 4–8. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.037
- Kim, S.-Y., Kim, J.-N., Wee, Y.-J., Park, D.-H., & Ryu, H.-W. (2006). Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter* sp . RKY5 Isolated From Persimmon Vinegar. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *121-124*, 705–715.
- Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1997). Effect of Agitator Configuration on Bacterial Cellulose Productivity in Aerated and Agitated Culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *83*(4), 371–376.

- Krässig, H. A. (1993). *Cellulose : structure, accessibility and reactivity* (p. 376). Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers.
- Krystynowicz, a, Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, a, Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(4), 189–95. doi:10.1038/sj.jim.7000303
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333–335. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.009
- Li, Y., Tian, C., Tian, H., Zhang, J., He, X., Ping, W., & Lei, H. (2012). Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1479–87. doi:10.1007/s00253-012-4242-6
- Liu, X., Marks, S., Tours, Z. W., Jianmei, C., & Yankui, Z. (2013). Bacterial cellulose-containing anti-counterfeiting paper and its preparation method. China.
- Lu, Z., Zhang, Y., Chi, Y., Xu, N., Yao, W., & Sun, B. (2011). Effects of alcohols on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 186. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 2281–2285. doi:10.1007/s11274-011-0692-8
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384. doi:10.1007/s12088-013-0414-z
- Masaru Uryu, C., & Noboru kurihara, K. (1993). Acoustic diaphragm and method for producing same. USA.
- Matsouka, M., Tsuchida, T., Matsushita, K., Adachi, O., & Yoshinaga, F. (1996). A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem*, 60, 575–579.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998a). Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(6), 598–603.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998b). Effect of Lactate on Bacterial Cellulose Production Fructose in Continuous Culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(1), 89–95.

- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, a. T., Kere, C., ... Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 916–923. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.01.020
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. a. (2008). Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Current Microbiology*, 57(5), 449–53. doi:10.1007/s00284-008-9228-3
- Okajima, K., Matsuda, Y., & Kamide, K. (1991). Study on Change in the Degree of Polymerisation of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* during its Cultivation. *Polymer International*, 25, 145–151.
- Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters*, 25(24), 2055–2059. doi:10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18
- Qiu, K., & Netravali, A. (2013). Bacterial Cellulose based “green” composites. USA.
- Ramana, K. V, Tomar, A., & Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 245–248.
- Rani, M. U., & Appaiah, A. (2011a). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology*, 61(4), 781–787. doi:10.1007/s13213-011-0196-7
- Rani, M. U., & Appaiah, A. (2011b). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 755–762. doi:10.1007/s13197-011-0401-5
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ruka, D. R., Simon, G. P., & Dean, K. M. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 613–622. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.059
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., & Adachi, O. (1997). Development of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria Useful for

Vinegar Fermentation at Higher Temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 138–145. doi:10.1271/bbb.61.138

Sani, A., & Dahman, Y. (2009). Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, (June 2009), n/a–n/a. doi:10.1002/jctb.2300

Sarkar, D., Yabusaki, M., Hasebe, Y., Ho, P. Y., Kohmoto, S., Kaga, T., & Shimizu, K. (2010). Fermentation and metabolic characteristics of *Gluconacetobacter oboediens* for different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 127–136. doi:10.1007/s00253-010-2474-x

Saxena, I. M., & Brown Jr, R. M. (2001). Biosynthesis of Cellulose. In N. Morohoshi & A. Komamine (Eds.), *Molecular Breeding of Woody Plants* (pp. 69–76). Austin, Texas: Elsevier Science B.V.

Shen, S., & Lai, D. (2013). Bacterial cellulose/chitosan composite medical dressing and preparation method thereof. China.

Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Ashori, A., Shakeri, A., & Golalipour, M. (2011). Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1187–1191. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.011

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.012

Shiru, J., Weihua, T., Yuanyuan, J., & Fei, L. (2009). Preparation of bacteria cellulose tube having bacteriostasis property. China.

Sugiyama, J., Persson, J., Chanzy, H., Recherche, C. De, & Vbgktales, M. (1991). Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. *Macromolecules*, 24(9), 2461–2466.

Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. (2005) (pp. 3–260).

Toda, K., Fukaya, M., Asakura, T., Entani, E., & Kawamura, Y. (1997). Cellulose Production by Acetic Acid-Resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(3), 228–231.

Ul-Islam, M., Ha, J. H., Khan, T., & Park, J. K. (2013). Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 360–6. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.060

- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 93–99. doi:10.1016/S0141-3910(97)00185-7
- Wan, W., & Guhados, G. (2013). Nanosilver Coated Bacterial Cellulose. USA.
- Wertz, J.-L., Bedue, O., & Mercier, J. P. (2010). *Cellulose science and technology* (First, p. 364). Lausanne: EPFL Press.
- Yang, X.-Y., Huang, C., Guo, H.-J., Xiong, L., Luo, J., Wang, B., ... Chen, X.-D. (2014). Beneficial Effect of Acetic Acid on the Xylose Utilization and Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), 268–73. doi:10.1007/s12088-014-0450-3
- Yunoki, S., Osada, Y., & Kono, H. (2004). Role of Ethanol in Improvement of Bacterial Analysis Using ¹³C-Labeled Carbon Sources D₂O containing one drop of DMSO-d the Biosynthesized. *Food Science and Technology*, 10(3), 307–313.
- Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506–513. doi:10.1016/j.carbpol.2011.02.034
- Zhong, C. (2013). Bacterial Cellulose-Based Ice Bags and the Production Method Thereof. USA.
- Zhong, C., Zhang, G.-C., Liu, M., Zheng, X.-T., Han, P.-P., & Jia, S.-R. (2013). Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6189–99. doi:10.1007/s00253-013-4908-8
- Zhou, L. L., Sun, D. P., Hu, L. Y., Li, Y. W., & Yang, J. Z. (2007). Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(7), 483–9. doi:10.1007/s10295-007-0218-4
- Zuluaga, R., Putaux, J. L., Cruz, J., Vélez, J., Mondragon, I., & Gañán, P. (2009). Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers*, 76, 51–59. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.024
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.

8.ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de Buffer de Acetato de Sodio

La solución de buffer de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M se preparó pesando 32.812 g de acetato de sodio, se colocó en un matraz aforado y se agregó 980 mL de agua destilada. Se mezcló hasta que la sal se disolvió y se ajustó el pH a 5 con HCl concentrado. Una vez que se llegó al pH, se procedió a aforar a 1 L con agua destilada.

La solución se marcó, se esterilizó y posteriormente se guardó en la nevera hasta su uso.

DNS

Se agregó 2,12 g de ácido 3,5 di-nitrosalicílico y 3,96 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 283,2 mL de agua destilada y se colocó en agitación constante a una temperatura de 40 °C.

Una vez disuelto, se agregó 61,2 g de sal de Rochelle (tartrato sódico potásico), 1,52 mL de Fenol derretido a 50 °C y 1,66 g de metabisulfito de sodio. Se agitó hasta que se disolviera completamente.

Una vez realizada la mezcla se pasó a titular, valorando 3 mL de muestra con fenolftaleína con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N, esta valoración se debía llevar de 5 -6 mL de HCl 0,1 N, de lo contrario se debió adicionar hidróxido de sodio (NaOH) en la siguiente relación (2 g de NaOH por cada mL de HCL 0,1 N de mas).

ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMASA DE *Gluconacetobacter medellinensis*.

La curva de calibración para la determinación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* se realizó por medio de turbimetría, midiendo la absorbancia de muestras cuyo contenido celular era conocido. Para esto se siguió la siguiente metodología:

Se preparó 100 mL de medio HS como se describe en el punto 3.1.1, posteriormente se agregó 1 mL de la cepa crio-preservada la cual se encontraba a una concentración de 8×10^{12} UFC/ml. Se colocó a constante agitación durante un minuto y se procedió a realizar diluciones.

Una vez realizadas las diluciones se procedió a hacer el procedimiento descrito en el punto 3.3.2 del tratamiento para la cinética de producción de CB, y se procedió a leer la absorbancia (A) de cada dilución a 640 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

Con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración de concentración vs absorbancia Figura 25.

