

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

<b>TITULO</b>	Evaluación de la producción de celulosa por <i>Acetobacter xylinum</i> ifo en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Perna Manrique, Olga		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	celulosa		aireación
	<i>Acetobacter xylinum</i>		consumo de sustrato
	melaza		cultivo estático
<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>La producción de Celulosa Bacteriana en un cultivo con melaza (Max MZA) y aireación intermitente representa un importante avance para la comunidad científica. El cultivo se llevó a cabo a un pH 5,6 y a 30°C. La incubación se realizó durante 1.5, 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se determinaron la producción de celulosa, grosor, comprensibilidad, ufc/mL y concentración de glucosa, fructosa, y sacarosa en los medios de cultivo a diferentes tiempos. La producción de celulosa hasta los 28 días en el medio Max MZA con aireación se incrementó en un rango del 20% en relación a las obtenidas en Estático; asimismo el consumo de sustrato incidió directamente en la producción de celulosa durante el tiempo de cultivo.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR  
*Acetobacter xylinum* IFO EN PRESENCIA DE MELAZA DE  
CAÑA BAJO CONDICIONES ESTÁTICAS Y/O DE FLUJO  
DE AIRE INTERMITENTE**

**OLGA PERNA MANRIQUE**



Universidad de  
**La Sabana**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS  
ÉNFASIS BIOPROCESOS  
CHÍA, 2013**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR  
*Acetobacter xylinum* IFO EN PRESENCIA DE MELAZA DE  
CAÑA BAJO CONDICIONES ESTÁTICAS Y/O DE FLUJO  
DE AIRE INTERMITENTE**

**OLGA PERNA MANRIQUE**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN DISEÑO  
Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**DIRECTORES**

**RUBÉN DARÍO JARAMILLO LANCHERO Ph.D**

**LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA. Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**ÉNFASIS BIOPROCESOS**

**CHÍA, 2013**

*A Dios principio y fin, guiador de este sueño que algunas veces sentí inalcanzable por quien tiene sentido mi vida y quien le dio fuerzas a mi espíritu y mi alma para poder culminar esta gran empresa.*

*A mis hijos, Nicolás y Jeremías mi razón de lucha.*

*A Hernando mi amor, este es uno de los tantos sueños compartidos.*

*A mi Mamá y mi Papá gracias por su apoyo incondicional, la sabiduría que los años les han regalado son invaluable.*

*A mis Hermanos, Jorge y Martha, solo me queda un agradecimiento eterno, les amo.*

*A mis sobrinos, Son parte de mi vida.*

*A mis amigas de quienes recibí tantas enseñanzas Nidia, Helen y Pili, las quiero.*

*“Dios permite siempre! que mi condición de ser , la Mujer, la Madre, la Esposa, la Hija, la Hermana, la Amiga y la Profesora. Prime sobre cualquier logro alcanzado”*

*Con Afecto sincero!!!*

*OLGA*



# AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su agradecimiento a:

Rubén Jaramillo, Ph.D director de esta investigación por su ayuda, sus consejos acertados.

Luis Eduardo Díaz, Ph.D codirector de esta investigación, por su apoyo, respaldo, comprensión y amistad.

Edgardo Escamilla Marvan, Ph.D , QEPD. Instituto de fisiología celular UNAM, por sus valiosas opiniones y aportes a este trabajo.

La Universidad de Sucre por permitirme trabajar en su Laboratorio de Investigaciones en Microbiología (LIM).

Jhon Víctor Vidal Durango ,MSc por su aporte en la parte Estadística de los resultados.

La Universidad Libre de Barranquilla por permitir hacer ensayos en su laboratorio de investigaciones, en especial al Microbiólogo José Luis Villareal.

La Universidad de La Sabana por hacer posible este sueño; y en especial a la MSc Clementina Cueto Vigil ,y a la MSc Ligia Consuelo Sánchez Leal por sus enseñanzas valiosas.

A la MSc, Esperanza Carvajal porque aun sin conocerla fue de ayuda, impulso y sostén en los momentos difíciles, su amabilidad y colaboración son valiosísimos para mí.

Al estudiante de Biología de la Universidad de Sucre Adrian Benito Revollo., por su ayuda en la parte experimental.

Gracias a Dios por su compañía en las noches de soledad y en cada instante de mi vida.

A Nidia, Helen y Pilar, su ayuda y amistad significan mucho para mí.

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

**PhD. Nubia Yineth Piñeros**

---

**PhD. Ruth Yolanda Ruíz**

---

**MSc. Catalina Aguilar**

**Chía , Junio de 2013**



**La Universidad no se hace responsable por las opiniones contenidas en el presente documento que son exclusiva responsabilidad del autor**

# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	15
1.OBJETIVOS.....	19
1.1 Objetivo General .....	19
1.2 Objetivos Específicos .....	19
2. Estado del arte de la investigación.....	20
3. Marco Teórico.....	25
3.1 Celulosa.....	25
3.1.1 Celulosa Bacteriana.....	25
3.1.1.1 Síntesis de Celulosa Bacteriana.....	26
3.1.1.2 Medios de cultivo para la producción de celulosa bacteriana.....	27
3.1.1.3 Técnicas de cultivo utilizadas en la producción de celulosa Bacteriana. ....	31
3.1.1.4 Acetobacter xylinum (Gluconacetobacter xylinus).....	34
3.1.1.5 Reactores utilizados en la producción de Celulosa Bacteriana.....	37
4. MATERIALES Y METODOS.....	38
4.1 Material Biológico.....	38
4.2 Mantenimiento de la cepa de <i>A. xylinum</i> .....	38
4.3 Producción de celulosa bacteriana .....	38
4.4 Determinación del grosor, peso húmedo y seco de las películas de celulosa.....	39
4.5 Medición de pH y volumen remanente del medio MZA.....	39
4.6 Determinación de la compresibilidad de la celulosa sintetizada.....	39
4.7 Cuantificación de la Fuente de Carbono. ....	40
4.8 Determinación de la formación de producto. ....	40
4.9 Coeficiente de Rendimiento del producto.....	41
4.10 Relación área-Volumen del biorreactor. ....	41
4.11 Diseño Estadístico.....	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5.1 Evaluación de la producción de acuerdo a las propiedades de la celulosa Obtenida.....	45

5.1.1	Peso de la celulosa húmeda.....	45
5.1.2	Peso de celulosa seca .....	48
5.1.3	Capacidad de retención de líquido.....	48
5.1.4	Grosor de la película de celulosa. ....	50
5.1.5	Compresibilidad de la Película de Celulosa Bacteriana. ....	51
5.1.6	Volumen de medio de cultivo remanente.....	52
5.1.7	pH del medio de cultivo. ....	53
5.1.8	Concentración de Células de <i>Acetobacter xylinum</i> .....	54
5.2	Relación área-volumen del biorreactor. ....	55
5.3	Consumo de Sustrato en relación a la cuantificación de sacarosa, Glucosa y Fructosa durante el tiempo de incubación (1.5; 3; 7; 14; 21; 28 días).....	57
5.3.1	Hidrólisis de la Sacarosa.....	59
5.3.2	Coefficiente de rendimiento de producto. (Yp/s).....	61
5.4	Costos de producción. ....	63
5.5	Análisis Estadístico.....	63
6.	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	65
6.1	Conclusiones.....	65
6.2	Sugerencias.....	66
	BIBLIOGRAFÍA.....	68
	Anexos.....	79

# Lista de figuras

	Pág.
Figura 3.1 Medio de cultivo estático .....	33
Figura 3.2 Medio de cultivo agitado .....	34
Figura 3.3 Vías Metabólicas del <i>Acetobacter xylinum</i> . <i>CS</i> :celulosa sintasa; <i>FBP</i> : fructosa bifosfatasa; <i>FC</i> :fructocinasa; <i>F1FC</i> : fructosa-1-p cinasa; <i>FGI</i> : fosfoglucoisomerasa; <i>FGM</i> :fosfoglucomutasa; <i>FTS</i> :fosfofructotransferasa; <i>GC</i> : glucocinasa; <i>GP</i> :glucosa permeasa; <i>G6P-DH</i> : glucosa-6-P deshidrogenasa; <i>UGP</i> : uridin difosfato glucopirofosforilasa. ....	36
Figura 3.4 Esquema de los reactores mas utilizados en la producción de celulosa bacteriana (CB). a. Reactor cónico convencional. b. Reactor cilíndrico convencional c. Reactor de tanque agitado. d. Reactor Airlift. e. Reactor de discos paralelos rotatorio.....	37
Figura 4.1 Diseño Experimental fase inicial en la producción de celulosa a partir de <i>A. xylinum</i> .....	42
Figura 4.2 Diseño de la Producción de celulosa en un Cultivo de <i>A. xylinum IFO</i> con melaza en solución al 13,3%. Dos condiciones de cultivo, Estático y Estático + aireación. ....	43
Figura 5.1 Producción de celulosa Húmeda en un Cultivo de <i>Acetobacter xylinum IFO</i> con melaza en solución al 13,3% .....	46
Figura 5.2 Producción de celulosa seca (g) a diferentes Tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días.....	47

<b>Figura 5.3 Producción de celulosa (g) y Crecimiento microbiano (ufc/mL) durante el tiempo de incubación. (1,5; 3; 7; 14; 21; 28) días.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 5.4 CRL( capacidad de retención de líquido) durante el tiempo de incubación. (1,5; 3; 7; 14; 21; 28) días.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 5.5 Grosor de la película de celulosa (mm) en diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 5.6 Porcentaje de compresibilidad a diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5.7 Volumen de Medio remanente (%) en diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 5.8 pH del medio de cultivo en los diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 5.9 Número de células (ufc/mL) en el medio remanente de cultivo durante el tiempo de incubación. (1,5;3,7,14,21,28) días.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 5.10 Diagrama del recipiente de cultivo A( Biorreactor Plástico cilindrico), 2000mL de medio de cultivo. B ( Biorreactor Cónico) , 2000mL de medio de cultivo.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura. 5.11 Concentración de Sacarosa con dos estrategias de cultivo y a diferentes tiempos de cultivo (1.5, 3, 7, 14,21, y 28 días).....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 5.12. Concentración de Glucosa A y Fructosa B con dos estrategias de cultivo.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 5.13 Regresión lineal de los datos obtenidos por la ecuación integrada de Michaelis- Menten con dos estrategias de cultivo .....</b>	<b>61</b>

**Figura 5.14 Coeficiente de rendimiento del producto en relación a la glucosa consumida durante el proceso en las dos estrategias de cultivo.....62**

**Figura 5.15 Coeficiente de rendimiento del producto en relación a la Fructosa consumida durante el proceso en las dos estrategias de cultivo.....62**

## **Lista de tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla. 3-1 Composición de la Melaza de Caña.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 3-2 Usos y Aprovechamiento de la melaza de caña.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5-1 Producción de celulosa en dos cantidades de medio de cultivo y dos condiciones de aireación.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabla 5-2 Valores Promedio del medio de cultivo para la producción de celulosa bacteriana.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 5-3 P-valores para el proceso de Producción de celulosa bacteriana.....</b>	<b>65</b>

# Lista de anexos

	Pág
ANEXO A. CONCENTRACIONES DE MELAZA (ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA ESCOGENCIA DE LA CONCENTRACION DE TRABAJO, 13, 3%).....	79
ANEXO B. MANTENIMIENTO Y VIABILIDAD DE LA CEPA ( <i>Acetobacter xylinum</i> ).....	80
ANEXO C. LOTE DE BIORREACTORES DE 3 LITROS, CON 1 LITRO DE MEDIO MELAZA (MZA)- PRELIMINARES.....	81
ANEXO D. BIORREACTOR CON PELÍCULA DE CELULOSA EN EL MEDIO MELAZA.....	82
ANEXO E PELÍCULAS DE CELULOSA HÚMEDA Y SECA SINTETIZADAS EN (MEDIO MELAZA), EN CONDICIONES ESTÁTICAS EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SUCRE.....	83
ANEXO F. BIORREACTORES CILÍNDRICOS PLÁSTICOS DE 6 LITROS CON 2 LITROS DE MEDIO MZA (AIREACIÓN).....	84
ANEXO G. PELICULA DE CELULOSA SINTETIZADA EN LOS BIORREACTORES CILÍNDRICOS CON 2 LITROS DE MEDIO MZA (AIREACIÓN).....	85
ANEXO H. ANALÍISIS DE VARIANZA OBTENIDOS CON EL SOFTWARE STATGRAPHICS CENTURION XVI.I.....	86
ANEXO I. CERTIFICADO DE PONENCIA EN EL I CONGRESO INTERNACIONAL DE	



**INGENIERÍA QUÍMICA BIOTECNOLÓGICA Y ALIMENTARIA (CIIQBA, 2010) ISBN 978-959-261-317.1.....92**

**ANEXO J PARTICIPACION EN ELXLVI CONGRESO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACCB 2011, CON PONENCIA.....94**

**ANEXO K CARTA DONDE CONSTA QUE SE VA A SOMETER UN ARTICULO CIENTÍFICO A LA REVISTA MVZ CATEGORÍA A1..... ..97**

## RESUMEN

La explotación masiva de los recursos fósiles y los problemas de contaminación han aumentado la preocupación en relación al medioambiente y la economía de los países debido al predecible agotamiento de estos recursos en el futuro. Estas razones han dado lugar al establecimiento de una economía de materiales renovables. En relación a esta, podemos categorizar a los polímeros a partir de recursos renovables como polisacáridos, proteínas y otros; dentro de estas se encuentra la celulosa que es el biopolímero más abundante que existe en la naturaleza, proveniente principalmente de fuentes de origen vegetal. La celulosa producida por *Acetobacter xylinum* es celulosa pura, que no contiene hemicelulosa, pectina y lignina; Se diferencia de la vegetal por no tener la cavidad intracelular. Además, extracelularmente sintetiza microfibrillas que la diferencian de la celulosa obtenida de las plantas por su alta cristalinidad, alta capacidad de absorción de agua y resistencia mecánica. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la melaza y de las condiciones del cultivo (Estático y Estático –Aireación) sobre la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum*, en un reactor cilíndrico de seis litros de volumen, con dos litro de medio de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo melaza (MZA) a pH 5,6. El volumen del inóculo fue el 10% v/v del medio de cultivo; la incubación se realizó en condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente a temperatura ambiente (30°C). Se determinaron la formación de celulosa, el rendimiento del producto, grosor, pH, compresibilidad, volumen, UFC y concentración de glucosa, fructosa, y sacarosa en los medios remanentes del cultivo a diferentes tiempos. La producción de las biopelículas hasta los 28 días de incubación en el medio MZA (Estático-Aireación) se incrementó en un rango del 7 al 9 % en relación a las obtenidas en el medio MZA (Estático); sin embargo, la compresibilidad de la celulosa que se midió utilizando el método de Budhiono (1999), es semejante para las dos condiciones de cultivo, ya que los valores a los 28 días muestran un descenso hasta un porcentaje del 5-6%. El pH del medio se disminuyó hasta 4.6, sin afectar la síntesis de celulosa; asimismo se evaluó el consumo de sustrato (melaza) en relación a la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa presentes en el medio de cultivo durante el proceso de producción de la celulosa, mostrando un significativo consumo de glucosa durante el tiempo de incubación.

El medio de cultivo melaza sin tratamiento y sometido a aireación superficial, demostró ser eficiente en la producción de celulosa, debido a las sustancias que contiene la melaza y a la cantidad de azúcares que posee, en contraste con la utilización de azúcares puros en la síntesis del polímero, además debido a lo económica que es la melaza, disminuye los costos de producción, en conjunto con la utilización de reactivos de grado industrial utilizados en el medio.

**Palabras Clave:** Celulosa bacteriana, *Acetobacter xylinum*, melaza, aireación intermitente, consumo de sustrato.

## Abstract

The massive exploitation of fossil resources and pollution problems have raised concerns regarding the environment and the economy of the countries due to predictable depletion of these resources in the future. These reasons have led to the establishment of an economy of renewable materials. In relation to this, we can categorize the polymers from renewable resources such as polysaccharides, proteins and others of these is located inside the cellulose is the most abundant biopolymer that exists in nature, primarily from plant sources. The cellulose produced by *Acetobacter xylinum* is pure cellulose, it does not contain hemicellulose, pectin and lignin from the plant is distinguished by not having the intracellular cavity. Furthermore, the microfibrils synthesized extracellularly differ from plant cellulose obtained by its high crystallinity, high water absorption capacity and mechanical strength. This study aimed to evaluate the effect of molasses and culture conditions (Static and Static-aeration) on cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a cylindrical reactor six liters of volume, with two liters of medium cultivation.

We used the molasses medium (MZA) at pH 5.6. The inoculum volume was 10% v / v of the culture medium, incubation was performed in static conditions and / or intermittent flow of air at room temperature (30 ° C). Formation was determined cellulose, product performance, thickness, pH, compressibility, volume, UFC and glucose, fructose, and sucrose in the culture media remaining at different times. The production of biofilms to 28 days of incubation in the medium MZA (Static-aeration) increased in the range of 7 to 9% compared to those obtained in the middle MZA (Static), however, the comprehensibility of the cellulose measured using the method of Budhiono (1999), is similar for the two culture

conditions, since the values at 28 days show a decrease to a percentage of 5-6%. %. The medium pH was lowered to 4.6, without affecting the synthesis of cellulose also was assessed substrate consumption (molasses) in relation to the quantification of sucrose, fructose and glucose present in the culture medium during the production process cellulose, a significant glucose consumption during the incubation time.

**Keywords:** bacterial cellulose, *Acetobacter xylinum*, molasses, intermittent aeration, substrate consumption.

# INTRODUCCIÓN

La celulosa es el material más abundante de la naturaleza y el principal polisacárido estructural de la pared celular en las plantas superiores, algunos hongos y algas; también es sintetizada por microorganismos de los géneros *Agrobacterium*, *Sarcina*, *Rhizobium* y *Acetobacter* (1); la bacteria gram negativa *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*), aerobio estricto, produce en cultivos estáticos una película de celulosa sobrenadante en la superficie del cultivo permitiéndole estar en la interfase aire-líquido y así obtener una mayor cantidad de oxígeno; propiciando un aumento en la retención de humedad y facilitando el crecimiento bacteriano (2). La bacteria sintetiza celulosa a partir de una amplia gama de fuentes de carbono, puede metabolizar glucosa mediante las vías de la pentosa fosfato y el ciclo de Krebs. La biosíntesis de celulosa ocurre en la membrana citoplasmática de la bacteria involucrando algunas reacciones que generan una microfibrilla que se excreta al exterior, formando fibras ramificadas con una longitud aproximada entre 180 y 960  $\mu\text{m}$  (3). La celulosa bacteriana dada su alta pureza, grado de polimerización y estructura se utiliza en diversas aplicaciones industriales como la estabilización de emulsiones, la fabricación de materiales de alta absorción acuosa, como reparador de documentos, aditivo para alimentos, técnicas cromatográficas, piel temporal para terapia de quemaduras, implantes dentales y diafragmas de alta sensibilidad para audífonos (1).

La producción de celulosa bacteriana (CB) por *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) se realiza en cultivos a partir de sustratos económicos como el licor de maíz, la sacarosa, la remolacha, los jugos de frutas, la melaza entre otros; en este trabajo se utilizó como fuente de carbono principal la melaza de caña debido a que se considera como una alternativa importante por su composición, además reduce costos a los procesos biotecnológicos; un aspecto determinante dentro de la producción de celulosa bacteriana es el oxígeno, donde se ha comprobado que actúa como sustrato limitante en las fases iniciales del cultivo (4).

El trabajo que se presenta aborda la evaluación de la producción de celulosa en medio melaza, con un reactor de configuración cilíndrica, a temperatura ambiente y pH ácido. Se desarrolló en dos etapas; en la primera, se evaluaron todas las variables anexas al

proceso en una estrategia de cultivo estático y en la segunda etapa se evaluaron las variables pero con una estrategia de cultivo estático con aireación intermitente; observando la manera en que influyen la fuente de carbono utilizada junto con la aireación y las condiciones generales del cultivo sobre la síntesis de CB. El alcance principal de este estudio es el establecimiento de un medio de cultivo donde se utilice la melaza como fuente de carbono bajo condiciones de aireación superficial en un cultivo de *Acetobacter xylinum* incrementando la producción de celulosa al menos en un 10% y que sirva como base para estudios posteriores, en la búsqueda de un proceso estable para su producción, de tal manera que se genere interés económico en el producto microbiano (CB) y se presente un aporte social positivo al desarrollo del Departamento de Sucre y la costa Caribe dirigido a la generación de empleo.

