



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH  
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

**MÁSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**OPTIMITZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE NANOCELULOSA  
BACTERIANA POR FERMENTACIÓN**



**Memoria y Anexos**

**Autor:** Alberto García González  
**Director:** Jordi Bou Serra  
**Convocatoria:** Octubre 2017



## Resum

La cel·lulosa bacteriana és un biopolímer obtingut per fermentació amb diversos microorganismes, dels quals l'espècie més eficient en la producció és la *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*.

La principal diferència entre la cel·lulosa bacteriana y la resta de cel·luloses que existeixen és la seva puresa, per això, és un del biopolímer més atractius per les seves possibles aplicacions en diverses àrees com són l'alimentació, la farmàcia i la medicina. A més de la seva puresa, les seves principals propietats són la biocompatibilitat, no toxicitat i la seva grandària de fibres nanomètriques.

No obstant això, el principal problema de la cel·lulosa bacteriana és el baix rendiment i productivitat obtingut fins al moment, per això, no és possible una producció a gran escala el que genera la necessitat de desenvolupar i optimitzar les condicions de cultiu que permetin millorar el seu rendiment. Això últim és l'objectiu d'aquest treball, la millora de la productivitat de cel·lulosa bacteriana a través de la variació de les condicions de cultiu. Un altre objectiu fixat es el desenvolupament de un medi de cultiu químicament definit, al qual es coneix la composició de manera qualitativa i quantitativa.

Per aconseguir aquest objectiu es realitzen diferents fermentacions en les quals es variaran condicions de cultiu i s'analitza el seu efecte sobre la cel·lulosa bacteriana obtinguda. A més, es realitzen dues proves a escala pre-planta pilot i planta pilot per veure el seu efecte d'una manera més realista.

Finalment, després d'analitzar els resultats es determinen les condicions òptimes de fermentació, la composició dels medis de cultiu i el mètode de purificació òptim.

## Resumen

La celulosa bacteriana es un biopolímero obtenido por fermentación con diversos microorganismos, de los cuales la especie más eficiente en su producción es la *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*.

La principal diferencia entre la celulosa bacteriana y el resto de celulosas que existen es su pureza, por ellos, es uno de los biopolímeros más atractivo por sus posibles aplicaciones en diversas áreas como son la alimentación, farmacia y medicina. Además de su pureza, sus principales propiedades son la biocompatibilidad, no toxicidad y tamaño de fibras nanométricas.

Sin embargo, el principal problema de la celulosa bacteriana es el bajo rendimiento y productividad obtenido hasta el momento, por ello, no es posible una producción a gran escala lo que genera la necesidad de desarrollar y optimizar las condiciones de cultivo que permitan mejorar su rendimiento. Esto último es el objetivo de este trabajo, la mejora de la productividad de celulosa bacteriana a través de la variación de las condiciones de cultivo. Otro de los objetivos planteados en este trabajo será el desarrollo de un medio de cultivo químicamente definido en el cual se conozca la composición tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Para alcanzar este objetivo se realizarán diferentes fermentaciones en las cuales se varían condiciones de cultivo y se analiza su efecto sobre la celulosa bacteriana obtenida. Además, se realizan dos pruebas a escala pre-planta piloto y planta piloto para ver su efecto de una manera más realista.

Finalmente, tras analizar los resultados se determinan las condiciones óptimas de fermentación, la composición de los medios de cultivo y el método de purificación óptimo.

## Abstract

Bacterial cellulose is a biopolymer obtained by fermentation with various microorganisms, which the most efficient species in its production is the *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*.

The main difference between bacterial cellulose and the rest of celluloses that exist is their purity, for this reason, is one of the most attractive biopolymers for its possible applications in various areas such as food, pharmacy and medicine. In addition to its purity, the main properties are biocompatibility, non-toxicity and size of nanometric fibers.

However, the main problem of bacterial cellulose is the low yield and productivity achieved for the moment, for this reason, it is not possible large-scale production, so that problem creates the need to develop and optimize the culture conditions to improve performance. This is the aim of this work, improving the productivity of bacterial cellulose through the variation of growing conditions. Another objective in this work is the development of a chemically defined culture medium in which the composition is known both qualitatively and quantitatively.

To reach this objective, different fermentations are carried out in which the culture conditions are varied and their effect on the bacterial cellulose obtained will be analyzed. In addition, two tests are carried out on a pre-pilot scale and pilot plant to see its effect in a more realistic way.

Finally, after analyzing the results, the optimum conditions of fermentation, the composition of the culture media and the optimum purification method is determined.



## Agradecimientos

Después de un intenso período, hoy es el día: escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de máster. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, pero también a nivel personal. Escribir este trabajo ha tenido un gran impacto en mí y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

Además, me gustaría darle las gracias a mi tutor Jordi Bou, por su valiosa ayuda. Definitivamente me has brindado todas las herramientas necesarias para completar mi trabajo de fin de máster satisfactoriamente.





## Glosario

<b>B1</b>	Vitamina B1
<b>CB</b>	Celulosa bacteriana
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivo Tipo
<b>INO</b>	Inóculo
<b>M</b>	Molar
<b>MET</b>	Microscopio Electrónico de Transmisión
<b>PET</b>	Polietileno Tereftalato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Tg</b>	Temperatura de transición vítrea
<b>UDP</b>	Uridin Difosfato
<b>UDPG</b>	Uridin Difosfato Glucosa
<b>v/v</b>	Volumen de disolución de bacterias concentrada entre volumen de medio de cultivo



# ÍNDICE

<b>RESUM</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>V</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	5
1.2. ALCANCE DEL TRABAJO .....	5
<b>2. CELULOSA</b>	<b>7</b>
2.1. ESTRUCTURA DE LA CELULOSA.....	8
2.2. PROPIEDADES DE LA CELULOSA .....	9
2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS .....	9
2.2.2. GRADO DE POLIMERIZACIÓN .....	10
<b>3. CELULOSA BACTERIANA</b>	<b>11</b>
3.1. PROPIEDADES DE CELULOSA BACTERIANA .....	11
3.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS .....	12
3.1.2. PROPIEDADES TÉRMICAS .....	12
3.1.3. MORFOLOGÍA .....	12
3.1.4. CRISTALINIDAD .....	13
3.2. BIOSÍNTESIS DE CELULOSA BACTERIANA .....	13
3.3. BACTERIA ENCARGADA DE LA PRODUCCIÓN.....	15
3.3.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	15
3.4. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA .....	17
3.4.1. FERMENTACIÓ EN CULTIVO ESTÁTICO.....	17
3.4.2. FERMENTACIÓ EN CULTIVO AGITADO .....	18
3.4.3. BIOREACTOR DE PELÍCULA .....	20
3.4.4. RESUMEN DE BIOREACTORES .....	21
<b>4. APLICACIONES DE LA CELULOSA BACTERIANA</b>	<b>22</b>
4.1. APLICACIONES BIOMÉDICAS.....	22
4.1.1. TISSUE SCAFFOLDS .....	22

4.1.2.	EXCIPIENTE DE FÁRMACOS O SUMINISTRADOR DE FÁRMACOS.....	23
4.1.3.	TERAPIA DE PIEL.....	23
4.1.4.	VASOS SANGUÍNEOS ARTIFICIALES .....	24
4.2.	FABRICACIÓN DE PAPEL .....	25
4.3.	APLICACIONES DE ENVASADO DE ALIMENTOS.....	25
<b>5.</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>6.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>29</b>
6.1.	INTRODUCCIÓN A LA OPTIMIZACIÓN .....	29
6.2.	MATERIAL DE LABORATORIO .....	29
6.2.1.	ULTRACENTRÍFUGA SIGMA 6K10 .....	29
6.2.2.	ORBITAL AGITATOR OVAN.....	30
6.2.3.	COLORIMETER ZUZI 4200 A, X = 600 NM .....	31
6.2.4.	SELECTA STOVES .....	31
6.2.5.	LIOFILIZADOR .....	32
6.2.6.	ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRARROJOS.....	33
6.2.7.	BIOREACTORES DE TANQUE AGITADO.....	33
6.3.	OPERACIONES PREVIAS A LA OPTIMIZACIÓN .....	34
6.3.1.	MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO .....	34
6.3.2.	AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS .....	35
6.3.3.	SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA.....	36
6.3.4.	MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	38
6.3.5.	MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO .....	38
6.4.	OPTIMIZACIÓN MEDIANTE EL USO DE OLIGOELEMENTOS.....	40
6.4.1.	MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	41
6.5.	OPTIMIZACIÓN MEDIANTE USO DE OLIGOELEMENTOS (II) .....	45
6.5.1.	MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	45
6.5.2.	MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO .....	47
6.6.	FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO (1L) .....	49
6.6.1.	RESULTADOS FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO (1L) .....	50
6.7.	OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICCIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA .....	53
6.7.1.	MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	53
6.7.2.	MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO .....	56
6.8.	OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO .....	58
6.8.1.	MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	60

6.8.2. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO.....	61
6.9. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO MEDIANTE LA ADICCIÓN DE VITAMINA B1 .....	63
6.10. FERMENTACIÓN EN ESCALA PLANTA PILOTO (10L).....	65
6.10.1. RESULTADOS FERMENTACIÓN A ESCALA PLANTA PILOTO (10L) .....	67
6.11. COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	69
6.11.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO .....	69
6.11.2. MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO .....	70
6.11.3. COMPARACIÓN GLOBAL .....	72
<b>7. MORFOLOGIA DE LA CELULOSA BACTERIANA OBTENIDA _____</b>	<b>73</b>
7.1. PRUEBA PILOTO 1: REACTOR 1 LITRO PURIFICACIÓN MEDIANTE LIOFILIZACIÓN	73
7.2. PRUEBA PILOTO 2: REACTOR 1 LITRO PURIFICACIÓN MEDIANTE SECADO EN ESTUFA .....	74
7.3. PRUEBA PILOTO 3: REACTOR 10 LITROS PURIFICACIÓN MEDIANTE LIOFILIZACIÓN .....	74
<b>CONCLUSIONES _____</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFIA _____</b>	<b>77</b>



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. OBJECTIVOS DEL TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es la mejora en la productividad de la síntesis de celulosa bacteriana por fermentación mediante la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*. La mejora se llevará a cabo variando las condiciones de cultivo así como los compuestos que componen el medio de cultivo.

El segundo objetivo principal es el desarrollo de un nuevo medio de cultivo químicamente definido en el cual sea posible el crecimiento bacteriano y la producción de celulosa bacteriana.

También se han propuesto otros objetivos más específicos a través de los cuales se alcanzará el objetivo principal del trabajo.

- Realización de fermentaciones utilizando la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*
- Realización de la separación y purificación de la celulosa bacteriana obtenida
- Evaluar la productividad obtenida
- Estudiar el efecto que tendrán los cambios producidos en los resultados de las fermentaciones

## 1.2. ALCANCE DEL TRABAJO

El alcance de este trabajo se centra en la obtención de celulosa bacteriana por fermentación y la optimización de su síntesis a través de la modificación de los compuestos que componen los medios de cultivo utilizados. Además de esto se realiza dos pruebas piloto para contrastar los resultados de una manera más realista.





## 2. CELULOSA

La celulosa es el biopolímero más abundante de la tierra, estimando su síntesis anual sobre las  $10^{11}$ - $10^{12}$  toneladas por medio de la fotosíntesis. Fue descubierta en 1838 por el químico francés Anselme Payen tras tratar diferentes tejidos vegetales con ácidos obteniendo fibras de un material que tenía la misma fórmula química que el azúcar y el almidón  $[-C_6H_{10}O_5-]_n$  [WÜSTENBERG, Tanja et al., 2014].

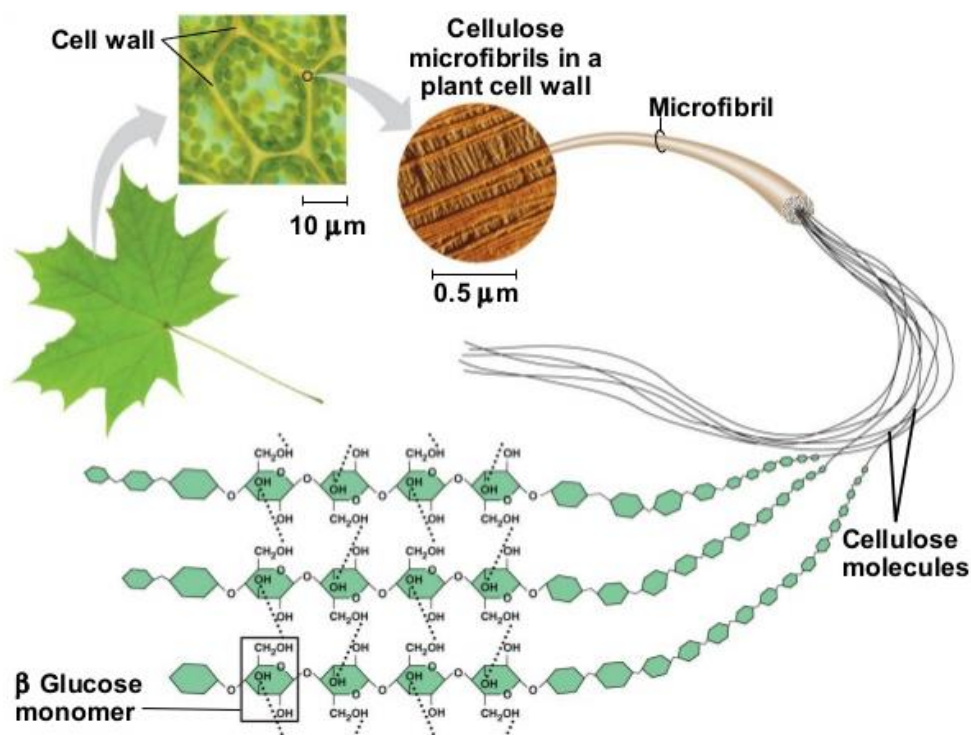


FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA CELULOSA REF: LIDIACONLAQUIMICA.WORDPRESS.COM/TAG/CELULOSA (5/06/2017)

En la actualidad, la celulosa es el polímero orgánico más común y una fuente muy importante de materia prima para la creciente demanda de materiales biocompatibles renovables y ecológicos. Las pastas derivadas de la madera siguen siendo la principal fuente de materias primas para el procesamiento técnico de la celulosa.

Su uso es principalmente para tres propósitos; en forma de madera como material para la construcción, para la producción de energía o bien en forma de pasta de papel. La mayoría (> 97%) de las pulpas producidas se utiliza hasta ahora en la fabricación de papel y cartón aunque aproximadamente el 2,5% de esta pulpa de celulosa se aplica en las industrias químicas con sólo 0,24% (4,8 millones de toneladas en 2003) para la producción de fibras y películas de celulosa regeneradas,

así como para la síntesis de diversos ésteres y éteres de celulosa [WÜSTENBERG, Tanja et al 2014].