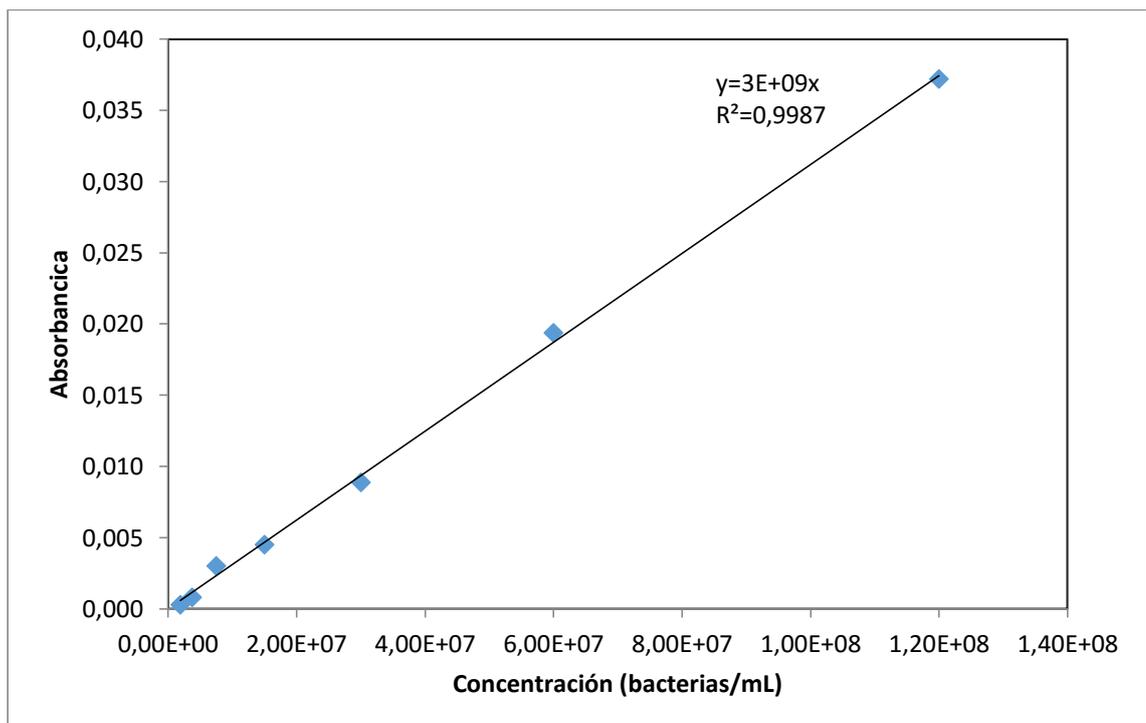


Figura 25 Curva de calibración de concentración vs absorbancia

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR DNS

La curva de calibración para la determinación de fuentes de carbono se realizó por medio de la determinación de azúcares reductores mediante la técnica DNS, midiendo la absorbancia de muestras cuyo contenido de glucosa era conocido. Para esto se siguió la siguiente metodología:

Se preparó una muestra de glucosa en agua a una concentración de 0,4 g/mL, se agitó la muestra hasta la completa disolución de la glucosa. Posteriormente se tomó 0.5 mL de la muestra y se le agregó 0.5 mL de reactivo DNS, se agitó la muestra en el vortex y se sometió a calentamiento en un baño maría a 100 °C durante 5 min. Pasado el tiempo se procedió a enfriar con hielo y se le adicionó 5 mL de agua destilada, se agitó y se dejó reposar por un periodo de 15 min, pasado el tiempo se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm (Arteaga Valencia, 2014).

Con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración de concentración de glucosa vs absorbancia (Figura 26).

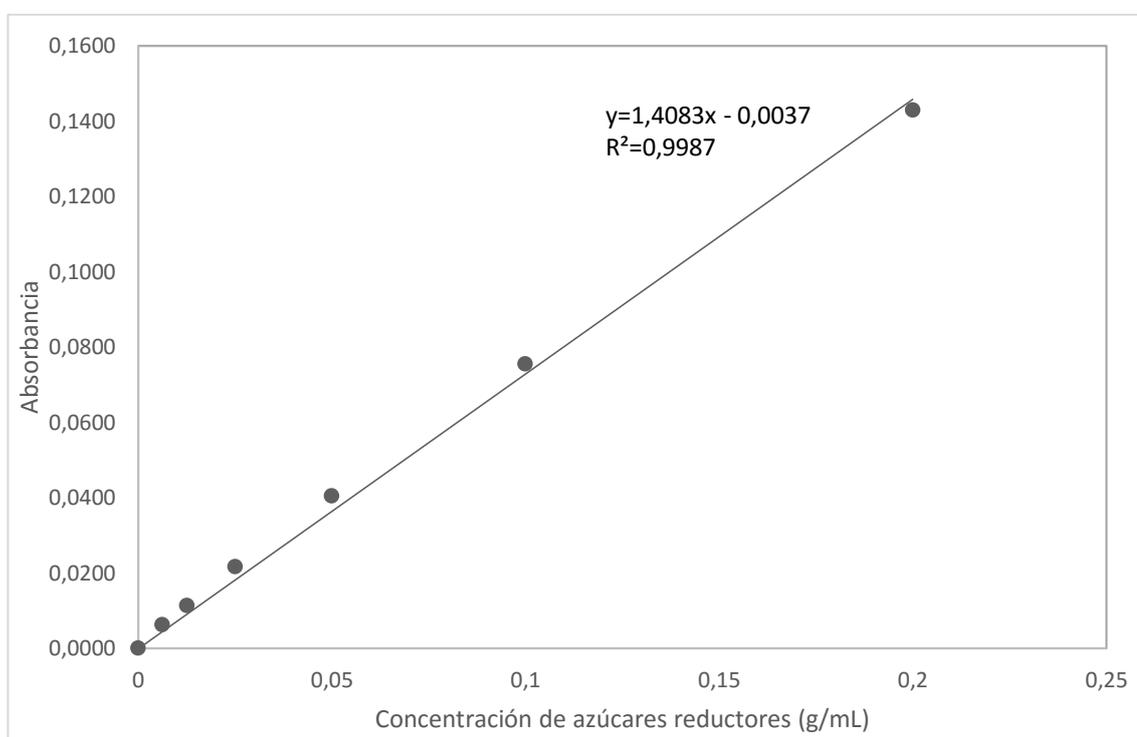


Figura 26 curva de calibración de concentración de glucosa vs absorbancia

ANEXO 3. ESTADÍSTICA DE RESULTADOS

FASE 1. EVALUACIÓN DE DIFERENTES INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE PRODUCCIÓN DE CB						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza	Aumento de producción respecto al blanco
Blanco (HS)	6	0,6105	1,0175	8,0219E-05	0,00822	
Ácido Acético	6	1,2588	2,0980	2,5314E-04	0,01461	2,06
Ácido láctico	6	0,9686	1,6143	8,7183E-04	0,02711	1,59
Acido succínico	6	0,9712	1,6187	2,4444E-03	0,04539	1,59
Ácido cítrico	6	0,9948	1,6580	1,5065E-04	0,01127	1,63
Ácido oxálico	6	0,1529	0,0000	2,6878E-05	0,00476	0,00
Ácido málico	6	0,3028	0,5047	8,9991E-05	0,00871	0,50
Etanol	6	1,6457	2,7428	2,8694E-04	0,01555	2,70
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,2819	7	0,0403	76,6307	3,7483E-21	2,2490
Dentro de los grupos	0,0210	40	0,0005			
Total	0,3029	47				

Pruebas de Múltiple Rangos para Producción de CB por Medio			
Método: 95,0 porcentaje LSD			
Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AO	6	0	X
AM	6	0,0504667	X
HS	6	0,10175	X
AL	6	0,161433	X
AS	6	0,161867	X
AC	6	0,1658	X
AA	6	0,2098	X
ET	6	0,274283	X

En la **Figura 27** se muestra el gráfico de medias y 95,0 % de Fisher LSD en el cual se muestran la homogeneidad de los grupos entre sí, con esto es posible observar entre cuales grupos existen diferencias significativas y cuáles no, por ejemplo aquí se observa que no existen diferencias significativas en la producción de CB entre el AC, AL y AS, además de esto, existen diferencias significativas de estos tres inductores y el blanco HS, así como también entre el HS y los otros grupos.

