

Recibido: 11 de Junio de 2014. Aceptado: 14 de Julio de 2014.

Efecto de la melaza de caña tratada con ácido sulfúrico en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693

Resumen

En este estudio se evaluó el efecto de la melaza tratada con ácido sulfúrico (MZA-TR) y de las condiciones del cultivo (estático) sobre la síntesis de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693, para ello, se usó un reactor con 0,2 litros de medio de cultivo, con concentraciones iniciales de 13,3 % y 26,6 % de MZA-TR en el medio de cultivo a pH 5,6. El volumen del inóculo fue del 10 % del volumen total del medio; el proceso se realizó a temperatura ambiente (30 °C), con tiempos de incubación de 3, 7, 14, 21 y 28 días. Además, se evaluaron distintos parámetros fisicoquímicos y mecánicos de la celulosa. El grosor de la película de celulosa presentó un máximo de 2,5 cm, siendo el mejor resultado obtenido, en comparación con anteriores reportes en la literatura. También se encontró que al usar MZA-TR en el medio de cultivo hay un incremento considerable de la producción de celulosa en estático a los 28 días de incubación. Finalmente, se observó que el consumo de glucosa y de fructosa disminuye durante la síntesis de celulosa bacteriana (CB); durante los 3 primeros días de incubación se observó el máximo descenso, lo que permite correlacionar la producción de CB con el consumo de medio. La concentración de 13,3 %, presenta los mejores resultados en los parámetros de velocidad de crecimiento microbiano, cantidad y calidad de la celulosa producida.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, *Gluconacetobacter xylinus* ifo 13693, melaza tratada, cultivo estático, consumo de sustrato.

Effect of molasses cane treated with sulfuric acid in the production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693

Abstract

This study assessed the effect of molasses treated with sulfuric acid (MZA-TR) and the condition of the crop (static) on the synthesis of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693, using a reactor with 0,2 liters of growing medium, with initial concentrations of 13,3 % and 26,6 % of molasses treated (MZA-TR) in the culture medium at pH 5,6. The volume of the inoculum was 10 per cent of the total volume of the environment; the process was carried out at ambient temperature (30 °C), with times of incubation of 3, 7, 14, 21 and 28 days. Also, different physico-chemical and mechanical parameters of the pulp were evaluated. The thickness of the cellulose film presented a maximum of 2.5 cm, being the best result obtained, in comparison to previous reports in the literature. Furthermore, it was found that using MZA-TR in the middle considerably increased the production of cellulose in static at 28 days of incubation. Finally, it was observed that the consumption of glucose and fructose decreased during the synthesis of Bacterial Cellulose (BC); during the first 3 days of incubation it was noted the maximum decline, which allows to correlate the production of CB with the consumption of media. The concentration of 13.3 %, presents the best results in the speed parameters of microbial growth, the quantity and quality of cellulose produced.

Key words: bacterial Cellulose, *Gluconacetobacter xylinus* ifo 13693, molasses treated, static culture, substrate consumption.

Efeito do melaço de cana tratada com ácido sulfúrico na produção de celulose por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693

Resumo

Neste estudo foi avaliado o efeito do melaço tratado com ácido sulfúrico (MZA-TR) e das condições da cultura (estática) sobre a síntese de celulose pelo *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. Para isso, foi utilizado um reator com 0,2 litros de meio de cultura, com concentrações iniciais de 13,3 e 26,6% de MZA-TR, e pH igual a 5,6. O volume de inóculo foi de 10% do volume total do meio, e o processo foi realizado a temperatura ambiente (30°C), com tempos de 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Além disso, foram avaliados os distintos parâmetros físico-químicos e mecânicos da celulose. A espessura máxima que apresentou o filme de celulose foi de 2,5 cm, sendo o melhor resultado obtido, ao comparar com os reportados anteriormente na literatura. Verificou-se também que ao usar MZA-TR no meio de cultura houve um aumento considerável na produção de celulose no meio estático aos 28 dias de incubação. Finalmente foi observado que o consumo de glicose e frutose diminuiu durante a síntese de celulose bacteriana (CB). Durante os três primeiros dias de incubação verificou-se a diminuição máxima, o que permite correlacionar a produção de CB com o consumo do meio. A concentração de 13,3% apresentou os melhores resultados nos parâmetros da velocidade de crescimento microbiano, quantidade e qualidade da celulose produzida.

Palavras-Chave: celulose bacteriana, *Gluconacetobacter xylinus* ifo 13693, melaço tratado, cultura estática, consumo de substrato.