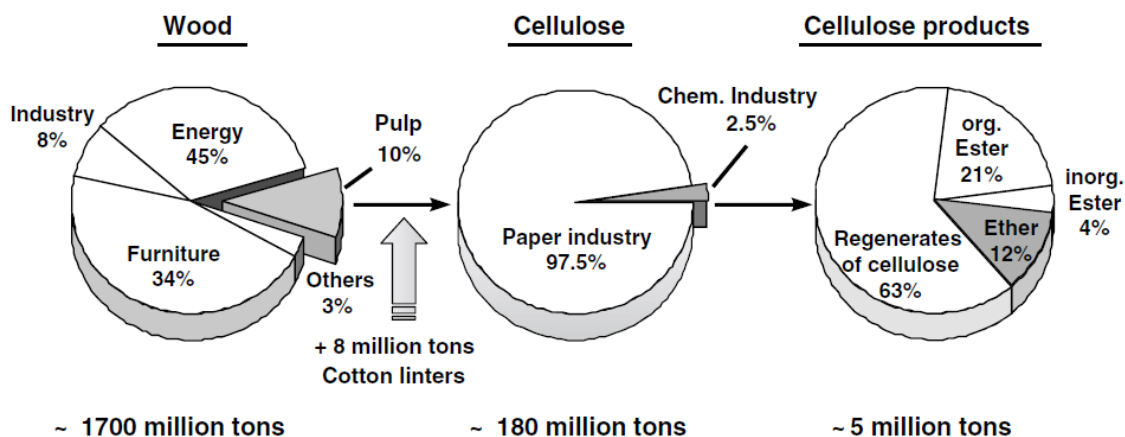


FIGURA 2. USO GLOBAL DE LA MADERA Y LA CELULOSA. FUENTE: ANON (2005) EUROPEAN COATINGS JOURNAL, 12, 36–41.

## 2.1. ESTRUCTURA DE LA CELULOSA

La celulosa es un homopolímero formado por cadenas lineales de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosas, estas largas cadenas de glucopiranosas hace que la celulosa sea insoluble en agua. La celulosa puede llegar a formar 6 estructuras cristalinas distintas: celulosa I, II, III, IIII, VI, and VII. De las cuales tan solo la celulosa I y la celulosa II se encuentran en la naturaleza, las demás son obtenidas por medio de transformaciones química o bien tratamientos térmicos. La celulosa I se divide en dos formas más  $I_\alpha$  y  $I_\beta$ , la forma  $I_\alpha$  es sintetizada por las bacterias y algas mientras que la celulosa  $I_\beta$  predomina en las plantas [Sturcova et al., 2004].

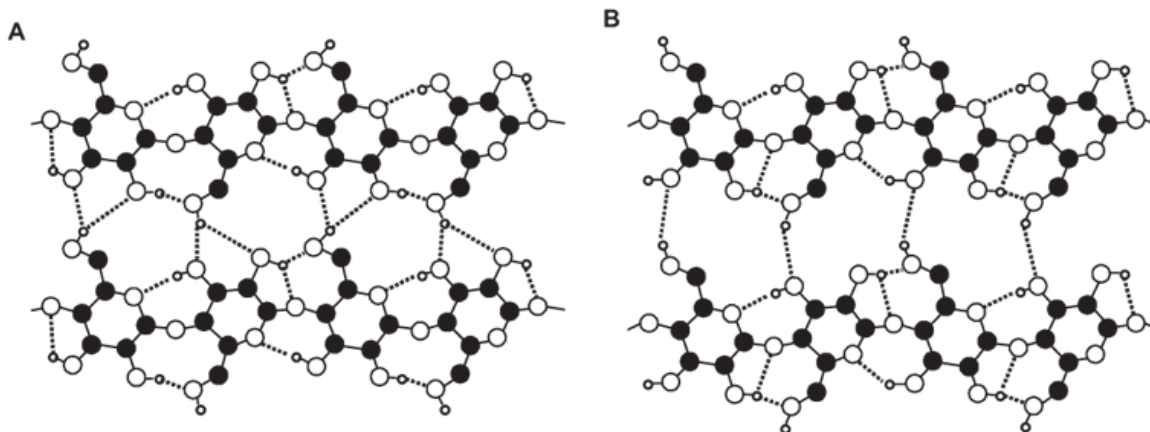


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS IA Y IB. FUENTE: STURCOVA ET AL., 2004

Por otro lado, la celulosa II es la que presenta mayor grado de cristalinidad y estabilidad termodinámica, esta se puede obtener de la naturaleza o bien por un proceso de regeneración y mercerización de la celulosa I [CREDOU, Julie; BERTHELOT, Thoma et al 2014].

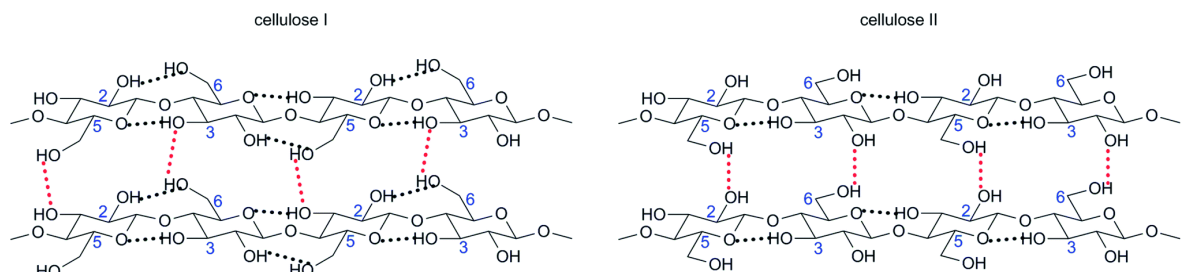


FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESPACIAL DE LA CELULOSA I Y LA CELULOSA II. FUENTE: CREDOU, JULIE; BERTHELOT, THOMA ET AL 2014

A partir de estas dos formas cristalinas, celulosa I y celulosa II, es posible obtener a través las demás formas cristalinas que existen mediante las siguientes transformaciones químicas.

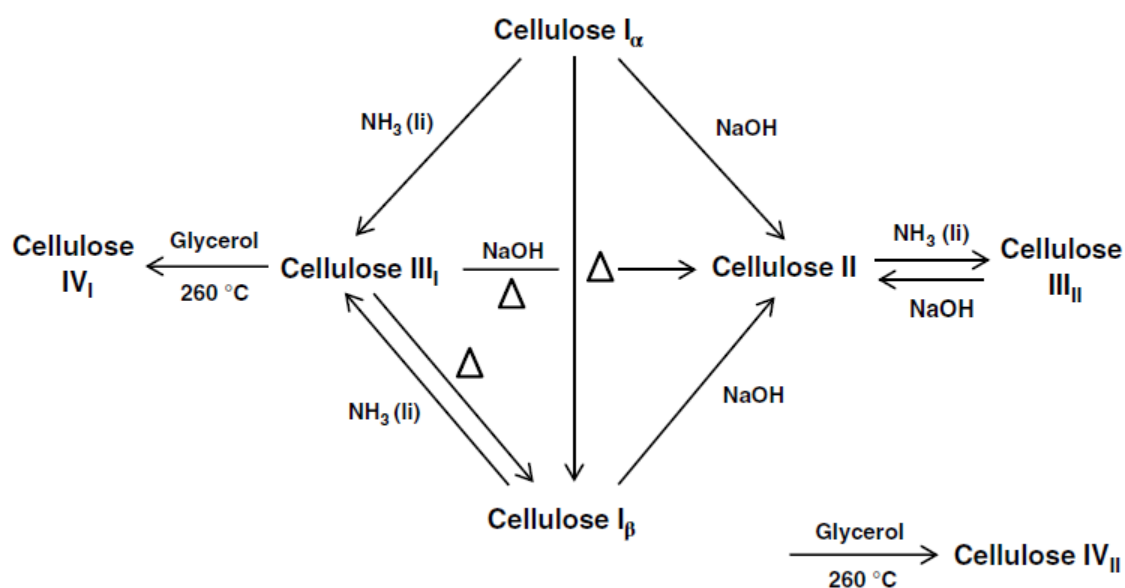


FIGURA 5. OBTENCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS CRISTALINAS DE LA CELULOSA. FUENTE: KLEMM, D. ET AL 2005

## 2.2. PROPIEDADES DE LA CELULOSA

### 2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS

- La celulosa es una sustancia higroscópica llegando a adsorber entre un 8-14% de agua aunque es insoluble.
- Densidad: 1,52-1,59 g/cm<sup>3</sup>

- Índice de refracción:
  - 1,62 en el eje paralelo a las fibras
  - 1,54 e el eje perpendicular a las fibras
- Calor de combustión 17,46 J/g
- Calor específica: 18,7 – 21,8 kJ/mol glucosa
- Coeficiente de conductividad térmica:
  - 0,255 kJ/m h K para un empaquetamiento pobre
  - 0,920 kJ/m h K para un empaquetamiento grande
- Área específica: 10-200 m<sup>2</sup>/g

## 2.2.2. GRADO DE POLIMERIZACIÓN

Normalmente, la celulosa que se encuentra en la naturaleza tiene un grado de polimerización de 10.000 correspondiente a un peso molecular de 2.000.000 g/mol. En la tabla siguiente se indican los grados de polimerización para las principales fuentes de obtención de celulosa:

TABLA 1. DIFERENTES GRADOS DE POLIMERIZACIÓN PARA LAS FUENTES DE OBTENCIÓN DE CELULOSA. FUENTE: [WÜSTENBERG, TANJA ET AL 2014]

Fuente de obtención	Grado de polimerización
Madera de diferentes especies	6.000-10.000
Lino textil	8.000-9.000
Hierba china	6.500
Ramina	10.000
Pulpa de madera	500-3.500
Algodón	10.000-15.000
Celulosa bacteriana	2.500-6.000
Celulosa bacteriana (Glucoacetobacter)	600
Seda artificial (rayon)	300-500
Celofán	300
Acetato de celulosa	200-350
Valonia	25.000

### 3. CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana es un polímero extracelular sintetizado por fermentación con microorganismos principalmente por bacterias del género *Acetobacter*. Descrita por primera vez en 1886 por Adrian J. Brown como “una membrana gelatinosa traslúcida que crece en la superficie del medio de cultivo”. También existen otras bacterias capaces de producir celulosa bacteriana que son los del género *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*.

La razón por la cual los microorganismos producen celulosa ha sido discutida en diversos reportes [Iguchi et. al., 2000]. La primera teoría se basa en que las bacterias aeróbicas producen una película para mantener su posición cerca de la interfase aire-medio de cultivo. La segunda asume que las bacterias generan celulosa para protegerse de los rayos ultravioleta, y la tercera teoría asume que los microorganismos producen una “jaula” para protegerse de enemigos e iones de metales pesados mientras que los nutrientes pueden ser suministrados fácilmente por difusión.

Esta celulosa de origen bacteriano es idéntica en composición química a la celulosa vegetal, aunque presenta diferencias significativas respecto a su conformación estructural. La característica más importante que distingue la celulosa bacteriana de la vegetal es el grado de pureza ya que no se encuentra asociada a la hemicelulosa y lignina como es el caso de la celulosa vegetal. La estructura de la celulosa bacteriana se encuentra formando cristales de celulosa I $\alpha$  y I $\beta$ .

#### 3.1. PROPIEDADES DE CELULOSA BACTERIANA

Además del grado de pureza existen otras características como son mayor capacidad de retención de agua, mayor cristalinidad (de 80 a 90%), alta estabilidad mecánica y térmica [Klemm et. al, 2011], su biocompatibilidad y biodegradabilidad [DUBEY, Vinita, et al.2002]. Todas estas características hacen de la CB un producto de alto interés para múltiples aplicaciones en la industria del papel, textil, alimentaria y biomateriales de la medicina y cosmética

La CB no solo tiene propiedades en condiciones normales sino también al agregar componentes al cultivo puede modificar y potenciarlas. Derivados de la celulosa, ácidos sulfónicos, fosfatos de alquilo y otros polisacáridos (almidón, dextrano) son componentes que introducidos en el cultivo alteran la morfología macroscópica, la resistencia a tracción, la densidad óptica y sus propiedades de absorción. Al mismo tiempo, la combinación con otras sustancias es posible, tal como celulosa seca, obteniendo composites con propiedades fisicoquímicas especiales.

### 3.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

Debido a su cristalinidad y estructura nanométrica, la celulosa bacteriana tiene excelentes propiedades mecánicas, la cual la convierte en un material adecuado como refuerzo de diversos materiales. Los principales estudios realizados en materia de composites han sido para el caso de láminas secas. Los valores de módulo de elasticidad pueden variar entre 16 y 18 GPa de manera isotrópica, dependiendo si el método de secado es solo con aire o prensado en caliente. Asimismo, el esfuerzo a la tracción y la deformación de las láminas secas alcanzan 260 MPa y 2.1%, respectivamente [Yamanaka et. al., 1989].

TABLA 2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE MATERIALES ORGÁNICOS. FUENTE: ADAPTACIÓN DE [YAMANAKA ET AL., 1989]

Material	Módulo de Elasticidad [GPa]	Esfuerzo a la tracción [MPa]	Elongación [%]
Celulosa bacteriana	15 - 35	200 - 300	1,5 - 2
Polipropileno (PP)	1 - 1,5	30 - 40	100 - 600
Polietileno Tereftalato (PET)	3 - 4	50 - 70	50 - 300
Celofán	2 - 3	20 - 100	15 - 40

### 3.1.2. PROPIEDADES TÉRMICAS

Se ha determinado que la degradación de la celulosa bacteriana en estado puro y sin tratamiento inicia entre los 290 y 298 °C. Asimismo, la temperatura de fusión es de 120,4 °C y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de 13,9 °C [Gea et. al., 2011; George et. al., 2005]

### 3.1.3. MORFOLOGÍA

Las nanofibrillas de CB son extruidas de la membrana citoplasmática de las células y se agregan en una fibrila en forma de cinta [Huang et al., 2014]. Esta elevada relación de aspecto (Longitud / Grosor) aumenta el área superficial del CB, que es un factor clave para ser utilizado como material de refuerzo para una fácil transferencia de tensiones.

TABLA 3. DIÁMETROS DE FIBRILLA FORMADA POR DIFERENTES TIPOS DE CELULOSA

Tipo	Diámetro de fibrilla [nm]
Celulosa bacteriana	4 - 7
Algodón	7 - 9
Ramio	10 - 15
Celulosa sintetizada por alga Valonia	10 - 35

### 3.1.4. CRISTALINIDAD

La estructura cristalina es una de las propiedades más prometedoras de CB, induciendo mejores propiedades mecánicas e interfaciales que en la celulosa vegetal. Se compone de celulosa tipo I $\alpha$  y I $\beta$ , que corresponden respectivamente a celdas unitarias triclinicas y monoclinicas. La proporción de cada uno varía debido a diferentes condiciones de cultivo, por lo que puede modificarse si se cambia el medio nutritivo, el tipo de reactor, el pH o la cepa bacteriana [Huang et al., 2014].

## 3.2. BIOSÍNTESIS DE CELULOSA BACTERIANA

Su biosíntesis consta de dos etapas principalmente: la primera es la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa) y la segunda es la formación de la celulosa y secreción al medio.

- **Etapla 1:** Se inicia con el ingreso del sustrato, glucosa, en el microorganismo y su conversión a glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa. Posteriormente, la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. El siguiente paso es la conversión de la glucosa-1-fosfato a UDP-glucosa por la enzima UDPG pirofosforilasa.
- **Etapla 2:** Por la acción de la enzima celulosa sintasa, encargada de realizar la polimerización de la glucosa, se forma la celulosa. La excreción de la celulosa del microorganismo se efectúa por unos poros alojados en la pared de la membrana celular de un diámetro de 3,5 nm. La celulosa es secretada al medio de cultivo como una subfibrilla elemental de 1.5 nm de diámetro; al juntar estas subfibrillas se forma una microfibrilla y el empaquetamiento de microfibrillas produce las fibras y las cintas de celulosa.