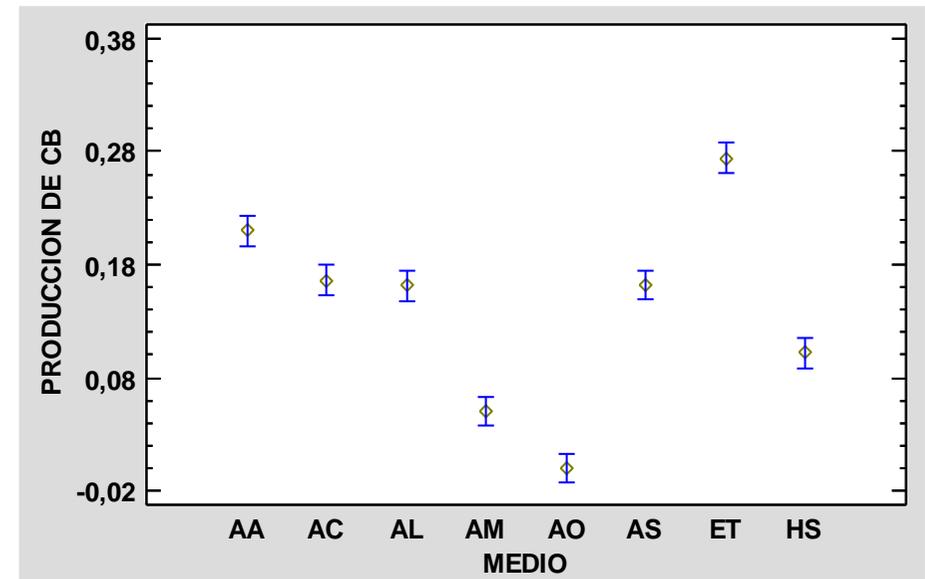


Figura 27 Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para producción de CB

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DEL PH

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio pH final	Varianza	Intervalo de confianza	pH inicial
HS	3	8,639	2,880	4,23E-05	0,01094	3,685
Ácido Acético	1	3,368	3,368	0,00E+00	0,00000	3,682
Ácido láctico	3	11,466	3,822	1,30E-05	0,00606	3,665
Ácido succínico	2	6,738	3,369	2,00E-06	0,00291	3,688
Ácido cítrico	3	9,932	3,311	5,83E-05	0,01285	3,710
Ácido oxálico	3	9,143	3,048	2,53E-05	0,00847	3,657
Ácido málico	3	10,145	3,382	1,00E-04	0,01685	3,690
Etanol	2	5,871	2,936	1,25E-05	0,00728	3,685
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,814364633	7	0,259194948	6306,872669	2,00613E-20	2,913358179
Dentro de los grupos	0,000493167	12	4,10972E-05			
Total	1,8148578	19				

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Medio			
Método: 95,0 porcentaje LSD			
Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
HS	3	2,880	X
ET	2	2,936	X
AO	3	3,048	X
AC	3	3,311	X
AA	1	3,368	X
AS	2	3,369	X
AM	3	3,382	X
AL	3	3,822	X

En la **Figura 28** se muestran los grupos homogéneos para el pH final, en donde se observa que no existen diferencias significativas en el pH final medido entre el AA, AM y AS, además de esto se observan que hay diferencias significativas entre estos grupos, al igual que los otros grupos al compararlos con el HS .

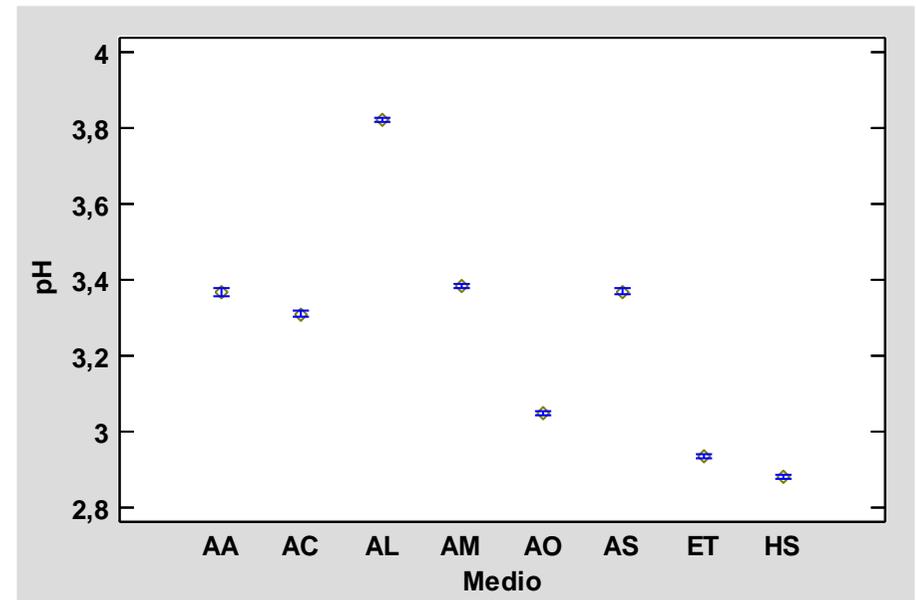


Figura 28 Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para pH

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA HUMEDAD

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Intervalo de confianza
HS	6	5,948276548	98,97%	6,55363E-07	0,07%
Etanol	6	5,969923576	99,50%	1,47162E-07	0,04%
Ácido Acético	6	5,959606131	99,33%	2,04444E-07	0,04%
Ácido láctico	6	5,955956697	99,27%	9,79949E-08	0,03%
Acido succínico	6	5,945371558	99,09%	1,53204E-06	0,11%
Ácido cítrico	6	5,929755305	98,83%	1,9222E-07	0,04%
Ácido oxálico	6	5,960551159	0,00%	1,56205E-06	0,11%
Ácido málico	6	5,953271431	99,22%	2,17044E-06	0,14%

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000169416	7	2,42023E-05	29,50730815	6,95758E-14	2,249024325
Dentro de los grupos	3,28086E-05	40	8,20214E-07			
Total	0,000202225	47				

Pruebas de Múltiple Rangos para Humedad por Medio			
Método: 95,0 porcentaje LSD			
Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AO	6	0	X
AC	6	98,83%	X
HS	6	98,97%	XX
AS	6	99,09%	XX
AM	6	99,22%	XX
AL	6	99,27%	XX
AA	6	99,33%	XX
ET	6	99,50%	X

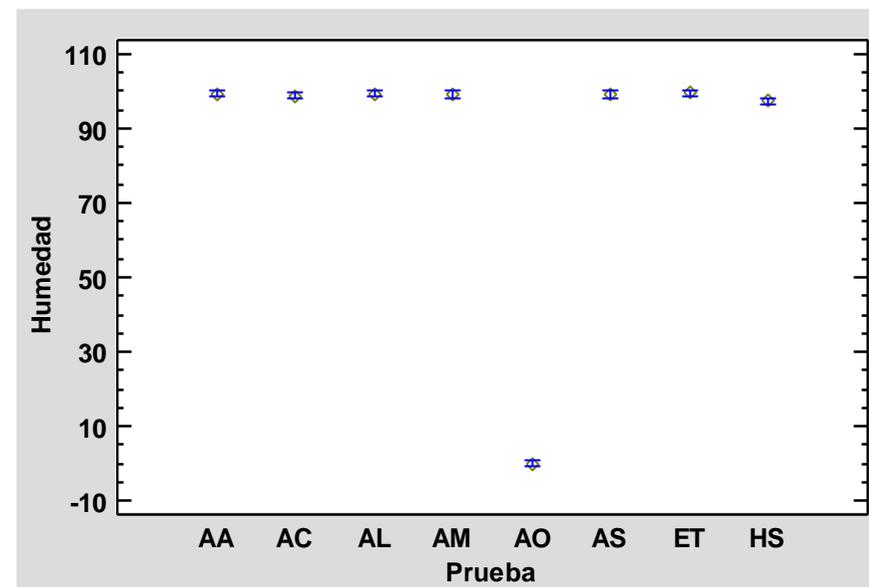


Figura 29 Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para Humedad

En la tabla de Pruebas de Múltiple Rangos para la Humedad por Medio se muestra las diferencias entre los grupos, donde se observa que entre el medio AC y el HS no existen diferencias significativas, así como entre el HS y el AS, el AM y AL y el AA y AL, respectivamente.