# 1. OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo General

Evaluar la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente para lograr un alto rendimiento en el proceso de producción de CB utilizando estrategias de cultivo que garanticen la síntesis.

## 1.2 Objetivos Específicos

- Establecer el efecto de la aireación sobre la producción de CB.
- Determinar el espesor, peso húmedo, peso seco y compresibilidad de la CB producida.
- Determinar el consumo de sustrato (melaza) en relación a la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa presentes en el medio de cultivo durante el proceso de producción de celulosa bacteriana.

## 2. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

La celulosa bacteriana fue descrita por primera vez en 1886 por A. J Brown. Brown observó que algunos microorganismos utilizados para la producción de ácido acético eran capaces de producir una membrana en la superficie del medio de cultivo en presencia de glucosa y oxígeno; a los cuales nombró como bacteria *xylinum*. Esta especie que pertenece a la familia *Acetobacteriae*, fue, sin embargo reclasificada taxonómicamente varias veces hasta el nombre actual *Gluconacetobacter xylinus*. Aunque también se conoce a menudo como *Acetobacter xylinum*. (5)

Schramm y Hestrin (1954), realizaron uno de los primeros trabajos sobre producción de celulosa bacteriana. Concluyeron que la producción de celulosa es función del suministro de oxígeno tanto para cultivo estático como agitado, pues bajo una atmósfera de nitrógeno no hubo producción significativa mientras que la producción óptima se encontró utilizando aire enriquecido (6). Posteriormente Hestrin y Schramm, desarrollaron un medio definido, usado como referencia para estudios de celulosa bacteriana, compuesto por: glucosa 2% (p/v), peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, fosfato disódico 0.27%, ácido cítrico 0.115% y pH 6.0. Este medio es conocido como H-S.(6)

Estudios posteriores se encaminaron a describir la síntesis del biopolímero, así como la ruta oxidativa de la fuente de carbono.

Dudman (1959), presentó un estudio acerca del efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulosa y encontró que el uso de glicerol como fuente de carbono aumenta la producción de celulosa en un 40%, comparado con glucosa y fructosa. En el caso de las fuentes de carbono complejas, este mismo autor muestra cómo al utilizar melaza hidrolizada se obtienen producciones hasta 88% superiores a las alcanzadas en medios con glucosa como fuente de carbono.(7) Así mismo Embuscado y colaboradores (1994), a través de un estudio de optimización con dos fuentes de carbono, sacarosa y fructosa, encontraron que las concentraciones que permiten la máxima producción de celulosa son 24.8 y 76.5 g/l respectivamente.(8), lo que es muy significativo en la búsqueda del medio de cultivo ideal para la producción de celulosa bacteriana (CB), por lo



que además evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de celulosa: la glucosa presentó las menores producciones, mientras la fructosa, fructosa + sacarosa y fructosa + lactosa presentaron las mayores producciones. El comportamiento de la glucosa se explica por el descenso drástico de pH que sufre el medio al usar esta fuente de carbono, mientras que con las otras este descenso es menor. De las fuentes de nitrógeno estudiadas, se encontró que las mayores producciones de celulosa se presentaron al combinar extracto de levadura y peptona. (8). Más adelante los señores Oikawa y colaboradores (1995), usaron arabitol como fuente de carbono y obtuvieron celulosa en cantidad seis veces superior al cultivo empleando glucosa. El pH final del medio al usar arabitol fue 5.8 mientras que con glucosa fue 3.4. El descenso del pH se debe a que se presenta mayor producción de ácido cetoglucónico, cuando se usa glucosa, comparada con el arabitol, caso en el cual su producción es muy baja. En otros ensayos estos mismos autores utilizaron manitol como fuente de carbono y obtuvieron una producción de celulosa tres veces superior a la alcanzada con glucosa por las razones ya expuestas.(9); de igual forma Budhiono y colaboradores, (1999), utilizaron agua de coco con algunos suplementos para evaluar la producción de celulosa; se concluyó que agregar sacarosa 1% (p/v) es suficiente para obtener la máxima producción de celulosa. En cuanto a la fuente de nitrógeno, el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  mostró el mejor comportamiento.(10). Así mismo Ramana y colaboradores (2000) evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y encontraron que usar sacarosa o manitol como fuente de carbono en cultivo estático aumenta la producción con respecto a la glucosa; las fuentes de nitrógeno que reportaron las mejores productividades fueron la peptona y el hidrolizado de caseína, y las de menor producción fueron el sulfato de amonio y la harina de soya.(11), ya mas adelante se probaron fuentes de carbono como la xilosa por Ishihara y colaboradores (2002), quienes la evaluaron como fuente de carbono y encontraron que presenta producciones menores que las obtenidas con glucosa.(12). En el año 2004 los señores Bae y Shoda utilizaron melaza como fuente de carbono en la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum BPR2001* y trabajaron con un fermentador de jarra. Su propósito fue mejorar la producción de celulosa (CB) y para esto la melaza fue sometida a tratamiento térmico y ácido con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Donde se incrementó la producción de celulosa, hasta en un 76%, pero con una estrategia de cultivo por lotes alimentado, utilizando en el medio además de la melaza, vitaminas.(13), al año siguiente Bae y Shoda

(2005) evaluaron la producción de celulosa bacteriana (CB) por *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001 usando en el medio de cultivo melaza y reactivos de grado analítico, se utilizó un fermentador de jarra pero en un estrategia fed-bach. En este estudio la melaza se sometió a tratamiento (ácido+ calor) usando  $H_2SO_4$  donde la cantidad de Celulosa bacteriana aumento considerablemente en relación a la melaza no tratada , en cultivo estático. Las concentraciones de melaza en el medio no fueron especificadas, sin embargo en el medio se utilizó también vitaminas que contribuyó considerablemente en el aumento de la producción de celulosa.(14). Se empezó a utilizar fuentes de carbono alternativas que de igual manera presentaran mejores rendimientos en la producción de CB, es así como Keshk y colaboradores (2006), emplearon melaza de remolacha como fuente de carbono y obtuvieron un aumento en la producción de celulosa de 31% con respecto al uso de glucosa como única fuente de carbono; este aumento se atribuye a la cantidad de micronutrientes adicionales presentes en la melaza, especialmente sulfuros y nitrógeno orgánico, que favorecen el crecimiento del microorganismo.(15).

En aras de encontrar medios de cultivo que fueran eficientes para la producción de CB y que además disminuyeran los costos del proceso , Premjet y Colaboradores (2007), Evaluaron la forma de reducir el costo de producción de celulosa por *Acetobacter xylinum ATCC 10245* en escala de laboratorio mediante el uso de melaza negra como fuente de carbono. Realizaron ensayos para identificar cual componente de la melaza era el eficaz para mejorar el rendimiento. Además midieron propiedades físicas y observaron la estructura por microscopía electrónica, determinaron que los rendimientos de celulosa se incrementaron considerablemente a partir del componente de color negro de la melaza.(16), y se siguieron haciendo estudios que ayudaran a identificar la mejor fuente de carbono para la producción de CB y es así como Surma-Ślusarska y colaboradores (2008), emplearon en su estudio diversas fuentes de carbono para producir celulosa: glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, xilosa y manitol; todas comparables entre si y las que presentaron las mayores producciones fueron la glucosa y el manitol.(17).

Continuando con los estudios internacionales Kurosumi y colaboradores (2009), utilizaron jugo de diversas frutas como fuente de carbono para la producción de celulosa y encontraron que al suplementar los jugos con las fuentes de nitrógeno en las cantidades propias del medio H-S, la producción de celulosa aumenta desde 200% para el jugo de

---

naranja, hasta 1800% para el jugo de manzana.(18). Así mismo Mikkelsen y colaboradores (2009), encontraron que la sacarosa y el glicerol presentan producciones similares y más altas que las obtenidas con manitol, glucosa y fructosa, con respecto a las cuales el aumento en la producción es 12, 19 y 26% respectivamente.(19)

En Canadá, Zeng y colaboradores (2011) Buscaron optimizar la producción de celulosa a partir de *Acetobacter xylinum* BPR 2001 usando como fuente de carbono el jarabe de arce en el medio de cultivo y comparándolo con fuentes de carbono tradicionales utilizadas para la producción de CB como glucosa, fructosa y sacarosa, pero utilizando la metodología de área de superficie de respuesta que minimiza la cantidad de experimentos al optimizar las condiciones de cultivo. Se concluyó que el jarabe era una fuente de carbono adecuada por ser un recurso renovable abundante en el área donde se realizó el estudio. El estudio fue significativo en relación al uso de la nueva metodología de superficie de respuesta con los diseños convencionales de un factor en el tiempo, que presentan desventajas que interfieren en la producción de celulosa bacteriana.(20), lo cual resultó ser novedoso por cuanto se puede aplicar esta metodología para estudios con melaza como el actual.

Siguiendo con los estudios para evaluar factibilidad económica del proceso de producción Jyh-Ming Wu y Ren-Han Liu (2012) estimaron la conveniencia económica de la utilización de las vinazas de destilería , siendo una fuente económica y que podría reemplazar al medio Hestrim –Schramm en la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus*, esto debido la riqueza de componentes benéficos para el desarrollo celular, el costo efectivo de la utilización de las vinazas en relación al Hestrim Schramm resultó ser 67% menor, obteniendo películas de celulosa mas cristalinas pero con menor capacidad de retención de agua, esto no solo disminuye costos sino que contribuye significativamente en resolver el problema de aguas residuales de la industria vitivinícola.(21)

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 CELULOSA

La celulosa es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, formados por un gran número de unidades estructurales que se forman por la unión de monosacáridos, mediante enlaces glucosídicos, con pérdida de una molécula de agua. Este tipo de enlace se establece entre el radical -OH del carbono hemiacetálico (carbono que porta el grupo aldehído o el cetónico en la fórmula lineal del monosacárido) y el grupo alcohol de otro monosacárido. El enlace glucosídico puede ser  $\alpha$ -glucosídico cuando el primer monosacárido es  $\alpha$  (el grupo -OH unido al carbono hemiacetálico está hacia arriba), o  $\beta$ -glucosídico cuando el primer monosacárido es  $\beta$  (el grupo -OH está hacia abajo); realizan una función estructural los que presentan enlaces  $\beta$ -glucosídico, y los que realizan una función de reserva energética presentan el enlace  $\alpha$ -glucosídico (22). De ella se conocen diferentes estructuras seis en particular como (I, II, III1, III2, IV1y IV2), las cuales se pueden transformar unas en otras.(22)

La celulosa tiene muchas aplicaciones entre las que se encuentran la fabricación de textiles, del papel, explosivos, alimentos, farmacéutico, resinas cromatográficas, área ambiental, absorción de gases tóxicos etc. y el uso biotecnológico (23,24). La celulosa utilizada industrialmente proviene de fuentes vegetales; sin embargo la celulosa bacteriana ha tomado gran auge en los últimos años debido a las significativas ventajas sobre la celulosa vegetal por sus fibras ultrafinas, alta fuerza mecánica (fuerza tensil), biodegradabilidad, capacidad para absorber agua y alta cristalinidad (25,26) .

#### 3.1.1 CELULOSA BACTERIANA

Es un polímero lineal no ramificado de glucopiranososa que presenta un enlace covalente entre el carbono 1 y el 4 ( $\beta$  1-4) formando una cadena lineal, plana, insoluble en agua y difícil de hidrolizar (27), por sus puentes de hidrogeno es soluble en algunos solventes orgánicos, ácidos concentrados como (el ácido fosfórico 85% v/v, ácido sulfúrico 72%v/v, ácido clorhídrico 40% v/v y en sales inorgánicas (sales de cadmio y etilendiamino). Entre las propiedades químicas de la celulosa se cuentan su susceptibilidad a ser hidrolizada

por vía química (ácidos) o vía enzimática, su estabilidad a los oxidantes la hace competitiva en el blanqueamiento de la pulpa y en los métodos en los cuales selectivamente oxidan lignina (28).

La Celulosa Bacteriana es químicamente pura, libre de lignina y hemicelulosa lo que la hace más resistente y disminuye los costos de extracción y purificación con respecto a la celulosa de origen vegetal. En condiciones estáticas de cultivos esta se produce en forma de una película superficial en la interfase aire-líquido a temperatura ambiente, la película es visiblemente plana y puede ser procesada posteriormente con un tratamiento alcalino (29); mientras, que en condiciones de agitación es producida como suspensión fibrosa con una alta viscosidad que a su vez implica una gran fuerza de agitación si se desea mantener un alto coeficiente de transferencia de oxígeno (30).

#### **3.1.1.1 Síntesis de Celulosa Bacteriana.**

Esta ocurre en el interior de la célula, la polimerización es realizada por la celulosa sintasa, proteína integral de membrana, debe ser activada para catalizar la biosíntesis de la celulosa a partir de glucosa transformada en UDP-Glucosa para ir formando y alargando las cadenas 1,4  $\beta$ -glucano (31, 32). El ácido diguanílico cíclico (di-GMPc) actúa como regulador alostérico para la actividad de la celulosasintasa en *Acetobacter xylinum* (31). El proceso de ensamblaje comienza con la reacción de la celulosasintasa y culmina en la construcción de una hebra enrollada de fibras conteniendo cerca de 1000 cadenas glucano en total. Las fibrillas se forman por el racimo de microfibrillas excretadas de poros alineados sobre la superficie de la célula en hilera, alineados a lo largo de su eje. La velocidad de crecimiento de las fibrillas se retrasa por factores tales como la falta de nutrientes y la disminución de la actividad de la enzima por aumento de la edad celular (33); finalmente, por cada tres moléculas de glucosa, una es completamente oxidada y dos son convertidas a celulosa (34). El complejo celulosa sintasa de *Acetobacter xylinum* está formada por cuatro subunidades de diferentes pesos moleculares. Las cuales se encuentran codificadas en el operon bcs (6,15).

La celulosa bacteriana, ha cobrado gran importancia en sectores industriales y académicos que la han adoptado como modelo de estudio, ven en ella propiedades únicas como la alta cristalinidad, biodegradabilidad, buen comportamiento mecánico, sus

fibras ultrafinas y su alta capacidad para absorber agua la presentan como una excelente materia prima en la producción de alimentos, medicinas y papel entre otros (9), sin embargo los métodos reportados como procesos estáticos de cultivos no responden satisfactoriamente, en términos de cantidad, a la creciente demanda de este producto, debido a los bajos coeficientes de transferencia de oxígeno (35); en este sentido ha sido necesario el desarrollo y establecimiento de estrategias de cultivo que garanticen una alta producción de celulosa y su viabilidad económica. Las investigaciones tendientes a lograr una buena producción de celulosa han sido muy extensas y abarcan hoy todos los factores que pueden afectar su producción, entre estos se pueden mencionar la fuente y la concentración de los sustratos, características del reactor, condiciones del medio y los efectos de la presión y coeficiente de transferencia del oxígeno sobre el medio.

### **3.1.1.2 Medios de cultivo para la producción de celulosa bacteriana.**

En los estudios científicos se ha indicado que el *A. xylinum* posee la capacidad de crecer y producir celulosa en diversos sustratos, dando lugar a múltiples investigaciones sobre el medio óptimo de crecimiento para obtener mayores rendimientos en la producción y una celulosa de mejor calidad (11,14,18,36)

El medio de cultivo utilizado y más antiguo y modelo por el cual muchos científicos se han guiado es el de Hestrim Schramm (HS) formulado desde 1954 y que consiste básicamente en glucosa 2.0% p/v, peptona 0.5% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v, ácido cítrico 0.12% p/v y fosfato disódico 0.27% p/v (37); posteriormente, reportaron diversas variaciones del medio, donde cambia la fuente de carbono principalmente, tratando de demostrar con esto cual es el sustrato más eficiente para la producción tanto en el laboratorio como en la industria (12). En los últimos años se han reportado grandes avances en materia de producción asociado a los medios de cultivo entre los que se encuentran:

La utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de celulosa bacteriana como la lactosa, galactosa, ácido cítrico, almidón, maltosa, sacarosa, manitol, fructosa y glucosa, de las que sobresalen la sacarosa, el manitol y la glucosa pues se logra un mayor rendimiento en la producción (36,18); de nitrógeno fueron utilizadas: hidrolizado de caseína, sulfato de amonio, glicina, soya, peptona, y glutamato de sodio,

mostrando un mayor rendimiento el hidrolizado de caseína y la peptona, en presencia de sacarosa, manitol o glucosa (36). La adición de polisacáridos como agar o xantano al 0,1% a un cultivo estático causa una disminución de la producción, debido a que se reduce la transferencia de oxígeno. (39,40)

Se han realizado variaciones al medio de cultivo donde reemplaza la fuente de carbono (glucosa) por sacarosa, xilosa y lactosa, dando como resultado mejores rendimientos en relación a la velocidad de consumo por parte de la sacarosa (93.5%) y por lo tanto una mejora en el proceso, lo cual incrementa la producción de celulosa, sin embargo aún se siguen utilizando reactivos analíticos que no disminuyen los costos de producción (38). Por otro lado, se reportó el reemplazo de la glucosa por jugos de frutas (naranja, piña, manzana, pera y uva japonesa) en el medio de cultivo HS con la posibilidad de producir celulosa bacteriana (39) incrementándose la producción de celulosa por la adición de fuentes de nitrógeno, a los jugos, donde los resultados se enfocaron a determinar la eficiencia y comportamiento de la producción utilizando estos últimos.

Las investigaciones se dirigen a la implementación de un medio de cultivo de bajo costo económico, de allí que se han realizado avances en la utilización de la melaza de caña como fuente de carbono en el medio de cultivo, el jugo de tomate y el zumo de ahuyama (14,41)

- **Melaza de caña de Azúcar**

Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, se definen como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. La Norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza (no cristizable) al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (ICONTEC, 1994). La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida, donde el proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (43).

La melaza contiene azúcares fermentables como la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa que normalmente están presentes en el jugo de caña, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar. Las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 3-1). La melaza es un producto residual de un conjunto de tratamientos a que es sometido el jugo de la caña de azúcar, cuya composición suele ser muy compleja, debido a la gran cantidad de constituyentes que tiene, como la sacarosa, glucosa y fructosa y un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos: vitaminas, ácidos orgánicos, sustancias cromóforas derivadas del furfural y de reacciones de color café no enzimático.(43).

Además la melaza de caña de azúcar es un sustrato económico que aporta los nutrientes para el crecimiento y reproducción de la bacteria *A. xylinum*, contiene compuestos que favorecen el desarrollo de la biomasa como altos contenidos de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa), proteínas, grasas, calcio, fósforo, aminoácidos y vitaminas entre otros (44). en la Tabla 2-1 se pueden observar los diferentes componentes y constituyentes de la melaza de caña.

**Tabla. 3-1 Composición de la Melaza de Caña**

Componentes	Constituyentes	Contenido
Componentes Mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 - 63 % p/p
	Fructosa	15.4%p/p
	Glucosa	12.2%p/p
	Azucares reductores	3 - 5 % p/p
	Sustancias disueltas	4 - 8 %
	Agua	16%
	Grasas	0,40%
	Cenizas	9%



**Tabla 3-1 (Continuación)**

Componentes	Constituyentes	Contenido
Contenido de Minerales	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Fosforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de Aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0.02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Acido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

Fuente: Adaptado de Tellez, 2004 ; Hernández Domínguez y col, 2003

La melaza de caña tiene diversos usos como alimento para el ganado de carne y de leche y como principal aditivo para facilitar la reducción a comprimidos de las raciones convencionales mezclados en seco; también, ha sido utilizada como vehículo en varios tipos de alimentos líquidos, como suplemento para el ganado en pastoreo solo o adicionado con otros componentes como urea y ácido fosfórico; igualmente, ha sido común como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos, en donde constituye un subproducto de primer orden para su alimentación, puede ser utilizada a niveles hasta de 40%, logrando alimentación adecuada en los animales (45). De igual manera, se usa como fertilizante para suelos, mezclada con bagazo y otros componentes, en casos especiales de abundancia. También es frecuentemente utilizada como combustible, para la preparación de pavimentos. Los diferentes usos de la melaza se resumen en la Tabla 3-2.