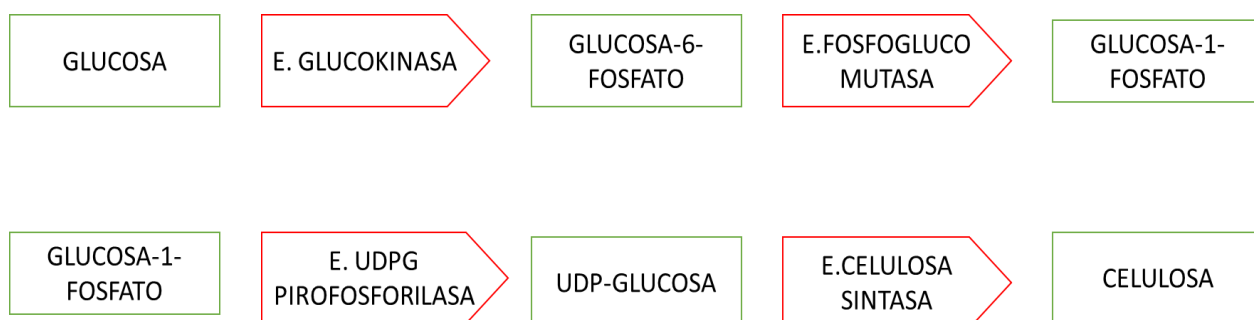


FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DEL PROCESO DE BIOSÍNTESIS DE LA CELULOSA BACTERIANA. ADAPTACIÓN DE JONAS, RAINER ET AL 1998

Existen distintos modelos de síntesis y extrusión de esta celulosa bacteriana que explican cómo y dónde se realiza la polimerización que son los siguientes [Chávez-Pacheco, J.L. et al .2004]:

- **Modelo I.** El sitio catalítico de la celulosa sintetasa orientado al citoplasma:

Este modelo se basa en la proposición de que si la polimerización ocurre en el citoplasma es necesario que la extrusión se realice por medio de un poro proporcionado por la celulosa sintetasa o por otras proteínas asociadas a ella.

- **Modelo II.** El sitio catalítico está orientado al espacio extracelular:

Este modelo aunque no avalado establece que la polimerización se lleva a cabo en el espacio extracelular y no requiere proceso de extrusión aunque tiene el inconveniente de explicar la disponibilidad de sustrato.

- **Modelo III.** Catálisis asociada a intermediarios lipídicos:

Este modelo propone la unión de UDP-glucosa a un intermediario lipídico para su entrega a la celulosa sintetasa. La polimerización tiene lugar en el citoplasma y requiere de un proceso de extrusión de la celulosa al exterior de la célula.

- **Modelo IV.** Asociación de glicosil-transferasas:

Este modelo implica de la participación de dos  $\beta$ -glicosil transferasas, una en el lado citoplasmático y otra en el lado extracelular, y se realiza la polimerización en el espacio extracelular sin requerimiento de extrusión.

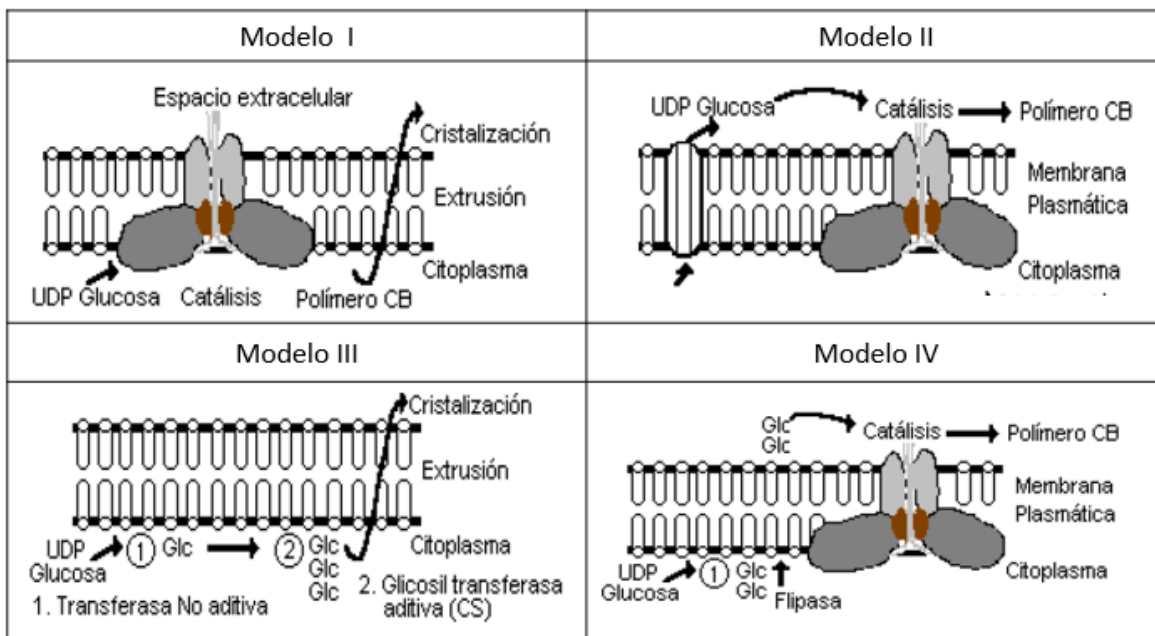


FIGURA 7. EXPLICACIÓN DE LOS MODELOS DE SÍNTESIS Y EXTRUSIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA. FUENTE: CHÁVEZ-PACHECO, J.L. ET AL .2004



### 3.3. BACTERIA ENCARGADA DE LA PRODUCCIÓN

La CB es sintetizada por fermentación por la bacteria del género *Acetobacter* reclasificada como *Gluconacetobacter*. Dentro del género *Gluconacetobacter*, la bacteria que produce la celulosa de manera más eficiente es la bacteria Gram-Negativo del género *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* [DARY, Luz, et al.2012]. Su morfología es de tipo bacilo, forma de bastón, de una longitud de 2-10 micras y una anchura de 0,5-1 micra. Su fórmula molecular es  $CH_2O_{0,52}N_{0,23}$  y es de tipo aerobio [MOHAMMAD, S., et al 2014].

Produce celulosa a partir de una fuente de carbono como glucosa, sacarosa, manitol o arabitol entre otros polisacáridos.

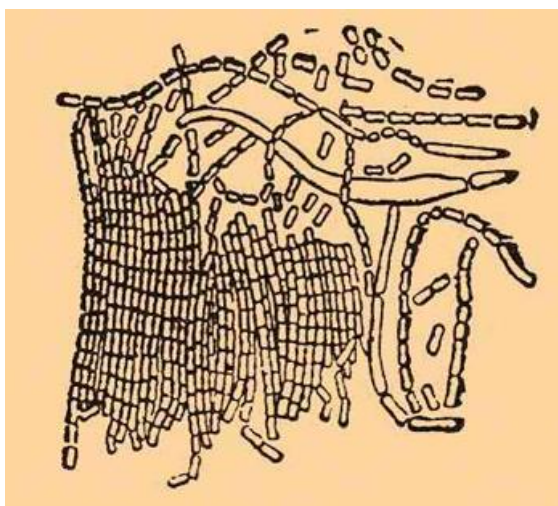


FIGURA 8. BACTERIAS DEL GÉNERO ACETOBACTER FUENTE: [STUDY.COM/ACADEMY/LESSON/WHAT-IS-ACETOBACTER-ACETI.HTML](https://www.study.com/academy/lesson/what-is-acetobacter-aceti.html) (6/06/2017)

La función fisiológica que lleva a cabo esta celulosa, y es el motivo por el cual se encuentra en forma de agregados extracelulares, es conferir protección mecánica, química y biológica dentro del hábitat natural, además de mantener a la población bacteriana en la interfase aire-líquido facilitando el acceso al oxígeno.

Estas bacterias también se conocen como bacterias del vinagre ya que son capaces de formar el ácido acético a partir de glucosa, alcohol etílico y alcohol propílico aunque su característica más importante es la capacidad de polimerizar glucosa para formar celulosa a través de un solo proceso de síntesis.

#### 3.3.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Estudios anteriores han ilustrado que *G. xylinus* tiene la capacidad de crecer y producir celulosa en una variedad de sustratos. Esto conduce a muchas investigaciones sobre la composición óptima del medio

para el crecimiento bacteriano y la producción de celulosa. El medio estándar utilizado para el cultivo de CB, el medio Hestrin-Schramm (Schramm y Hestrin et al, 1954). Los principales factores que afectan al crecimiento de la bacteria y a la producción de celulosa son:

#### 3.3.1.1. Fuente de carbono

Para la producción de celulosa, es necesario una fuente de carbono como precursor de la síntesis de glucosa por la vía de la gluconeogénesis. El manitol puede ser un carbono más eficiente como intermedio para generar UDP-glucosa para la síntesis de celulosa que otras fuentes de carbono [CZAJA, Wojciech, et al., 2006]. Panesar y sus colaboradores y Jonas y Farah encontraron que el manitol dio la mayor productividad para la producción de celulosa [Panesar et al. 2009, Jonas y Farah et al. 1998]. Ramana y sus compañeros de trabajo informaron que entre las fuentes de carbono, el manitol era uno que resultó ser adecuado para niveles óptimos de producción de celulosa.

Heo reportó que el mayor rendimiento de celulosa de *Acetobacter sp. A9* era utilizando glucosa [Heo y Son et al, 2002]. Sin embargo, una alta cantidad de concentración de glucosa puede inhibir el crecimiento celular y la producción de celulosa debido a la acumulación de ácidos (ceto)-glucónicos por la disminución del pH del medio [Vandamme et al. 1998].

Aunque también existen otras fuentes de carbono potenciales que pueden incrementar el rendimiento de la producción de celulosa, por ejemplo, los polialcoholes (manitol y glicerol), fructosa y glucosa [, CZAJA, Wojciech et al. 2006, Panesar et al. 2009].

#### 3.3.1.2. Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es el principal componente de las proteínas necesarias en el metabolismo celular y comprende 8-14% de la masa de células secas de las bacterias. Las posibles fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar en la producción de celulosa bacteriana son extracto de levadura, peptona, sulfato de amonio, polipeptona y caseína hidrolizada y la combinación de estas. Entre las diversas fuentes de nitrógeno evaluadas por Ramana y sus colaboradores, la peptona / sulfato de amonio o hidrolizado de caseína resultó ser adecuada para la síntesis de celulosa [Ramana et al. 2000]. También se observó que la adición de metionina para cultivar *A. xylinus* estimuló la tasa de crecimiento durante el período de cultivo temprano, redujo el tiempo de retardo y aumentó la velocidad de producción de celulosa [Matsuoka et al., 1996].

#### 3.3.1.3. pH

Se acepta generalmente que el rango de pH óptimo para la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* es 4-7. Hestrin y Schramm consideraron que un pH por debajo de 7 era

posible la producción de celulosa bacteriana mientras que Matsuoka demostró un pH 4-6 como óptimo para la producción de celulosa.

#### 3.3.1.4. Temperatura

En relación con la temperatura, algunos autores han observado que la máxima producción de celulosa tanto para glucosa como para sacarosa, se logra a 30°C. A 25°C y 35°C las producciones son similares en sí, pero menores que a 30°C, mientras a 40°C no existe crecimiento del microorganismo y, consecuentemente, no se presenta producción de celulosa. El rango de temperatura óptimo es de 28-30°C aunque la producción se puede llevar a cabo entre 20-35°C.

#### 3.3.1.5. Disponibilidad de oxígeno

La formación de celulosa se produce en la interfase de la película aire/celulosa y no en la interfase medio/celulosa. Así, el oxígeno es un factor importante para la producción de celulosa. Watanabe y Yamanaka descubrieron recientemente que la concentración de oxígeno afectó tanto a la producción de celulosa como al rendimiento de la membrana formada. Una correlación negativa entre la producción de celulosa sugirió que la celulosa cultivada bajo una menor concentración de oxígeno tenía menos ramificaciones que la celulosa cultivada bajo una concentración de oxígeno más alta.

### 3.4. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA

Los métodos de producción de celulosa bacteriana estudiados hasta el momento son principalmente de tipo batch y a través de fermentaciones en cultivo estático, en cultivo agitado y en bioreactores de tipo air-lift. Las perspectivas de futuro para la producción de la celulosa bacteriana tratan de resolver la baja productividad alcanzada hasta el momento a través de la optimización de los reactores de tipo batch y la implantación de modelos de producción en continuo, además de su práctica a escala industrial.

#### 3.4.1. FERMENTACIÓN EN CULTIVO ESTÁTICO

En esta fermentación se obtiene la celulosa bacteriana en forma de gel o película en la parte superior del medio de cultivo. Según estudios realizados muestran que los microorganismos incrementan su población y producción de celulosa al principio de la fermentación debido a la presencia de oxígeno disuelto en el medio, a medida que este disminuye también lo hace la actividad de las bacterias. Una vez es formada esta película de celulosa tan solo las bacterias situadas en la parte superior de esta tienen acceso al oxígeno de la interfase aire-líquido y por ello mantienen su actividad bacteriana mientras que las situadas en regiones inferiores ven su actividad bacteriana disminuida. A medida que

transcurre el tiempo de fermentación, el espesor de la película se incrementa por la generación de nuevas capas en la superficie, formando una estructura de capas suspendidas en el medio de cultivo [BORZANI, W. et al. 1995; KLEMM, Dieter, et al.2001].

Los principales inconvenientes para las fermentaciones mediante esta técnica son los largos periodos de fermentación que requieren para obtener una cierta cantidad de celulosa y la gran área superficial que requieren este tipo de fermentadores con tal de aumentar la interfase aire-líquido [CARREÑO PINEDA, Luz Dary, et al.2011].



FIGURA 9. PELÍCULA DE CELULOSA BACTERIANA GENERADA POR FERMENTACIÓN ESTÁTICA FUENTE:  
[HTTPS://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/BACTERIAL\\_CELLULOSE](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_Cellulose)

### 3.4.2. FERMENTACIÓN EN CULTIVO AGITADO

Debido a la gran necesidad que tienen las bacterias por el oxígeno, la mejor opción a la hora de producir celulosa bacteriana es a través de bioreactores que aumenten el contacto de las bacterias con el oxígeno disuelto en el medio de fermentación. Para lograr aumentar la superficie de interfase aire-líquido se utilizan bioreactores aireados. Este tipo de reactor tiene también inconvenientes como pueden ser la oxidación de la fuente de carbono.

#### 3.4.2.1. BIOREACTOR DE TANQUE AGITADO

Se han hecho varios intentos para producir CB usando la fermentación agitada, lo cual es más conveniente para la producción escalonada. Sin embargo, hay dos preocupaciones principales:

- Suministro insuficiente de oxígeno y forma irregular de la CB producida.
- Acumulación simultánea de mutantes no productores de CB en el cultivo de agitación.

Por otra parte, la insolubilidad del producto de celulosa plantea obstáculos para la transferencia de la nutrientes dando como resultado no homogeneidad.

### 3.4.2.2. BIOREACTOR DE TIPO AIR-LIFT

Estos bioreactores son mezclados gracias a una corriente de gas, normalmente aire u oxígeno. La primera vez que fue usado para la producción de la celulosa bacteriana fue en el año 2000. Este tipo de reactor fue una alternativa al bioreactor de tanque agitado ya que a medida que el medio de cultivo aumenta su contenido en celulosa también lo hace su viscosidad llegando a impedir una buena agitación y reduciéndose el contenido en oxígeno disuelto. Para solucionar esta problemática se planteó la utilización de un bioreactor de tipo air-lift [CHAO, Yaping, et al 2000]. La ventaja que presenta este tipo de reactores es la disminución de los costes de energía para la agitación de la mezcla.