FASE 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CONCENTRACIÓN DE LOS INDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DEL ETANOL						
Concentración	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza	
0	5	0,4973	0,9946	6,09E-05	0,0081	
0,1	5	1,5980	3,1960	6,74E-04	0,0268	
1	5	1,3486	2,6972	2,02E-04	0,0147	
2	5	1,5147	3,0294	2,75E-04	0,0172	
4	5	0,7752	1,5504	3,21E-05	0,0059	
6	5	0,3432	0,6864	2,64E-04	0,0168	
8	5	0,0000	0,0000	0,00E+00	0,0000	
10	5	0,0000	0,0000	0,00E+00	0,0000	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,6033	7	0,0862	457,1052	3,3260E-30	2,313
Dentro de los grupos	0,0060	32	0,0002			
Total	0,6093	39				

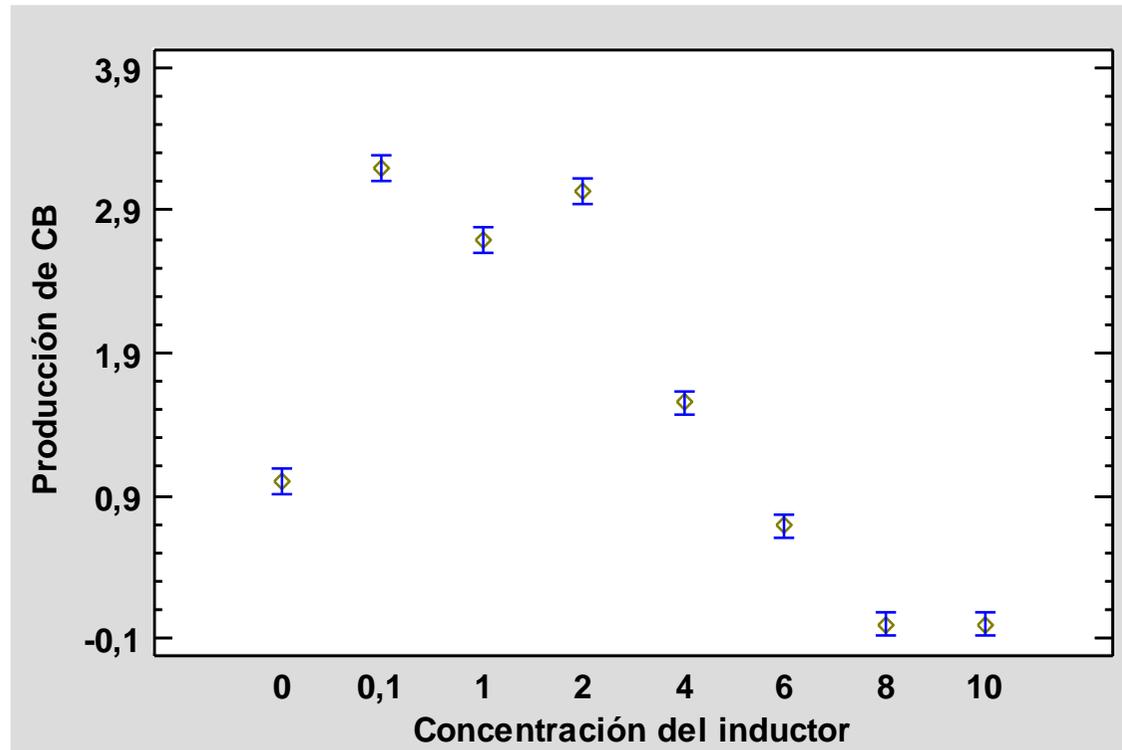


Figura 30 Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la concentración del etanol en el medio

En la Figura 30 se muestran las diferencias entre las medias para la concentración del etanol en el medio, donde se observa que se presentan diferencias significativas entre todas las concentraciones exceptuando el 8,0 y 10,0 % (P/V), donde la producción de CB se vio inhibida.

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO ÁCETICO

Concentración	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza
0	5	0,4973	0,9946	6,094E-05	0,0081
0,1	5	1,7817	3,5634	1,896E-04	0,0142
1	5	1,0299	2,0598	2,070E-04	0,0149
2	5	0,5486	1,0972	7,514E-05	0,0090
4	5	0,0000	0,0000	0	0,0000
6	5	0,0000	0,0000	0	0,0000
8	5	0,0000	0,0000	0	0,0000
10	5	0,0000	0,0000	0	0,0000

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,5847	7	0,0835	1254,4962	3,6057E-37	2,3127
Dentro de los grupos	0,0021	32	6,66E-05			
Total	0,5868	39				

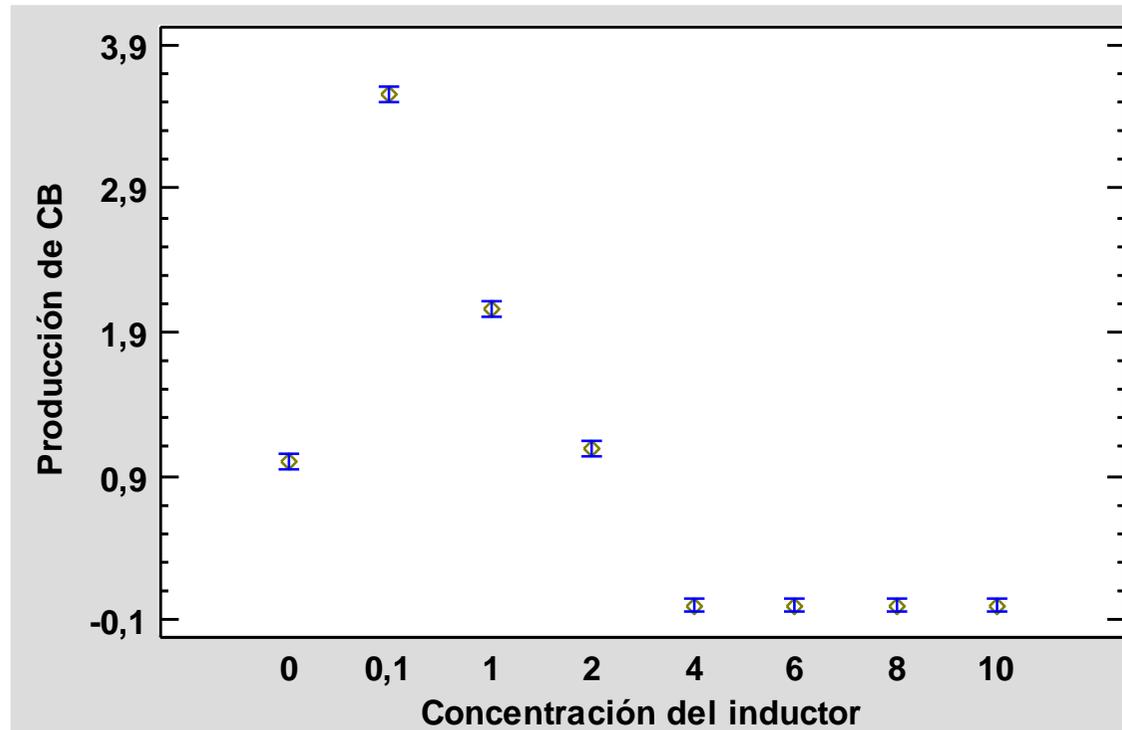


Figura 31 Gráfico de Medias y 95,0 % de Fisher LSD para la concentración del ácido acético en el medio

En la Figura 31 se muestran las diferencias entre las medias para la concentración del ácido acético en el medio, donde se observa que se presentan diferencias significativas entre todas las concentraciones exceptuando entre las concentraciones del 4,0 al 10,0 % (P/V), donde la producción de CB se vio inhibida.