**Tabla 3-2 Usos y Aprovechamiento de la melaza de caña.**

<b>USOS</b>	<b>GENERALIDADES</b>
Alimentos	Endulzantes, productos de galletería, rica en hierro, cobre y magnesio
Animales	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla con diversos suplemento de ensilajes, alimentos, pulverizado de forrajes
Recuperación de líquidos desazucarados	Vinazas para la obtención de ácido glutámico.  Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos
Fermentación	Levaduras para panificación. Levaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácidos nucleicos. Además es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular. Grasas de levadura. Alcohol etílico. Productos colaterales de fermentación alcohólica.

Fuente: Adaptación de (Ariza y González, 1997)

### **3.1.1.3 Técnicas de cultivo utilizadas en la producción de celulosa Bacteriana.**

Existen dos formas generales de cultivo, el estático y el agitado:

- **Cultivo Estático**

La macro-estructura de la celulosa es dependiente de las condiciones de cultivo, en el cultivo estático la celulosa se encuentra en forma de película. Estudios realizados muestran que en un primer estado, el microorganismo incrementa su población gracias al consumo de oxígeno disuelto que se encuentra en el medio de cultivo; durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido. Sólo las bacterias que se encuentran en las inmediaciones de la interfase aire/medio de cultivo y tienen disponibilidad de oxígeno, pueden mantener su actividad y producir celulosa, la cual se forma por capas superpuestas; a medida que transcurre el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana se incrementa por generación de nuevas capas en la

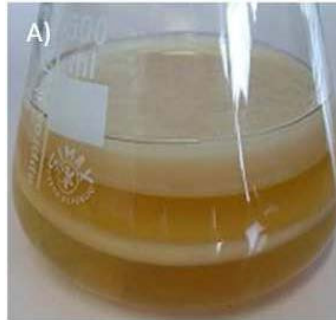
superficie formando una estructura de capas suspendidas en el medio de cultivo. (46, 47,48).

Las bacterias que permanecen en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en un estado de letargo, y pueden ser reactivadas y usadas como inóculo en una fermentación posterior (46). El inconveniente con las fermentaciones en cultivo estático surge porque requiere tiempos largos y una gran área superficial, lo que no hace práctica su producción a gran escala.(47,51).

Existen estudios en los que se examinan las variables que afectan el escalado; Caicedo y colaboradores (49), estudiaron la relación entre la concentración inicial de sustrato para glucosa y la relación área superficial/volumen de medio, encontrando producción óptima de celulosa en una concentración de glucosa de 20-50 g/l y una relación área superficial/volumen de medio de 0.3- 0.8 cm, intervalo en el cual la producción de celulosa es la máxima y el espesor no cambia significativamente.

En este método de cultivo se han utilizado como reactores frascos cónicos, frascos Roux y bandejas. En cuanto a la morfología de la membrana, algunas investigaciones muestran la existencia de tres zonas a través de su espesor: la capa superficial, la intermedia y la inferior. La capa inferior presenta una baja densidad de celulosa debido a que la producción de celulosa está asociada al crecimiento celular y los primeros días de cultivo éste es bajo; a medida que aumenta la población celular la densidad de la celulosa producida aumenta y esto se aprecia en la zona media de la membrana; la superficial se caracteriza por ser una estructura compacta y con una intensa población celular (46).

Se ha estudiado extensamente la celulosa producida en cultivo estático puesto que las membranas obtenidas tienen uso potencial en diversos campos, especialmente en medicina y en procesos de separación. Algunos de estos estudios se enfocan en el escalado con miras a una mayor producción, mientras que otros se concentran en las propiedades de la estructura como conformación, propiedades térmicas y mecánicas, cristalinidad, etc. (42,50,52,53,54)



**Figura 3.1 Medio de Cultivo Estático.**

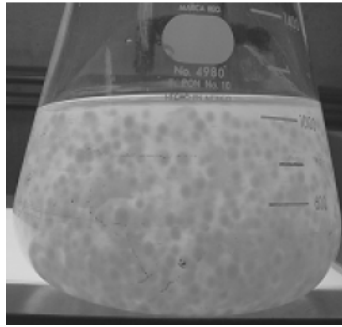
Fuente: Da P, Cunha. 2010. Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. Tesis de maestría. Universidad de Aveiro.

- **Cultivo Agitado**

En las fermentaciones en cultivo agitado se pueden obtener pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras, lo cual depende del tipo de reactor empleado. Estos cultivos pueden realizarse por lotes o en continuo; se utilizan reactores de tanque agitado o reactores *airlift*. El cultivo agitado se investiga con miras a escalar el proceso a nivel industrial (54,55).

Las bajas productividades reportadas, menores que en cultivos estáticos, hacen que no sea fácil su escalamiento, especialmente por el hecho de que el cultivo agitado favorece el crecimiento de células no productoras de polímero que consumen el sustrato; esto se atribuye a mutaciones que lesionan la maquinaria enzimática encargada de la polimerización de la glucosa (6, 56).

Otro problema que presenta este método de cultivo es la habilidad de las células de *Acetobacter* para convertir la glucosa en ácidos glucónico y cetoglucónico por lo que implica que se remueve la glucosa del medio pero en detrimento de la producción de celulosa (55).



**Figura 3.2 Medio de Cultivo Agitado**

Fuente: Chávez, J., Martínez, S., Contreras, M., Escamilla, E. 2004. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. *Rev. Especializada en ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 7, 18-25.

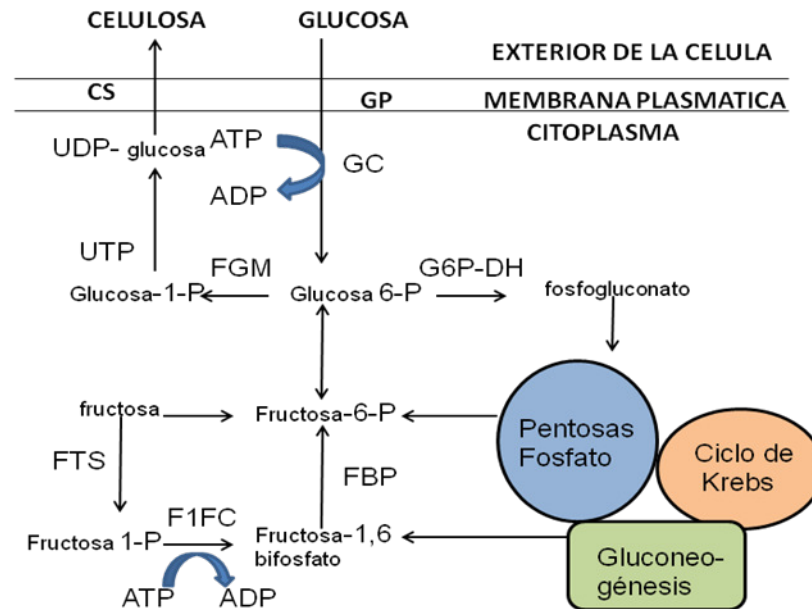
**3.1.1.4 *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*)** : Este microorganismo tiene forma bacilar, recto o ligeramente curvado, Gram negativo que puede estar solo, o agrupado en parejas o en cadenas cortas; crece a temperaturas entre 25 y 30 °C y el pH óptimo para desarrollarse está entre 4,5 y 5,5 (29). Algunas especies del género *Acetobacter* como *A. xylinum* son productoras de celulosa, también conocida como *Gluconacetobacter xylinus* (57)

El *A. xylinum* a diferencia de otros sistemas biológicos es capaz de producir celulosa en cantidad suficiente, lo cual realiza en forma fibrilar extracelularmente (15). Una sola bacteria de *A. xylinum* es capaz de polimerizar 200.000 moléculas de glucosa por segundo en cadenas de  $\beta$ -1-4 glucano, que luego son excretadas en forma de microfibrillas (58). La CB tiene fibras cristalinas que en su forma y ancho son parecidas a la estructura media de algas y plantas (59). La síntesis de la CB ocurre en presencia de la celulosa sintasa (60) y es secretada en forma de fibras en una hilera de 50 a 80 poros a lo largo del eje longitudinal de la célula (61). La formación de esta matriz de celulosa flotante se cree que permiten al *A. xylinum*, un aerobio obligado, a crecer en la superficie del medio donde hay mayor tensión de oxígeno (62).

- **Principales rutas catabólicas de *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*)**. En este aparte se restablece la relación de estas rutas y las del metabolismo central de este microorganismo. En el caso del etanol este se transporta activamente hasta el interior de la célula a través de su oxidación por la alcoholdehidrogenasa (*ADH1*), situada en la membrana celular (63); donde la PQQ(pirroloquinolina quinona) se reduce a PQQH2(quinol)) cuando el etanol es oxidado a acetaldehído y este a su vez a ácido acético en el periplasma. El ácido acético se libera al medio que le rodea y el resto alimenta al depósito donde se

encuentra el acetato intracelular, el cual tiene dos rutas: puede ser excretado al medio que le rodea (64) o puede ser esterificado con el ATP, lo que conduce a la síntesis de acetil-Coenzima A (65).

De igual manera con el catabolismo de la sacarosa, la glucosa y la fructosa; en este caso la sacarosa se hidroliza en el periplasma a glucosa y fructosa, y la glucosa es transportada activamente por una fosfohexoquinasa, con consumo de una molécula de ATP. Mientras la fructosa se incorpora a la célula mediante la síntesis del complejo enzimático-sistema de la fosfotransferasa (*PTS*), que enlaza a la fructosa que cruza la membrana celular con el fosfoenolpiruvato (PEP), fosforilando la hexosa a fructosa 6-fosfato (F6P) con formación de piruvato (66). Este género tiene la particularidad de carecer de una fosfofructoquinasa, por lo que ni la glucosa ni la fructosa puede catabolizarse vía la ruta de la glucólisis. La G6P (glucosa 6-fosfato) puede alimentar la ruta de las fosfo-aldolasas o de las fosfo-cetolasas (PK), que resulta en la hidrólisis de estos precursores a acetato y eritrosa 4-fosfato (E4P). La E4P puede unirse a la G6P produciendo seduheptulosa 7-fosfato (S7P) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P). La reacción de la S7P con el G3P conduce a la síntesis de dos moléculas de ribosa 5-fosfato (R5P). La R5P puede descomponerse en acetil-fosfato y G3P. La G6P también puede seguir la ruta de la pentosa-fosfato (PP) que implica la oxidación a ácido fosfogluónico, con generación de NADH, y la descarboxilación de éste a ribosa 5-fosfato (R5P) (67,68). En la figura 3.3 se muestran las principales vías involucradas en el metabolismo del *Acetobacter xylinum*.

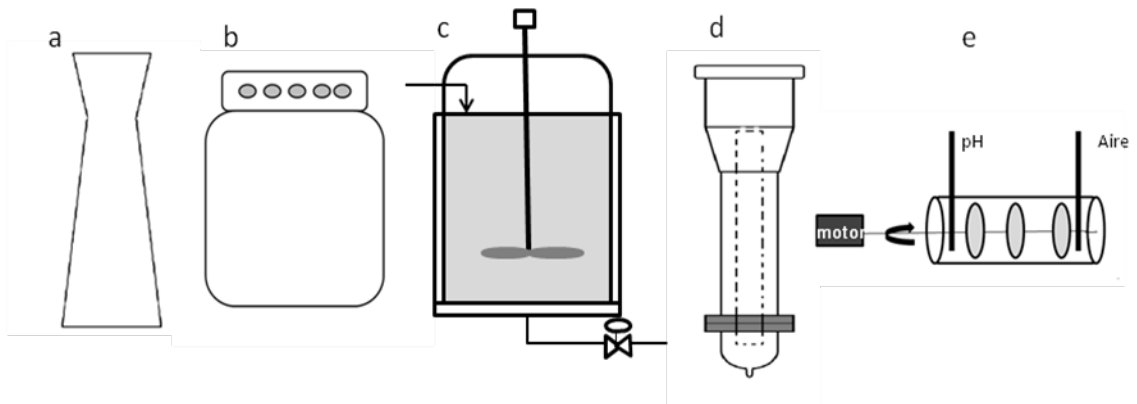


**Figura 3.3 Vías Metabólicas del *Acetobacter xylinum*.** CS:celulosa sintasa; FBP: fructosa bifosfatasa; FC:fructocinasa;F1FC: fructosa-1-p cinasa; FGI: fosfoglucoisomerasa; FGM:fosfoglucomutasa; FTS:fosofructotransferasa; GC: glucocinasa; GP:glucosa permeasa; G6P-DH: glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP: uridin difosfato glucopirofosforilasa. Adaptado de Chávez-Pacheco y Col, 2004 .

- **Composición Atómica de la Masa Microbiana:** Los cambios en las condiciones de cultivo ocasionan variaciones en la composición atómica de la masa celular microbiana, Según Bailey y Ollis, (69) ; Blanch y Clark,(70) la composición por átomo de carbono de las células de diversas especies (bacterias, levaduras y hongos), esta para el hidrógeno entre 1,55 y 2 átomos, para el oxígeno de 0,43 a 0,56 y para el nitrógeno de 0,1 a 0,24; finalmente, la composición atómica promedio puede ser escrita como sigue:  $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$  (71,72).

**3.1.1.5 Reactores utilizados en la producción de Celulosa Bacteriana.** En la producción de CB se han utilizado diferentes biorreactores en condiciones estáticas y agitadas. Los reactores de tanque agitado presentan un mejor comportamiento, otros estudios muestran que el uso de un reactor convencional sin agitación mecánica con un dispersor en la parte inferior y que permite agitación por la entrada de una corriente de aire es posible mantener el nivel de productividad de CB similar al de un reactor de tanque agitado a un nivel inferior de consumo de energía (72). Se reporta que el

enriquecimiento del aire con oxígeno aumenta la productividad de un  $0.059 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ , a un  $0.093 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$  a las mismas condiciones de aireación pero con un mayor costo. La producción de CB ha mostrado una gran dependencia del coeficiente de transferencia de oxígeno y éste a su vez de la velocidad de agitación, mostrando que esta última no afecta directamente la velocidad de producción cuando se reduce la velocidad de agitación en presencia de aire enriquecido con oxígeno (73,74). También se han utilizado reactores *airlift* o reactor de transporte aéreo para producir celulosa.(75). Ver figura 3.4



**Figura 3.4 Esquema de los reactores mas utilizados en la producción de celulosa bacteriana (CB).** a. Reactor cónico convencional. b. Reactor cilíndrico convencional c. Reactor de tanque agitado. d. Reactor Airlift. e. Reactor de discos paralelos rotatorio. Fuente: Perna. O 2012



## 4. MATERIALES Y METODOS

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigaciones en Microbiología, Grupo de Investigación en Biología de Microorganismos (GIBM), Departamento de Biología y Química, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre.

**4.1 Microorganismo.** Se utilizó la cepa de *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693), donada por el Dr. Edgardo Escamilla del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**4.2 Medios de cultivo.** Para el mantenimiento de *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693) se usó el medio de Watanabe (51) modificado, y la bacteria se cultivó a 30°C en condiciones estáticas hasta la aparición de CB. La composición del medio de cultivo líquido fue la siguiente: Melaza diluida, amonio, ácido cítrico y suplementado con sales de magnesio, fosfato, calcio y potasio. Se utilizó una concentración inicial de melaza en solución del 13,3% de acuerdo a estudios anteriores que dan cuenta de que en concentraciones por debajo y por encima de este valor el crecimiento microbiano se inhibe y la producción de CB disminuye (ver Anexo A). El pH del medio se ajustó a 5.6 con NaOH 1.0 N o HCl 10% (v/v), y todos los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121°C durante 20 min. El mantenimiento de *A. xylinum* se realiza cada 15 días. Ver ANEXO B

**4.3 Condiciones de cultivo.** Colonias de *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693) fueron inoculadas en 500 mL de medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de 2 L y se adicionó etanol 1.0% (v/v), las cuales fueron incubadas a 30°C por 24 h en agitación a 125 rpm. Posteriormente, previo control de pureza, mediante la observación de las características morfológicas típicas en preparaciones en fresco y tinciones de Gram fue seleccionado el matraz Erlenmeyer del preinóculo con mayor turbidez y formación de pequeñas fibras de celulosa, el cual fue transferido a un volumen adecuado de medio de cultivo e incubado a 30°C por 24 h en agitación a 125 rpm. Este inóculo activado fue transferido a los 36 biorreactores cilíndricos de plástico de 20 cm de diámetro y 20 cm

de altura, con un volumen final de 2 litros de medio en cada biorreactor, con tapa de plástico y orificios cubiertos con tapones de algodón y gasa estéril a 30°C por 1,5, 3, 7, 14, 21 y 28 días bajo condiciones estáticas y de flujo de aire intermitente (se suplió aire en el área superficial de los cultivos de forma intermitente a través de un compresor de aire, 3HP, 50 l, voltaje de red 110V, frecuencia de red 60Hz, potencia de entrada 1700W, potencia de motor 3 HP; presión 115 PSI, capacidad 140 l x min, RPM 3400, diámetro del cilindro 50mm, peso 35 Kg, y se controló la aireación con medidores de flujo de aire (Flowmeter LPM) Cole Parmer®, durante 12 horas intermitentes (2VVM) (Ver Anexo E). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

**4.4 Medición de la producción de BC.** Para establecer el peso de cada película de celulosa se retiraron del biorreactor a los diferentes tiempos de cultivo y se lavaron con NaOH 0.1 N a 30°C durante 20 min, con el objetivo de disolver las células bacterianas. Para remover otras impurezas, la CB se lavó con agua destilada por dos veces y se secó parcialmente con papel absorbente antes de ser medido su peso húmedo. Posteriormente, la celulosa se secó a 60±10°C (estufa de laboratorio de 220°C, 28 lts Jouan, modelo: EU28) hasta que el peso alcanzara un valor constante (72), el cual correspondió al peso seco de la CB. La variación entre las replicas fue menor que el 9%.

**4.5 Determinación de la compresibilidad de la celulosa sintetizada.** Una vez lavadas y secadas, las películas de celulosa producidas, se sometieron a la aplicación de un peso de 2000g por espacio de 30 segundos (Método de Budhiono modificado.1999).(10)

$$V = (1 - 1/r) \times 100 \quad r = p_1/p_2$$

Donde p2 es el peso húmedo después de haber aplicado el peso de 2000 g y p1 es el peso húmedo obtenido antes de aplicar los 2000 g.

#### **4.6 Medición de pH.**

El pH de los medios de cultivo se determinó tomando pequeños volúmenes de medio en los diferentes tiempos de incubación durante el proceso de producción de CB, con el fin de determinar las variaciones de pH que suceden durante este proceso y así establecer las condiciones óptimas que el microorganismo necesita para su crecimiento, para esta medición se utilizó un potenciómetro de pH (Ohaus ph meter, Starter Series).

#### 4.7 Volumen remanente de medio

El volumen de medio remanente se midió, luego de extraer la película de celulosa, para obtener el valor consumido. Este se realizó utilizando una probeta 2000ml, en la que se depositó el medio de cultivo que quedó en el bioreactor y se anotó el volumen obtenido.

**4.8 Medición de la fuente de carbono.** Un volumen del medio remanente de cada uno de los biorreactores a los diferentes tiempos de cultivo se centrifugaron a 15000 rpm (ENGELSDORF / LEIPZIG<sup>®</sup> DDR - 7123) por 30 min para sedimentar los sólidos suspendidos, y 3 mL del sobrenadante se utilizaron en la cuantificación inmediata de glucosa, fructosa y sacarosa o almacenados a -70°C, para posterior análisis.

La glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa / peroxidasa, para lo cual se utilizó el Kit Glicemia Enzimática AA, Wiener Lab<sup>®</sup>. Que contiene una solución estándar de glucosa de (100 mg/dL). El principio está en la conversión de la glucosa por la acción de la glucosa-oxidasa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, que en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno (4-Aminoantipirina/fenol) en un compuesto de color rojo. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 505 nm y una temperatura de 37°C. Esta lectura se realizó en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS<sup>®</sup> 10S. )

El método de Taylor (74) se utilizó en la cuantificación de fructosa; se mezclaron 25 µL de la muestra (sobrenadante), 25 µL del reactivo de triptamina, (Tryptamine Hydrochloride, 99 % (ALDRICH<sup>®</sup>) ) y 750 µL de HCl fumante, 37% (Merck<sup>®</sup>) y esta solución se colocó en un baño de agua termorregulado a 60°C por 15 min, y se realizó la lectura a temperatura ambiente contra un blanco de reactivo a 518 nm (Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS<sup>®</sup> 10S) una curva patrón, de 0 a 12 µg de fructosa se utilizó para obtener la concentración de las muestras.

En la identificación de sacarosa se utilizó el método fenol-ácido sulfúrico o método de Dubois (75); se mezclaron 100 µL de la muestra, 100 µL de la solución de fenol al 5% (p/v (Merck<sup>®</sup>), 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (Merck<sup>®</sup>) y se incubó a 25°C por 20 min, posteriormente se leyó la densidad óptica a 490 nm contra un blanco reactivo; la concentración de la muestra se determinó a partir de una curva patrón de 0 a 20 µg para

sacarosa. las muestras debieron ser diluidas para garantizar la linealidad de la ley de Lambert-Beer en la curva patrón.

Las mediciones de sacarosa, glucosa y fructosa se realizaron por triplicado para cada una de las muestras.

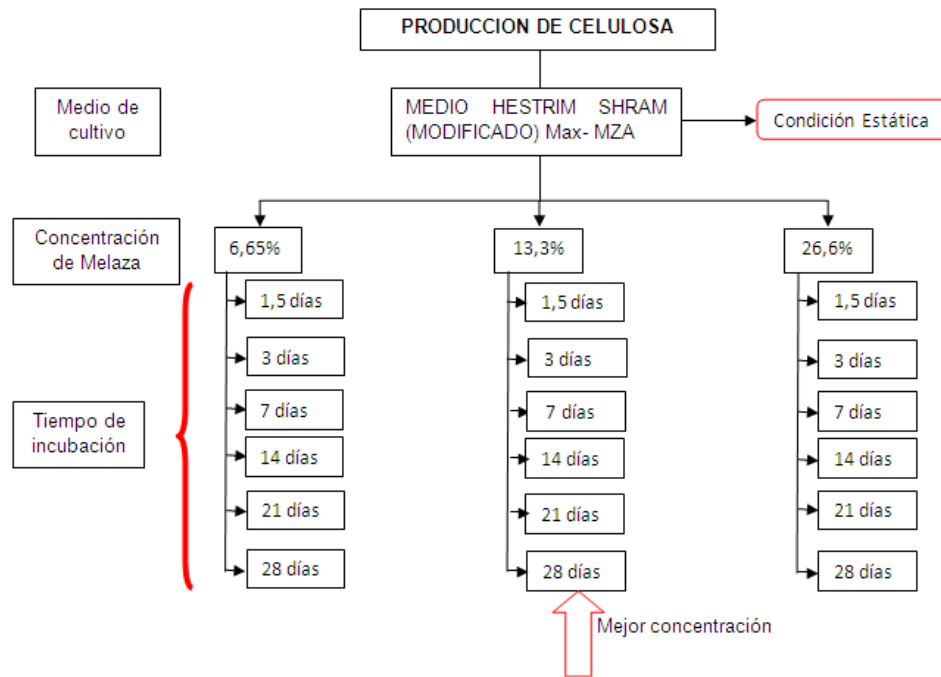
**4.9 Coeficiente de Rendimiento del producto.** Se determinó como la relación de peso entre la celulosa bacteriana seca producida a los 28 días del cultivo y la melaza consumida en relación a (Sacarosa, Glucosa y Fructosa) por la siguiente ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Siendo  $\Delta P$ , cantidad de celulosa formada y seca y  $\Delta S$ , la cantidad de sustrato consumido durante el proceso.

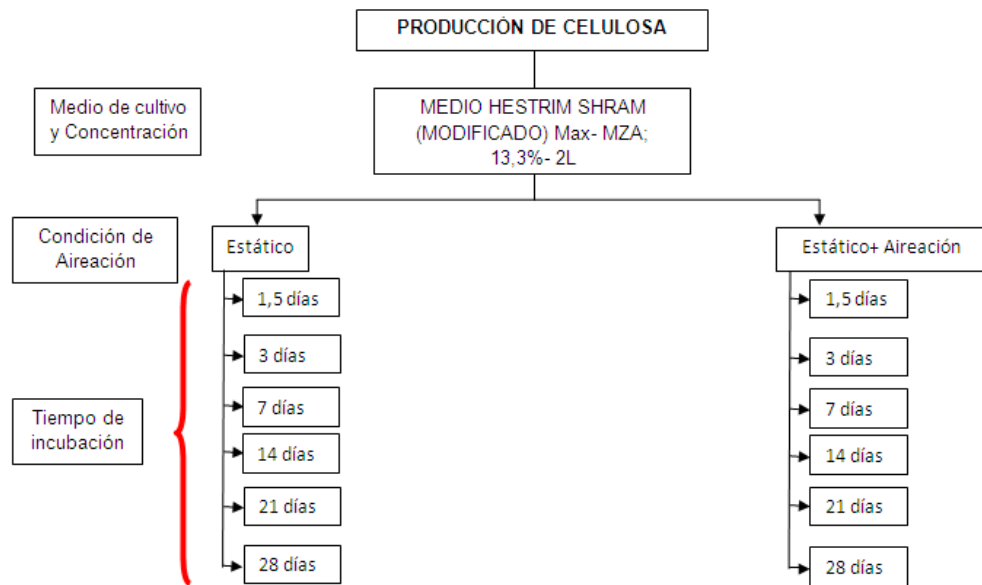
**4.10 Relación área-Volumen del biorreactor:** Se determinó el efecto de la geometría del biorreactor utilizando dos configuraciones de bioreactor (cónico y cilíndrico) y determinando el espesor relativo límite (altura de la película= altura del líquido)

**4.11 Diseño Experimental.** Se realizó un Anova factorial donde se involucraron como variables incidentes en el proceso la condición de aireación (Cultivo estático sin aireación y cultivo estático con aireación), volumen de medio de cultivo y como variable de respuesta la producción de celulosa representado como (peso húmedo, peso seco, compresibilidad y grosor), luego se aplicó un análisis de comparación de medias y una prueba t-test, con el software Staphgraphics centurión versión 16. El experimento se realizó en dos fases, en la fase inicial se realizaron varios experimentos, para poder escoger la concentración de melaza más adecuada de acuerdo a estudios anteriores



**Figura 4.1** Diseño Experimental fase inicial en la producción de celulosa a partir de *A. xylinum*

A partir de los resultados obtenidos se escogió la concentración con mayor producción de CB en el medio de cultivo (MAX-MZA) ver Anexo A. Posteriormente se realizó el siguiente diseño final: Ver ANEXO A



**Figura 4.2** Diseño de la Producción de celulosa en un Cultivo de *A. xylinum* IFO con melaza en solución al 13,3%. Dos condiciones de cultivo, Estático y Estático + aireación.

Los resultados obtenidos fueron tabulados en Excel; a la vez, analizados y graficados en el programa Staphgraphics centurión versión 16; con el fin, de observar la influencia que tenía la condición de aireación sobre la producción de celulosa bacteriana. Para así, posteriormente determinar cuál de las dos condiciones era más relevante en la producción de CB. VER ANEXO H

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan y discuten los resultados obtenidos en la evaluación de la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* *ifo* (*Gluconacetobacter xylinus*) en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente, de acuerdo con la metodología señalada en la sección anterior. Se tuvieron en cuenta los cultivos de *A. xylinum* a una temperatura de 30°C, donde se utilizó como fuente de carbono la melaza de caña, tomando en cuenta propiedades como el peso húmedo, el peso seco, la compresibilidad, el grosor de la CB, se determinaron características importantes que influirán en el establecimiento de un proceso estable para la producción de celulosa bacteriana. Los componentes de medio de cultivo utilizado fueron de grado industrial y se utilizó como fuente de carbono principal la melaza de caña de azúcar 13.3% p/v, pues en estudios anteriores realizados por Orozco y Martínez (77) y luego corroborados en los preliminares de este estudio (ver Anexo A) se encontró que la producción de celulosa en concentraciones menores y mayores a esta no fueron satisfactorias por lo que se consideró trabajar con esta concentración con un contenido del 55 al 65% de sacarosa aproximadamente, siendo una fuente de carbono de bajo costo y renovable; así mismo, la fuente de nitrógeno que se utilizó proviene del amonio y en menor cantidad de la melaza, y cantidades mínimas de bioelementos y vitaminas del complejo B contenidos en la melaza. Los biorreactores utilizados para la producción de CB en preliminares fueron de forma cilíndrica con diferentes diámetros y altura. El biorreactor utilizado en este estudio fue cilíndrico de plástico con un diámetro de 20 cm y una altura de 20 cm con un volumen de medio final de 2000 mL con tapa de plástico que tenía 9 orificios de 1,5 cm de diámetro c/u y cubiertos con tapón de gasa y algodón en el experimento estático; en los experimentos con aireación se utilizó un bioreactor de iguales dimensiones y material pero con un diseño especial que consta de una tapa plástica, recubierta por una sobre-tapa de aluminio, con orificios para la entrada del aire al área superficial, a través de un tubo en acero inoxidable provisto de pequeños agujeros, un orificio para la salida del aire con conexión a una manguera que iba a una fuente de agua y evitar contaminación del cultivo, la aireación al cultivo se realizó de forma intermitente con un flujo de 2 vvm en el área superficial durante 12 horas intercaladas.

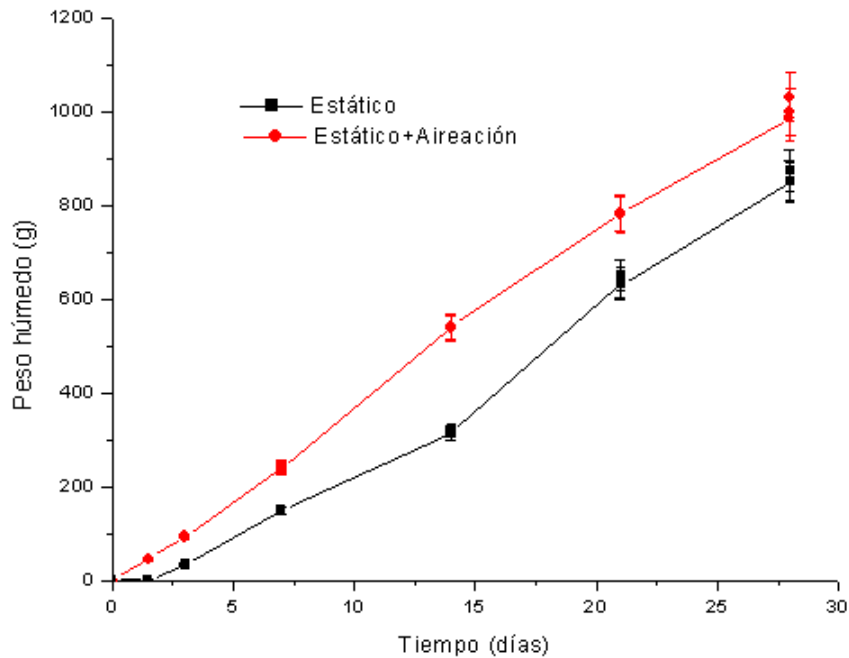
El inicio de la síntesis de CB se observó como la formación de una capa muy delgada sobre la superficie del medio de cultivo en ambas condiciones durante las primeras 36 horas del cultivo, y con el tiempo se formó una película de mayor grosor. Es importante anotar en los resultados que se escogió aireación intermitente, porque con la aireación continua durante 24 horas inicialmente y luego 12 ( datos no mostrados), se presentó saturación del área superficial y del medio con (oxígeno proveniente del aire), lo que inhibió el crecimiento y por consiguiente la producción, además esta aireación continua trascendía en el costo del bioproceso.

**5.1 Evaluación de la producción de acuerdo a las propiedades de la celulosa Obtenida.** Los resultados de la celulosa obtenida se evidencian en los siguientes ítems.

**5.1.1 Peso de la celulosa húmeda.** La síntesis de celulosa por *A. xylinum* fue realizada en un medio de cultivo económico y sencillo, por la utilización de melaza y reactivos de grado industrial, en condiciones estáticas y estáticas con aireación a temperatura ambiente, en presencia de melaza de caña (13,3%) como fuente de carbono principal.

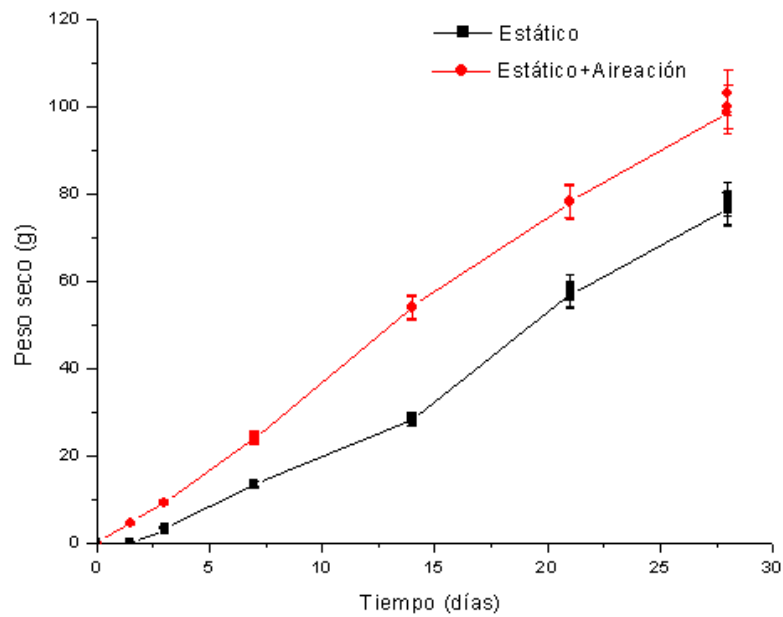
Se observó que durante los diferentes tiempos de incubación, existe una diferencia en el peso de CB medido en los mismos reactores, con las dos estrategias de cultivo, (ver figura 5.1) Esto se explica por la relación que existe entre el crecimiento de *Acetobacter xylinum* y la producción de celulosa (77,78). Ver ANEXO E



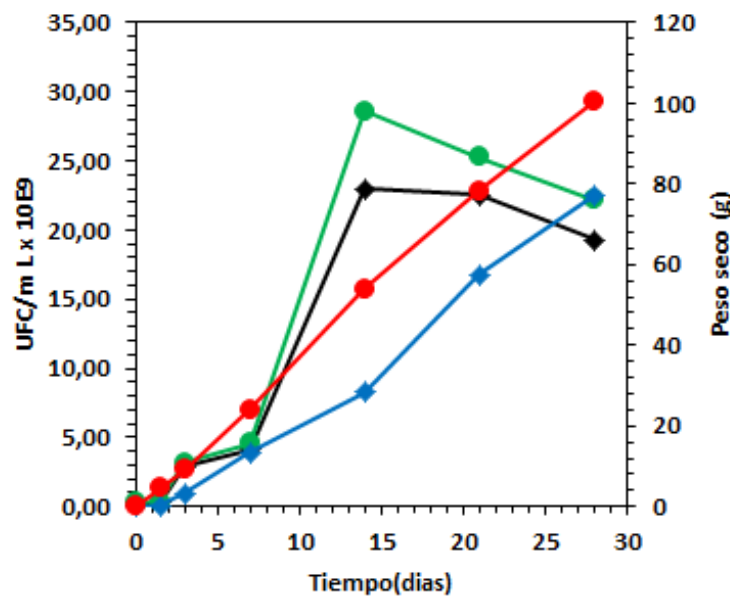


**Figura 5.1 Producción de celulosa Húmeda (g) a diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28 días).**

Los resultados indican que se presentó un incremento considerable en la producción de CB húmeda entre los días 14 y 21 con un porcentaje alrededor del 51% en el cultivo estático, en contraste con lo observado en el cultivo estático-aireación cuyo incremento se comenzó a presentar entre los días 7 y 14 con un porcentaje del 55 %, la velocidad de formación promedio de CB fue diferente durante los 28 días de cultivo con valores que oscilan entre 0,027 g/L/h y 0,63 g/L/h para el cultivo estático, mientras que para el cultivo estático con aireación, la velocidad se mantuvo casi constante con un valor promedio de 0,70g/L/h.



**Figura 5.2 Producción de celulosa seca (g) a diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28 días).**



**Figura 5.3 Producción de celulosa seca (g) Estático ■, Estático+ Aireación ● y Crecimiento microbiano (ufc/mL) durante el tiempo de incubación. (1,5; 3; 7; 14; 21; 28) días. Estático ■, Estático+ Aireación ●**

**5.1.2 Peso de celulosa seca.** En la figura 5.2 se observó a los 7 días una producción de 24,4 g/L de celulosa sintetizada en el cultivo estático aireado y 13 g/L de CB en cultivo estático, lo que resultó ser una producción bastante considerable en relación a las cantidades de celulosa obtenidas por El-Saied, H y col (79), quienes también utilizaron melaza en el medio de cultivo en una concentración de melaza del 17% y la cantidad obtenida fue de 1,97 g/L a los 6 días, debido a que se evidencia que a concentraciones mayores de melaza la producción de CB disminuye lo que se hizo evidente en este estudio, para un cultivo estático y en una configuración de reactor cónico, o Erlenmeyer. Ver ANEXO E; de igual manera

El peso de la celulosa seca representó entre el 5% y el 9% del peso total de la celulosa húmeda, valor cercano al encontrado por Hwang, J.W., y Col (33). De igual manera se estableció según la Fig. 5.3 la relación existente entre el crecimiento microbiano y la producción de celulosa seca, siendo estos datos concordantes donde se evidenció que entre los días 7 y 14 hubo incremento del crecimiento celular, para ambas estrategias de cultivo, y evidenciándose una mayor producción de celulosa para el cultivo aireado, condición que se mantuvo durante casi todo el proceso, no obstante es importante anotar que si la aireación hubiera sido directa y no al área superficial donde la película de celulosa formada a partir del día 3 impedía la llegada de aire al medio de cultivo, la producción hubiese resultado mayor, sin embargo se obtuvieron datos de peso seco mayores a los encontrados por El-Saied, H y col (79), así como de Bae y Shoda (14) quienes trabajaron también con melaza.

**5.1.3 CRL (capacidad de retención de líquido).** El porcentaje de humedad osciló entre (93-95%), de igual manera se evaluó la capacidad de retención de líquido de la celulosa que se formó en el biorreactor y donde se utilizó esta relación para determinarla.

$$WHC = \frac{\text{g Agua}}{\text{g celulosa seca}} \text{ o } CRL = \frac{PH-PS}{PS}$$

Donde *CRL* es la capacidad para retención de medio líquido; *PH* es el peso húmedo y *PS* es el peso seco de la celulosa. Esta relación es derivada del *WHC* (*Water Holding*

*Capacity*), (80), donde se asumió que el medio en su mayor parte estaba compuesto por agua. Es una de las propiedades más importantes de la CB, cuando se ha utilizado en aplicaciones biomédicas, en el mantenimiento correcto de la humedad en heridas, indispensable para su aplicación en la terapia moderna debido a que la penetración de las sustancias activas en la herida se ve facilitada por un entorno húmedo. Esto también permite un cambio de apósito fácil, sin dolor ni daño para la piel recién formada (según Newman, 1998) (90). Con el fin de estimar la utilidad de las películas de CB producidas bajo condiciones de cultivo estáticas y con aire intermitente se determinó la capacidad de retención de agua (CRL).