Introducción

La celulosa es la molécula biológica más abundante, y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros en la tierra, su principal fuente es de origen vegetal, formando parte de la pared celular en plantas. La celulosa puede ser sintetizada por diferentes sistemas biológicos, como hongos, algunos representantes del phylum *Chordata* (o tunicados), que son un tipo de animales marinos y bacterias del género *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina* y *Acetobacter* (1), donde los productores más eficientes son las bacterias Gram-Negativas del género *Acetobacter*; la más importante de ellas *Acetobacter xylinum* (reclasificada como *Gluconoacetobacter xylinus*) se ha utilizado como microorganismo modelo en los estudios básicos y aplicados sobre este producto (2). La celulosa de origen bacteriano es de gran interés debido a sus propiedades mecánicas, su alto grado de cristalinidad, pureza y polimerización. Además, resulta ser de gran importancia industrial, pues a diferencia de las celulosas vegetales se encuentra libre de hemicelulosa y lignina, características que la hacen industrialmente conveniente (3). Por otro lado, esta forma de obtener celulosa a partir de bacterias resulta ser una alternativa ante la celulosa de origen vegetal, debido a que puede solucionar problemas de impacto ambiental tales como la pérdida de grandes cantidades de bosque, el debilitamiento del suelo, la extinción de fauna y flora nativa y el aumento del calentamiento global (2, 3).

La celulosa bacteriana tiene una gran variedad de aplicaciones en las industrias papeleras, textiles, alimenticias, militares, de azúcares fermentables, de fabricación de membranas usadas como agentes de separación, sustitutos temporales de la piel para el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones en la epidermis (1, 4, 5, 6), además de aplicaciones específicas en medicina y biotecnología. Es por ello que en los últimos años se han venido desarrollado investigaciones con distintas estrategias de cultivo para la obtención de celulosa con el fin de aumentar la producción, utilizando diferentes fuentes de carbono como sorbitol, etanol, manitol, glicerol, lactosa, galactosa, sacarosa, glucosa y fructosa (7, 8, 9, 10) que a pesar de su eficiencia en la producción, tienen un elevado costo comercial. El uso de diversas fuentes de carbono y el empleo de distintas metodologías y reactores (cultivos estáticos, en agitación), no han satisfecho la elevada demanda del producto, por lo cual se proyectó realizar una investigación donde se pueda obtener un alto rendimiento en el proceso de síntesis, utilizando estrategias que garanticen una alta producción y una reducción de los costos.

La melaza es un subproducto final en el proceso de fabricación de azúcar, además, es una mezcla muy compleja que contiene principalmente azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa. Este sustrato ha sido utilizado por la industria de la fermentación por su composición y por ser una fuente económica de carbohidratos; estudios sobre la modificación de las fuentes de carbono sobre la producción de celulosa en *G. xylinus* han demostrado que su uso aumenta la producción de celulosa sin afectar su pureza y cristalinidad (11).

La producción de exopolisacáridos microbianos en melaza sin tratamiento como fuente de carbono disminuye el costo y genera un valor agregado a este subproducto de la industria azucarera, por lo que el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de la melaza de caña tratada con ácido sulfúrico sobre la síntesis de celulosa por *G. xylinus*, estableciendo, por un lado, el efecto de la concentración de melaza tratada sobre la producción de Celulosa Bacteriana (CB), y por el otro, determinando las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de esta.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizó la cepa silvestre *Gluconoacetobacter xylinus* IFO 13693, donada por el Dr. Edgardo Escamilla (QEPD) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Medios y condiciones de cultivo

Para el mantenimiento de *G. xylinus* IFO 13693 se usó el medio Watanabe y Yamanaka (12) modificado a una temperatura de 30 °C en condiciones estáticas hasta observar la capa de celulosa. El medio de cultivo para pre-inóculos estuvo constituido por el 5 % (p/v) de melaza en solución (13), amonio, ácido cítrico y suplementos con sales de magnesio, fosfato, calcio y potasio.

El pH del medio se ajustó a 5,6 con NaOH 1,0 N o HCl 10 % (v/v), posteriormente los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 min, a su vez, los matraces fueron sometidos a luz UV durante 15 min en cámara de flujo laminar; este procedimiento se realizó antes de inocular el medio de cultivo. Luego se inocularon 5 mL (10 %) de colonias de *G. xylinus* en 50 mL de medio en un Erlenmeyer de 100 mL; y se incubaron a 30 °C. Los procedimientos se realizaron por duplicado cada 15 días aumentando el volumen de los medios hasta llegar al inóculo final activado.

Para la selección de pre inóculos se tuvieron en cuenta características físicas como la mayor turbidez, la formación de pequeñas fibras de celulosa y el color del medio; de igual forma se realizaron los controles de pureza, que se evaluaron mediante la observación de las características morfológicas en preparaciones en fresco y tinciones de Gram.