FASE 3. ESTABLECIMIENTO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN LOS MEDIOS MODIFICADOS CON LOS INDUCTORES

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN BIOMASA DEL MEDIO HS						
Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (bacterias/mL)	Varianza	Intervalo de confianza	
0	3		6,00E+05	0		
1	3	5,13E+08	1,69E+08	4,188E+15	8,77E+07	
2	3	5,61E+08	1,85E+08	4,647E+15	9,24E+07	
3	3	6,87E+08	2,27E+08	8,04E+14	3,84E+07	
4	3	7,41E+08	2,45E+08	5,772E+15	1,03E+08	
6	2	6,40E+08	3,18E+08	2,4642E+16	2,61E+08	
7	3	8,79E+08	2,91E+08	1,2339E+16	1,51E+08	
8	3	9,54E+08	3,16E+08	2,2557E+16	2,04E+08	
9	3	8,91E+08	2,95E+08	2,0739E+16	1,95E+08	
10	3	8,61E+08	2,85E+08	9,261E+15	1,30E+08	
12	2	9,01E+08	4,49E+08	1,0125E+15	5,28E+07	
13	3	1,54E+09	5,12E+08	1,2513E+16	1,52E+08	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,96376E+17	10	2,96376E+16	2,805338887	0,023772132	2,347877567
Dentro de los grupos	2,11295E+17	20	1,05647E+16			
Total	5,07671E+17	30				
COEFICIENTES DEL MODELO						
ECUACION	A	B	K	R ²		
$y = A[1 - B \exp(-kt)]$	6,115900	0,999560	2,455500	0,994		

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN SUSTRATO DEL MEDIO HS

Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza
0	3	60	20,0000	0	0,000
1	3	40,4299878	13,1783	0,062331432	0,243
2	2	25,4661604	12,4551	0,036556349	0,186
3	3	16,7226656	5,4930	0,30439296	0,537
4	3	15,0524218	4,9516	0,656874549	0,788
6	2	9,9579608	4,9141	0,101545415	0,310
7	3	13,2779638	4,3763	1,179746171	1,056
8	2	8,2849004	4,1006	0,416399668	0,628
9	2	9,118614	4,5060	0,053374809	0,225
10	3	15,7819212	5,1880	0,055984843	0,230
12	2	10,315669	5,0881	0,042081848	0,200
13	2	7,5807504	3,7582	0,137229109	0,360

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	793,1078716	11	72,1007156	244,6005048	2,99134E-17	2,374155594
Dentro de los grupos	5,305847108	18	0,294769284			
Total	798,4137187	29				

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CB DEL MEDIO HS						
Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza	
0	3	0	0,0000	0,00E+00	0,0000	
1	3	0,125	0,0417	3,80E-04	0,0195	
2	2	0,095	0,0475	4,50E-06	0,0021	
3	3	1,428	0,4760	5,36E-03	0,0732	
4	3	1,721	0,5737	1,03E-03	0,0320	
6	3	2,202	0,7340	1,94E-03	0,0440	
7	2	1,512	0,7560	3,87E-03	0,0622	
8	3	2,664	0,8880	6,92E-03	0,0832	
9	3	2,939	0,9797	5,90E-02	0,2428	
10	3	2,746	0,9153	1,50E-02	0,1224	
11	3	3,082	1,0273	6,37E-03	0,0798	
12	3	3,632	1,2107	5,33E-06	0,0023	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,3152704	12	0,60960587	58,7583325	8,5834E-15	2,18338008
Dentro de los grupos	0,24899517	24	0,0103748			
Total	7,56426557	36				

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN BIOMASA DEL MEDIO MODIFICADO CON ETANOL

Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (bacterias/mL)	Varianza	Intervalo de confianza
0	1	6,00E+05	6,00E+05		0,00E+00
1	3	4,50E+08	1,48E+08	9,48E+14	3,08E+07
2	3	5,10E+08	1,68E+08	8,37E+14	2,89E+07
3	3	6,78E+08	2,24E+08	1,533E+15	3,92E+07
4	3	9,39E+08	3,11E+08	2,73E+14	1,65E+07
6	3	9,06E+08	3,00E+08	3,141E+15	5,60E+07
7	3	1,34E+09	4,45E+08	2,028E+15	4,50E+07
8	3	1,49E+09	4,95E+08	1,971E+15	4,44E+07
9	3	1,53E+09	5,07E+08	2,187E+15	4,68E+07
10	3	1,21E+09	4,00E+08	4,2069E+16	3,61E+07
12	3	1,60E+09	5,30E+08	3,387E+15	5,82E+07
13	3	1,81E+09	6,00E+08	2,943E+15	5,42E+07

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8,54286E+17	11	7,76623E+16	13,93227845	1,74955E-07	2,258518357
Dentro de los grupos	1,22634E+17	22	5,57427E+15			
Total	9,7692E+17	33				

COEFICIENTES DEL MODELO

ECUACION	A	B	K	R²		
$y = A[1 - B \exp(-kt)]$	6,486200	0,995110	1,629500	0,993		

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN SUSTRATO DEL MEDIO MODIFICADO CON ETANOL

Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza
0	3	60	20,0000	0	0,00E+00
1	2	30,383944	14,8465	1,031717285	9,88E-01
2	3	41,7988554	13,6220	1,587416636	1,23E+00
3	3	19,3730862	6,3522	0,940001148	9,43E-01
4	3	19,1252254	6,2719	0,033012838	1,77E-01
6	3	18,5534556	6,0865	0,13333389	3,55E-01
7	3	15,8692358	5,2163	0,693343633	8,10E-01
8	2	8,8735698	4,3868	0,683150747	8,04E-01
9	2	11,1071336	5,4729	0,366578949	5,89E-01
10	3	17,1451556	5,1155	1,211534646	8,39E-01
12	3	15,3791474	5,0575	0,646156748	7,82E-01
13	3	11,340143	3,7481	0,182260798	4,15E-01

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	818,5115298	11	74,41013908	120,7997177	2,04008E-16	2,282916078
Dentro de los grupos	12,93556765	21	0,615979412			
Total	831,4470975	32				

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CB DEL MEDIO MODIFICADO CON ETANOL

Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza
0	3	0	0,0000	0,00E+00	0,0000
1	2	0,023	0,0115	4,50E-06	0,0021
2	3	0,446	0,1487	9,74E-04	0,0312
3	3	1,175	0,3917	2,52E-03	0,0502
4	3	2,003	0,6677	1,68E-03	0,0410
6	3	2,553	0,8510	1,37E-02	0,1172
7	3	3,306	1,1020	2,79E-03	0,0528
8	3	3,139	1,0463	2,84E-03	0,0533
9	2	2,542	1,2710	3,20E-05	0,0057
10	3	4,827	1,6090	5,35E-02	0,2313
11	3	5,23	1,7433	5,25E-03	0,0725
12	3	6,344	2,1147	9,08E-03	0,0953

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	26,8684943	12	2,23904119	239,991017	6,0491E-22	2,18338008
Dentro de los grupos	0,2239125	24	0,00932969			
Total	27,0924068	36				

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN BIOMASA DEL MEDIO MODIFICADO CON ACIDO ACETICO

Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (bacterias/mL)	Varianza	Intervalo de confianza
0	1	6,00E+05	6,00E+05		0,00E+00
1	3	3,39E+08	1,11E+08	6,3E+13	7,94E+06
2	3	4,53E+08	1,49E+08	1,281E+15	3,58E+07
3	3	1,00E+09	3,32E+08	1,911E+15	4,37E+07
4	3	5,97E+08	1,97E+08	1,11E+14	1,05E+07
6	3	1,12E+09	3,73E+08	2,919E+15	5,40E+07
7	3	1,03E+09	3,41E+08	3,3969E+16	1,84E+08
8	3	8,73E+08	2,89E+08	8,589E+15	9,27E+07
9	3	8,37E+08	2,77E+08	9,012E+15	9,49E+07
10	3	1,60E+09	5,32E+08	1,731E+15	4,16E+07
12	2	1,17E+09	3,89E+08	1,6245E+15	3,38E+08
13	3	1,33E+09	4,43E+08	2,3349E+16	1,53E+08

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7,02959E+17	11	6,39053E+16	8,01227321	2,69411E-05	2,282916078
Dentro de los grupos	1,67495E+17	21	7,97593E+15			
Total	8,70453E+17	32				