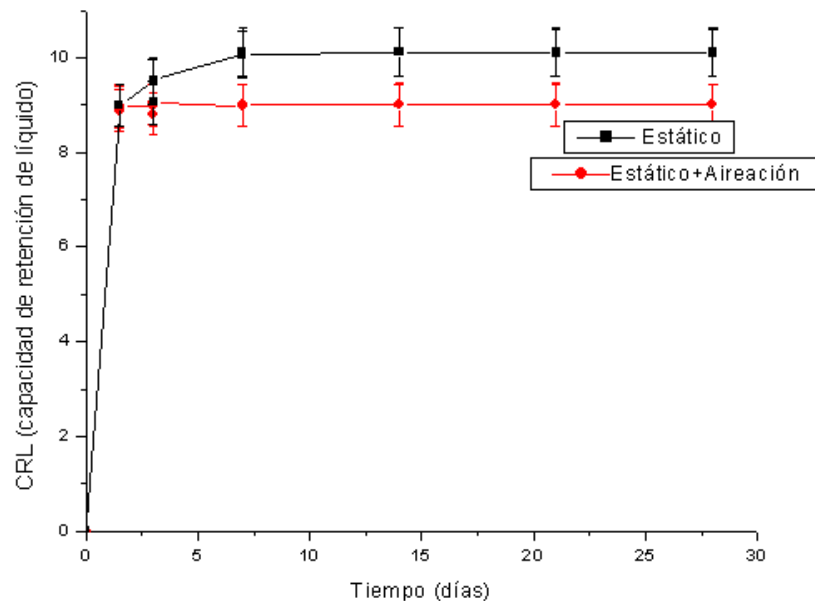


Figura 5.4 Efecto de las condiciones de cultivo estático y estático+aireación sobre la capacidad de retención de líquido de la película de celulosa producida en condiciones estáticas durante el tiempo de cultivo .

En la Figura 5.4 se observó el comportamiento de CRL Capacidad de retención de líquido y mostró valores que oscilan entre 0 y 9 para el cultivo con aireación y valores mayores para el cultivo estático, llegando hasta 10, durante los 28 días la gráfica evidenció un comportamiento similar entre los dos tratamientos y en general durante todo el proceso, los datos no tuvieron mayor diferencia, lo cual indicó que aunque el aire superficial seca la celulosa expuesta al área interfacial, el contenido de líquido no es muy diferente.

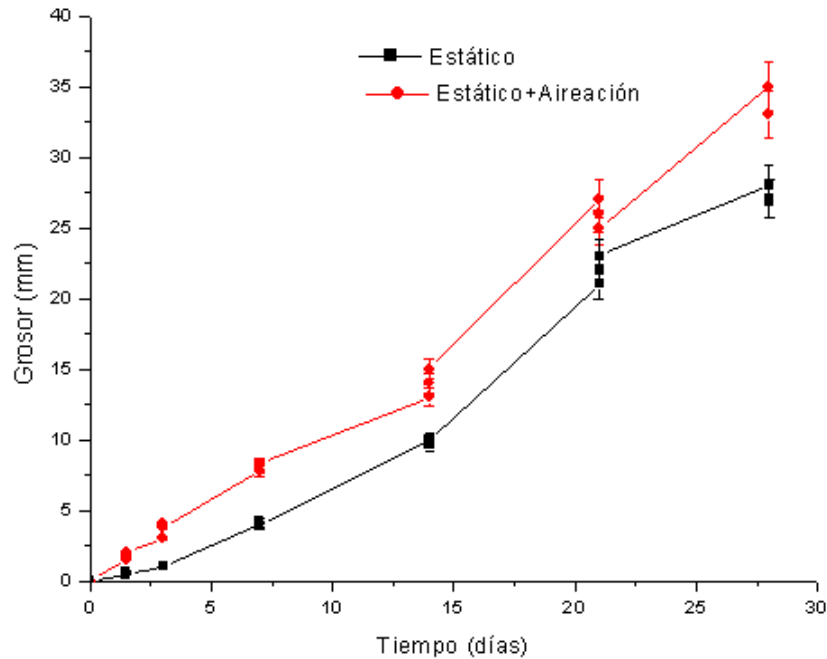


Figura 5.5 Grosor de la película de celulosa (mm) en diferentes tiempos de incubación (0;1,5;3;7;14;21;28) días.

**5.1.4 Grosor de la película de celulosa.** Los grosores alcanzaron valores promedios máximos de 34,3 mm, con una desviación estándar de 1,15 y un coeficiente de variabilidad de alrededor 3,36% para el experimento con aireación, lo que indica poca diferencia en los resultados obtenidos para cada periodo de tiempo. Los grosores tuvieron un aumento acorde a lo esperado, de acuerdo al tiempo del cultivo y al peso húmedo alcanzado por la celulosa. En la Figura 5.5 se observó que los grosores alcanzados en el cultivo estático son menores que los alcanzados en el cultivo estático con aireación. Estos valores guardan relación con los obtenidos por Hesse-Ertelt S y Col (80) quienes trabajaron con volúmenes de medio similar (1600 ml), en un cultivo estático, con una configuración geométrica del bioreactor rectangular y medio de cultivo Hestrin-Schramm 1954. Para este estudio la fuente de carbono principal fue la glucosa, la cual demostró ser bastante eficiente en la producción de celulosa, a través del tiempo; obteniéndose películas de celulosa con un grosor máximo de 12 mm a los 7 días del cultivo. Al comparar estos valores con el estudio experimental se obtuvieron grosores

promedios máximos de 8,1 mm a los 7 días, en un volumen de 2000 mL, un medio de cultivo, donde las sales utilizadas fueron de grado industrial, como fuente principal de carbono, la melaza de caña y con unas condiciones de cultivo (Estático- Aireación). Todo esto representa un importante resultado por cuanto la aireación se suplió intermitentemente por 12 horas, lo que se reflejó en los valores obtenidos que doblan los valores del Experimento Estático cuyo grosor máximo fue de 4.1 mm.

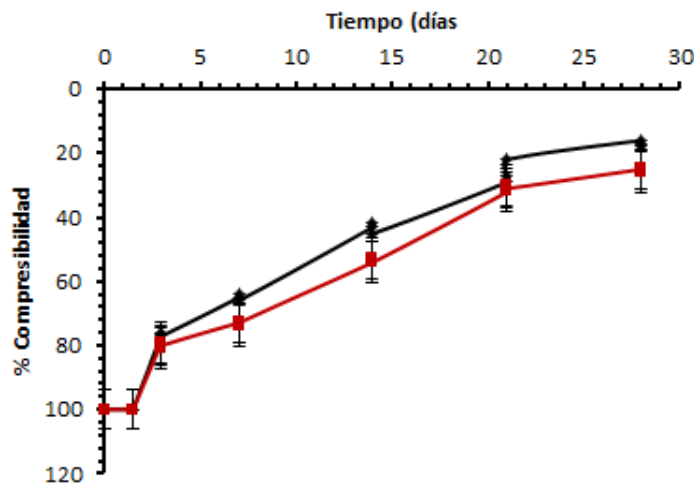


Figura 5.6 Porcentaje de compresibilidad a diferentes tiempos de incubación (0; 1; 5; 3; 7; 14; 21; 28 días).

**5.1.5 Compresibilidad de la Película de Celulosa Bacteriana.** El porcentaje de compresibilidad de la celulosa presentó una disminución a medida que se llevó a cabo el proceso de síntesis debido a la pérdida de agua en su estructura, al ser sometido a una presión de 2000 g en un tiempo de 30 segundos, sin embargo luego del día 14 la celulosa presentó un porcentaje de compresibilidad estable en el tiempo, con una ligera disminución en el día 28, esto debido al contenido de agua que la película alcanzó en el tiempo final y que la hizo más compacta por lo que la pérdida de volumen fue menor y por consiguiente su compresibilidad también fue menor como se observa en la figura 5.6 donde se evidenció un descenso de la compresibilidad durante el tiempo de cultivo, esta propiedad es muy importante para las futuras aplicaciones que se le pueden dar a la

celulosa por ser un parámetro importante que permite controlar las propiedades mecánicas finales de las películas de celulosa(81).

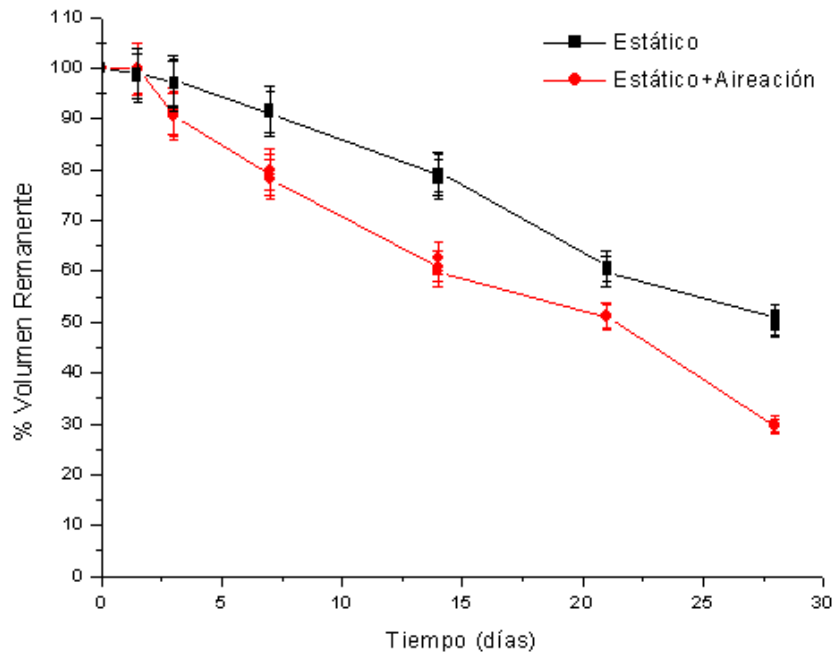


Figura. 5.7 Volumen de Medio remanente (%) en diferentes tiempos de incubación (0; 1,5; 3; 7; 14; 21; 28 días).

**5.1.6 Volumen de medio de cultivo remanente.** El volumen inicial de medio fue de 2000 mL, que fue disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo debido a que en la estructura de la celulosa quedan atrapadas grandes cantidades de moléculas de agua. El volumen total de medio, resultó de la adición del medio remanente y el contenido en la celulosa, presentando una pérdida de aproximadamente un 10% para el cultivo estático y un poco superior en el cultivo estático-aireación, llegando a porcentajes de aproximadamente 17%. En la Figura 5.7 se muestran los porcentajes de volúmenes de medio remanente, que coinciden con los valores de peso húmedo de la celulosa confirmando así lo expresado y su relación con las pérdidas de agua durante el secado parcial de las películas.

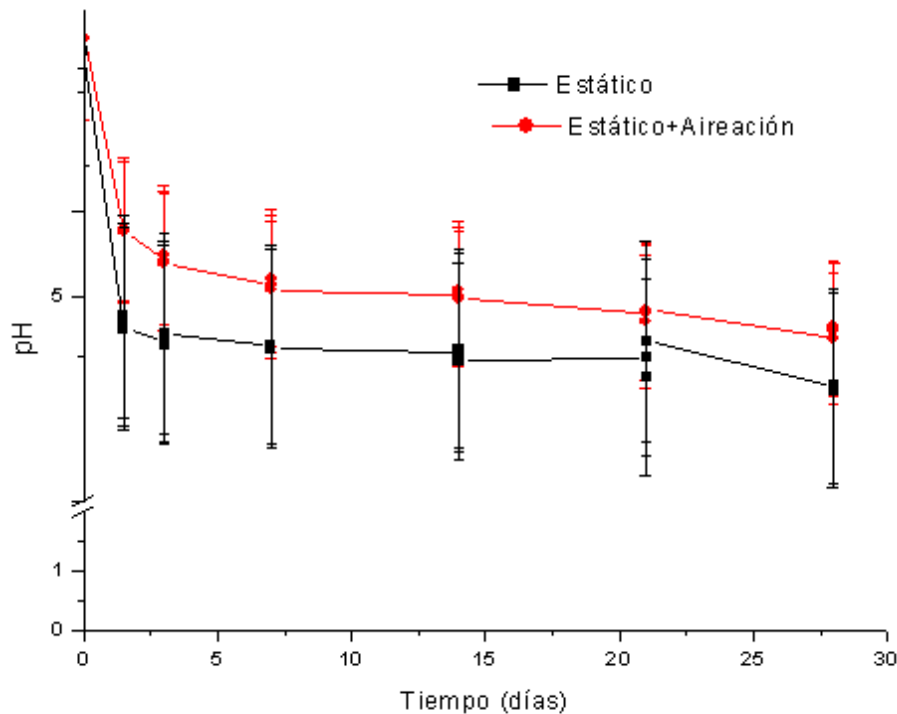


Figura 5.8 Efecto del pH sobre la producción de CB en los diferentes tiempos de incubación (0; 1; 5; 3; 7; 14; 21; 28 días).

**5.1.7 pH del medio de cultivo.** El rango óptimo de pH para la producción de celulosa y crecimiento de *A. xylinum* es de 4.5 a 5.5, como lo estableció Noro y col (91), debido a que la síntesis de celulosa y el crecimiento de la bacteria se obstaculizan en medios que estén por encima de 6.0 y por debajo de 4.0, (81). En este estudio experimental el pH logró mantenerse en la zona útil de amortiguamiento, 5,6-4,6 debido a la utilización del buffer citrato fosfato, que mostró una buena capacidad amortiguadora durante el proceso; este mecanismo para el control del pH tiene un gran número de ventajas entre las que se encuentra el no incluir riesgos adicionales de contaminación. En los primeros días hubo un descenso abrupto del pH debido a la producción de ácido glucónico en las etapas iniciales durante el catabolismo de la glucosa (67). De igual manera Pourramezan y col. (36) estudiaron los efectos de diferentes pH entre 4 y 8 en el medio de cultivo HS (Hestrim Schram) obteniendo un rendimiento máximo a un pH de 7, contrastando esto con los resultados que se obtuvieron en este trabajo donde el pH inicial fue de 5,6 pero que llega a su máxima producción de celulosa en un pH entre 4.8 y 4,7 para cada condición de



cultivo respectivamente; debido a la capacidad amortiguadora del Buffer citrato- fosfato. Así mismo Shead, O y col (81) reportó una producción importante de celulosa bacteriana de 3 g/L a 30°C y pH 5,6 a 7,5 durante 4 semanas de cultivo, en condiciones estáticas, lo que coincide con las condiciones de este trabajo donde la temperatura también fue de 30°C y un pH de 5,6 pero obteniendo resultados mayores en producción del orden de 26 g/L de celulosa seca. Los resultados obtenidos en este estudio experimental, mostraron la eficacia del buffer citrato-fosfato ver Fig. 5.8, lo que permitirán diseñar una mejor estrategia de cultivo para la producción de celulosa bacteriana.

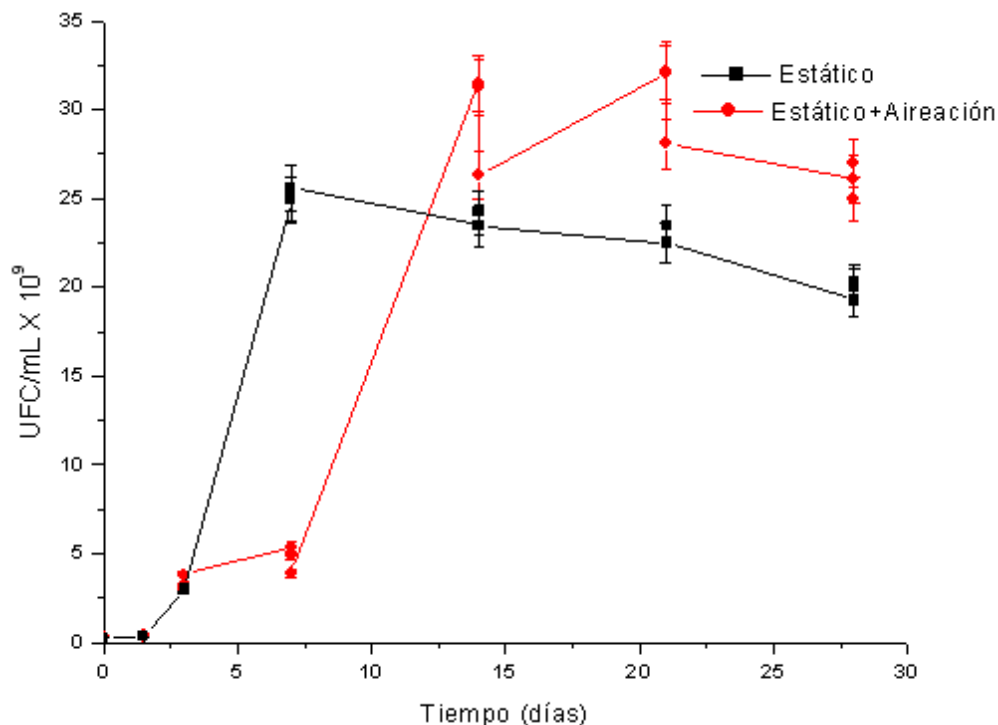
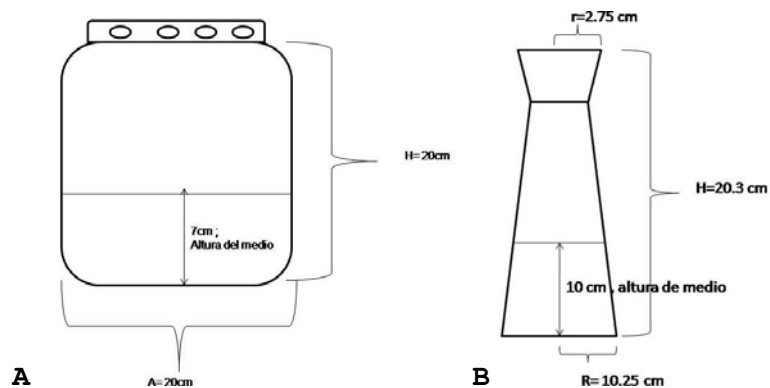


Figura.5.9 Número de células (ufc/mL) en el medio remanente de cultivo durante el tiempo de incubación. (1,5; 3; 7; 14; 21; 28) días.

**5.1.8 Concentración de Células de *Acetobacter xylinum*.** En este estudio se encontró que la cantidad de células viables fue mayor en el cultivo estático con aireación debido al suplemento de oxígeno sobre la capa superficial del medio, lo cual suplió los faltantes de este importante reactivo para el proceso de síntesis de celulosa bacteriana durante el tiempo de cultivo. Además, el aumento en la concentración celular coincide con los

resultados obtenidos de peso húmedo, de igual manera como lo expresó Bae y Shoda (14), puesto que al final del tiempo de cultivo la producción de celulosa bacteriana no es tan acelerada en clara relación con el crecimiento celular, que comienza a disminuir debido a una limitación de nutrientes en el medio de cultivo, teniendo en cuenta que las películas de celulosa son considerados como productos del metabolismo secundario de las células (84). Como se evidenció en la figura 5.9 el crecimiento celular tiene una fase de crecimiento exponencial bastante marcada a partir del día 7, hasta el 14, y notándose una disminución en la cantidad de células a partir del día 15 en adelante hasta finalizar el tiempo de incubación.

**5.2 Relación área-Volumen del bioreactor.** Se estableció que durante el cultivo y la producción de CB, se presentó una marcada relación entre el área del biorreactor y el volumen de este, lo que permitió observar el efecto sobre la superficie del cultivo y la interface aire-líquido.



**Figura 5.10 Diagrama del recipiente de cultivo A** (biorreactor plástico cilíndrico), 2000 mL de medio de cultivo, Estático y Estático+Aireación . **B** (biorreactor cónico), 2000 mL de medio de cultivo, Estático.

Se estudió el efecto que la geometría del biorreactor sobre la producción de celulosa, se relacionaron las dos áreas, una de ellas con la misma configuración de biorreactor, pero con diferente condición de cultivo, donde se puede inferir que en la configuración de biorreactor mostrado en la Fig. 5.10A el espacio ocupado por el medio de cultivo correspondió al 35% del espacio total, a diferencia del biorreactor cónico Fig 5.10B donde el espacio ocupado por el medio de cultivo correspondió al 50%, ahora de acuerdo a los resultados de relación entre el área y el volumen de medio de cultivo para ambos

biorreactores se pudo inferir que la relación área-volumen es importante por cuanto se muestra un mayor rendimiento en la cantidad de celulosa obtenida por área en el experimento con volúmenes de 2000 mL estático-aireación, lo que no sucedió con el experimento estático de 2000 ml y el estático en el reactor cónico que mostró unos rendimientos mucho menores debido a que el área superficial del cultivo en relación con el volumen de aire allí depositado fue menor en este experimento pues solo representó inicialmente el 50% de aire en la fase aérea lo que corroboró el hecho que el área interfacial ocupada por el aire es primordial para el desarrollo celular y por consiguiente para la producción de celulosa, que se suplió en el caso del experimento estacionario-aireación por la introducción de aire filtrado con 21% de oxígeno y suministrado por un compresor a una rata de 2 vvm, durante 12 horas intermitentes, datos suministrados en gráficos anteriores.