Hidrólisis ácida de la melaza

Inicialmente se diluyó melaza cruda con agua destilada y se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min, posteriormente se separó el material sólido del sobrenadante. La melaza en solución se ajustó a un pH 3,0 con H₂SO₄ 4 N, y se calentó a 120 °C durante 20 min, luego se dejó reposar 24 horas para nuevamente ser centrifugada. La melaza en solución se denominó melaza tratada H₂SO₄. Calor Según Bae y Shoda (13), medio modificado.

Las soluciones de melaza a evaluar corresponden a mezclas al 13,3 % y 26,6 % (v/v); estas fueron transferidas a 30 biorreactores cilíndricos de vidrio de 9,5 cm de diámetro y 11 cm de altura con capacidad de 750 mL. En cada biorreactor se utilizaron 200 mL de medio de cultivo y una alícuota del 10 % de inóculo final activado, los biorreactores se cubrieron con papel kraft a una temperatura de 30 °C y se ajustaron a un pH inicial de 5,6 durante 3, 7, 14, 21 y 28 días de incubación. El experimento se realizó por triplicado en condiciones estáticas, además, se prepararon 10 controles con el medio estipulado por Watanabe y Yamanaka (12), medio modificado, mantenidos en las mismas condiciones.

Medición de los parámetros fisicoquímicos y mecánicos

Después de retirarla del biorreactor, se tomó el peso de cada película de celulosa en los diferentes tiempos de incubación y en las distintas concentraciones de cultivo. Así mismo, las películas fueron lavadas con

NaOH 0,1 N a 30 °C durante 20 min, e inmediatamente enjuagadas con agua destilada para remover las impurezas, luego fueron secadas con papel absorbente para posteriormente tomar su peso húmedo utilizando una balanza analítica (OHAUS-Scout pro). Una vez realizada la medición del peso húmedo, se procedió a determinar el grosor de la película de celulosa en los tiempos de incubación, manipulando un calibrador o vernier (Mitutoyo, 6" 0,05MM. 530-104 BR). Para la determinación de la compresibilidad se utilizó el método de Budhiono (14), que consiste en aplicar un peso de 2000 g sobre las películas durante un espacio de 30 segundos, luego se calcula la comprensión con la ecuación [1], en la cual p_1 es el peso inicial de la película de celulosa y p_2 es el peso después de aplicar el peso de 2000 g por 30 s.

$$v = \left[1 - \frac{p_2}{p_1} \right] * 100 \quad [\text{ec. 1}]$$

La pesa de 2000 g cubrió el mismo diámetro de la capa de celulosa en todas las mediciones, garantizando así que la fuerza de compresión fuera uniforme en toda la extensión de la muestra. Después de realizar las mediciones de grosor y compresibilidad, las películas de celulosa fueron secadas en una estufa de laboratorio a 220 °C, 28 Sassin 35 B1-63N 60 °C±10 °C hasta que la celulosa obtuvo un peso constante (15).

Se determinó el volumen del remanente de cada uno de los medios de cultivo después de haber extraído las películas de celulosa a los 3, 7, 14, 21 y 28 días. Posteriormente, se determinó el pH del remanente en los diferentes días de incubación con un potenciómetro de pH (Orionstar A2 11 pH meter, Thermoscientific). Esto se realizó para determinar las transiciones de pH que ocurren durante el proceso de producción de celulosa y para establecer las condiciones de pH óptimas para el crecimiento del microorganismo.

Quantificación de la fuente de carbono

Para la cuantificación de glucosa y fructosa se tomó una alícuota de 5 mL del remanente de cada uno de los medios de cultivo. La glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa, utilizando el Kit Glicemia Enzimática AA, Wiener Lab. Este método se fundamenta 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 oxidada 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 a una temperatura de 37 °C. Esta lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible spectroquantpharo 300.

La fructosa se cuantificó por el método de Taylor (16); para ello se mezclaron 100 µL de la muestra (sobrenadante), 100 µL del reactivo de triptamina, (Tryptamine Hydrochloride, 99 % (ALDRICH®)) y 3 mL de HCl fumante, 37 % (Merck®), esta solución se colocó en un baño de agua termostregulado a 60 °C durante 15 min, y se realizó la lectura a temperatura ambiente contra un blanco de reactivo a 518 nm en un espectrofotómetro UV-Visible spectroquantpharo 300. Se utilizó una curva patrón de fructosa hasta una concentración de 50 µg/mL. Las mediciones de glucosa y fructosa se realizaron por triplicado para cada una de las muestras.

Tabla 1. Propiedades físicas de la celulosa bacteriana (CB).

MZA-TR % (p/v)	Grosor (cm)	Peso húmedo (g/L)	Peso seco (g/L)	Vol. remanente (%)
13,3	2,5	855	386,5	10
26,6	1,4	531,5	105,5	60

Densidad óptica

Se calculó la densidad óptica (DO) de la cepa bacteriana con un espectrofotómetro UV-Visible spectroquantpharo a 600 nm para el control y las concentraciones de melaza de 13,3 % y 26,6 % en sus respectivos días de incubación (3, 7, 14, 21, 28). El proceso se realizó por triplicado y tres veces de forma independiente.