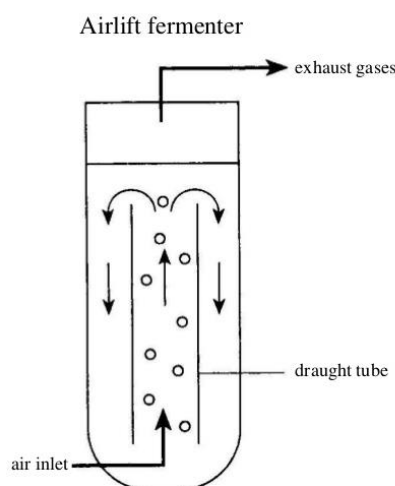


FIGURA 10. DIAGRAMA DE UN BIOREACTOR DE TIPO AIR-LIFT. FUENTE: [HTTP://BIOTECH4YOU.COM/BIOTECH-NOTES/BIOPROCESS-ENGINEERING/65-BIOREACTORS](http://biotech4you.com/biotech-notes/bioprocess-engineering/65-bioreactors)

Las conclusiones que se pueden extraer tras los diferentes estudios de reactores de tipo air-lift para la producción de celulosa bacteria son que si el medio de cultivo es agitado mediante aire enriquecido en oxígeno es posible alcanzar los 7,7 g/l de celulosa bacteriana tras 72 horas de fermentación mientras que si la agitación se realiza con aire atmosférico es posible obtener hasta 3,8 g/l de celulosa bacteriana tras 67 horas de fermentación, las productividades son 0,116 g/l·h y 0,05 g/l·h respectivamente. Se alcanzan menores concentraciones de celulosa bacteriana que en los reactores de mezcla perfecta, pudiendo llegar a igualarse en el caso del uso de aire enriquecido en oxígeno.

En cuanto al tipo de celulosa bacteriana producida por el reactor de tipo air-lift se forma un único pellet esférico diferente de la forma fibrosa que se produce en un fermentador de tanque agitado.

Por otra parte, el consumo de energía para un reactor de air-lift para la producción de 1 gramo de celulosa bacteriana es de 0.126 kWh mientras que para el mismo medio de cultivo y operación para un reactor de tanque agitado ha sido de 0,663 kWh [CHAO, Yaping, et al 2000].

### 3.4.3. BIOREACTOR DE PELÍCULA

Este tipo de bioreactores tienen la finalidad de aumentar el área superficial de la masa bacteriana depositando las bacterias en forma de película. De esta manera se aumenta la densidad celular, a consecuencia de este aumento de densidad celular aumenta el contacto de medio de cultivo y oxígeno lo cual genera un aumento en la producción de celulosa bacteriana. Un ejemplo de este tipo de bioreactores es el Bioreactor rotatorio y los bioreactores de células inmovilizadas.

#### 3.4.3.1. BIOREACTOR DE DISCOS ROTATORIOS

Serafica describió por primera vez la producción de BC en un bioreactor de disco giratorio. Este bioreactor consiste en una entrada de inóculo y varios discos circulares montados en un eje central giratorio [Bungay et al., 1991]. El bioreactor de discos giratorios fue diseñado de modo que la mitad de la superficie de sus discos quedara sumergida en el medio y la otra mitad expuesta a la atmósfera. Con la rotación continua, la superficie de los discos se alterna entre el medio y la atmósfera.

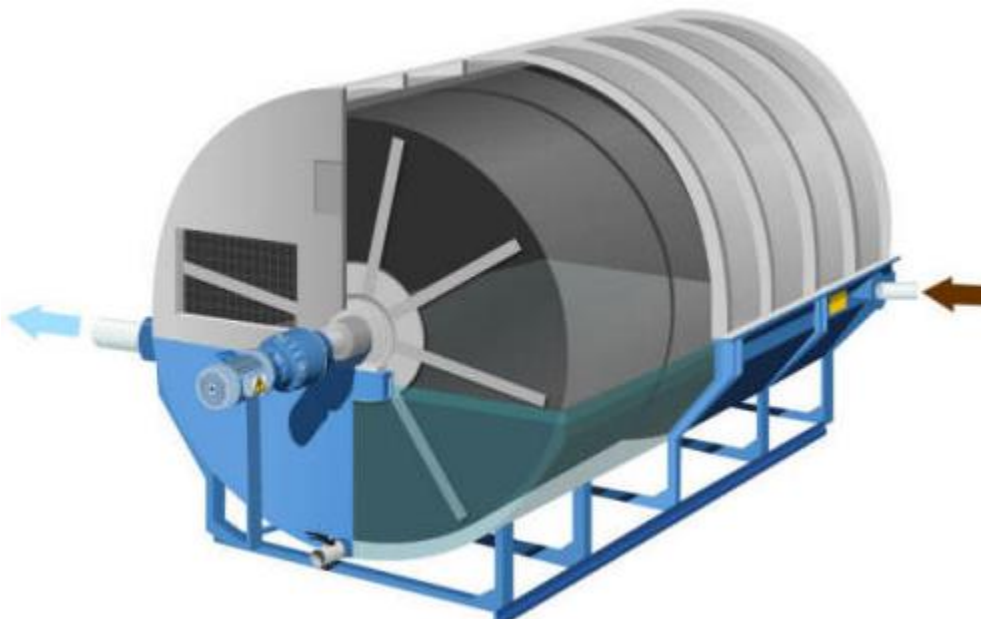


FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DE UN BIOREACTOR DE DISCOS ROTATORIOS. FUENTE: ES.SLIDESHARE.NET/CARLOSBARONARISTIZABAL/BIODISCOS

Las condiciones óptimas de este reactor fueron estudiadas por Krystynowicz llegando a alcanzar los 5,35 g/l de celulosa y las condiciones eran velocidad de rotación de 4 rpm y relación de superficie libre/medio de cultivo de 0,71 [Krystynowicz et al. 2002].

#### 3.4.3.2. REACTORES DE BIOFILM O DE CÉLULAS INMOVILIZADAS

Los reactores de biofilm muestran varias ventajas sobre los reactores de células suspendidas, particularmente en proporcionar alta densidad de biomasa, comodidad de operación y rendimiento de producción. Cheng mejoró con éxito la producción de CB mediante el uso de un reactor de biofilm con soportes plásticos (Plastic Composite Support) [Cheng et al. 2009]. Los resultados demostraron que el reactor de biofilm PCS produjo una producción de CB (7,05 g/l) que fue 2,5 veces mayor que el control (2,82 g/l).

#### 3.4.4. RESUMEN DE BIOREACTORES

TABLA 4. PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA SEGÚN EL TIPO DE REACTOR

Tipo de reactor	Ventaja	Inconveniente	Productividad [g/l·h]	Concentración [g/l]
Mezcla perfecta	Alta productividad y fácil escalado	Esfuerzo de cizallamiento de las células y requerimiento alto de mezcla	0,058 – 0,23	4,57 - 13
Air-lift	Alta productividad y bajo esfuerzo cortante	Elevado consumo energético	0,056 – 0,116	3,8 – 8,7
Discos rotatorios	Adecuado para cepas aeróbicas. Alta concentración celular	Gran riesgo de contaminación	0,015	5,35 g/l
Biofilm	Alta concentración celular y productividad; Fácil separación del producto	Difícil escalado	0,08	5,8

## 4. APLICACIONES DE LA CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana combina las excelentes propiedades que le confieren su estructura con las características únicas de los materiales a escala nanométrica. Debido a sus propiedades estructurales y mecánicas únicas en comparación con la celulosa de plantas, se espera que BC se convierta en un material básico en diversos campos. Las fibras BC tienen una elevada relación de aspecto con un diámetro de 20-100 nm. Como resultado, BC tiene una superficie muy alta por unidad de masa. Esta calidad, combinada con su naturaleza altamente hidrofílica, da como resultado una capacidad de carga de líquido muy alta. Además, su biocompatibilidad, hidrofiliidad, biocompatibilidad, transparencia y no toxicidad lo convierten en un candidato atractivo para una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, especialmente aquellos relacionados con aplicaciones biomédicas y biotecnológicas [Dahman et al, 2009].

### 4.1. APLICACIONES BIOMÉDICAS

El principal campo de aplicaciones que tiene la celulosa bacteriana es en el campo biomédico. Esto es debido al alto coste de producción y preparación que tiene esta nanocelulosa además de las inmejorables propiedades que posee. El mercado global para la nanocelulosa en 2017 se estima en 97 billones de dólares para este tipo de aplicaciones. La celulosa bacteriana tiene unas propiedades óptimas para este campo como pueden ser una gran resistencia mecánica en estado húmedo, también posee una gran permeabilidad para líquidos y gases, es insoluble en medios acuosos, totalmente biocompatible y no presenta toxicidad en el cuerpo humano. Posteriormente se detallan las aplicaciones biomédicas más importantes de la nanocelulosa.

#### 4.1.1. TISSUE SCAFFOLDS

La principal aplicación biomédica está dirigida a los “andamios” para los tejidos o del tissue scaffolds, que consisten en facilitar la regeneración de los tejidos dañados del cuerpo humano mediante la suportación y el anclaje a unas estructuras tridimensionales fabricadas con nanocelulosa que reduzcan el posible estrés que puedan sufrir estos tejidos. Los tissue scaffolds fabricados en nanocelulosa presentan propiedades como una baja citotoxicidad, una alta biocompatibilidad y una alta porosidad, además de proporcionar un ambiente cell-friendly que facilite y estimule la proliferación de las células del tejido dañado. La utilización para este tipo de aplicaciones se puede dividir en tres aspectos principales: aplicada a scaffolds de membrana, aplicada a la formación de la matriz del scaffold o bien para modificación de la superficie del scaffold. Las formas de utilización de la celulosa bacteriana sería como hidrogeles, composites, esponjas y membranas.



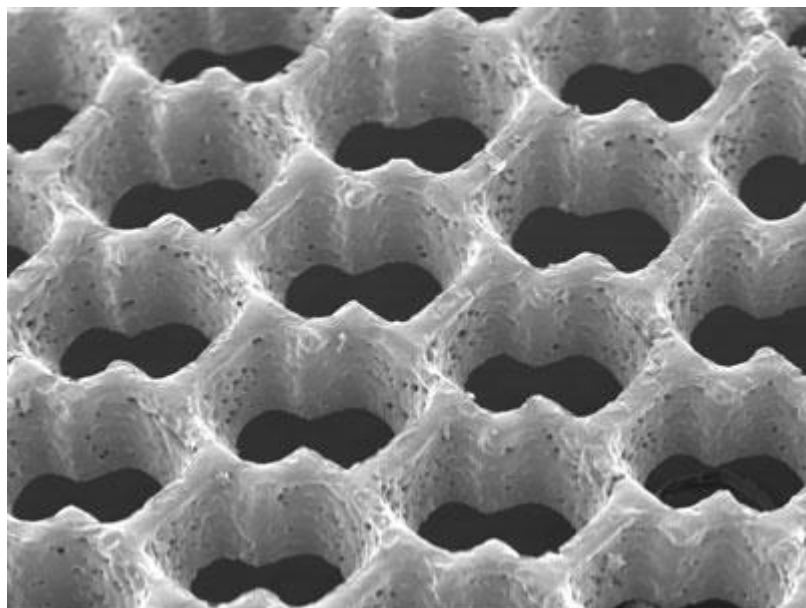


FIGURA 12. TISSUE SCAFFOLDS. FUENTE: MIT DEVELOPMENTS 2008

#### 4.1.2. EXCIPIENTE DE FÁRMACOS O SUMINISTRADOR DE FÁRMACOS

La nanocelulosa es utilizada hoy en día como excipiente de fármacos orales, su finalidad es la de producir una compactación del fármaco para la administración oral de los medicamentos. Las formas en las cuales se presenta la nanocelulosa para uso farmacéutico son en forma de microesferas, hidrogeles y membranas

Las investigaciones existentes tratan de desarrollar nuevos fármacos con nanocelulosa que facilite la liberación prolongada del fármaco y por otro lado disminuir la velocidad de desintegración del comprimido en el organismo para alcanzar órganos diana.

#### 4.1.3. TERAPIA DE PIEL

BC tiene características tales como una alta cristalinidad, resistencia a la tracción, capacidad de absorción de agua, buena permeabilidad, biocompatibilidad, resistencia a la degradación y una baja solubilidad que puede resultar ventajosa para materiales de tejido cutáneo. En la actualidad ya existen productos como Biofill® y Gengiflex® que están desarrollados con celulosa bacteriana con amplias aplicaciones en cirugía e implantes dentales como sustituto de piel [KESHK et al 2014]. Los beneficios de estos productos son alivio inmediato del dolor, estrecha adhesión a la herida, disminución de la incomodidad después de la cirugía, reducción de la tasa de infección, facilidad de inspección de la herida (transparencia), cicatrización más rápida y retención de exudados mejorada, desprendimiento espontáneo después de la reepitelización y reducción del tiempo y los costos del tratamiento por el contrario uno de sus inconvenientes es la limitación elástica en zonas de gran movilidad.



FIGURA 13. RECUBRIMIENTO DE UNA LÁMINA DE CELULOSA BACTERIANA COMO SUSTITUTO DE PIEL HUMANA. FUENTE: W. K. CZAJA, D. J. YOUNG, M. KAWECKI, R. M. BROWN, 2007

#### 4.1.4. VASOS SANGUÍNEOS ARTIFICIALES

La celulosa bacteriana podría utilizarse para realizar vasos sanguíneos artificiales, ya que conlleva un menor riesgo de coágulos de sangre que los materiales sintéticos utilizados actualmente para las operaciones de derivación cardiaca. El material debe resistir tanto el estrés mecánico durante la preparación microquirúrgica y la anatomía como la presión arterial. La celulosa bacteriana tiene propiedades mecánicas, incluyendo retención de forma y resistencia al desgarramiento, que son superiores a muchos materiales sintéticos y en comparación con los materiales utilizados hasta el momento como el polipropileno o el PET. Esto significa que la celulosa bacteriana funciona muy bien en contacto con la sangre y es una alternativa muy interesante para su utilización en vasos sanguíneos artificiales.

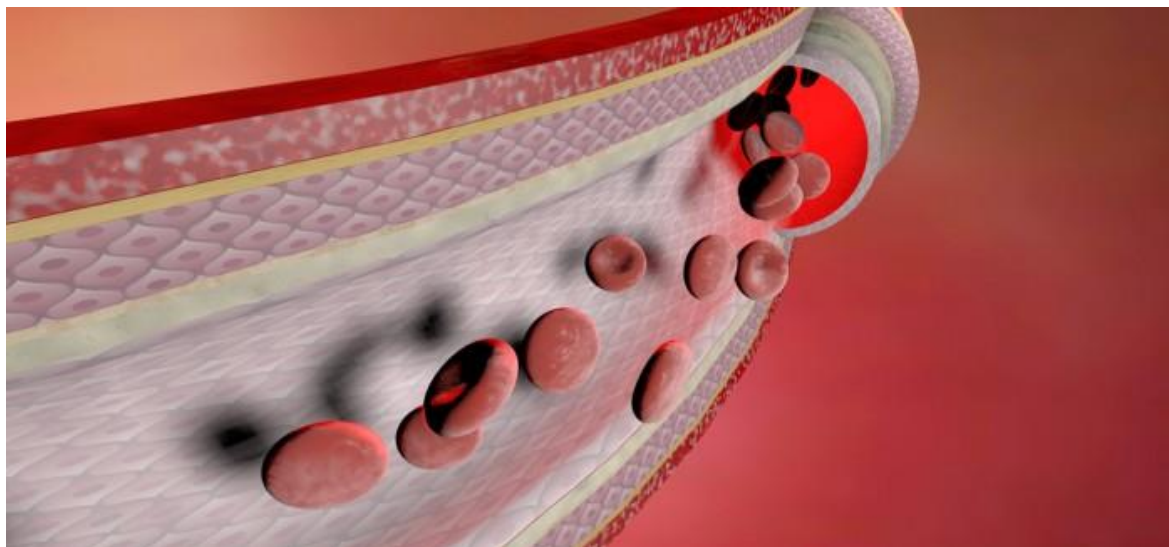


FIGURA 14. VASOS SANGUÍNEOS ARTIFICIALES FABRICADOS CON IMPRESIÓN 3D

## 4.2. FABRICACIÓN DE PAPEL

El uso principal de la celulosa bacteriana en la fabricación del papel es como un aglutinante para la mejora considerable de la resistencia y durabilidad de la pulpa del papel. En el estudio realizado por [Basta y El-saied et al 2009] confirmaron que la incorporación de 5% de celulosa bacteriana con pasta de madera durante la formación de hojas de papel mejoraba significativamente la retención de caolín, resistencia y propiedades de resistencia al fuego en comparación con las hojas de papel producidas sin la incorporación de celulosa bacteriana.