Se comparó la producción de celulosa obtenida con medio de cultivo económico (Max-MZA) usado en este experimento y con la configuración de biorreactor cilíndrico en condiciones estáticas con los resultados obtenidos por Phunsri A., y col (83), donde no se encontró diferencia significativa, dato que contrasta con la cantidad de celulosa que se obtuvo en el experimento con aireación, donde si se evidenció diferencia significativa; relacionándolo con los datos que reportó Retegi A., y Col (85), donde se utilizó un bioreactor rectangular y con una cantidad de medio semejante 1600 mL, y donde se obtuvo un rendimiento máximo de 1,93 g/L, lo cual muestra la eficiencia del bioreactor convencional cilíndrico que se utilizó en este experimento y además resultó satisfactorio para el interés de establecer una producción a nivel industrial. Ver ANEXO C

**Tabla 5.1 Producción de celulosa en dos cantidades de medio de cultivo y dos condiciones de aireación.**(Adaptada de Krystynowicz et al, 2002)

Volumen de medio (mL)	Altura del medio de cultivo (cm)	Área Superficial (cm <sup>2</sup> )	S/V (cm <sup>-1</sup> )	Grosor de la Película de CB (cm)	Peso de la celulosa seca (g)	Rendimiento de la CB (g/L)
<b>2000</b>	10	1282.5	0.64	0.56	5.8	2.9
<b>2000 *</b>	7	1885	0.94	0.41	6.23	3.11
<b>2000**</b>	7	1885	0.94	0.81	12.73	<b>6.4</b>

Estático → Reactor Cónico

\* Estático → Reactor cilíndrico

\*\* Estático+Aireación → Reactor cilíndrico

Datos a los 7 días de cultivo

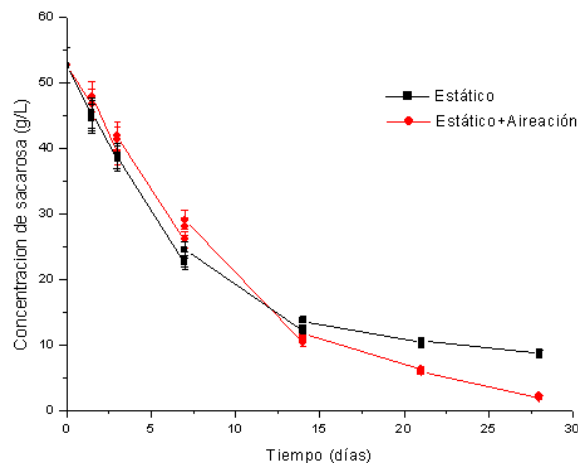
### 5.3 Consumo de Sustrato en relación a la cuantificación de sacarosa, Glucosa y Fructosa durante el tiempo de incubación (1.5; 3; 7; 14; 21; 28 días).

Se han utilizado diferentes fuentes de carbono para la producción de celulosa bacteriana, utilizando además diferentes estrategias de cultivo y diferente configuración del biorreactor. En el estudio realizado se utilizó melaza de caña como fuente de carbono principal dentro del medio líquido de cultivo Max MZA, que además contiene sales de grado industrial. La melaza es un subproducto de la industria azucarera que tiene una gran utilización biotecnológica, posee una composición rica en azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), en este trabajo se obtuvieron resultados tendientes a observar el comportamiento del consumo de azúcares durante el tiempo de cultivo y su influencia en la producción de celulosa bacteriana.

La melaza es una de las fuentes de carbono más económicas para la producción de celulosa bacteriana, por su alto contenido de azúcares y su alta viabilidad en materia de costos; la melaza a partir de la hidrólisis de la sacarosa y el consumo de glucosa y fructosa muestra un importante comportamiento en la síntesis del polímero.

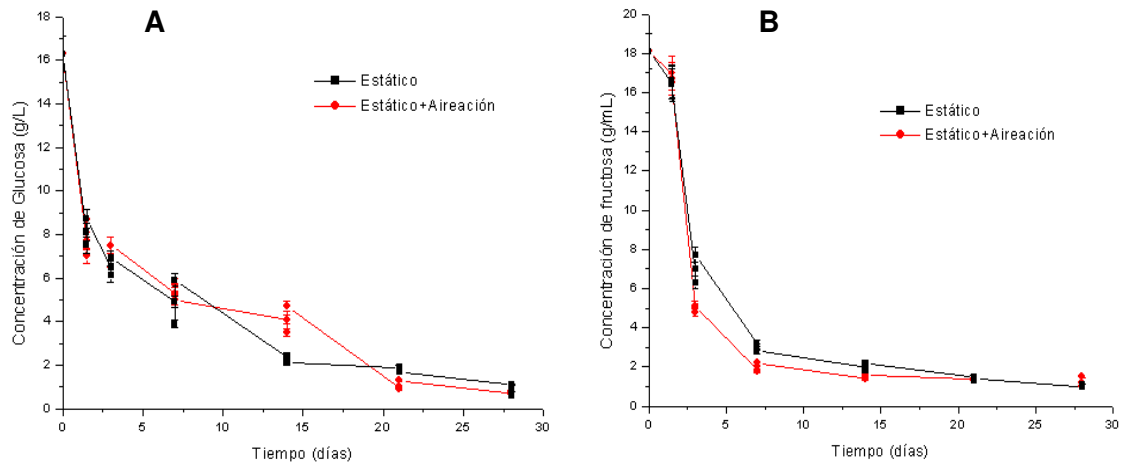
Inicialmente se presentó una disminución de la concentración de sacarosa, ver fig. 5.11 debido a que el medio de cultivo se sometió a calentamiento en autoclave con el propósito de esterilizarlo, lo que ocasionó una hidrólisis parcial del azúcar (tratamiento en caliente), donde el contenido inicial fue de 61 g/L, y pasó a ser de 52,6 g/L .

En la figura 5.11 se muestra el cambio en la concentración de sacarosa en cada uno de los tiempos de incubación, y para cada estrategia de cultivo. Se observó una mayor hidrólisis de sacarosa entre el día 3 al 14 con velocidades entre 2,85 a 4,71 g/L/d , y del día 14 en adelante la velocidad de hidrólisis disminuye con velocidades entre 2,84 y 1,57 g/L/d, para el experimento estático; Las velocidades de hidrólisis fueron muy semejantes durante todo el tiempo de incubación con valores entre 3,93 y 2,96 g/L/d para cada tiempo en el experimento estático+Aireación, posteriormente, la sacarosa residual hasta los 28 días tiende a decrecer hasta valores cercanos al 2% para el experimento con aireación y para el experimento estático hasta un valor de 16,4%. En relación a una eficiente hidrólisis de la sacarosa por *A. xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*), el proceso de producción de la BC se vió favorecido en el área interfacial (4), donde la difusión del oxígeno de la fase gaseosa tiene un efecto mayor (82); de acuerdo a esto se puede anotar que el consumo de sacarosa al final del tiempo de cultivo para el experimento estático corresponde a una cantidad del 79%, y en el experimento estático-aireación la concentración disminuyó hasta en un 82%.



**Figura. 5.11 Concentración de Sacarosa con dos estrategias de cultivo y a diferentes tiempos de cultivo (1,5, 3, 7, 14,21, y 28 días).**

Las concentraciones de glucosa y fructosa, son utilizadas por el microorganismo como fuente de carbono, de energía y en la síntesis de la celulosa bacteriana y están determinadas por las cantidades que la melaza tiene en su composición y por lo aportado por la hidrólisis parcial de la sacarosa componente también de la melaza, de ahí que inicialmente la melaza en solución tenía 61 g/L de sacarosa, 7 g/L de glucosa y 8 g/L de fructosa, luego de la esterilización las cantidades de sacarosa, glucosa y fructosa, cambiaron de igual manera después de que se inocularon los medios de cultivo con el 10 % V/V, las cantidades fueron 52,6 g/L de sacarosa, 16,3 g/L de glucosa y 18,1 g/L de fructosa, lo que corrobora lo expresado anteriormente.



**Figura 5.12. Concentración de Glucosa A y Fructosa B con dos estrategias de cultivo Estático Aireación**

**5.3.1 Hidrólisis de la Sacarosa.** El comportamiento de la hidrólisis de la sacarosa Figura 5.13 fue similar al consumo de glucosa y fructosa Figura 5.12A y 5.12B, lo que sugiere una relación directa entre la hidrólisis de la sacarosa y el consumo de glucosa, lo cual se refleja en la síntesis de celulosa bacteriana. Esto debido a que después del calentamiento del medio de cultivo (Esterilización) la sacarosa presente en la melaza se hidroliza parcialmente disminuyendo su concentración en el medio pero aumentando las concentraciones de glucosa y fructosa como se mencionó anteriormente, y de ahí más

adelante la maquinaria enzimática comenzó a realizar su trabajo en el proceso de síntesis de la celulosa bacteriana por lo que se observó en la figura 5.12A que a los 1,5 y 3 días hubo un mayor consumo de glucosa con respecto a fructosa; mientras, a los 7 días el consumo de glucosa es menor que el de fructosa. A los 21 y 28 días, la glucosa fue consumida hasta alcanzar concentraciones remanentes cercanas a cero (datos no mostrados). De acuerdo al consumo de los azúcares durante el tiempo y las condiciones iniciales de cultivo la bacteria muestra una mayor afinidad con el consumo de glucosa que casi es consumida en su totalidad durante el tiempo de cultivo. La fructosa también es consumida durante el tiempo de cultivo pero debe transformarse a glucosa-6 fosfato, por la vía de la pentosa fosfato o por medio de la gluconeogénesis. La glucosa 6 fosfato es convertida a glucosa 1 fosfato por la enzima fosfoglucomutasa y ser luego convertida a UDP-Glucosa, por la UDP-glucosa–fosforilasa que es el sustrato de la enzima celulosa sintasa como lo expresan Ariza, B. y González, L (39).

Todos los datos de consumo de glucosa y de la fructosa, dan muestra de la hidrólisis de la sacarosa, necesaria para la síntesis de celulosa.

La bacteria *Acetobacter xylinum*, ha mostrado ser eficiente para la hidrólisis de sacarosa, en medios de cultivo donde esta se encuentra libre, sin embargo el comportamiento presentado por ésta en el medio enriquecido con melaza de caña ha resultado eficiente aun cuando éste suele ser mas viscoso por no ser tratado inicialmente, sino solamente diluido. El proceso de producción de la celulosa bacteriana se ve favorecido en la interface aire/película de celulosa (87).

Para representar la hidrólisis de la sacarosa se utilizó el modelo de Michaelis–Menten, (88), los datos son representados en la grafica 5.13 a la que se le aplicó una regresión lineal donde se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\ln \frac{s}{s_0}}{(s_0 - s)} = -0,011 + 0,15 \frac{t}{(s - s_0)} \text{ Estático}$$

$$\frac{\ln \frac{s}{s_0}}{(s_0 - s)} = -0,006 + 0,160 \frac{t}{(s - s_0)} \text{ Estático + Aireación}$$

El complejo enzimático celulosa sintetasa se ajustó al modelo como lo expresa Ross. y col.(51), con un valor de  $K_m$  de 0,021 M y con una velocidad máxima de hidrólisis de 0,0041M/h para el experimento con aireación y de 0,0036 M/h para el experimento sin aireación. La dispersión de los datos mostraron un  $R^2$  de aproximadamente 0,995 para ambos experimentos, lo que indicó que el modelo se adecuó a la cinética encontrada. Los valores de  $K_m$  y de la velocidad máxima para la hidrólisis de sacarosa han sido escasos en este sistema de producción de celulosa. Los datos se representaron en la Figura 5.13., donde S (concentración de sustrato) y  $S_0$  (Concentración inicial del sustrato en el tiempo de cultivo).

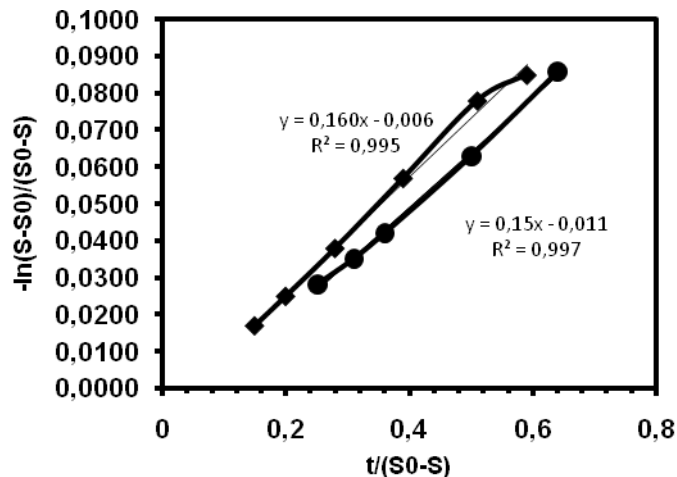


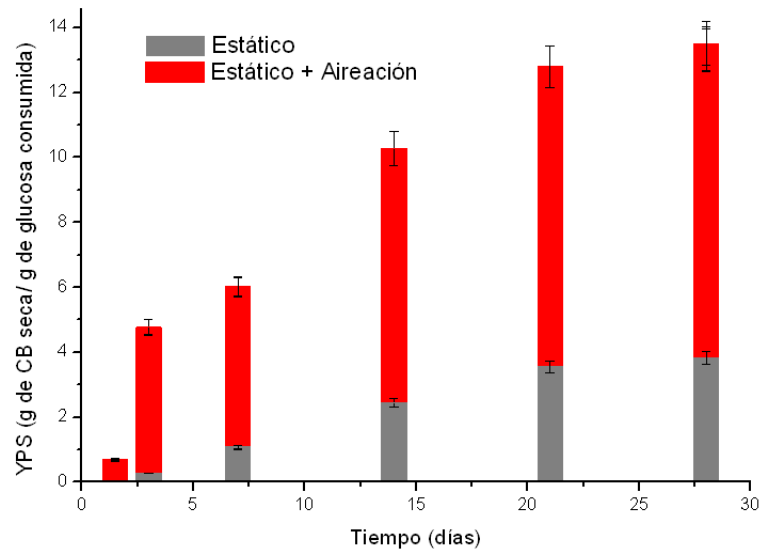
Figura 5.13 Regresión lineal de los datos obtenidos por la ecuación integrada de Michaelis-Menten con dos estrategias de cultivo. Estático ● Estático + Aireación ▲

**5.3.2 Coeficiente de rendimiento de producto. ( $Y_p/s$ )** El coeficiente fue determinado como la relación que existe entre la CB seca producida en el tiempo de cultivo y la cantidad de glucosa consumida, donde se pudo evidenciar un mejor rendimiento en cultivos estáticos con aireación que en cultivos estáticos sin aireación, dependiendo en gran manera de la configuración del reactor con valores que oscilan entre 0,013 hasta 8,7 g Celulosa seca/g de glucosa o fructosa (Ver fig. 5.14 y 5.15).

Lo anterior permitió concluir que utilizando el medio de cultivo en presencia de melaza como fuente principal de carbono, pero cuantificando rendimiento del producto en relación a la cantidad de glucosa y fructosa presente en el medio de cultivo y su consumo durante el proceso para las dos condiciones de cultivo, en el estático con aireación intermitente se



obtuvo el mayor rendimiento de CB a los 28 días con una producción de 81% más que en condiciones estáticas. El mayor consumo de glucosa en condiciones estáticas por *A. xylinum* se presentó en la primera semana del experimento en un promedio de 70% del consumo total, esto debido a distintos procesos metabólicos, como la utilización de glucosa como sustrato para la síntesis de CB, para la vía de pentosa fosfato y ciclo de krebs (35, 87). En relación al consumo de fructosa durante la producción de celulosa y su correspondiente  $Y_{p/s}$  presentó valores menores que los obtenidos con glucosa, con lo que se demostró la mayor afinidad y participación de la glucosa en la síntesis de celulosa.



**Figura 5.14 Coeficiente de rendimiento del producto ( $Y_{p/s}$ ) en relación a la glucosa consumida durante el proceso en las dos estrategias de cultivo Estático y Estático+Aireación**

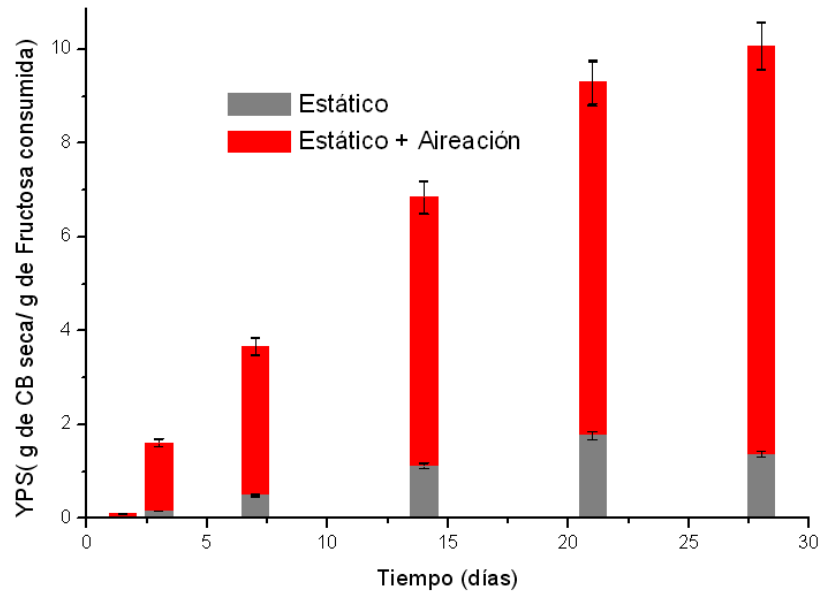


Figura 5.15 Coeficiente de rendimiento del producto (Yp/s) en relación a la fructosa consumida durante el proceso en las dos estrategias de cultivo Estático y Estático+Aireación

#### 5.4 Costos de producción.

Los costos de la preparación del medio de cultivo para la producción de celulosa bacteriana, donde se obtuvieron aproximadamente 500 g de celulosa (CB) húmeda se presentan en la tabla 5.2, comparándolos con otros medios evaluados por el grupo GIBM ( grupo de investigación en biología de microorganismos- Unisucre)

Tabla 5.2 Valor del litro de Medio MZ(medio melaza) en concentración de 13, 3% y valor del kilogramo de celulosa producido a los 28 días

Medio de Cultivo	Valor del litro de medio	Kilogramo de celulosa húmeda/litro de medio	Costo del kilogramo de celulosa (valor del medio y del proceso)
MZA(13,3%) Estático	206 pesos (US\$ 0,106)	0,43	479 pesos (US\$ 0,246)

<b>MZA (13,3%) Estático+Aireación</b>	<b>286 pesos (US\$ 0,1479)</b>	<b>0,48</b>	<b>595 pesos (US\$ 0,31)</b>
<b>Medio HS (modificado con Fructosa industrial) Benito-Revollo ,2012</b>	<b>680 pesos (US\$ 0,37)</b>	<b>0,39</b>	<b>1743 pesos (US\$ 0,968)</b>
<b>Medio HS (Hestrim Shram- sacarosa industrial) , Jaramillo y col , 2012</b>	<b>520 pesos (US\$ 0,29)</b>	<b>0.45</b>	<b>1155 pesos (US\$ 0,641)</b>
<b>Medio melaza tratada Bae and shoda (2005)</b>	<b>393 pesos (US\$0,202)</b>	<b>0, 46</b>	<b>854 pesos (US\$ 0,450)</b>

**Fuente: Valores hallados por Perna O, 2012**

En este estudio se pudo observar que los costos de producción de celulosa en el medio de cultivo MZA y con sales industriales resultan entre 479 y 595 pesos el kilogramo, lo que contrasta con el valor de 1 Kg de celulosa vegetal que esta alrededor de 1940 pesos valor que incluye materia prima y procesamiento (US\$ 1) (89).