Para medir la biomasa y relacionarla con una magnitud física tal como la absorbancia, se hizo necesario el uso de una curva de calibración utilizando como patrón la escala estándar de McFarland (23).

Viscosidad

La viscosidad del líquido de las diferentes suspensiones se midió en un viscosímetro de caída de bola de Höppler. Mediante este método se determinó la viscosidad del medio MZA-TR midiendo el tiempo de caída de una bola. Primero se llenó el tubo de caída del viscosímetro con el medio MZA-TR, en el cual la bola se deja caer a una distancia calibrada de 100 mm. A partir del tiempo de caída t se obtuvo la viscosidad dinámica η de la melaza, en sus diferentes concentraciones, empleando la ecuación [2]. En esta ecuación, ρ_2 es la densidad de la melaza, K la constante del viscosímetro y ρ_1 la densidad de la esfera utilizada en el ensayo (K y ρ_1 se tomaron de los datos técnicos del viscosímetro).

$$\eta = K (\rho_1 - \rho_2) t \quad [\text{ec. 2}]$$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software Statgraphics® centurión XVI, utilizando un diseño multifactor categórico, con la melaza como fuente de carbono con 2 niveles que son las dos concentraciones y el tiempo del proceso con 5 niveles.

Se realizó un ANOVA para describir el efecto de estos dos factores sobre propiedades físicas de la celulosa como el peso húmedo, peso seco, grosor de la película. Realizaron pruebas para determinar si existen o no diferencias significativas entre las medias de los diferentes niveles de los factores y si hay o no interacciones entre los factores. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Para este experimento se tuvieron en cuenta los medios de cultivos de *G. xylinus* en condiciones controladas, donde se utilizó como sustrato la melaza de caña hidrolizada con H₂SO₄. Se evaluó el efecto de la concentración de celulosa bacteriana utilizando concentraciones de 13,3 % y 26,6 % v/v (medio melaza). Estas concentraciones se eligieron teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Perna y Orozco (17, 18).

En la Tabla 1 se observa el efecto de las concentraciones de fructosa sobre la producción y calidad de la celulosa bacteriana obtenida en

condiciones estáticas; por un lado se evidenció que la celulosa obtenida con distintas concentraciones de MZA-TR exhibe diferencias en los distintos parámetros fisicoquímicos y mecánicos evaluados, por ejemplo, se observa que el grosor de la celulosa obtenida en el medio con MZA-TR al 13,3 % es mayor (2,5 cm) que el grosor de la celulosa que se obtiene usando MZA-TR al 26,6 % (1,4 cm); estos valores superan a los obtenidos por Perna (18), quien utilizó melaza sin tratar. Por otro lado, los resultados indican que para la producción de celulosa es mejor usar MZA-TR al 13,3 % pues se obtienen 855 g/L, además, al analizar los datos se nota que hay una diferencia significativa entre las medias tratadas y que el peso es directamente proporcional al grosor. Cabe resaltar que, en términos de cantidad, la concentración de 13,3 % presenta mayores beneficios para la producción de celulosa en comparación a la concentración de 26,6 % durante los 28 días de seguimiento.

El aumento en peso húmedo de la CB, se debe a que esta, al estar compuesta por nanofibras, posee una mayor relación de área superficial a volumen, en comparación con las microfibrillas de celulosa que componen a la celulosa vegetal, por lo que tiene más capacidad de absorción de agua (19). Se ha informado en estudios realizados por Jung (20) que una membrana de celulosa hidratada contiene más de 90 % de agua en peso, este resultado presenta relación con los pesos secos o pérdidas de humedad presentes en las películas de CB; esto también se ve evidenciado al medir el volumen remanente puesto que estos valores demuestran que el consumo es inversamente proporcional al peso húmedo (18), es

decir a medida que disminuye el volumen del medio, aumenta el peso húmedo de las películas.

Consumo de sustrato en relación a la cuantificación de glucosa y fructosa

La melaza obtenida de la hidrólisis de la sacarosa y el consumo de glucosa y fructosa, muestran un comportamiento importante, que se evidencia en el declive de los monosacáridos durante la producción de la celulosa.

Entre el principio y el final del experimento, el consumo de fructosa para la concentración de 13,3 % se encontró desde 20,59 % hasta concentraciones mínimas de 3,7 % mostrando un máximo descenso entre los 0 y 3 días, y una estabilidad entre los días 7 y 14; no obstante, la concentración de 26,6 % para el tiempo inicial, constaba de 22,39 % de fructosa y el consumo final corresponde a una cantidad de 6,89 %, (ver Figura 2).