## 4.3. APLICACIONES DE ENVASADO DE ALIMENTOS

Las nanoestructuras de celulosa se han aplicado normalmente como fases de refuerzo, pero también pueden utilizarse como matrices para una variedad de materiales, incluidas los films para aplicaciones de envasado de alimentos. En este caso, la celulosa bacteriana (BC) es especialmente útil, debido a sus propiedades peculiares. BC ya se produce como nanomaterial por especies del género *Gluconacetobacter* cultivadas en un medio con fuentes de carbono y nitrógeno. A pesar de ser químicamente idéntica a la celulosa vegetal, la BC se produce como un proceso de síntesis de celulosa y ensamblando fibrillas en forma de cinta nanométrica con 70-80 nm de ancho produciendo una película (membrana) con una capacidad de retención de agua de 60-700 veces su peso seco. También está libre de hemicelulosa y lignina, reduciendo los costos de purificación y los daños ambientales derivados del uso de productos químicos agresivos. BC se utiliza para formar películas de diferentes

maneras: en forma de nanofibrillas de celulosa bacteriana (BCNF o nanocristales de celulosa bacteriana (BCNC) [Azeredo, H.M.C., et al., 2016].

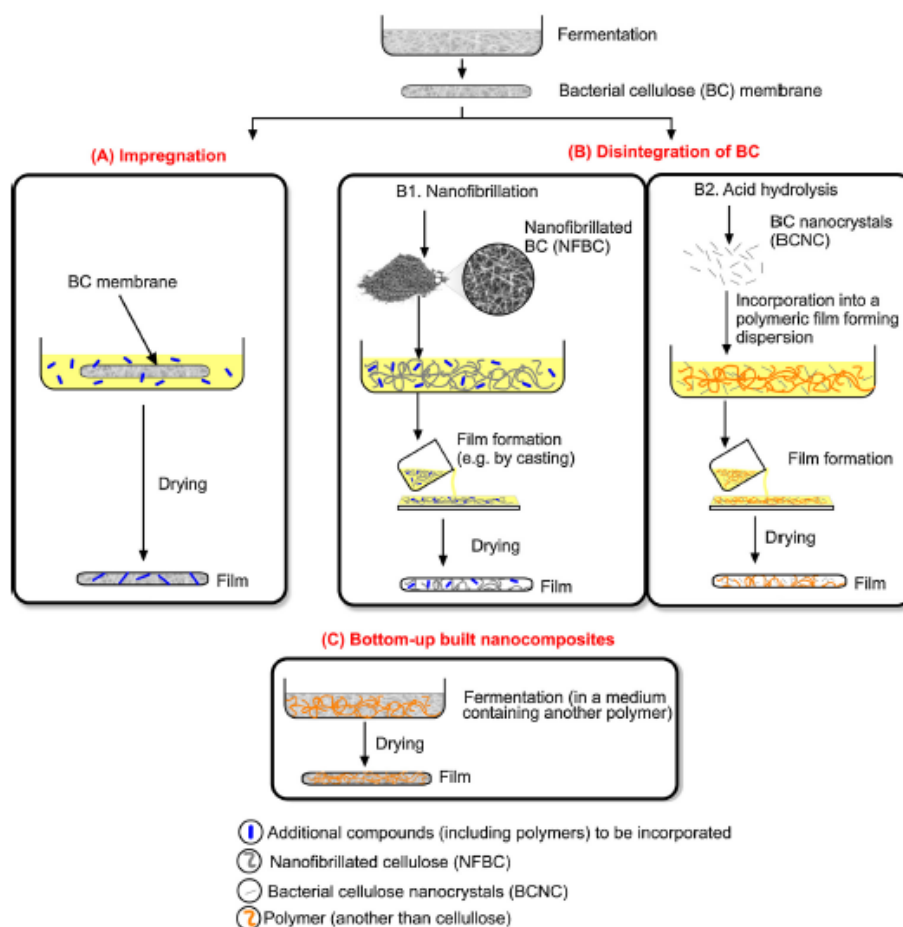


FIGURA 15. PROCESOS DE UTILIZACIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EN FILMS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. FUENTE: [AZEREDO, HENRIETTE MC ET AL 2017]

## 5. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo es el material alimenticio en el que crecen los microorganismos. El medio de cultivo tiene por tanto que contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y tiene que estar libre de microorganismos contaminantes. Las condiciones físicas de este también tienen que ser controladas como pueden ser el pH, la temperatura, atmósfera y grado correcto de acidez o alcalinidad.

Existen distintos tipos de medios de cultivo y se pueden clasificar según su estado físico, formulación, uso u origen.

- Según su estado físico existen:
  - Líquidos: se utilizan cuando no se desea obtener colonias de bacterias aisladas.
  - Sólidos: se realizan mediante la adición de agentes espesantes como el agar y se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo y para el estudio de la morfología de las colonias.
  - Semisólidos: tienen un menor porcentaje de agar, por lo que no solidifican totalmente a la temperatura ambiente.
- Según su formulación existen:
  - Químicamente definidos: los cuales se conoce de manera exacta la cantidad adicionada de cada compuesto.
  - Complejos: los cuales están hechos a partir de extractos naturales como por ejemplo el extracto de levadura.
- Según su uso existen:
  - Medios corrientes: son aquellos medios apropiados para el cultivo y mantención de la mayoría de las bacterias. Además sirven de base para la preparación de los medios especiales.
  - Medios especiales: son aquellos medios de cultivo que por su riqueza nutritiva, sirven para el cultivo de bacterias muy exigentes e incluyen inhibidores para ciertas bacterias.
- Según su origen existen:
  - Naturales: son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal.
  - Sintéticos: son los medios que contienen una composición química definida cualitativamente y cuantitativamente.
  - Semisintéticos: son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento complejos.



FIGURA 16. MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO  
FUENTE: JARUN ONTAKRAI



FIGURA 17. MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO: MEDIO COMPLEJO  
(IZQUIERDA) Y MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO  
(DERECHA)

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. INTRODUCCIÓN A LA OPTIMIZACIÓN

En este apartado se tratará la optimización de la síntesis de celulosa bacteriana por fermentación mediante las bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*. Para ello se realizarán diferentes experimentos variando los compuestos que forman el medio de cultivo, las condiciones de la fermentación y se llevarán a cabo pruebas con reactores biológicos de escala laboratorio y planta piloto.

Las variaciones del medio de cultivo que se llevarán a cabo tienen como objetivo mejorar las condiciones de fermentación de las bacterias utilizadas para alcanzar una mayor tasa de productividad. Estos compuestos serán elegidos previo a estudio de su posible influencia en las bacterias o bien en la fermentación.

Los experimentos que se llevarán a cabo en las posteriores optimizaciones serán diseños factoriales en los que se probará el efecto que tiene el cambio efectuado en las condiciones de fermentación o el compuesto añadido y su resultado en la productividad de celulosa bacteriana.

Por último, se realizarán pruebas en reactores de escala laboratorio (1L) y de escala planta piloto (10L) para comprobar los resultados en un volumen mayor del que se realizan los experimentos. Para realizarlas se montarán y equiparán completamente los dos reactores con todos los equipamientos necesarios para llevar a cabo las fermentaciones.

A través de todos los experimentos y pruebas en reactores se obtendrán unos resultados que puedan mejorar y optimizar el medio de cultivo y las condiciones de fermentación utilizadas hasta el momento.

### 6.2. MATERIAL DE LABORATORIO

En este apartado se tratarán los equipamientos de los que se dispone en la *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona* (ETSEIB) que serán utilizados para las diferentes optimizaciones a realizar. Se explicarán las características de estos y su utilidad.

#### 6.2.1. ULTRACENTRÍFUGA SIGMA 6K10

Para realizar las separaciones de fases y la obtención de la celulosa es necesario la separación mediante una ultracentrífuga. La ultracentrífuga que se utiliza en el laboratorio es del modelo SIGMA 6K10, es una ultracentrífuga para grandes volúmenes. Esta centrifuga cuenta con un sistema de refrigeración

que alcanza hasta los 6°C de temperatura para facilitar la separación de fases y sedimentación de la fase sólida, la velocidad de giro que puede alcanzar es de 8600 rpm y cuenta con un temporizador. Tiene una capacidad máxima de carga de 2 litros a dividir en 6 compartimentos.



FIGURA 18. CENTRIFUGA SIGMA 6K10 REFRIGERADA

### 6.2.2. ORBITAL AGITATOR OVAN

Para mejorar la aireación de los medios de cultivo se utilizará un agitador de bandeja u orbital. En este agitador orbital se pueden agitar simultáneamente hasta 25 erlenmeyer de capacidad 100 ml o bien 9 erlenmeyer de capacidad 500 ml. La velocidad de agitación que se utilizará en los experimentos posteriores será 130 rpm para asegurar la buena aireación del medio.

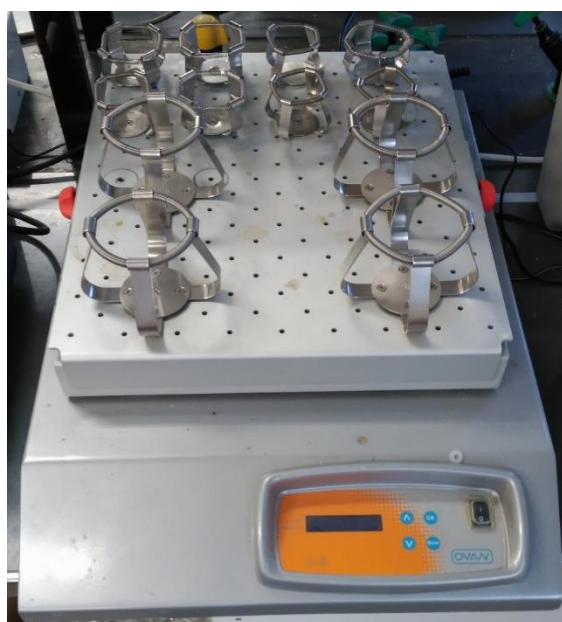


FIGURA 19. ORBITAL AGITATOR OVAN



### 6.2.3. COLORIMETER ZUZI 4200 A, X = 600 NM

Otro de los instrumentos que se utilizará en el laboratorio será el colorímetro Zuzi 4200, un colorímetro es un instrumento capaz de medir la absorbancia de una disolución en una frecuencia de onda determinada, en este caso se medirá a 600 nm. La absorbancia de la muestra nos indicará la concentración de celulosa y bacterias que posee una muestra con lo que indicará una medida de avance de la reacción biológica.



FIGURA 20. COLORIMETER ZUZI 4200

### 6.2.4. SELECTA STOVES

También serán utilizadas dos estufas idénticas SELECTA STOVES a las temperaturas de 48 °C y 200 °C respectivamente. La estufa de 48 °C es utilizada para el secado de muestras y mantener material de laboratorio fuera de contaminación mientras que la estufa de 200 °C es utilizada para la esterilización del material de laboratorio mediante el procedimiento de esterilización por calor seco. Este procedimiento consiste en introducir el material de laboratorio en el horno de 200 °C durante 2 horas para la eliminación de cualquier microbio existente.



FIGURA 21. SELECTA STOVES

### 6.2.5. LIOFILIZADOR

El liofilizador será utilizado durante el proceso de purificación de las muestras para secar la celulosa bacteriana. Es el último proceso que se llevará a cabo en todas las fermentaciones. La liofilización trabaja congelando la celulosa bacteriana y luego reduciendo la presión para permitir que el agua congelada en la celulosa se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido.



FIGURA 22. LIOFILIZADOR UTILIZADO EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE CB

### 6.2.6. ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRARROJOS

El funcionamiento de este aparato se basa en la espectroscopia de infrarrojo en el que un haz de radiación infrarroja incide a una determinada longitud de onda en el material a analizar midiendo la absorción por parte de las moléculas. Es una técnica que sirve para determinar la estructura de compuestos orgánicos. En el caso de estos experimentos, durante la purificación de la celulosa bacteriana obtenida de cada fermentación se medirá la espectroscopia de infrarrojos para comprobar la pureza que tiene esta.



FIGURA 23. ESPECTROFOTÓMETRO DISPONIBLE EN ETSEIB

### 6.2.7. BIOREACTORES DE TANQUE AGITADO

Para llevar a cabo las pruebas de fermentación a escala pre-planta piloto y planta piloto será necesario dos reactores de vidrio de 1L y 10L respectivamente. Estos bioreactores contarán con todos los equipamientos para llevar a cabo las fermentaciones; sistema de agitación, sistema de aireación, diferentes entradas y salidas de medio de cultivo, sistema de toma de muestras y captadores de presión.



FIGURA 24. BIOREACTOR DE TANQUE AGITADO DE 10 LITROS DE CAPACIDAD

## 6.3. OPERACIONES PREVIAS A LA OPTIMIZACIÓN

### 6.3.1. MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO

El medio de cultivo utilizado para las bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* es el recomendado por la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT). Es un medio líquido complejo basado en el manitol como fuente de carbono y el resto de elementos son proporcionados por los compuestos complejos del extracto de levadura y la peptona. Los compuestos que forman este medio de cultivo son los siguientes:

TABLA 5. MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LA MASA BACTERIANA. FUENTE: CECT

Medio de cultivo	Cantidad por 1.000 ml de medio
Extracto de levadura	5 g
Peptona	3 g
Manitol	25 g
Agua destilada	1000 ml

Para la preparación de este medio de cultivo es necesario un paso previo que consiste en la esterilización de todo el material en el cual se realizará la fermentación. Se destinarán dos erlenmeyer de 500 ml cada uno en los cuales se generará suficiente masa bacteriana para los próximos experimentos a realizar. Esta esterilización tiene la finalidad de evitar contaminaciones por parte de otros microorganismos que puedan competir con nuestra bacteria de interés.

El primer paso de la esterilización es desinfectar los erlenmeyer a utilizar llenándolos con una disolución al 1% en hipoclorito de sodio como agente desinfectante durante 24 horas. Posteriormente se lava con abundante agua destilada para eliminar las trazas de hipoclorito de sodio y se introducirá en una estufa a 150°C durante 2 horas con una pequeña cantidad de agua destilada, procedimiento conocido como esterilización seca.

Paralelamente al proceso de esterilización seca, en un erlenmeyer se prepara el medio de cultivo recomendado por el CECT, se homogeneiza y se procede con una esterilización a través de una microfiltración al vacío con un filtro de poliamida de 0,45 micras. Para esta filtración será necesario un matraz kitasato y un embudo de filtrado además de un sistema de vacío. El diámetro de paso del microfiltro está diseñado para el paso de líquido y evitar así el paso de cualquier microorganismo. Una vez ha sido filtrado el medio de cultivo se divide en partes iguales en los erlenmeyer previamente esterilizados, se le añade una punta de espátula de las bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* en cada uno de ellos. Las condiciones de cultivo del crecimiento bacteriano serán de 25°C a pH 6 y al tratarse de bacterias aeróbicas para su crecimiento óptimo se incorpora una agitación elevada con un agitador magnético para proporcionar el oxígeno necesario por medio de la

turbulencia. Se mantendrán estas condiciones durante las 48 horas que dura la fermentación. Tras estas 48 horas se procede con el aislamiento y conservación de las bacterias producidas en la fermentación.