### **5.5 Análisis Estadístico.**

El análisis de las variables que influyeron en la producción de la celulosa por *Acetobacter xylinum*, mostró cómo la aireación, el tiempo de cultivo y el volumen de medio utilizado fueron determinantes sobre los resultados obtenidos, de esta forma utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I y aplicándose un Anova factorial mostró las contribuciones debida a varios factores sobre la producción de celulosa y las variables inherentes al proceso, evaluando la contribución de cada factor para así obtener los valores P que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores, es así como en la tabla 5-3 se reportan estos datos.

**Tabla 5-3 P-valores para el proceso de Producción de celulosa bacteriana**

<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>AIREACION</b>
<b>Peso Húmedo</b>	0.0000	0.0258
<b>Peso Seco</b>	0,0000	0,0345
<b>Volumen sobrante</b>	0.0000	0.0009
<b>Espesor</b>	0.0000	0.0019
<b>Ph</b>	0.0000	0.0000
<b>Compresibilidad</b>	0.0000	0.0020
<b>UFC</b>	0.0000	0.0000
<b>Sacarosa</b>	0.0000	0.0162
<b>Fructosa</b>	0.0000	0.0000
<b>Glucosa</b>	0.0000	0.0000

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el tiempo es altamente significativo sobre la producción de celulosa bacteriana, fue influyente sobre todas las variables anexas al proceso con un nivel de confianza del 95%, de igual manera la condición de cultivo (estático y estático-aireación) también lo muestran de esta manera, lo que llevó a realizar una prueba de comparación de medias de múltiples rangos para cada una de las variables donde se evaluaron las diferencias significativas para la comparación en los resultados entre los diferentes tiempos y condición de cultivo, de esta forma se pudo observar los valores de la desviación estándar para cada variable y en cada tiempo entre sí (resultados que se muestran en ANEXO H).

De igual manera se realizó una comparación de medias entre cada tiempo parara cada variable y cada condición de cultivo lo que nos ayudó a dilucidar resultados mostrados anteriormente, ya que a través de estos se pudo observar las diferencias estadísticamente significativas paso por paso (estos datos también se muestran en ANEXO H).

---

## 6. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

### 6.1 Conclusiones

- Diferentes sistemas biológicos tienen la capacidad de sintetizar celulosa, pero se comprobó que la Bacteria *A. xylinum* en condiciones estáticas con aireación superficial Y utilizando melaza como fuente de carbono, 103 g/L, aproximadamente 20%, más que en el cultivo estático sin aireación.
- Los pesos secos obtenidos son mayores en un 50% que los reportados en la literatura, a pesar de que la estrategia de cultivo fue la estática, y la melaza utilizada solo fue diluida, se muestra la importancia de la aireación superficial, que suple la disminución de oxígeno durante el proceso de producción de la celulosa.
- En relación a la cantidad de células en el medio de cultivo se observa un crecimiento en fase exponencial hasta el día 14, a partir del cual se observa un descenso que tiende a la estabilidad en el número de colonias, causado por factores tales como la disminución de nutrientes y metabolitos producidos conjuntamente durante el proceso.
- El peso seco fue aumentando gradualmente durante el tiempo de cultivo, lo que al final mostró una diferencia entre las dos estrategias de alrededor 44,8 % para los 28 días.
- El mayor rendimiento producto/sustrato lo presentó la glucosa, lo que indica que el microorganismo presenta mayor afinidad por esta y además utiliza una ruta metabólica más eficiente que la fructosa.
- El valor comercial del medio de cultivo utilizado (Medio Max Mza) fue menor que el de otros estudios reportados donde se utilizaron reactivos de grado analítico y en este estudio, se integraron la melaza y reactivos de grado industrial.

La presente tesis permitió la presentación de resultados parciales y finales en los siguientes eventos nacionales e internacionales.

- Síntesis de celulosa por *Acetobacter xylinum* *ifo* en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente. XLVI Congreso Nacional De Ciencias Biológicas Medellín –Colombia Octubre 11-15 de 2011. Resultados finales.

- Producción de Celulosa Bacteriana en Condiciones Estáticas en un biorreactor cónico.(Artículo Corto) Memorias del evento ISBN Avance de Investigación (Ponente) I Congreso Internacional de Ingeniería Química, Biotecnológica y Alimentaria CLIQBA La Habana (Cuba) Noviembre 29- Diciembre 3 de 2010. Resultados parciales
- Producción de Celulosa Bacteriana en un Reactor Cónico y Condiciones Estáticas.Ponencia Memorias XLV Congreso Nacional De Ciencias Biológicas Armenia –Colombia Octubre 5-8 de 2010. Resultados parciales
- Producción de Celulosa Bacteriana en condiciones Estáticas en un biorreactor cónico.Poster Congreso Iberoamericano de Biotecnología y diversidad (CIB)Bioredandina. Manizales- Septiembre 1 – 4 de 2010 de 2010. Resultados parciales
- Efecto de la melaza y de otras fuentes de carbono sobre la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum*. Financiado por la División de Investigaciones (DIUS). Proyecto Concluido. Universidad de Sucre- Febrero, 2011. Proyecto Madre
- Aplicaciones Biomédicas de la celulosa bacteriana. Avance de investigación (Ponente).Presentado en el Cuarto Simposio regional de Investigación en Salud.Universidad de Sucre -Octubre de 2009. Revision.

## 6.2 Sugerencias

- Se hace necesario seguir estudiando el efecto de la melaza tratada y otras fuentes de carbono sobre la producción de celulosa de tal manera que se aumente la producción y que los costos disminuyan con el fin de escalar el proceso.
- Estudiar el efecto de la melaza pero con tratamiento térmico y químico sobre la producción de celulosa de tal manera que se haga más eficiente la síntesis, a partir de glucosa y fructosa, agregando aireación al medio de cultivo.
- Realizar estudios donde se evidencien las ventajas de la utilización de la celulosa bacteriana en comparación de la celulosa vegetal y las implicaciones ambientales respectivas, Biodegradabilidad etc.

- Realizar estudios a nivel exploratorio sobre la utilización de residuos agroindustriales, que contengan buenas fuentes de carbono y permitan el establecimiento de industrias locales productoras de celulosa bacteriana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Krystynowicz, A. & Bielecki, S. Biosynthesis of bacterial cellulose and its potential application in the different industries. Polish Biotechnology News consultado en. [www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html](http://www.biotechnology-pl.com/science/krystynowicz.html)
2. Williams, S. & Cannon, R. (1989). Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55,2448-2452
3. Hans, N. & Robyt, J. (1998). The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. *Carbohydr. Res.* 313, 125-133
4. Verschuren P.G., Cardona T.D., Robert Nout MJ., De Gooijer K.D and Van den Heuvel J.e. (2000). Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. *J. Biosci. Bioeng.* 89(5): 414-419.
5. Brown, A.J. (1886). XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose. *Rev. Journal of the Chemical Society, Transactions, Vol.49, 432-439.*
6. Hestrin, S. and Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochem. J.*, 58, 345
7. Dudman, W. (1959). Cellulose production by *Acetobacter Acetigenum* in defined medium. *J. gen. Rev. Microbiol. Vol. 21, 327.*
8. Embuscado, M., Marks, J., Bemiller, J. 1994. Bacterial Cellulose. *Rev. Food Hydrocolloid, Vol. 8, 407-418.*
9. Oikawa, T., Ohtori, T. y Ameyama, M. (1995) Production of cellulose from D.mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry.* vol. 59(2), pág. 331-332.
10. Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M..(1999). Kinetic aspect of bacterial cellulose formation in nata-decoco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 40,137–143.



- 
11. Ramana KV, Tomar A, Singh L.( 2000).Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. J Microbiol Biotechnol; 16:245-248.
  12. Ishihara, M., Matsunaga, M., y col.(2002). Utilization of D- xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. Enzyme and Microbial Technology. vol. 31, pág. 986-991.
  13. Bae, S. y Shoda, M . (2004) .Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium.\_Biotechnol Prog. Vol 20(5), pág1366-71.
  14. Bae, S. y Shoda, M.( 2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. Applied Microbial Biotechnology vol. 67, pág. 45-51
  15. S. Keshk, K. Sameshima, (2006). Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture, Enzyme Microb. Technol. 40 4–8. A19
  16. Premjet, S. Premjet, D. y ,Ohtani, Y. (2007). The Effect of Ingredients of Sugar Cane Molasses on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. Sen'i Gakkaishi, 63.193-199.
  17. Surma, B., Presler, S., Danielewicz., D. (2008). Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter xylinum* culture for application in papermaking. Rev. Fibres Text. Eastern Eur. Vol. 16: 108-111.
  18. Kurosumi, A., Sasaki, C., y col.( 2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. Carbohydrate Polymers. vol. 76, pág. 333-335
  19. Mikkelsen, D., Flanagan, B., Dykes, G. and Gidley, M.( 2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production y *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. Journal of Applied Microbiology, 107: 576–583. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.

- 
20. 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*. 85:506-513.
21. Jyh-Ming Wu, Ren-Han Liu (2012). Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Available online 23 October 2012.
22. Campbell, P.N. Smith, A.D. y Peters, T.J.,. *Bioquímica Ilustrada* . Quinta Edición. Barcelona: Masson. (2006)
23. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S. and Brown J., R. Malcolm. (2006). "Microbial cellulose--the natural power to heal wounds". *Biomaterials*, Vol. 27, No. 2, pp. 145-151.
24. Arshad Chaudry (Agosto 2004). «Cell Culture» (en inglés). *The Science Creative Quarterly*. [Consultado el 12 de Diciembre de 2010]. Disponible en <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>
25. Akerholm, M., Hinterstoisser, B. y Salmén, L. (2004). Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. vol. 339,pág. 569-578.
26. Watanabe K., Tabuchi M., Morinaga Y. and Yoshinaga F. (1998) "Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture". *Cellulose*, Vol. 5, No. 3, pp. 187-200.
27. Jung HI, Jeong JH, Lee OM, Park GT, Kim KK, Park HC, Lee SM, Kim YG, Son HJ (2010). Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresour. Technol*. 101: 3602-3608.
28. Romling U.( 2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria.*Research in Microbiology* 153: 205–212.
29. Saxena, I. M., and R. M. Brown, Jr. (2007). A perspective on the assembly of cellulose-synthesizing complexes: possible role of KORRIGAN and microtubules in

cellulose synthesis in plants. In: Brown, Jr., R. M. and Saxena, I. M. (eds) Cellulose: Molecular and Structural Biology, pp 169-181.

30. Zhou LL, Sun DP, Hu LY et al (2007) Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. J Ind Microbiol Biotechnol 34(7):483–489

31. Delmer DP (1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 245-276. Brown, Jr. R. M. (1994). Understanding nature's preference for cellulose I assembly: Toward a new biotechnology era for cellulose. Proc. Inter.Symp. Fiber Sci. and Tech. p437-239. Publishers. The Society of Fiber Science and Technology, Japan.

32. De Faveri D, Torre, P., Molinari F., Perego P., Converti A., (2003) Carbon material balances and bioenergetics of 2,3-butanediol bio-oxidation by *Acetobacter Hansenii*. Enzyme and Microbial Technology 33 708-719

33. Hwang JW, Yang YK, Hwang JK et al (1999) Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. J Biosci Bioeng 88(2):183–188

34. Méndez Ortiz, Micaela Marcela; Membrillo Hernández, Jorge. (2004). Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 7, núm. 001, , pp. 26-34 Universidad Nacional Autónoma de México.

35. Matsuoka, M., Tsuchida, T., y col.( 1996). A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry vol. 60, pág. 575-579.

36. Pourramezan, G.Z., A.M. Roayaei and Q.R. Qezelbash.( 2009). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2 Biotechnology, 8: 150-154.

37. Bielecki, S., Krystynowicz, A., y col.(2002). Bacterial Cellulose. Biopolymers. vol. 5(3), pág. 40-85.

- 
- 38 Jung, H., Jeong, J., y col.( 2010). Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresource Technology*. vol. 101(10), pág. 3602-3608.
39. Ariza, B. y Gonzalez, L.( 1997). Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología. Bogotá. Colombia. 22-27p.
40. Chao, Y., Miratai, M., y col.( 2001). Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50- L Airlift Reactor. *Biotechnology Progress*. vol. 17 pág. 781-785.
41. Villareal J.L .( 2002). Efecto de la Pulpa madura de la ahuyama (*Cucurbita maxima duchesne*) y de la cascara del banano comun (*Musa sapientum* L.) sobre la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* IFO. Tesis de pregrado Microbiología. Universidad Libre. Sede Barranquilla.
42. Czaja, W., Romanovicz, D. y Brown, R.( 2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*. vol. 11, pág. 403-411.
43. Castro, M.( 1993). Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación Acetobutílica. Tesis Pregrado Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. 3-35p.
44. Tellez, D. (2004.) Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín- Industria de Licores del Valle. Universidad del Valle. Tesis pregrado Bacteriología. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali. Cali, Colombia. 79p.
45. Czaja, N.; Krystynowics, A.; Kaweki, M.; Wysota, K.; Sakiez, S.; Wroblewsky, P.; Glik, J.; Nowak, M. y Bielicki, S.(2007). Biomedical applications of Microbial Cellulose in Burn Wound Recovery en *Cellulose Molecular and Structural Biology* (Brow, R. M. y Saxena, I. M.).

- 
46. Klemm, D.; Schumann, D.; Udhardt, U.; Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* 26: 1561–1603
47. Bolívar A. H.J., Orozco S. C.J. (2006.) Efecto de diferentes concentraciones de extracto de pulpa de tomate sobre la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum*. Tesis de Pre-Grado. Barranquilla, Colombia. Universidad Libre Barranquilla, Colombia. Facultad Ciencias de la Salud. Programa Microbiología Industrial.
48. Carreño, L. (2011). Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia.
49. Caicedo, L., De Franca, F. Y Lopez, L. (2001). Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática. *Revista Colombiana de Química.* vol. 30(2), pág. 155-162.
50. Chawla, P., Bajaj, I., y col.(2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology.* vol. 47(2), pág. 107-124.
51. Watanabe, K. y Yamanaka, S.(1995). Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed Under Static Culture Conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* vol. 59(1), pág. 65-68.
52. Hwang, Jung Wook, et al. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by acetobacter xylinum BRC5 in agitated cultura. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 183-188.
53. Astley, O., Chanliaud, E., Y Col. (2003). Tensile deformation of bacterial cellulose composites. *International Journal of Biological Macromolecules.* vol. 32, pág. 28–35.

- 
54. Caicedo, L., De Franca, F., Y Col. (2003). Permeabilidad hidráulica e hinchamiento en membranas de celulosa bacteriana. Memorias, III Congreso Internacional de Biomateriales BIOMAT
55. Chavez, J., Martinez, S., Contreras, M., Escamilla, E.(2004). Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. *Rev. Especializada en ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 7, 18-25.
56. Yang, Y., Park, S., Y Col. (1998). Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under Agitated Condition. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 85(3), pág. 312-317.
57. Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T.( 1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1244-125.
58. Jonas R, Farah LF. (1998). Production and application of microbial. cellulose. *Poly. Deg. Stab.* 59: 101-106.
59. Ross P, Mayer R, Benziman M.( 1991). Cellulose biosynthesis and fuction in bacteria. *Microbiol. Rev.* 55: 35-58.
60. Méndez Ortiz, Micaela Marcela; Membrillo Hernández, Jorge. (2004). Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 7, núm. 001, pp. 26-34 Universidad Nacional Autónoma de México. México.
61. Delmer DP.( 1999). Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 245-276.

- 
62. Legnani, C., Vilani, C., y col. (2008.). Bacterial cellulose membrane as flexible substrate for organic light emitting devices. *Thin Solid Films*. vol. 517(3), pág. 1016-1020.
63. Gómez-Manzo S, Arreguín-Espinosa R, Contreras-Zentella M, Escamilla-Marván E.( 2005). Las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas en los sistemas bacterianos: distribución, clasificación, estructura y función *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol*.
64. Matsushita, K.; Takakai, Y.; Shinagawa, E.; Ameyama, M. y Adachi, O.( 1992). Ethanol oxidase respiratory chain of Acetic Acid Bacteria *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 304 -310.
65. Benziman, M. y Palgi, A. (1970) Characterization and properties of the Pyruvate Phosphorilation system of *Acetobacter xylinum* *Journal of Bacteriology*. 104 (1): 211-218..
66. Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T. & Adachi, O. (2003), 5-Keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl Environ Microbiol*.
67. Wolfe, A. J.( 2005). The Acetate Switch *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69 (1): 12-50.
68. Chávez-Pacheco, J. L.; Martínez-Yee, S.; Contreras, M. L.; Gómez-Manzo, S.; Membrillo-Hernández, J., Escamilla, J. E (2005). Partial bioenergetic characterization of *Gluconoacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology *Journal of Applied Microbiology*. 99: 1130-1140 51.
69. Bailey, J., Ollis, D. T. (1997). *Biochemical Engineering Fundamentals* Mc Graw-Hill.
70. Blanch, H. W.; Clark, D. "Biochemical Engineering Marcel Dekker".

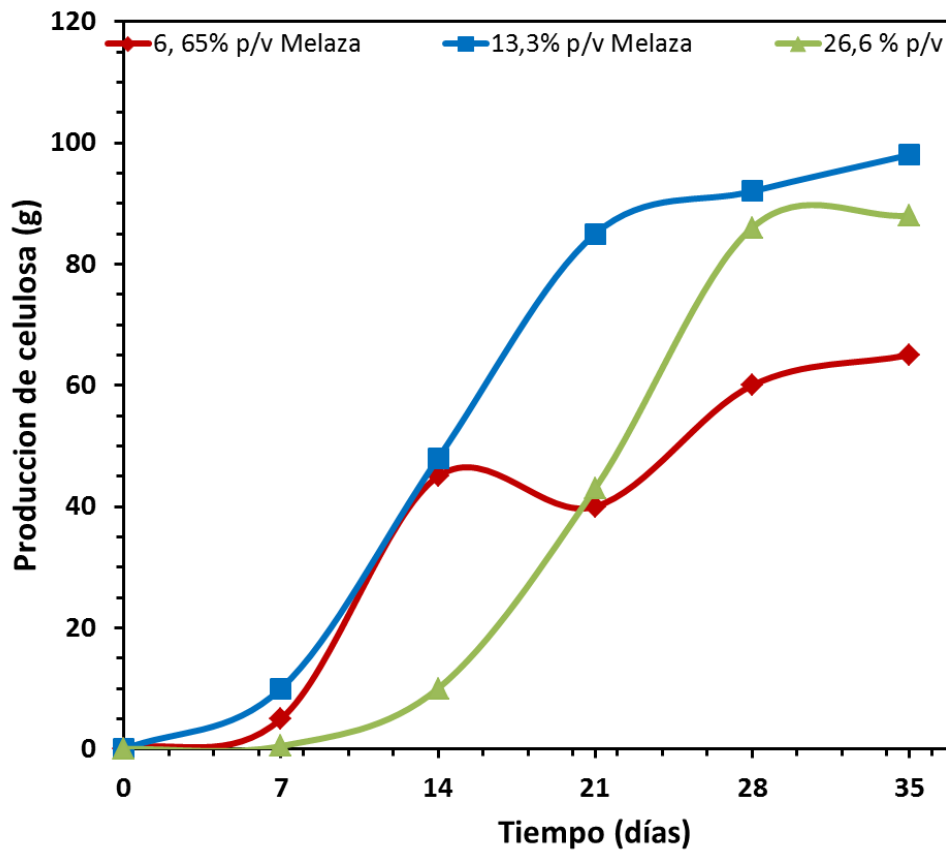
- 
71. Yadav V, Paniliatis BJ, Shi H, Lee K, Cebe P, Kaplan DL.( 2010). Appl Environ Microbiol. Novel in vivo-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus* 76(18):6257-65.
72. Marzieh Moosavi-Nasab, Ali R. Yousef. (2010). Investigation of Physicochemical Properties of the Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter xylinus* from Date Syrup. World Academy of Science, Engineering and Technology vol 68 .
73. Serafica, G., Mormino, R. Y Bungay, H.( 2002). Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. Applied microbiol biotechnology vol. 58, pág. 756-760.
74. Taylor, K.A.C.C.( 1995). Colorimetric Fructose Assay. Appl. Biochem. Biotechnol. 53 (3): 215-227.
- 75.K, Hamilton P. (1956). Division of biochemistry, University of Minnesota, St Paul.
76. Cheng Hp, Wang Pm, Chen Jw, Wu Wt. (2002). Cultivation Of *Acetobacter Xylinum* For Bacterial Cellulose Production In A Modified Airlift Reactor. Biotechnol. Appl. Biochem. 35:125-132.
77. Orozco, I., Martinez, S.( 2002). Diseño de un medio de cultivo a bajo costo para el rendimiento de celulosa producida por *Acetobacter xylinum* IFo. Universidad Libre de Barranquilla. Tesis de pregrado del programa de Microbiología Industrial.
78. Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-J A, Gonçalves-MM, Turkiewicz M, Bielecki S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. J Ind Microbiol Biotechnol (9:189-195).
79. El-Saied, H., El-Diwany, I., Basta, H., Atwa, a., & El-ghwas, D. (2008). Production and characterization of economical bacterial cellulose. BioResources, 3(4), 1196– 1217.