El consumo de glucosa (Figura 3), fue disminuyendo a medida que transcurrían los tiempos de incubación, comportamiento similar al de fructosa; el mayor descenso se observó en los primeros días de producción, 0 a 3 días, para ambas concentraciones. Para el primer y último día de síntesis con respecto a 13,3 % los valores se encontraron en un rango de 19,23 % a 0,21 %; para 26,6 % los valores de estos mismos días

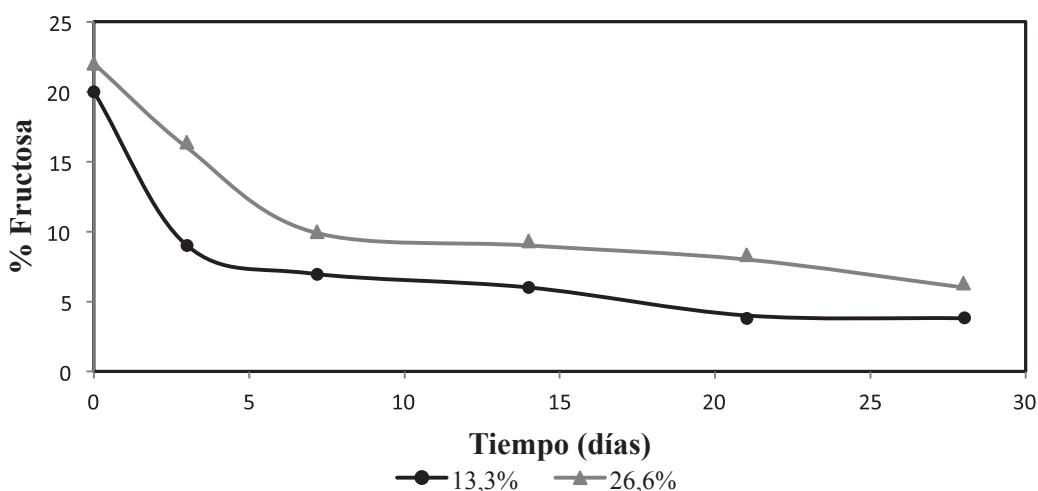


Figura 1. Fructosa consumida durante el proceso de producción en las dos concentraciones de cultivo.

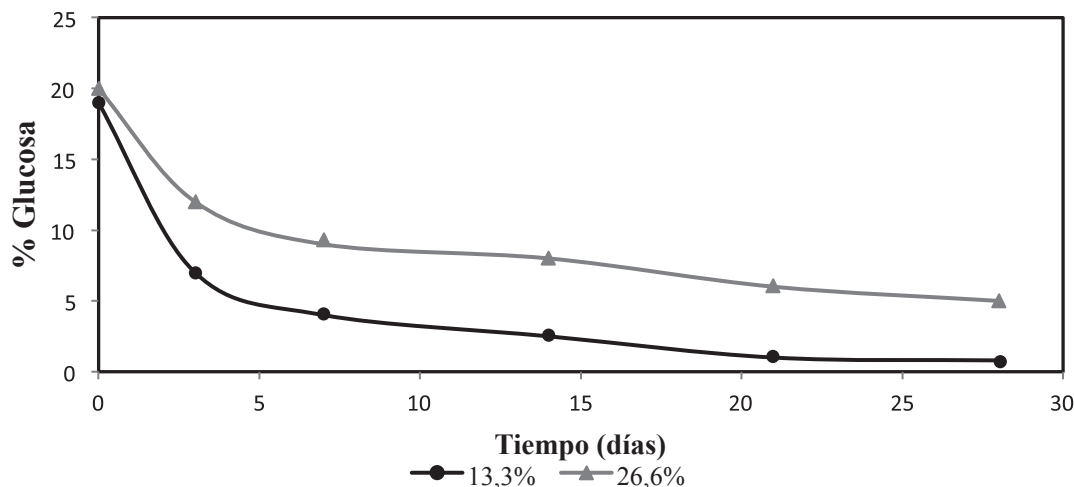


Figura 2. Glucosa consumida durante el proceso de producción en las dos concentraciones de cultivo.

se encontraron entre 20,43 % y 4,32 %. De acuerdo a esto se puede decir que el consumo de glucosa al final del proceso disminuyó en un 90 % con respecto a su concentración inicial.

Estudios anteriores mencionan que en concentraciones por debajo de 13,3 % o por encima de este valor, el crecimiento microbiano se inhibe y la producción de CB disminuye (17), es por ello que un factor determinante para la producción de CB podría ser la cantidad de azúcares presentes en el medio de cultivo; estos valores demuestran que convertir sacarosa en glucosa y fructosa, permite que el microorganismo los asimile rápidamente, aumentando los niveles de captación, producción de celulosa y crecimiento celular, no obstante, no se debe ignorar la acción de los micronutrientes adicionales presentes en la melaza. Una de las razones principales que demuestran la optimización de la hidrólisis es que en un medio con sacarosa el microorganismo posiblemente no sintetice invertasa, enzima encargada de convertir la sacarosa en glucosa y fructosa (21), esta situación deviene en una disminución del tiempo de producción de CB, debido a que no hay necesidad de desarrollar la ruta metabólica necesaria para consumir la sacarosa y producir celulosa.