FIGURA 25: FERMENTACIÓ PARA LA OBTENCIÓ DE MASA BACTERIANA

### 6.3.2. AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓ DE LAS BACTERIAS

Una vez han transcurrido las 48 horas necesarias para el crecimiento de la suficiente masa bacteriana se procede con el aislamiento mediante centrifugaci3n. Esta centrifugaci3n separa la fase s3lida compuesta por las bacterias y celulosa formada por las mismas de la fase l3quida formada por el medio de cultivo restante. La centrifugaci3n se realiza a 8000 rpm y 6°C para facilitar la sedimentaci3n durante 15 minutos. Posteriormente, se desecha el l3quido sobrenadante.



FIGURA 26. OBTENCIÓN DE LA MASA BACTERIANA POR CENTRIFUGACIÓN

Para la conservación de las bacterias es necesario separar en pequeñas colonias en diferentes eppendorfs y la cantidad a separar será de una punta de espátula (aproximadamente 0,23 gramos). Estas colonias serán utilizadas en los próximos experimentos a realizar para la optimización del proceso.



FIGURA 27: CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS EN LOS EPPENDORFS

### 6.3.3. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA

La parte final de todos los experimentos constará de la separación y purificación de la celulosa bacteriana. Se realiza la separación de fases mediante la centrifugación y se desecha el medio restante. La fase de interés al igual que en la conservación de la masa bacteriana es la fase sólida formada por las bacterias y la celulosa producida por las mismas.

Para la separación de la celulosa bacteriana de las bacterias hay que realizar una destrucción o lisis de las bacterias, de esta manera es posible solubilizarlas en agua y poder separarlas por centrifugación y decantación.

El método de lisis escogido es mediante el tratamiento con una solución básica de NaOH 2M durante 24 horas a temperatura ambiente y lavado con agua para eliminar el NaOH. Posteriormente, se analiza por espectroscopia IR las muestras de celulosa tratadas, si existiera persistencia de las bacterias en las muestras se debe proceder a realizar otro lavado con NaOH 2M o bien si no existen trazas de bacterias en las muestras proceder con el secado de la celulosa bacteriana.

El secado de la celulosa bacteriana se realiza mediante la liofilización para ello hay que congelar previamente las muestras e introducirlas en el liofilizador hasta que las muestras estén secas.

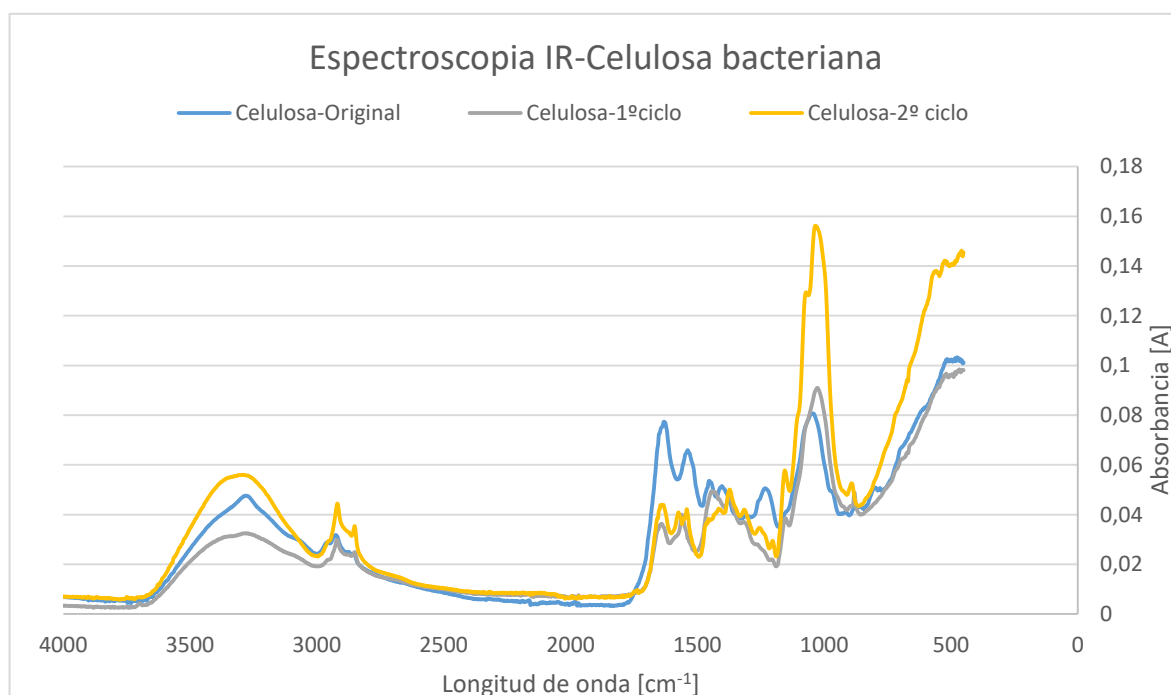


GRÁFICO 1. PROCESO DE PURIFICACIÓN DE VARIAS LIMPIEZAS CON NAOH

En las muestras inspeccionadas por espectroscopia IR hay que fijarse principalmente en 3 bandas: la banda situada a 3300 cm<sup>-1</sup> pertenece a los grupos alcoholes de la cadena polimérica de la celulosa, la doble banda situada a 1600 cm<sup>-1</sup> pertenece a la presencia de proteínas bacterianas y por último la banda situada en 1000 cm<sup>-1</sup> perteneciente enlace β-1,4-O-glucosídico (éster) que une las moléculas de glucosa formando la celulosa.

Como es posible ver en el proceso de purificación de la celulosa la banda situada en 1600 cm<sup>-1</sup> va disminuyendo su presencia y la situada en 3300 cm<sup>-1</sup> y 1000 cm<sup>-1</sup> aumentan, por lo que, las muestras van disminuyendo la presencia de masa bacteriana y quedando principalmente la celulosa bacteriana.

### 6.3.4. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

El medio de cultivo complejo que se utilizará como base de las optimizaciones posteriores es el medio desarrollado por Hestrin and Schramm en 1954 [Hestrin y Schramm et al 1954]. Este medio está compuesto por la glucosa y el ácido cítrico como fuente de carbono, la peptona y el extracto de levadura como fuente de nitrógeno además de todos los factores de crecimiento y vitaminas y para completar las necesidades de grupos fosfato que requiere la bacteria durante la síntesis de celulosa bacteriana el hidrogeno fosfato de sodio.

TABLA 6. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO DESARROLLADO POR HESTRIN Y SCHRAMM

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g/l]
Extracto de levadura	0,5	5
Peptona	0,5	5
Glucosa	2	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Ácido cítrico	0,115	1,15
Agua destilada	97	970

Al medio de cultivo se le añadirá la concentración de 5% v/v de inóculo de bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*. Por lo que previamente se hará una disolución de 0,23 gramos de bacterias en 100 ml de agua destilada de la cual se extraerá el equivalente al 5% en volumen respecto al volumen del medio de cultivo.

### 6.3.5. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Una importante optimización en el proceso de biosíntesis de celulosa por fermentación es la utilización de un medio de cultivo químicamente definido. Hasta el momento todos los medios utilizados son medios de cultivo complejos. Estos medios de cultivo complejos utilizan como fuente de nitrógeno compuestos como pueden ser el extracto de levadura o bien peptonas, estas fuentes de nitrógeno están formadas por la degradación de proteínas y pueden contener aminoácidos, pequeños péptidos y carbohidratos de las cuales no se conoce ni su composición cualitativa ni cuantitativa.

El beneficio que conllevaría el uso de un medio de cultivo químicamente definido es la estandarización del medio de cultivo y el conocimiento exacto de las necesidades de la bacteria en cuestión. La dificultad que conlleva desarrollar un medio de cultivo químicamente definido está en encontrar los compuestos óptimos que la bacteria necesita para su crecimiento y producción del producto deseado.

La fuente de nitrógeno a definir para el medio químicamente definido ha de ser distinto del utilizado en el medio complejo, el extracto de levadura. Otra de las fuentes de nitrógeno son los iones amonio que pueden ser aportados en el medio por el cloruro de amonio, el nitrato de amonio, el fosfato amónico y sobre todo el sulfato de amonio que es el mejor compuesto ya que aporta al mismo tiempo



azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos. Por tanto, el sustituto del extracto de levadura para el medio químicamente definido es el sulfato de amonio. La cantidad de sulfato de amonio que se le adicionará al medio es el equivalente en nitrógeno al extracto de levadura utilizado en el medio complejo.

Además de carbono y nitrógeno, el pathway de la biosíntesis muestra la dependencia de grupos fosfatos que requiere la bacteria hasta llegar a la síntesis de celulosa, por tanto, se añadirá también al igual que el medio complejo el hidrogeno fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

El medio de cultivo químicamente definido a utilizar es el siguiente:

TABLA 7. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g/l]
Sulfato de Amonio	0,52	5,2
Glucosa	2	20
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,27	2,7
Agua destilada	97	970

Al medio de cultivo se le añadirá la concentración de 5% v/v de inóculo de bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*. Por lo que previamente se hará una disolución de 0,23 gramos de bacterias en 100ml de agua destilada de la cual se extraerá el equivalente al 5% en volumen respecto al volumen del medio de cultivo.

## 6.4. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE EL USO DE OLIGOELEMENTOS

El primer experimento para la optimización del proceso de biosíntesis de la celulosa bacteriana será la adición de oligoelementos al medio de cultivo. Estos oligoelementos aportados son imprescindibles para cualquier organismo ya que actúan como catalizadores de las reacciones bioquímicas.

Se han seleccionado los cuatro oligoelementos principales que son Hierro, Calcio, Zinc y Manganeseo. La forma de adición al medio será mediante sus sales, el Hierro en su forma sulfato [ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ], el Calcio en su forma cloruro [ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ], el Zinc en su forma sulfato [ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ] y el Manganeseo en su forma cloruro [ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ].

La función de los oligoelementos seleccionados es la siguiente:

- **Hierro:** facilita el transporte de oxígeno dentro del organismo, es necesario para la correcta actividad de las vitaminas del grupo B y para obtener energía a partir de los carbohidratos ya que actúa como cofactor enzimático y es parte fundamental de las proteínas transportadoras de electrones.
- **Calcio:** es un cofactor de ciertas enzimas.
- **Zinc:** interviene como catalizador de múltiples funciones como síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos.
- **Manganeseo:** es un cofactor de enzimas que transfieren grupos fosfatos.

La hipótesis del experimento es que la producción de celulosa bacteriana aumentará gracias a la adición de estos oligoelementos. Para poder comprobar este aumento se diseña un experimento factorial con cuatro factores activos, los cuatro oligoelementos.

Las condiciones experimentales son un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm, una concentración de bacterias de 5% v/v de inóculo y una duración de 5 días. El tamaño de la muestra es de 150 ml para asegurar una buena aireación mediante la agitación.

La concentración a utilizar de estos oligoelementos se establece en 20 mg/l de oligoelemento, una concentración muy elevada para probar la efectividad de cada oligoelemento o su combinación de manera clara.

Las cantidades necesarias para alcanzar esa concentración son:

- En el caso del hierro:

$$20 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \text{Fe} \cdot \frac{1 \text{ mmol Fe}}{55,845 \text{ mg Fe}} \cdot \frac{1 \text{ mmol } [\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol Fe}} \cdot \frac{278,05 \text{ mg } [\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol } [\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]} = 99,58 \frac{\text{mg } [\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{\text{l}}$$

- En el caso del Calcio:

$$20 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \text{Ca} \cdot \frac{1 \text{ mmol Ca}}{40,078 \text{ mg Ca}} \cdot \frac{1 \text{ mmol } [\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol Ca}} \cdot \frac{147,02 \text{ mg } [\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol } [\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}]} = 73,37 \frac{\text{mg} [\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}]}{\text{l}}$$

- En el caso del Zinc:

$$20 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \text{Zn} \cdot \frac{1 \text{ mmol Zn}}{65,38 \text{ mg Zn}} \cdot \frac{1 \text{ mmol } [\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol Zn}} \cdot \frac{287,54 \text{ mg } [\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol } [\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]} = 87,96 \frac{\text{mg } [\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]}{\text{l}}$$

- En el caso del Manganeseo:

$$20 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \text{Mn} \cdot \frac{1 \text{ mmol Mn}}{54,94 \text{ mg Mn}} \cdot \frac{1 \text{ mmol } [\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol Mn}} \cdot \frac{197,91 \text{ mg } [\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}]}{1 \text{ mmol } [\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}]} = 72,04 \frac{\text{mg } [\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}]}{\text{l}}$$

#### 6.4.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

Para la primera optimización se utilizará el medio de cultivo complejo expuesto en el apartado 7.3.4 Medio de cultivo complejo y es el siguiente:

TABLA 8. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g / l]
Extracto de levadura	0,5	5
Peptona	0,5	5
Glucosa	2	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Ácido cítrico	0,115	1,15
Agua destilada	97	970

Se realiza un diseño factorial, un experimento con 4 factores activos ( $2^4$ ), por lo que se realizaran 16 muestras. Cada factor (metal) contará con dos posibilidades, no añadir (0 mg/l) o añadir 20 mg/l de metal activo.

TABLA 9: DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS DEL MEDIO COMPLEJO

Nº muestra	Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O [mg/muestra]
1	0	0	0	0
2	14,94	0	0	0
3	0	11,01	0	0
4	14,94	11,01	0	0
5	0	0	13,19	0
6	14,94	0	13,19	0
7	0	11,01	13,19	0
8	14,94	11,01	13,19	0
9	0	0	0	10,81
10	14,94	0	0	10,81
11	0	11,01	0	10,81
12	14,94	11,01	0	10,81
13	0	0	13,19	10,81
14	14,94	0	13,19	10,81
15	0	11,01	13,19	10,81
16	14,94	11,01	13,19	10,81

Para medir el crecimiento bacteriano se tomarán medidas de la absorbancia del medio, además de ello se analizará por espectroscopia IR para comprobar la pureza de las muestras y por último se purificará la masa de celulosa obtenida.

#### 6.4.1.1. RESULTADOS OPTIMIZACIÓN MEDIANTE EL USO DE OLIGOELEMENTOS

Pasados los 5 días que se habían estimado para la duración de este experimento se realizan los cálculos del incremento de absorbancia entre el inicio y final del experimento. Los valores se indican en la tabla a continuación:

TABLA 10. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS DEL MEDIO COMPLEJO

Nº experimento	Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	Δ Absorbancia
1	0	0	0	0	0,24
2	14,94	0	0	0	0,00
3	0	11,01	0	0	0,15
<b>4</b>	<b>14,94</b>	<b>11,01</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,61</b>
5	0	0	13,19	0	0,31
6	14,94	0	13,19	0	0,27
7	0	11,01	13,19	0	0,22
8	14,94	11,01	13,19	0	0,08
9	0	0	0	10,81	0,22
10	14,94	0	0	10,81	0,3
11	0	11,01	0	10,81	0,17
12	14,94	11,01	0	10,81	0,55
13	0	0	13,19	10,81	0,29
14	14,94	0	13,19	10,81	0,11
15	0	11,01	13,19	10,81	0,24
16	14,94	11,01	13,19	10,81	0,43

Una vez analizados los valores del incremento de absorbancias, el valor que pertenece al experimento número 4, formado por la combinación de los metales hierro y calcio, obtiene el mayor crecimiento de masa bacteriana seguido del experimento número 12, formado por la combinación de metales hierro, calcio y manganeso.

Para la determinación de la masa de celulosa bacteriana se purifica con NaOH 2M y se realiza el procedimiento de limpieza y aislamiento de la celulosa como el explicado en anteriores apartados.

Para comprobar la pureza de estas muestras se realiza un ensayo de espectroscopia IR en el cuál se observa que en la celulosa existe una contaminación con algún tipo indeterminado de compuestos proteínicos.

Tras el posterior análisis de los compuestos añadidos en el medio de cultivo y su tratamiento con NaOH 2M se determina que algunos de los compuestos que componen la peptona no son degradables bajo las condiciones establecidas por lo que en los próximos experimentos se eliminará la peptona del medio de cultivo sustituyéndose por extracto de levadura.