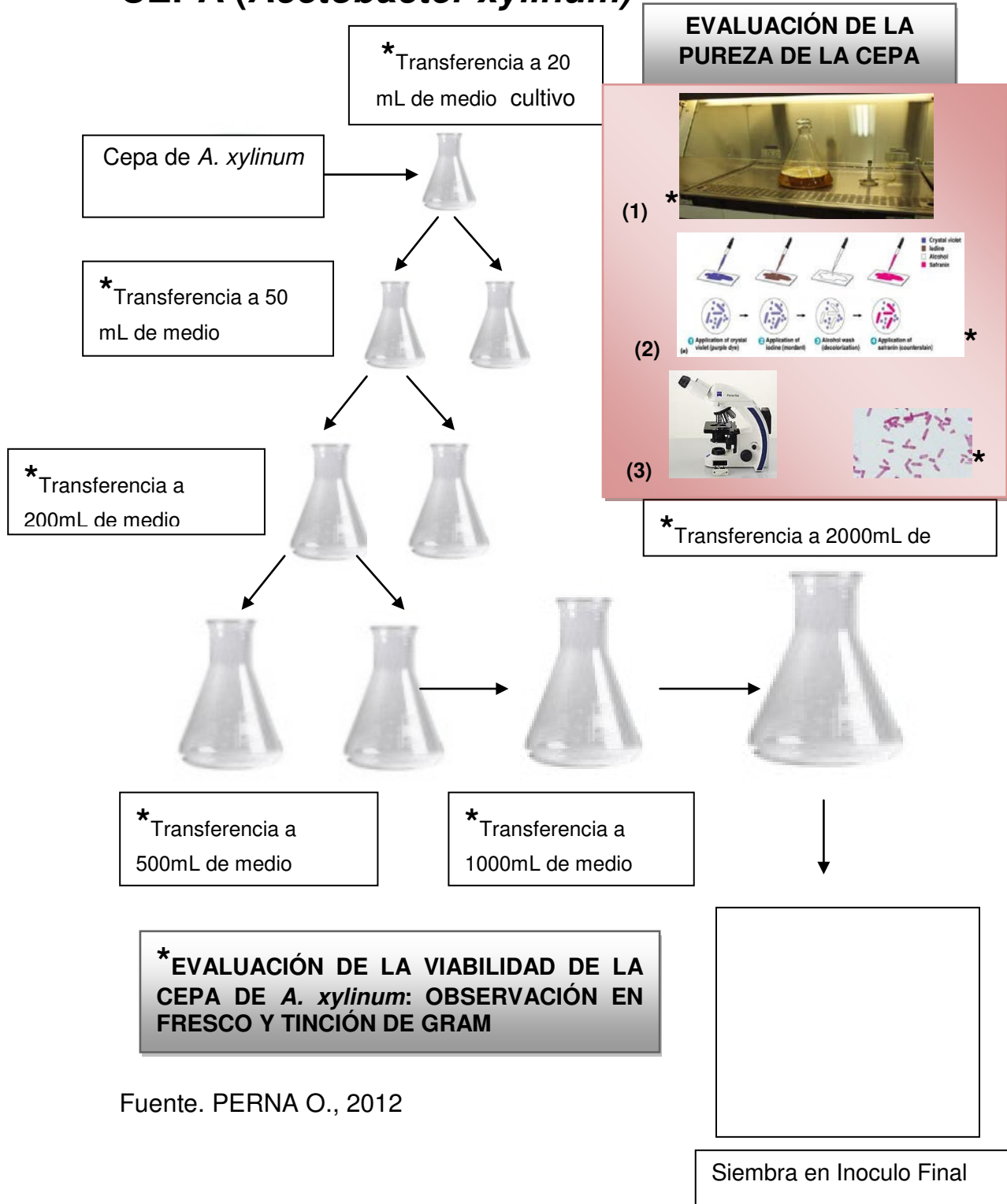
- 
80. Hesse-Ertelt S., Heinze, T; Togawa, E. (2010). Structure elucidation of uniformly C-13-labeled bacterial celluloses from different *Gluconacetobacter xylinus* strains ., Journal Article Cellulose.
81. Shead, O.; Khan, S.; Khan, T.; Park, J. K.( 2009). Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. Korean Journal of Chemical Engineering. 26: 1689–1692.
82. Verschuren P., Cardona T., and Van den Heuve J.( 2000). Location and Limitation of Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Established from Oxygen Profiles. Journal of bioscience and bioengineering Vol. 89, No. 5, 414-419.
83. Phunsri A, Tammarate P, Krusong W, Tantratian S.( 2003). The liquid/air interface area and depth of liquid medium suitable for cellulose production from *Acetobacter* TISTR 975. J Sci Res Chula Univ; 28(1):35-43.
84. Shead, O.; Khan, S.; Khan, T.; Park, J. K.(2009). Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. Korean Journal of Chemical Engineering. 26: 1689–1692.
85. Weia, B.; Yanga, B.G.; Hong, F. ( 2011). Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. Carbohydrate Polymers. 84:533–538.
86. Retegi A., Gabilondo N., Peña C., Zuluaga R., Castro C., Gañamon P., De la Caba K., Mondragon I.(2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships. Springer Science+Business Media .
87. Cheng Hp, Wang Pm, Chen Jw, Wu Wt.( 2002). Cultivation Of *Acetobacter Xylinum* For Bacterial Cellulose Production In A Modified Airlift Reactor. Biotechnol. Appl. Biochem. 35:125-132.

88. Missen RW, Mims CA, Saville BA.( 1999). Introduction to Chemical Reaction Engineering and Kinetics. New York: John Wiley & Sons, Inc
89. ([http://www.corma.cl/\\_file/file\\_405\\_82590\\_arauco-franco\\_bozzalla.pdf](http://www.corma.cl/_file/file_405_82590_arauco-franco_bozzalla.pdf)) consultado el 12 de Noviembre de 2012
90. Newman, R. H. (1998). Evidence for assignment of  $^{13}\text{C}$  NMR signals to cellulose crystallite surfaces in wood, pulp, and isolated celluloses. *Holzforschung*, 52, 157–159.
91. Noro, N.; Sungano, Y.; Shoja, M. 2004. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 199-205.

## ANEXO A. CONCENTRACIONES DE MELAZA (ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA ESCOGENCIA DE LA CONCENTRACION DE TRABAJO, 13, 3%)



# ANEXO B. MANTENIMIENTO Y ACTIVACIÓN DE LA CEPA (*Acetobacter xylinum*)



## **ANEXO C. LOTE DE BIORREACTORES DE 3 LITROS, CON 1 LITRO DE MEDIO MELAZA (MZA)-PRELIMINARES**



Fuente. PERNA O. 2012

## ANEXO D. BIORREACTOR CON PELÍCULA DE CELULOSA EN EL MEDIO MELAZA.



Fuente. PERNA O. 2012

**ANEXO E. PELÍCULAS DE CELULOSA HÚMEDA Y SECA SINTETIZADAS EN (MEDIO MELAZA), EN CONDICIONES ESTÁTICAS EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SUCRE**



Fuente. PERNA O. 2012

## ANEXO F. BIORREACTORES CILÍNDRICOS PLÁSTICOS DE 6 LITROS CON 2 LITROS DE MEDIO MZA (AIREACIÓN)



FUENTE. PERNA O. 2012



**ANEXO G. PELICULA DE CELULOSA SINTETIZADA  
EN LOS BIORREACTORES CILÍNDRICOS CON 2  
LITROS DE MEDIO MZA (AIREACIÓN)**



Fuente. PERNA O. 2012

## ANEXO H. ANÁLISIS DE VARIANZA OBTENIDOS CON EL SOFTWARE STATGRAPHICS CENTURION XVI.I

### Análisis de Varianza para Peso humedo - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	3,18156E6	5	636311,	36,04	0,0000
B:Volumen	796796,	2	398398,	22,57	0,0000
C:Aireacion	92081,9	1	92081,9	5,22	0,0258
RESIDUOS	1,11217E6	63	17653,4		
TOTAL (CORREGIDO)	5,97238E6	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Peso humedo en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Peso humedo con un 95,0% de nivel de confianza.

### Análisis de Varianza para Peso Seco - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	15179,0	5	3035,8	36,58	0,0000
B:Volumen	3816,84	2	1908,42	23,00	0,0000
C:Aireacion	387,434	1	387,434	4,67	0,0345
RESIDUOS	5228,34	63	82,9895		
TOTAL (CORREGIDO)	28224,3	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Peso Seco en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Peso Seco con un 95,0% de nivel de confianza.

### Análisis de Varianza para Volumen Sobrante - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	5,03714E6	5	1,00743E6	29,56	0,0000
B:Volumen	1,86617E7	2	9,33083E6	273,75	0,0000
C:Aireacion	417101,	1	417101,	12,24	0,0009
RESIDUOS	2,14738E6	63	34085,4		
TOTAL (CORREGIDO)	2,94582E7	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Volumen Sobrante en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Volumen Sobrante con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para Espesor - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	4985,78	5	997,157	82,57	0,0000
B:Volumen	438,489	2	219,244	18,16	0,0000
C:Aireacion	127,502	1	127,502	10,56	0,0019
RESIDUOS	760,779	63	12,0759		
TOTAL (CORREGIDO)	6862,57	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Espesor en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Espesor con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para pH - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	0,616407	5	0,123281	64,40	0,0000
B:Volumen	0,330478	2	0,165239	86,31	0,0000
C:Aireacion	0,132011	1	0,132011	68,96	0,0000
RESIDUOS	0,12061	63	0,00191444		
TOTAL (CORREGIDO)	1,1326	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de pH en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para Compresibilidad - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	5097,07	5	1019,41	958,60	0,0000
B:Volumen	0,12037	2	0,0601852	0,06	0,9450
C:Aireacion	11,1111	1	11,1111	10,45	0,0020
RESIDUOS	66,9965	63	1,06344		
TOTAL (CORREGIDO)	5178,97	71			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Compresibilidad en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2

valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Compresibilidad con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para UFC - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	2,10133E21	5	4,20267E20	9,27	0,0000
B:Volumen	1,97743E19	1	1,97743E19	0,44	0,5123
C:Aireacion	1,88926E21	1	1,88926E21	41,66	0,0000
RESIDUOS	2,08589E21	46	4,53453E19		
TOTAL (CORREGIDO)	6,47489E21	53			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de UFC en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre UFC con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para Sacarosa - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	5925,13	3	1975,04	138,30	0,0000
B:Aireacion	92,3825	1	92,3825	6,47	0,0162
RESIDUOS	442,717	31	14,2812		
TOTAL (CORREGIDO)	6454,96	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Sacarosa en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Sacarosa con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para Fructosa - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:B.Tiempo	468,387	5	93,6773	1859,76	0,0000
B:B.Aireacion	5,913	1	5,913	117,39	0,0000
RESIDUOS	1,46075	29	0,0503706		
TOTAL (CORREGIDO)	475,76	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Fructosa en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Fructosa con un 95,0% de nivel de confianza.

#### **Análisis de Varianza para Glucosa - Suma de Cuadrados Tipo III**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					

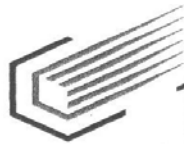
A:Tiempo	1085,36	5	217,072	1586,41	0,0000
B:Aireacion	5,81614	1	5,81614	42,51	0,0000
RESIDUOS	3,96815	29	0,136833		
TOTAL (CORREGIDO)	1095,15	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Glucosa en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Glucosa con un 95,0% de nivel de confianza.

# ANEXO I. CERTIFICADO DE PONENCIA EN EL I CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA BIOTECNOLÓGICA Y ALIMENTARIA (CIIQBA, 2010) ISBN 978-959-261-317.1



29 de noviembre al 3 de diciembre de 2010

**15 CONVENCIÓN CIENTÍFICA  
DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA**  
PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA

El Comité Organizador  
de la XV Convención Científica  
de Ingeniería y Arquitectura  
otorga el presente

## CERTIFICADO

Ponente

a.

*Rubén Darío Jaramillo Lanchero, Olga Perna, José  
Edgardo Escamilla Marvan*

Por la presentación del trabajo titulado:

*Producción de celulosa bacteriana en condiciones  
estáticas en un biorreactor cónico.*

En el marco del:

*I Congreso Internacional de Ingeniería Química,  
Biotecnológica y Alimentaria (CIIQBA 2010)*

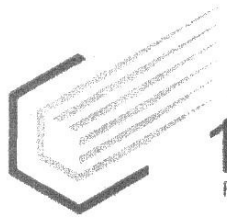
**46**

ANIVERSARIO  
cujae

2010

Dra. Alicia Alonso Becerra  
Presidenta del Comité Organizador  
Rectora del Instituto Superior Politécnico  
José Antonio Echeverría

La Habana, Cuba



29 de noviembre al 3 de diciembre de 2010

**15** CONVENCION CIENTIFICA  
DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA  
PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA

**cujae**

# CDMEMORIAS

Ministerio  
de Educación  
Superior  
La Habana, Cuba

Contenido por eventos

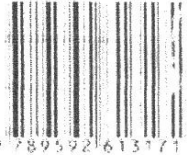
Programa

Ponencias

**46**  
ANIVERSARIO  
**cujae**  
2 0 1 0

© 2005 Cujae. Derechos Reservados

ISBN 978-959-261-317-1



9 789592 613171

## ANEXO J PARTICIPACION EN ELXLVI CONGRESO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACCB 2011, CON PONENCIA







**REVISTA  
DE LA  
ASOCIACION  
COLOMBIANA  
DE  
CIENCIAS  
BIOLOGICAS**

**MEMORIAS  
XLVI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Medellín, 11 al 15 de octubre de 2011**

**Editora**

Patricia Landazuri M.Sc. Ph.D

Carrera 15 Calle 12 norte. Fiv (6) 7460129 Universidad del Quindío

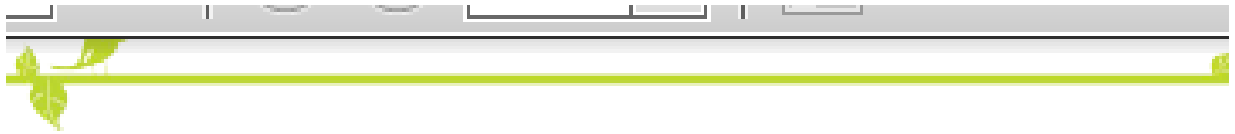
E-mail: [editorial.revista@asoccolombia.org](mailto:editorial.revista@asoccolombia.org)

Armenia Quindío Colombia

La revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas (ISSN 0120-4173) es el órgano de divulgación de esta asociación científica. Es una publicación periódica de circulación nacional e internacional que aparece anualmente en formato de 240mm x 17 mm con una tirada de 1.000 ejemplares por edición.

Todos los derechos por la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas (ACCB). La revista no asume responsabilidad alguna por la información contenida en los artículos publicados, responsabilidad imputable solo a los autores.

rev. asoc. col. cienc. biol.	Medellín, Ant. (Colombia)	Número 23 Suplemento 1	p p 1- 399	2011	ISSN 0120-4173
------------------------------------	------------------------------	---------------------------	------------	------	-------------------



## SÍNTESIS DE CELULOSA POR *ACETOBACTER XYLINUM* IFO EN PRESENCIA DE MELAZA DE CAÑA BAJO CONDICIONES ESTÁTICAS Y/O DE FLUJO DE AIRE INTERMITENTE

Rubén D. Jaramillo L.<sup>1</sup>, Olga Perna M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Sucre, Docente Grupo de Investigación en Biología de Microorganismos (GIBM), Laboratorio de Investigación en Microbiología (LIM), Programa de Biología, Universidad de Sucre.

[rubenjaramillo@hotmail.com](mailto:rubenjaramillo@hotmail.com); [olpar@hotmail.com](mailto:olpar@hotmail.com)

### RESUMEN

La celulosa es el biopolímero más abundante que existe en la naturaleza, proveniente principalmente de fuentes de origen vegetal. La celulosa producida por *Acetobacter xylinum* es celulosa pura, que no contiene hemicelulosa, pectina y lignina; Se diferencia de la vegetal por no tener la cavidad intracelular. Además, extracelularmente sintetiza microfibrillas de celulosa bacteriana que la diferencian de la celulosa obtenida de las plantas por su alta cristalinidad, alta capacidad de absorción de agua y resistencia mecánica. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la melaza y de las condiciones del cultivo (Estático y Estático –Aireación) sobre la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum*, en un reactor cilíndrico de seis litros de volumen, con dos litro de medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo melaza (MZA) a pH 5,6. El volumen del inóculo fue el 10% v/v del volumen de medio; la incubación se realizó en condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente a temperatura ambiente. Se determinaron la formación de celulosa, el rendimiento del producto, grosor, pH, compresibilidad, volumen, UFC y concentración de glucosa, fructosa, y sacarosa en los medios remanentes del cultivo a diferentes tiempos. La producción de las biopelículas hasta los 28 días de incubación en el medio MZA (Estático-Aireación) se incrementó en un rango del 7 al 9 % en relación a las obtenidas en el medio MZA (Estático); asimismo el consumo de sustrato (Sacarosa, Fructosa y Glucosa) incidió directamente en la producción de las películas de celulosa durante el tiempo de cultivo.

**Palabras Claves:** Celulosa bacteriana, *Acetobacter xylinum*, melaza, aireación intermitente, consumo de sustrato, cultivo estático.

## SATURACIÓN DEL MAPA GENÉTICO DE UNA POBLACIÓN INTRA-ACERVO DE FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EMPLEANDO MARCADORES MOLECULARES TIPO SSR Y SSCP

Natalia Franco Herrera, Matthew W. Blair y Nohra Rodríguez Castillo

<sup>1</sup>Estudiante Biología - Universidad del Quindío [nff364@gmail.com](mailto:nff364@gmail.com)

<sup>2</sup> PhD especialista en estudios de diversidad genética <sup>3</sup>. Docente Universidad del Quindío [nohrodriguez@gmail.com](mailto:nohrodriguez@gmail.com)

## ANEXO K CARTA DONDE CONSTA QUE SE VA A SOMETER UN ARTICULO CIENTÍFICO A LA REVISTA MVZ CATEGORÍA A1.

---

Sincatejo, Junio 4 de 2013

Señores  
Comisión de Maestría en Diseño y gestión de procesos.  
Facultad de Ingeniería  
UNIVERSIDAD DELA SABANA  
CHIA-CUNDINAMARCA-COLOMBIA

Estimados Señores  
De la manera más atenta, me permito hacer entrega del borrador del Artículo científico denominado "Síntesis de Celulosa en melaza por *Acetobacter xylinum* IFO bajo condiciones estáticas y/o aireación intermitente". Que va a ser presentado a la Revista MVZ de la Universidad de Córdoba, Categoría A1 para el mes de Julio de 2013, debido a su aparición cuatrimestral.  
Autor: La Estudiante de la Maestría en Diseño y Gestión de procesos OLGA PERNA MANRIQUE Código 200820617

Adjunto Manuscrito,

Agradeciendo la atención prestada.



RUBEN JARAMILLO LANCHERO  
DIRECTOR TESIS  
PhD IBB - UNAM  
Director Grupo GIBM  
Par Evaluador Colciencias - CNA