Para evaluar el consumo de azúcares y corroborar la hidrólisis, se determinaron la cantidad de glucosa y la fructosa presentes; la glucosa se determinó por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa, arrojando resultados de 19,23 % en los primeros días de incubación; posiblemente el microorganismo en esta etapa activa su maquinaria enzimática, comen-

zando de esta manera el proceso de síntesis. Posteriormente, el consumo fue de 0,34 y 0,21 para las dos últimas semanas (ver Figura 1), siendo la glucosa consumida hasta alcanzar concentraciones remanentes cercanas a cero. De igual forma la fructosa se determinó con el método de Taylor (16), demostrando que el consumo durante el experimento varió desde 20,59 % hasta 3,7 % (ver Figura 2), de acuerdo a esto y a las condiciones iniciales del cultivo, la bacteria muestra una mayor afinidad con el consumo de glucosa que a diferencia de fructosa, es consumida casi en su totalidad durante el tiempo de cultivo. La fructosa también es utilizada, pero debe transformarse a glucosa-6 fosfato, por la vía de la pentosa fosfato o por medio de la gluconeogénesis, es decir necesita más tiempo para producir celulosa. La glucosa-6 fosfato es convertida a glucosa-1 fosfato por la enzima fosfoglucomutasa, para luego ser luego convertida a UDP-Glucosa, por la UDP-glucosa-fosforilasa que es el sustrato de la enzima celulosa sintasa (22).

Densidad óptica de la cepa bacteriana

Se determinó la evolución del crecimiento bacteriano con la densidad óptica en un espectrofotómetro UV-Visible spectroquantpharo 300 a 600 nm, tomando muestras a una dilución 1:20 en los distintos tiempos de incubación. Se encontró que a medida que los días de incubación trascurren, el incremento bacteriano era evidente para las dos concen-

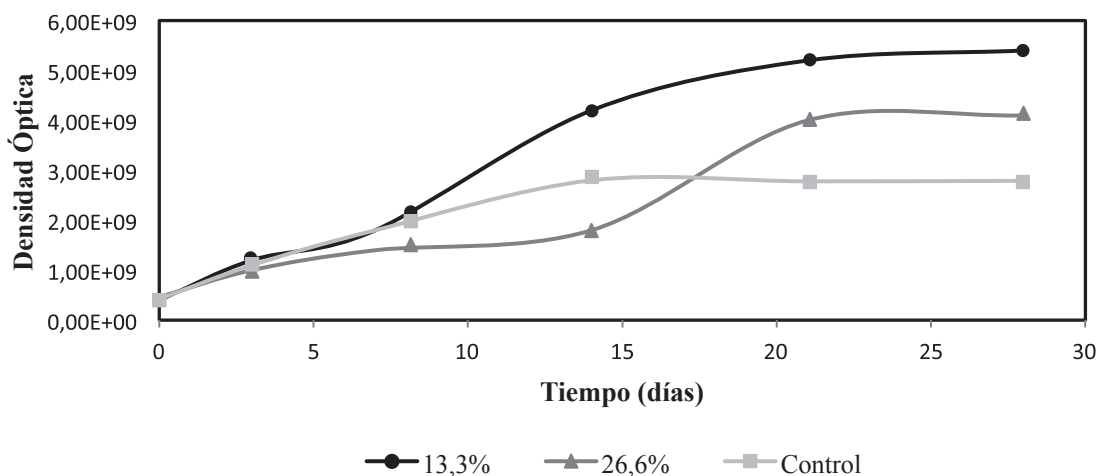


Figura 3. Densidad óptica de las concentraciones melaza tratada 13,3% y 26,6%.