COEFICIENTES DEL MODELO

ECUACION	A	B	K	R ²
$y = A[1 - B \exp(-kt)]$	6,3652	0,9955	1,5222	0,961

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN SUSTRATO DEL MEDIO MODIFICADO CON ÁCIDO ÀCETICO						
Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza	
0	3	60	20,000	0,0000	0	
1	3	43,1085744	14,047	0,2421	0,478482653	
2	3	39,365313	12,833	1,5046	1,192911379	
3	2	11,9239476	5,870	0,1885	0,422245703	
4	3	19,7026284	6,459	0,3271	0,5562195	
6	3	18,50839	6,072	0,2134	0,449298388	
7	2	9,0115832	4,454	1,1567	1,045929723	
8	3	10,8387882	3,586	3,5237	1,825571483	
9	2	10,1297734	4,998	0,1800	0,412561169	
10	2	9,9889434	4,929	0,2956	0,528775582	
12	3	14,6045824	4,806	2,9234	1,662819246	
13	3	16,95926	5,570	0,0901	0,291905857	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	818,2570903	11	74,38700821	76,41326076	7,363E-14	2,30999121
Dentro de los grupos	19,46965945	20	0,973482972			
Total	837,7267497	31				

RESUMEN DE ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CB DEL MEDIO MODIFICADO CON ÁCIDO ACÉTICO						
Tiempo (días)	Cuenta	Suma	Promedio (g/L)	Varianza	Intervalo de confianza	
0	3	0	0,0000	0,00E+00	0,0000	
1	3	0,133	0,0443	9,03E-05	0,0095	
2	2	0,099	0,0495	1,44E-04	0,0120	
3	3	0,89	0,2967	1,61E-03	0,0401	
4	3	1,515	0,5050	1,17E-02	0,1081	
6	3	2,002	0,6673	3,30E-03	0,0575	
7	3	2,736	0,9120	1,17E-02	0,1081	
8	3	2,916	0,9720	1,31E-02	0,1144	
9	3	3,723	1,2410	7,76E-02	0,2786	
10	3	3,887	1,2957	1,65E-03	0,0407	
11	3	4,219	1,4063	6,51E-03	0,0807	
12	3	4,289	1,4297	6,26E-04	0,0250	
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	14,5521406	12	1,21267839	86,0287038	3,0681E-17	2,16489145
Dentro de los grupos	0,35240517	25	0,01409621			
Total	14,9045458	37				

Modelos utilizados para la producción de CB y el consumo de sustrato obtenidos por el programa SimFit.

BLANCO HS

Results for Monomolecular Model

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A	6.1159E+00	6.377E-02	5.965E+00	6.267E+00	0.0000
B	9.9956E-01	2.879E-02	9.315E-01	1.068E+00	0.0000
k	2.4555E+00	3.559E-01	1.614E+00	3.297E+00	0.0002
t-half	2.8211E-01	4.162E-02	1.837E-01	3.805E-01	0.0003

Parameter correlation matrix

1.000
-0.003 1.000
-0.367 0.081 1.000

Largest observed data size = 6.279E+00 Theoretical asymptote = 6.116E+00

Largest observed/Th.asymptote = 1.027E+00

Maximum observed growth rate = 1.501E+01 Theoretical maximum = 1.501E+01

Time when max. rate observed = 0.000E+00 Theoretical time = 0.000E+00

Minimum observed growth rate = 3.254E-10 Theoretical minimum = 3.254E-10

Time when min. rate observed = 1.000E+01 Theoretical time = 1.000E+01

Time at largest rel. resid. = 0.000E+00

Largest relative residual (%) = 200.00 %

Average relative residual (%) = 21.97 % R-squared = 0.994 (theory,size)

Unweighted sum of squares SSQ = 2.170E-01

Best-fit variance estimate = 1.761E-01

Sample average of size values = 5.447E+00

Estimated average coeff.var.% = 3.233

No. of negative residuals (m) = 4

No. of positive residuals (n) = 6

No. of runs observed (r) = 4

P(runs \leq r : given m and n) = 0.1905

1% lower tail critical value = 2

5% lower tail critical value = 3

P(runs \leq r : given m plus n) = 0.2539

P(signs \leq observed) (2 tail) = 0.7539

Durbin-Watson test statistic = 1.2689 < 1.5, +ve serial correlation

Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.8860

Significance level of W = 0.1530

Akaike AIC statistic = -9.277E+00

Schwarz SC statistic = -1.182E+01

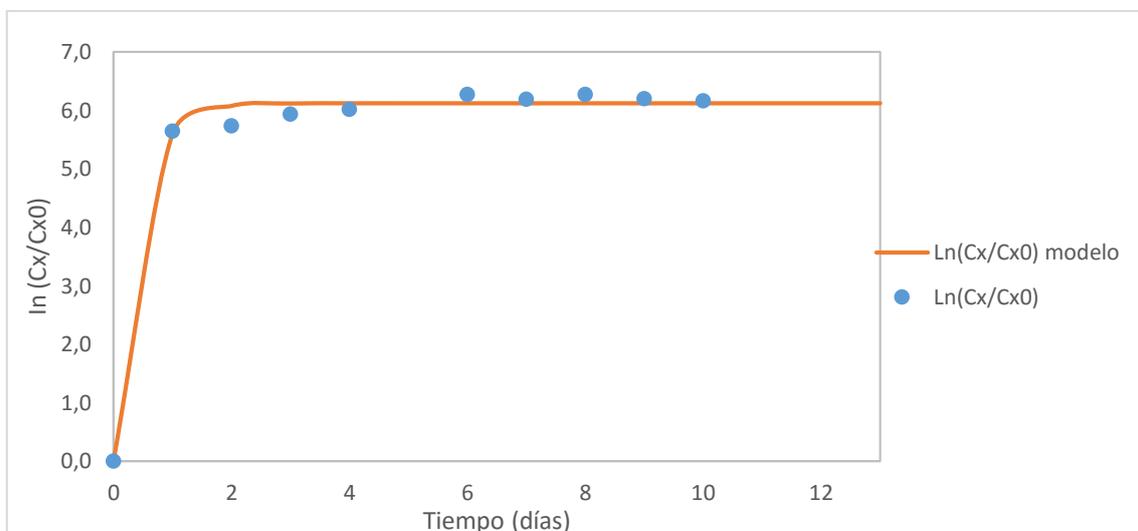


Figura 32 Grafica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio HS.

Model fitted for substrate is a summation of $A(i)\exp[-k(i)t] + C$

Parameter starting estimates

$$A(1) = 1.602E+01$$

$$k(1) = 5.414E-01$$

$$C = 4.217E+00$$

$$\text{WSSQ before fit} = 1.494E+01$$

$$\text{WSSQ after fit} = 1.494E+01 \text{ (IFAIL} = 0)$$

$$\text{Percent reduction} = 0.03\%$$

OK: The relative error in WSSQ is at most TOL

$$\text{No. data points} = 12$$

$$\text{No. parameters} = 3$$

$$\text{Rank of CV matrix} = 3 \text{ (TOL} = 1.000E-09)$$

For best-fit 1-exponential function

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	1.5983E+01	1.279E+00	1.309E+01	1.888E+01	0.0000
k(1)	5.3932E-01	9.597E-02	3.222E-01	7.564E-01	0.0003
C	4.2306E+00	5.528E-01	2.980E+00	5.481E+00	0.0000

$$\text{Initial time point (A)} = 0.000E+00$$

$$\text{Final time point (B)} = 1.300E+01$$

$$\text{Area from } t = A \text{ to } t = B = 8.461E+01$$

$$\text{Average over range (A,B)} = 6.508E+00$$

Parameter correlation matrix

$$1.0000$$

$$0.2060 \ 1.0000$$

$$-0.3074 \ 0.5952 \ 1.0000$$

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 1.4938E+01
Average % coeff. of variation = 17.57%
R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.9477
Largest Abs.rel.res. = 30.32%
Smallest Abs.rel.res. = 1.06%
Average Abs.rel.res. = 12.16%
Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 25.00%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 25.00%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 0.00%
Abs.rel.res. > 0.8 = 0.00%
No. of negative residuals (m) = 7
No. of positive residuals (n) = 5
No. of runs observed (r) = 7
P(runs \leq r : given m and n) = 0.6515
5% lower tail point = 3
1% lower tail point = 2
P(runs \leq r : given m plus n) = 0.7256
P(signs \leq least no. observed) = 0.7744
Durbin-Watson test statistic = 2.4877
Shapiro-Wilks W statistic = 0.9127
Significance level of W = 0.2312
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 8.6282E+00 (1.0083E+01)
Verdict on goodness of fit: good
Parameter starting estimates
A(1) = 1.363E+01
A(2) = 2.276E+00
k(1) = 5.845E-01
k(2) = 2.728E-01
C = 4.035E+00