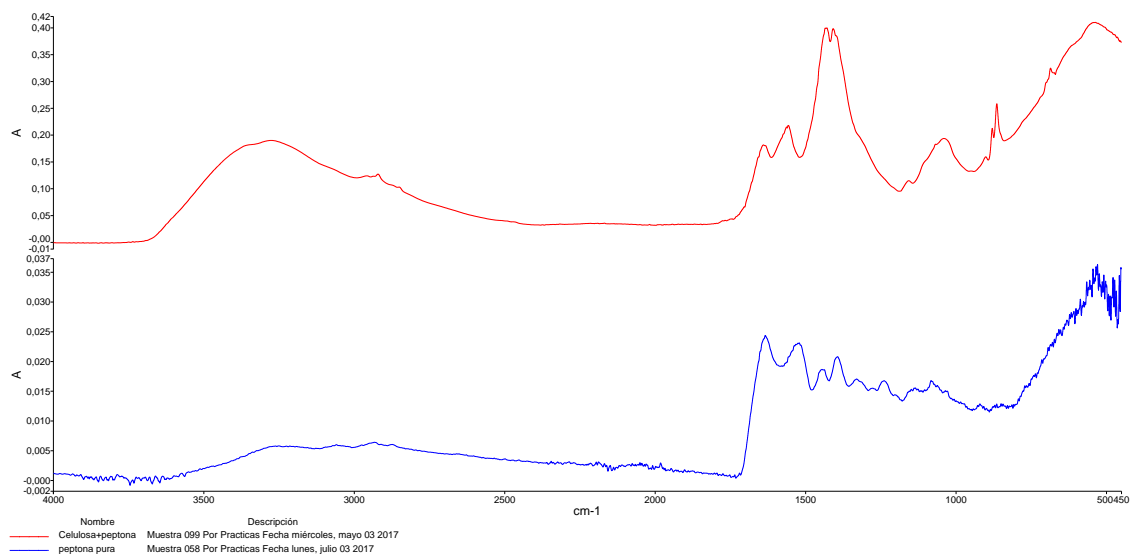


GRÁFICO 2. IRS DE LA MUESTRA DE CELULOSA (ROJO) Y LA MUESTRA DE PEPTONA (AZUL)

En el gráfico anterior se muestra los IR de la muestra de celulosa obtenida en el experimento y de la peptona tratada con NaOH 2M en el cual se puede observar la contaminación a longitud de onda 850  $\text{cm}^{-1}$  con 2 picos que también son observables en la peptona.

Como conclusión de este experimento los medios de cultivo a utilizar a partir de ahora incluirán los oligoelementos hierro y calcio con tal de mejorar los rendimientos del bioproceso.

Otra de las primeras conclusiones que se pueden extraer es que el oligoelemento Zinc combinado con otros oligoelementos desfavorece el crecimiento bacteriano y la producción de celulosa, por tanto, el Zinc no será utilizado para los próximos experimentos.

## 6.5. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE USO DE OLIGOELEMENTOS (II)

Se vuelve a realizar el experimento añadiendo oligoelementos al medio de cultivo aunque esta vez se tendrán en cuenta el Calcio, Hierro y Manganeso excluyendo el Zinc por la ineficacia que demostró en la anterior optimización.

La hipótesis del experimento es que la producción de celulosa bacteriana aumentará gracias a la adición de estos oligoelementos. Para poder comprobar este aumento se diseña un experimento factorial con tres factores activos, los tres oligoelementos.

Las condiciones experimentales son un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm, una concentración de bacterias de 5% v/v de inóculo y una duración de 5 días. El tamaño de la muestra es de 150 ml para asegurar una buena aireación mediante la agitación.

### 6.5.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

El medio de cultivo resultante de la anterior optimización y que será utilizado en esta optimización es el medio complejo sin peptona:

TABLA 11. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS (II)

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g / l]
Extracto de levadura	1	10
Glucosa	2	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Ácido cítrico	0,115	1,15
Agua destilada	97	970

El diseño factorial de la optimización es un experimento con 3 factores activos (2<sup>3</sup>), por lo que se realizarán 8 experimentos. Cada factor (metal) contará con dos posibilidades, no añadir (0 mg/l) o añadir 20 mg/l de metal activo. En cada uno de estos experimentos se utilizará 150 ml del medio preparado anteriormente.

TABLA 12. DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS (II) PARA EL MEDIO COMPLEJO

Nº muestra	Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O [mg/muestra]
1	0	0	0
2	14,94	0	0
3	0	11,01	0
4	14,94	11,01	0
5	0	0	10,81
6	14,94	0	10,81
7	0	11,01	10,81
8	14,94	11,01	10,81

Para comprobar la efectividad de estos oligoelementos se analizará el incremento de absorbancia de las muestras así como la masa de celulosa obtenida tras la purificación.

#### 6.5.1.1. RESULTADOS OPTIMIZACIÓN MEDIANTE USO DE OLIGOELEMENTOS (II)

Pasados los 5 días de fermentación se mide el incremento de absorbancia se realiza la separación y purificación de la celulosa bacteriana según el procedimiento explicado anteriormente.

TABLA 13. RESULTADOS PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS (II) PARA EL MEDIO COMPLEJO

Nº muestra	Δ Absorbancia	Masa CB [g]	concentración [g/l]	Productividad [g/l · día]
1	0,50	0,0641	0,4273	0,0855
2	0,46	0,0724	0,4827	0,0965
3	0,47	0,0794	0,5293	0,1059
<b>4</b>	<b>0,49</b>	<b>0,1337</b>	<b>0,8913</b>	<b>0,1783</b>
5	0,60	0,0676	0,4507	0,0901
6	0,53	0,0552	0,3680	0,0736
7	0,75	0,0776	0,5173	0,1035
8	0,67	0,1146	0,7640	0,1528

El experimento que obtiene una mayor masa de celulosa bacteriana es el experimento número 4 que presentaba el sulfato de hierro y el cloruro de calcio, Calcio y hierro como oligoelementos seguido del experimento número 8 que presentaba los tres oligoelementos a estudiar.

Por el contrario, el experimento que ha obtenido la menor masa de celulosa bacteriana es la muestra número 6, la muestra que presentaba el sulfato de hierro (II) y el cloruro de manganeso (II).

Cabe destacar a través de estos resultados que el efecto del manganeso es negativo cuando aparece en disolución con el hierro y el calcio disminuyendo la masa de celulosa obtenida.



La conclusión a este experimento de optimización mediante oligoelementos es que el efecto de añadir hierro y calcio como oligoelementos al medio de cultivo aumenta la producción de celulosa bacteriana.

Como segunda conclusión que se puede extraer es el efecto negativo que produce el manganeso sobre los otros oligoelementos estudiados.

## 6.5.2. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

De igual modo que para el medio complejo, el primer experimento para la optimización del proceso de biosíntesis de la celulosa bacteriana será la adición de oligoelementos al medio de cultivo.

El medio de cultivo a utilizar es el medio químicamente definido expuesto anteriormente añadiendo o no los oligoelementos según el número de experimento.

TABLA 14. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g / l]
Sulfato de Amonio	0,52	5,19
Glucosa	2	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Agua destilada	97	970

El diseño factorial de la optimización es un experimento con 3 factores activos (2<sup>3</sup>), por lo que se realizarán 8 experimentos. Cada factor (metal) contará con dos posibilidades, no añadir (0 mg/l) o añadir 20 mg/l de metal activo. En cada uno de estos experimentos se utilizará 150 ml del medio preparado anteriormente.

TABLA 15. DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS PARA EL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Nº muestra	Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O [mg/muestra]	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O [mg/muestra]
1	0	0	0
2	14,94	0	0
3	0	11,01	0
4	14,94	11,01	0
5	0	0	10,81
6	14,94	0	10,81
7	0	11,01	10,81
8	14,94	11,01	10,81

Para comprobar la efectividad de estos oligoelementos se analizará el incremento de absorbancia de las muestras así como la masa de celulosa obtenida tras la purificación.

### 6.5.2.1. RESULTADOS OPTIMIZACIÓN MEDIANTE USO DE OLIGOELEMENTOS

TABLA 16. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE OLIGOELEMENTOS PARA EL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Nº muestra	$\Delta$ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	0,09	0,0055	0,0367	0,0073
2	0,04	0,009	0,0600	0,0120
3	0,21	0,0076	0,0507	0,0101
<b>4</b>	<b>0,05</b>	<b>0,0190</b>	<b>0,1267</b>	<b>0,0253</b>
5	0,01	0,0082	0,0547	0,0109
6	0,03	0,0053	0,0353	0,0071
7	0,01	0,0055	0,0367	0,0073
8	0,02	0,0184	0,1227	0,0245

El experimento que ha obtenido la mayor masa de celulosa bacteriana ha sido el número 4 en el cual estaba presente el hierro y calcio como oligoelementos seguido del experimento número 8 que presentaba los tres oligoelementos estudiados.

Por el contrario, el experimento número 6 y muy seguidos a este los números 1, experimento de control, y el experimento número 7 han obtenido la menor masa de celulosa bacteriana.

El experimento 6 y 7 han obtenido la menor masa de celulosa bacteriana debido a que contenían manganeso en el medio de cultivo que afectará de manera negativa en el crecimiento de las bacterias o bien en la producción de celulosa. Esto puede ser debido a que la presencia o bien concentración de este metal puede llegar a ser tóxico para las bacterias o bien sea un antagonista de los otros dos oligoelementos estudiados.

Como conclusión global de este experimento se puede constatar que la adición de los oligoelementos calcio y hierro al medio de cultivo aumentan la producción de celulosa bacteriana llegando a ser máxima al adicionar ambos oligoelementos mientras que por el contrario la adición del oligoelemento manganeso la disminuye.

## 6.6. FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO (1L)

Además de las diferentes optimizaciones que se realizaran en este trabajo, también se realizaran varias pruebas en bioreactores de tanque agitado para simular con mayor exactitud la escala planta piloto y en un futuro la escala industrial de este proceso de síntesis de celulosa bacteriana.

Esta primera prueba será una prueba a escala pre-planta piloto con un bioreactor de 1 litro de volumen, este bioreactor contará con las siguientes características:

- **Bioreactor de vidrio** de 1L de volumen
- **Sistema de agitación:** se dispone de dos hélices de tipo Rushton, cada una de ellas de 6 palas que se dispondrán a  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  del fondo del bioreactor para asegurar una buena agitación. Además de las hélices, el reactor dispone de baffles en las paredes del reactor para aumentar la turbulencia durante la agitación. Para disminuir la espuma generada se le añade 0,05 ml de un antiespumante de tipo silicona
- **Sistema de aireación:** el reactor dispone de un motor externo que insufla aire atmosférico de manera constante a través de un distribuidor de burbujas de aire. De esta manera se provee al bioreactor del suficiente oxígeno y en burbujas suficientemente pequeñas para mejorar su disolución en el medio de cultivo y al alcance de las bacterias.
- **Sistema de entrada/salida:** el bioreactor cuenta con una salida de toma de muestras y vaciado por la parte inferior de este y una serie de entradas por la parte superior. Estas entradas serán utilizadas para incorporar al bioreactor todos los sistemas comentados anteriormente.

Esta prueba solo se realizará para el medio complejo, este medio incorporará los oligoelementos calcio y hierro por la mejora que conllevan en la productividad de la CB.

TABLA 17. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g / l]
Extracto de levadura	1,01	10,1
Glucosa	2	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Ácido cítrico	0,125	1,25
Agua destilada	96,425	964,25
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,1	1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,07	0,7

Las condiciones iniciales son 1 litro de volumen de medio de cultivo complejo, pH de 6, temperatura ambiente alrededor de 25°C, una concentración de inóculo correspondiente al 5% v/v de una

disolución concentrada de bacterias. La duración de la fermentación es de 4 días. Se realizaran dos replicas en el mismo bioreactor.



FIGURA 28. MONTAJE E INICIO DE LA PRUEBA DE ESCALA PRE-PLANTA PILOTO

### 6.6.1. RESULTADOS FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO (1L)

Durante la etapa de purificación se probará la eficacia de dos métodos de purificación: mediante liofilización y mediante secado en estufa.

- Para la purificación mediante liofilización será necesario esparcir la masa obtenida de CB húmeda en un recipiente, congelar las muestras, una vez esté congelada se introducirá en el liofilizador durante 5 días para eliminar por completo el agua retenida en la CB.
- Para la purificación mediante secado en estufa será necesario esparcir la masa obtenida de CB húmeda en un recipiente e introducirlo en una estufa a una temperatura de 120°C durante un día.

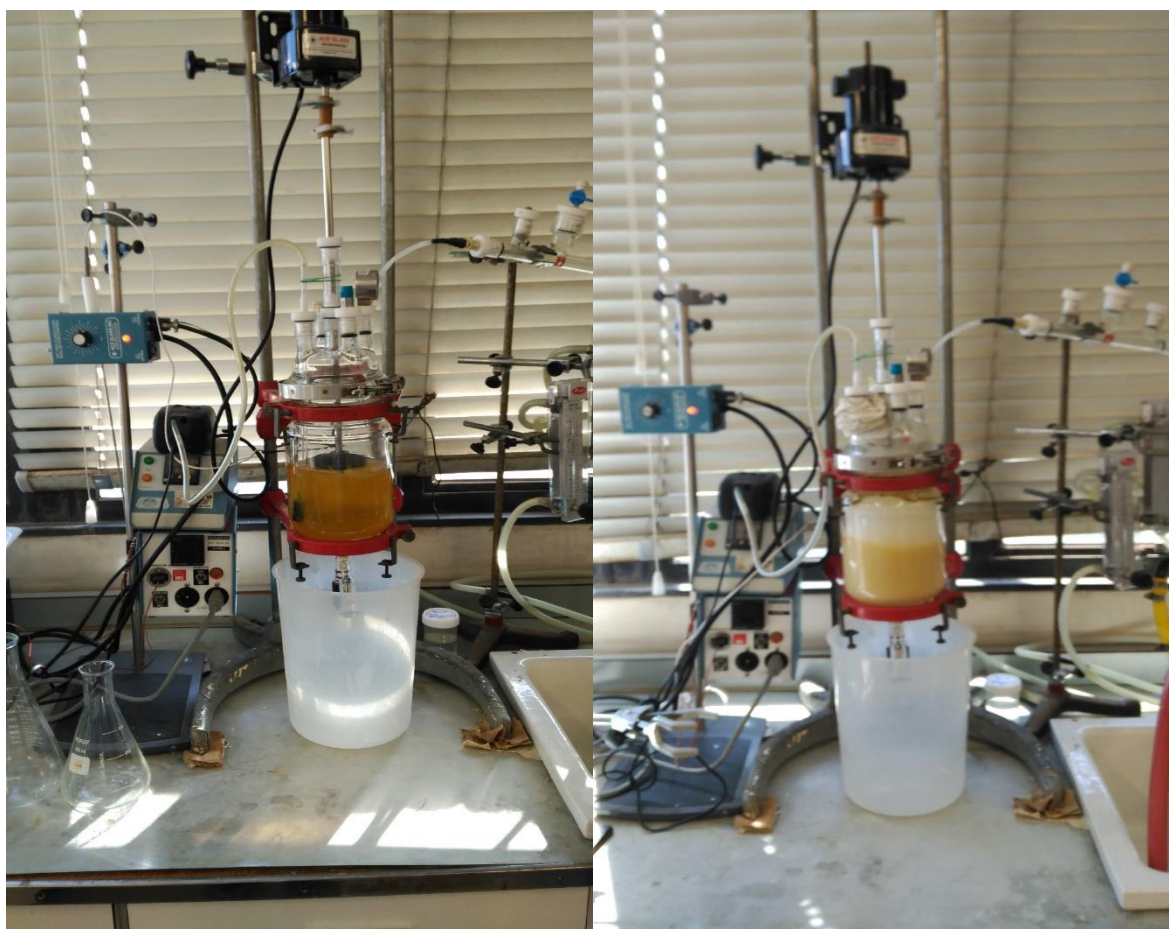


FIGURA 29. FERMENTACIÓN AL INICIO DE LA PRUEBA A LA IZQUIERDA Y FERMENTACIÓN FINAL A LA DERECHA.