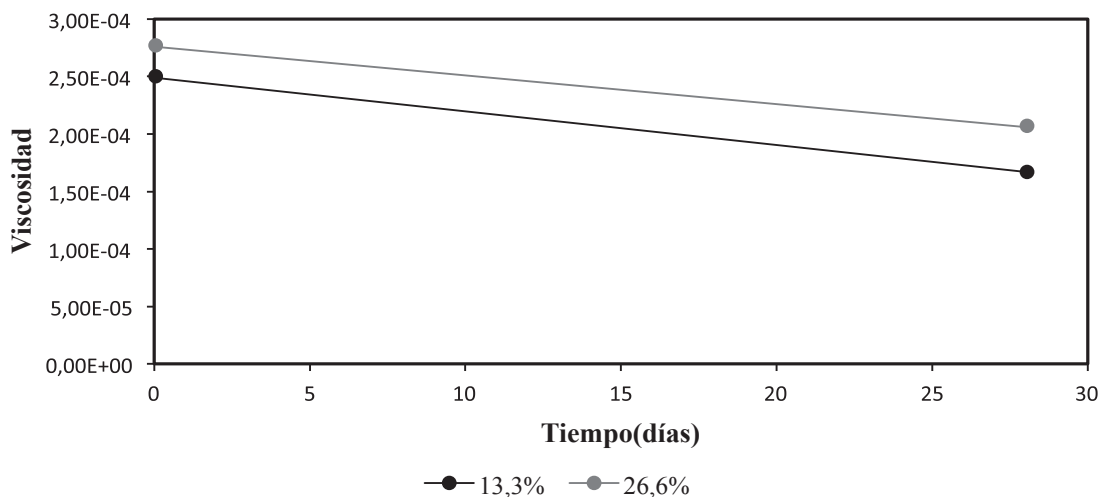


Figura 4. Viscosidad del medio de cultivo en las dos concentraciones de melaza tratada 13,3% y 26,6%.

traciones (ver Figura 2). Al respecto cabe anotar que la concentración de 13,3 % produjo el mayor crecimiento microbiano, demostrando que el aumento en biomasa se encuentra relacionado con la división celular y que la síntesis del componente celular es una medida del crecimiento.

Al hallar la densidad óptica de las diferentes concentraciones, se hizo necesaria una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa y la absorbancia. El patrón manejado fue la escala de MacFarland (23) en la cual se utiliza la ecuación [3] para determinar, mediante las medidas de absorbancia, el número de UFC/mL. El inóculo con el 10 % de medio para cada biorreactor, corresponde a una suspensión bacteriana máxima de $4,6 \times 10^8$ UFC/mL, es así como se inicia el crecimiento bacteriano durante los días de incubación, mostrando un mayor incremento los días 14 y 21 para las dos concentraciones (ver Figura 3); esto guarda relación con los valores obtenidos de producción y consumo de sustrato, sin embargo para la última semana de evaluación el crecimiento bacteriano se estabilizó; el descenso, según Perna (18) se debe a la disminución de nutrientes y metabolitos producidos durante el proceso.

$$D.O. = A = -\log(T/100) \quad [\text{ec.3}]$$

Viscosidad

Se estableció el efecto que producía la concentración del medio sobre la viscosidad de la melaza tratada antes y después del proceso de incubación. La viscosidad se determinó al principio (día 0) y al final del proceso de incubación (día 28), los datos indican que la viscosidad disminuyó a medida que transcurrían los días de incubación (Figura 4).

La viscosidad del medio de cultivo en el día inicial fue de $2,49 \times 10^{-4}$ kg/m.s para 13,3 % y al finalizar el experimento bajó a $1,67 \times 10^{-4}$ kg/m.s, mostrando que a medida que transcurrían los días, *G. xylinus*, consumía los azúcares presentes, reduciendo de esta manera la viscosidad del medio; no obstante, la concentración de 26,6 % presentó una viscosidad inicial de $2,76 \times 10^{-4}$ kg/m.s, mayor que 13,3 %, y una final de $2,06 \times 10^{-4}$ kg/m.s, mostrando una disminución de viscosidad en los días de incubación (ver Figura 4); así mismo, se concluye que la bacteria realiza un esfuerzo de movilidad (viscosidad dinámica), disminuyendo de esta forma la velocidad de captación de nutrientes y a su vez el crecimiento bacteriano, esto explicaría la relación que existe entre la velocidad de crecimiento de *G. xylinus* y la producción de celulosa en un medio con alta concentración de sustrato, agregando que existe una cantidad estándar de azúcares diluidos para la síntesis de CB.

Conclusiones

Con el medio de cultivo utilizado, se evaluó la síntesis de celulosa por *G. xylinus* durante diferentes días de incubación, comprobando que la velocidad de producción es mayor a la de los medios utilizados con melaza sin tratar o melaza cruda. Lo anterior permite concluir que la optimización del medio de cultivo para producción de CB es un avance significativo para la obtención de celulosa por *G. xylinus*, pues, se mejoraron parámetros como la velocidad de crecimiento microbiano y la cantidad y calidad de la celulosa producida. Además, al realizar el tratamiento de la melaza o provocar la hidrólisis de sacarosa, la concentración de monómeros (glucosa y fructosa) aumenta, facilitando su consumo por parte de los microorganismos, aunque, al evaluar la concentración mayor (26,6 %) la captación de azúcares se vio afectada por la viscosidad del medio, en comparación a la concentración menor 13,3 %. La concentración de 13,3 %, representa los mejores resultados en todos los parámetros evaluados; en particular el grosor de la película de celulosa presentó

un máximo de 2,5 cm de espesor, siendo el mejor resultado obtenido hasta ahora en comparación con anteriores reportes en la literatura.