MEDIO MODIFICADO CON ETANOL

Results for Monomolecular Model

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A	6.4862E+00	1.217E-01	6.211E+00	6.761E+00	0.0000
B	9.9511E-01	5.635E-02	8.676E-01	1.123E+00	0.0000
k	1.6295E+00	2.926E-01	9.675E-01	2.291E+00	0.0003
t-half	4.2238E-01	7.743E-02	2.472E-01	5.975E-01	0.0004

Parameter correlation matrix

1.000
-0.011 1.000
-0.374 0.183 1.000

Largest observed data size = 6.911E+00 Theoretical asymptote = 6.486E+00

Largest observed/Th.asymptote = 1.065E+00

Maximum observed growth rate = 1.052E+01 Theoretical maximum = 1.052E+01

Time when max. rate observed = 0.000E+00 Theoretical time = 0.000E+00

Minimum observed growth rate = 6.642E-09 Theoretical minimum = 6.642E-09

Time when min. rate observed = 1.300E+01 Theoretical time = 1.300E+01

Time at largest rel. resid. = 0.000E+00

Largest relative residual (%) = 200.00 %

Average relative residual (%) = 20.93 % **R-squared = 0.969**
(theory,size)

Unweighted sum of squares SSQ = 1.204E+00

Best-fit variance estimate = 3.658E-01

Sample average of size values = 5.817E+00

Estimated average coeff.var.% = 6.287

No. of negative residuals (m) = 5

No. of positive residuals (n) = 7

No. of runs observed (r) = 4

P(runs \leq r : given m and n) = 0.0758

1% lower tail critical value = 2

5% lower tail critical value = 3

P(runs \leq r : given m plus n) = 0.1133

P(signs \leq observed) (2 tail) = 0.7744

Durbin-Watson test statistic = 1.0854 < 1.5, +ve serial correlation

Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.9271

Significance level of W = 0.3499

Akaike AIC statistic = 8.228E+00

Schwarz SC statistic = 5.955E+00

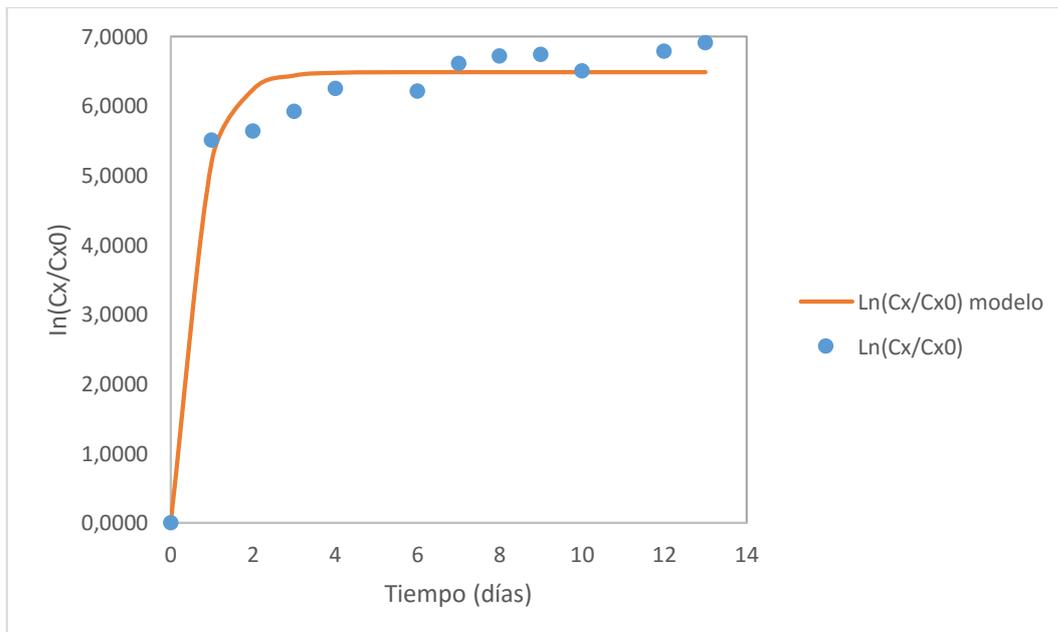


Figura 33 Gráfica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio modificado con etanol.

Model fitted for substrate is a summation of $A(i)\exp[-k(i)t] + C$

Parameter starting estimates

$$A(1) = 1.625E+01$$

$$k(1) = 1.538E-01$$

$$C = 3.748E+00$$

For best-fit 1-exponential function

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	1.5450E+01	4.483E-01	1.444E+01	1.646E+01	0.0000
k(1)	5.1982E-01	6.391E-02	3.753E-01	6.644E-01	0.0000
C	4.5504E+00	4.483E-01	3.536E+00	5.565E+00	0.0000

$$\text{Initial time point (A)} = 0.000E+00$$

$$\text{Final time point (B)} = 1.300E+01$$

$$\text{Area from } t = A \text{ to } t = B = 8.884E+01$$

$$\text{Average over range (A,B)} = 6.834E+00$$

Parameter correlation matrix

$$1.0000$$

$$-0.8353 \quad 1.0000$$

$$-1.0000 \quad 0.8353 \quad 1.0000$$

Goodness of fit

$$\text{Analysis of residuals: WSSQ} = 2.5911E+01$$

$$P(\text{chi-sq.} \geq \text{WSSQ}) = 0.0021 \quad \text{Reject at 1\% sig. level}$$

$$\mathbf{R\text{-squared, } cc(\text{theory,data})^2 = 0.9431}$$

$$\text{Largest Abs.rel.res.} = 30.54\%$$

$$\text{Smallest Abs.rel.res.} = 0.00\%$$

$$\text{Average Abs.rel.res.} = 12.07\%$$

Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 25.00%
Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 16.67%
Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 0.00%
Abs.rel.res. > 0.8 = 0.00%
No. of negative residuals (m) = 4
No. of positive residuals (n) = 7
No. of runs observed (r) = 6
P(runs =< r : given m and n) = 0.6061
5% lower tail point = 3
1% lower tail point = 2
P(runs =< r : given m plus n) = 0.6230
P(signs =< least no. observed) = 0.5488
Durbin-Watson test statistic = 2.0763
Shapiro-Wilks W statistic = 0.9745
Significance level of W = 0.9517
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 1.5237E+01 (1.6692E+01)
Verdict on goodness of fit: good
Parameter starting estimates
A(1) = 8.126E+00
A(2) = 8.126E+00
k(1) = 1.538E-01
k(2) = 1.538E-01
C = 3.748E+00

MEDIO MODIFICADO CON ÁCIDO ACÉTICO

Results for Monomolecular Model

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A	6.3652E+00	1.250E-01	6.083E+00	6.648E+00	0.0000
B	9.9545E-01	5.852E-02	8.631E-01	1.128E+00	0.0000
k	1.5222E+00	2.705E-01	9.103E-01	2.134E+00	0.0003
t-half	4.5236E-01	8.182E-02	2.673E-01	6.375E-01	0.0004

Parameter correlation matrix

1.000
-0.014 1.000
-0.383 0.203 1.000

Largest observed data size = 6.883E+00 Theoretical asymptote = 6.365E+00

Largest observed/Th.asymptote = 1.081E+00

Maximum observed growth rate = 9.645E+00 Theoretical maximum = 9.645E+00

Time when max. rate observed = 0.000E+00 Theoretical time = 0.000E+00

Minimum observed growth rate = 2.456E-08 Theoretical minimum = 2.456E-08

Time when min. rate observed = 1.300E+01 Theoretical time = 1.300E+01

Time at largest rel. resid. = 0.000E+00

Largest relative residual (%) = 200.00 %

Average relative residual (%) = 20.79 % R-squared = 0.967
(theory,size)

Unweighted sum of squares SSQ = 1.251E+00

Best-fit variance estimate = 3.729E-01

Sample average of size values = 5.690E+00

Estimated average coeff.var.% = 6.553

No. of negative residuals (m) = 6

No. of positive residuals (n) = 6

No. of runs observed (r) = 8

P(runs \leq r : given m and n) = 0.8247

1% lower tail critical value = 2

5% lower tail critical value = 3

P(runs \leq r : given m plus n) = 0.8867

P(signs \leq observed) (2 tail) = 1.0000

Durbin-Watson test statistic = 1.8134

Shapiro-Wilks W (wtd. res.) = 0.9559

Significance level of W = 0.7235

Akaike AIC statistic = 8.692E+00

Schwarz SC statistic = 6.419E+00

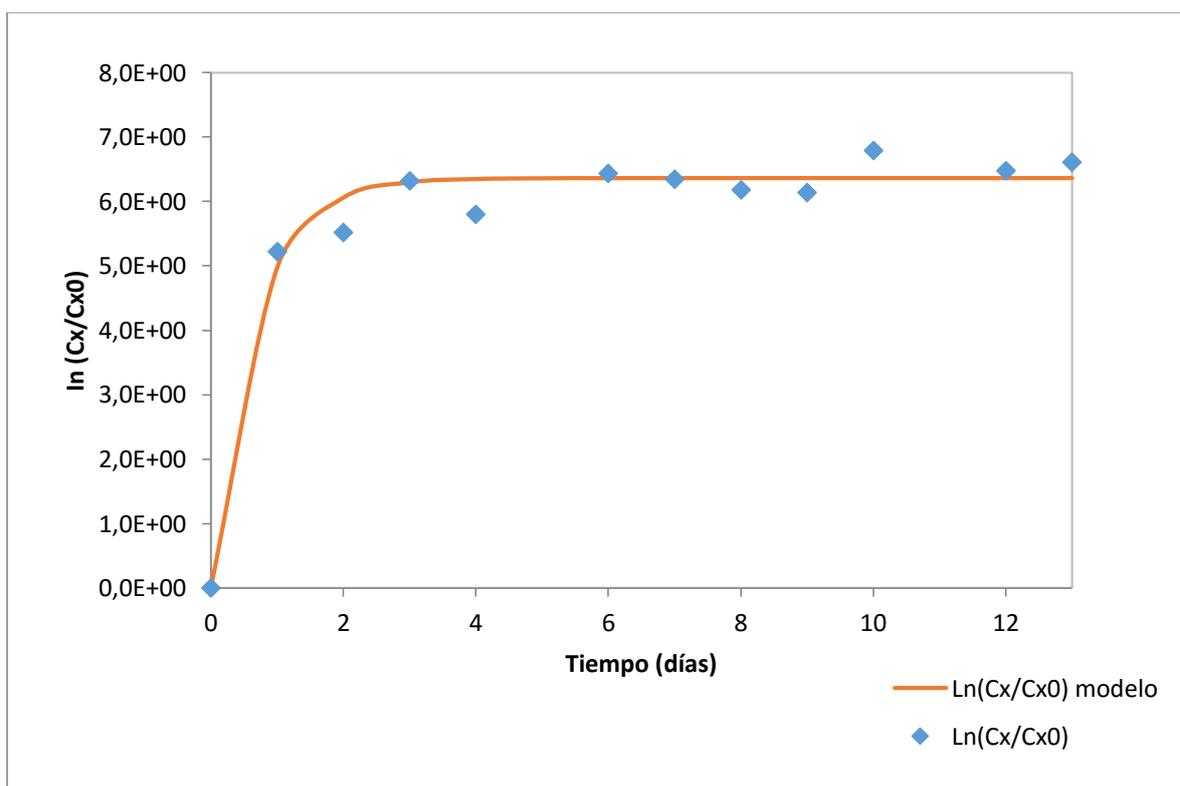


Figura 34 Gráfica del modelo y los datos obtenidos parametrizados para el medio modificado con ácido acético.

Model fitted for substrate is a summation of $A(i)\exp[-k(i)t] + C$

Parameter	Value	Std.error	Lower95%cl	Upper95%cl	p
A(1)	1.5721E+01	1.259E+00	1.287E+01	1.857E+01	0.0000
k(1)	4.9393E-01	8.973E-02	2.909E-01	6.969E-01	0.0004
C	4.5609E+00	5.747E-01	3.261E+00	5.861E+00	0.0000

Initial time point (A) = 0.000E+00

Final time point (B) = 1.300E+01

Area from t = A to t = B = 9.107E+01

Average over range (A,B) = 7.005E+00

Parameter correlation matrix

1.0000

0.1943 1.0000

-0.3121 0.6251 1.0000

Goodness of fit

Analysis of residuals: SSQ = 1.4760E+01

Average % coeff. of variation = 16.41%

R-squared, $cc(\text{theory}, \text{data})^2$ = 0.9474

Largest Abs.rel.res. = 32.32%

Smallest Abs.rel.res. = 0.76%

Average Abs.rel.res. = 12.41%

Abs.rel.res. in range 0.1-0.2 = 25.00%

Abs.rel.res. in range 0.2-0.4 = 25.00%

Abs.rel.res. in range 0.4-0.8 = 0.00%

Abs.rel.res. > 0.8 = 0.00%

No. of negative residuals (m) = 6

No. of positive residuals (n) = 6

No. of runs observed (r) = 6

$P(\text{runs} \leq r : \text{given } m \text{ and } n)$ = 0.3918

5% lower tail point = 3

1% lower tail point = 2

$P(\text{runs} \leq r : \text{given } m \text{ plus } n)$ = 0.5000

P(signs =<least no. observed) = 1.0000
Durbin-Watson test statistic = 2.5956 >2.5, -ve serial correlation
Shapiro-Wilks W statistic = 0.9599
Significance level of W = 0.7817
Akaike AIC (Schwarz SC) stats = 8.4841E+00 (9.9389E+00)
Verdict on goodness of fit: very good
Parameter starting estimates
A(1) = 1.324E+01
A(2) = 2.460E+00
k(1) = 5.042E-01
k(2) = 6.532E-01
C = 4.748E+00

Gráficas para el cálculo del Rendimiento

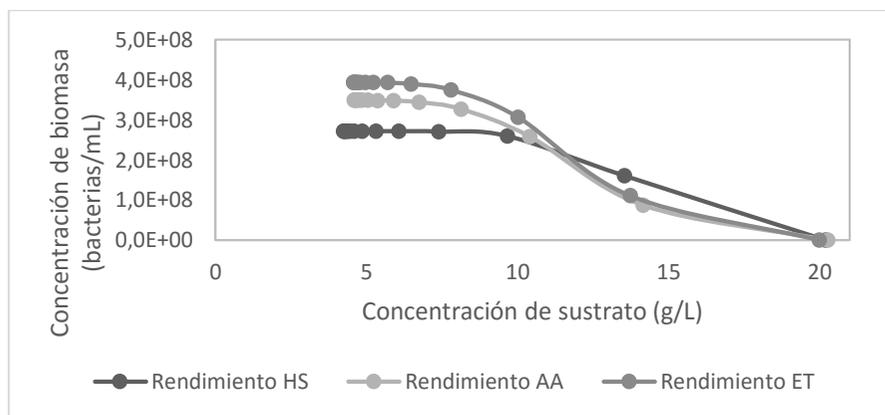


Figura 35 Gráfico para cálculo de rendimiento biomasa/sustrato

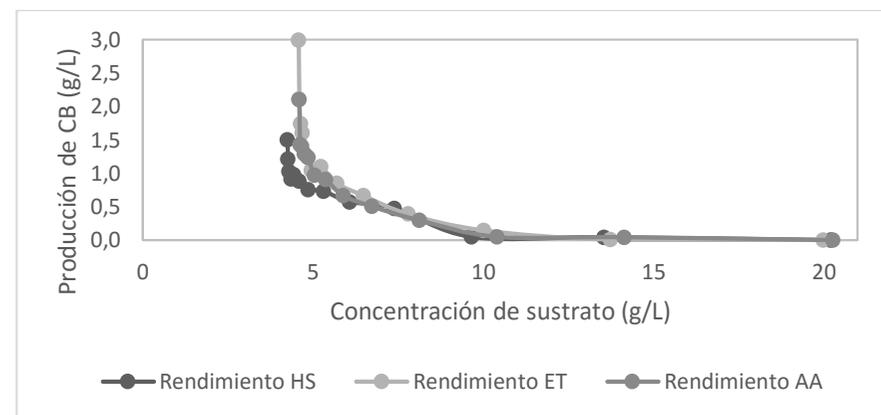


Figura 36 Gráfico para cálculo de rendimiento CB/sustrato