También se pudo comprobar que el uso de melaza hidrolizada con ácido sulfúrico como medio de cultivo es un avance significativo para establecer un proceso continuo de producción de CB a partir de *G. xylinus*. Esto redundará en un beneficio para la comunidad científica y la población de la región Caribe, en la medida en la que provee información científica y técnica para la producción de celulosa de fuentes no vegetales.

Referencias

1. Czaja, W.; Young, D. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2007. **8**(1): 1–12.
2. Carreño-Pineda, L. Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana. Tesis Doctoral en Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia. 2011. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/4303/1/299025.2011_pte_1.pdf. [Consultado el 21 de junio de 2013].
3. Brown, Jr. R.M. Position paper Microbial cellulose: A new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products. University of Texas. 1995. Disponible en <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.htm>. [Consultado el 20 de Junio de 2013].
4. Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielcki, S.; Brown, R. Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. *Biomaterials*. 2006. **27**: 145–151
5. Cai, Z.; Jin, H.; Kim, J. Chitosan blended bacterial cellulose as a smart material for biomedical application. *SPIE Proceedings*. 2009. **7291**.
6. Oliveira, L.; Trovatti, E.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Pascoal-Neto, C.; Cruz-Pinto, J. J. C.; Gandini, A. Novel bacterial cellulose-acrylic resin nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2010. **70**:1148–1153.
7. Kersters, K.; Lisdiyanti, P.; Komagata, K.; Swings, J. The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Kozakia*. *The prokaryotes*. Springer. 2006. **5**:163–200
8. Mikkelsen, D.; Flanagan, B. M.; Dykes, G. A.; Gidley, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 2009. **107**: 576–583.
9. Traeger, J.; Baldovino, M. R.; *Acetobacter xylinum*: Bioquímica, genética y biopolímeros. Tesis de pregrado, Universidad Libre Barranquilla, Facultad Ciencias de la Salud, Programa de Microbiología Industrial, Colombia. 2001.
10. Nguyen, V. T.; Flanagan, B.; Gidley, M. J.; Dykes, M. A.; Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from kombucha. *Current Microbiology*. 2008. **57**: 449–453.
11. Chawla, P. R.; Bajaj, I. B.; Shrikant, A.; Survase, S. A.; Singhal, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol Biotechnol*. 2009. **47**:107–124
12. Watanabe, K.; Yamanaka, S. Effects of oxygen tension in the gaseous phase on production and physical properties of bacterial cellulose formed under static culture conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995. **59**: 65–68
13. Bae, S. O.; Shoda, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied Microbial Biotechnology*. 2005. **67**: 45–51.

14. Budhiono, A.; Rosidi, B.; Taher, H.; Iguchi, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohyd. Polym.* 1999. **40**: 137-143.
15. Jaramillo, L. R.; Tobio, J. W. Y.; Escamilla, M. J. Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. *Rev. MVZ Unicórdoba.* **17**: 3004-3013.
16. Taylor, K. A. Colorimetric Fructose Assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995. **53**: 215-227.
17. Orozco, I.; Martínez, S. Diseño de un medio de cultivo a bajo costo para el rendimiento de celulosa producida por *Acetobacter xylinum* IFO. Tesis de pregrado, Universidad Libre de Barranquilla, programa de Microbiología Industrial. 2002.
18. Perna, O. 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. Tesis de grado Maestría en Diseño y Gestión de Procesos, Universidad de la Sabana, Bogotá D.C., Colombia. 2013.
19. Schrecker, S. T.; Gostomski, P. A. Determining the Water Holding Capacity of Microbial Cellulose. *Biotechnology Letters.* 2005. **27**: 1435-1438.
20. Jung, H. I.; Jeong, J. H.; Lee, O. M.; Park, G. T.; Kim, K. K.; Park, H. C.; Lee, S. M.; Kim Y. G.; Son, H. J. Influence of glycerol on production and structural-physical properties of BC from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresour Technol.* 2010. **101**: 3602-3608.
21. Tahara, N.; Tonouchi, N.; Yano, H.; Yoshinaga, F. Purification and characterization of exo-1,4+glucosidase from *Acetobacter xylinum* BPR. 2001. *J. Ferment. Bioeng.* 1998. **85**: 589- 594.
22. Ariza, B.; Gonzalez, L. Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. 1997, p. 22-27.
23. McFarland, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association.* 1907. **14**: 1176-1178.

Article citation:

Jaramillo, R. D.; Perna, O.; Ríos, L. E.; Escobar, J. Efecto de la melaza de caña tratada con ácido sulfúrico en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. *Rev Colomb Quim.* 2014. **43**(2): 25-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53121>