TABLA 18. RESULTADOS FERMENTACIÓN A ESCALA PRE-PLANTA PILOTO

	Método de purificación	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
RÉPLICA 1	LIOFILIZACIÓN	4,38	4,38	1,095
RÉPLICA 2	SECADO EN ESTUFA	2.06	2.06	0,515

La réplica 2 ha obtenido tan poca masa de CB debido a que el tratamiento de purificación mediante secado en estufa es demasiado agresivo por lo que produjo calcinación de la CB.

Por otro lado, la réplica 1 ha obtenido 4,38 gramos de CB y una productividad de 1,095 g/l·día. Este resultado es mejor del esperado ya que ha obtenido más de 5 veces la productividad resultante de la anterior optimización mediante oligoelementos. Este resultado se debe a que el reactor presenta una mejor aireación del medio de cultivo ya que se insufla aire de manera continua y se disuelve a través de la agitación hecho que no sucede en las optimizaciones realizadas en los erlenmeyer. De esta manera también es posible percibir la importancia que tiene el oxígeno disuelto en el medio en la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*.

Las conclusiones de la prueba a escala pre-planta piloto que se pueden obtener son que el método de purificación mediante la liofilización es mejor que el secado en estufa a 120°C ya que mantiene en perfecto estado la CB mientras que el tratamiento térmico puede llegar a calcinar la CB.

También se ha podido comprobar la influencia que tiene el aumento de oxígeno disuelto en el medio de cultivo llegando a alcanzar una productividad 5 veces mayor que en medios de cultivo sin un sistema de aireación.



*FIGURA 30. CB OBTENIDA DE LA PRUEBA ESCALA PRE-PLANTA PILOTO. PURIFICADA MEDIANTE SECADO EN ESTUFA A LA IZQUIERDA Y MEDIANTE LIOFILIZACIÓN A LA DERECHA.*

A través de esta imagen es posible ver la diferencia que existe en la CB en función del método de purificación que se utilice. En la imagen izquierda está la celulosa bacteriana tratada mediante el secado en estufa a 120°C observándose una tonalidad marrón producido por la calcinación de la celulosa mientras que en la imagen derecha se ve la CB purificada mediante liofilización en la cual no ha perdido la tonalidad blanquecina de la celulosa pura.

## 6.7. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Dada la baja producción de celulosa bacteriana obtenida utilizando el medio químicamente definido se tiene que rediseñar el mismo. La principal diferencia entre el medio químicamente definido y el medio complejo es la aportación de nitrógeno y otros factores de crecimiento proporcionados por el extracto de levadura. Los factores de crecimiento que aporta el extracto de levadura son principalmente aminoácidos y vitaminas mayoritariamente del complejo B. Por tanto, una de las posibles mejoras de este medio químicamente definido será la adición de aminoácidos que complementen al sulfato de amonio. Los aminoácidos que se disponen para la realización de esta mejora son: Glicina, L-Glutamina y monohidrocloreto de L-Lisina.

- La Glicina es el aminoácido más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos presentes en las células. La glicina se utiliza en el organismo para sintetizar gran número de sustancias entre ellas todas las purinas.
- La L-Glutamina es un aminoácido no esencial que interviene en la composición de las proteínas; es una cadena lateral de una amida del ácido glutámico, formada mediante el reemplazo del hidroxilo del ácido glutámico con un grupo funcional amina.
- La L-Lisina es uno de los 10 aminoácidos esenciales y es un elemento necesario para la construcción de todas las proteínas del organismo. y en la producción de hormonas y enzimas.

La concentración de aminoácidos a utilizar es de 0,1 g/l como factor de crecimiento añadido al medio complejo. Paralelamente se estudiará el efecto que tiene la concentración de glucosa en el medio de cultivo, para ello se estudiará la productividad de celulosa para 40 g/L, 120 g/L y 200 g/L.

La hipótesis del experimento es que la productividad de celulosa bacteriana aumentará con la adición de aminoácidos que suplan la falta de factores de crecimiento en el medio químicamente definido. Por otro lado, la segunda hipótesis es que el aumento de concentración de glucosa en el medio también conllevará un aumento de la productividad de celulosa por la aportación extra de carbono al medio.

Las condiciones experimentales iniciales son un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm, una concentración de bacterias igual a 5% v/v de inóculo y una duración de 72 horas. El tamaño de las muestras será de 70 ml para garantizar una buena aireación del medio.

### 6.7.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

El medio de cultivo complejo que se utilizará en esta optimización es el medio obtenido de la anterior optimización añadiendo los oligoelementos que mejoraban la producción de CB.

TABLA 19. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Compuesto	Cantidad [%]	Cantidad [g / l]
Extracto de levadura	1,01	10,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27	2,7
Ácido cítrico	0,125	1,25
Agua destilada	98,42	984
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,10	1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,07	0,73

Se realiza diseño factorial para comprobar la mejora de la producción de celulosa a través de 6 experimentos en los cuales varían la concentración de glucosa de 40 g/l, 120 g/l, 200 g/l y la presencia o no presencia de aminoácidos (0,1 g/l).

TABLA 20. DISEÑO FACTORIAL DEL MEDIO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Nº muestra	Presencia de Aminoácidos	Concentración de glucosa [g/l]
1	SI	40
2	SI	120
3	SI	200
4	NO	40
5	NO	120
6	NO	200

#### 6.7.1.1. RESULTADOS MEDIO COMPLEJO

TABLA 21. RESULTADOS DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Nº muestra	Glucosa [g/l]	Contiene Aminoácidos	Δ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	40	SI	6,4	0,0071	0,1014	0,0338
2	120	SI	5,4	0,0257	0,3671	0,1224
<b>3</b>	<b>200</b>	<b>SI</b>	<b>5,3</b>	<b>0,0433</b>	<b>0,6186</b>	<b>0,2062</b>
4	40	NO	8,6	0,0071	0,1014	0,0338
5	120	NO	8,7	0,0059	0,0843	0,0281
6	200	NO	4,5	0,0004	0,0057	0,0019

La muestra número 3 ha obtenido la mayor producción de CB con una concentración de 0,6186 g/l de CB seguido de la número 2 con 0,3671 gramos.

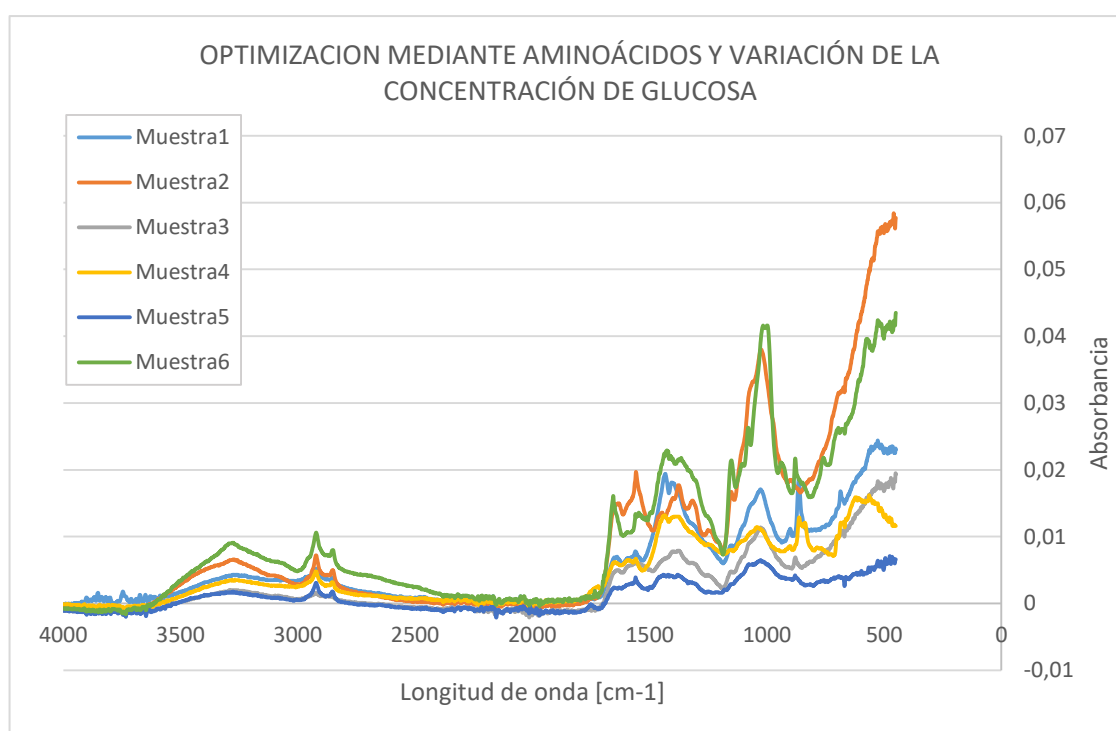
Las muestras que contenían en el medio de cultivo aminoácidos presentan una mayor producción de CB que las muestras que no los presentan esto puede ser debido a que el aporte de aminoácidos



favorezca la producción de proteínas necesarias para el crecimiento de las bacterias y producción de CB.

En cuanto a la variación de concentración de glucosa en el caso de contener aminoácidos a mayor concentración de glucosa mayor producción de CB mientras que en las muestras que no contenían aminoácidos existe una disminución de la producción a medida que aumenta la concentración de glucosa. Es posible que en presencia de aminoácidos, el aporte de estos favorezca la síntesis de proteínas capaces de asimilar la glucosa del medio mientras que en muestras sin presencia de aminoácidos, las bacterias no cuentan con la misma cantidad de proteínas para asimilar la glucosa y sufran de problemas de presión osmótica.

En cuanto a la pureza de las muestras se realiza una espectroscopia IR obteniendo la siguiente gráfica. En ella se puede ver que todas las muestras presentan las bandas características de la celulosa.



Estos resultados pueden ser debidos a que a las bacterias presentes en las muestras que contenían un suplemento de aminoácidos han podido crecer de manera más rápida y aumentar así la producción de CB mientras que las bacterias que no presentaban los aminoácidos en sus medios de cultivo no son capaces de asimilar la concentración de glucosa presente en el medio disminuyendo su actividad bacteriana, problemas de presión osmótica.

### 6.7.2. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

El medio de cultivo para la segunda optimización está formado por la misma fuente de nitrógeno que se determinó para el medio químicamente definido y los oligoelementos que mejoraban la producción en la optimización anterior. La concentración de la fuente de carbono será variable así como varios aminoácidos. El medio común para todas las muestras será el siguiente:

TABLA 22. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,950	9,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,300	3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,007	0,07337
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,010	0,09958
Agua destilada	98,74	987,4

El diseño factorial para comprobar la mejora de la producción de celulosa bacteriana se realiza mediante 6 experimentos en los cuales varían la concentración de glucosa de 40 g/L, 120 g/L, 200 g/L y la presencia o no presencia de aminoácidos (0,1 g/l).

TABLA 23. DISEÑO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE AMINOÁCIDOS Y CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Nº muestra	Presencia de Aminoácidos	Concentración de glucosa [g/l]
1	SI	40
2	SI	120
3	SI	200
4	NO	40
5	NO	120
6	NO	200

#### 6.7.2.1. RESULTADOS MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

TABLA 24. RESULTADOS DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE AMINOÁCIDOS Y VARIACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Nº muestra	Glucosa [g/l]	Contiene Aminoácidos	Δ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	40	SI	0,81	0	0	0
2	120	SI	0,77	0	0	0
3	200	SI	0,16	0	0	0
4	40	NO	1,02	0	0	0
5	120	NO	0,37	0	0	0
6	200	NO	1,28	0	0	0

Tras analizar el incremento de absorbancia no se muestra una correlación entre los resultados. En la totalidad de las muestras analizadas la masa de celulosa obtenida era prácticamente nula por lo que no se procedió ni a la purificación de esta.

En cuanto al incremento de absorbancia, las muestras que contienen aminoácidos no muestran un mayor incremento absorbancia frente a las que no contenían aminoácidos.

Como conclusión de este experimento, el medio de cultivo químicamente definido sigue sin alcanzar la masa de celulosa bacteriana del medio complejo y la utilización de aminoácidos ni el aumento de concentración de glucosa proporciona una mejora en la producción de celulosa bacteriana. Esto puede ser debido a faltas de factores de crecimiento que no permitan el crecimiento bacteriano.

Por tanto, el medio químicamente definido no incorporará los aminoácidos ni el aumento de concentración de glucosa.

## 6.8. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

La última optimización tiene el objetivo de encontrar la influencia que tiene el porcentaje de inóculo añadido al medio de cultivo frente a la producción de celulosa bacteriana.

Primero de todo hay que entender la posible influencia que puede tener el porcentaje de inóculo en el medio de cultivo y para ello hay que entender las fases del crecimiento bacteriano. Estas fases del crecimiento bacteriano se dividen en cuatro; la fase de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.

La fase de latencia es la fase de adaptación al medio de cultivo donde las bacterias sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben llevar a cabo. Durante esta fase no existe un crecimiento en el número de bacterias pero sí en la masa celular debido a la síntesis de enzimas.

La fase exponencial o logarítmica es la fase en la cual la bacteria crece de manera exponencial duplicando su población cada cierto tiempo, también es la fase donde existe el crecimiento máximo.

La fase estacionaria es la fase en la cual hay el mismo número de bacterias que mueren a las que se duplican. En cultivos cerrados la población de bacterias no puede crecer de manera indefinida de forma exponencial ya sea por agotamiento de los nutrientes, acumulación de tóxicos, disponibilidad de espacio o combinación de estas.

Por último, la fase de muerte es la fase en la cual de manera progresiva existe una disminución del número de bacterias.

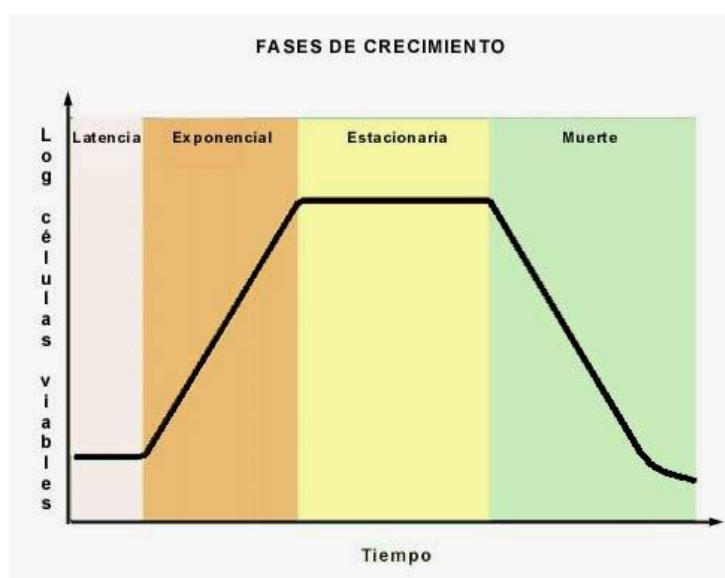


FIGURA 31. FASES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

La posible influencia de la cantidad de inóculo estará centrada en las primeras dos fases, la de latencia y la de crecimiento logarítmico. El efecto que tiene un aumento del porcentaje de inóculo sobre la fase de latencia es que aumentan las probabilidades de haber bacterias que se adapten al medio más rápido con menor concentración de inóculo. El efecto que tiene un aumento del porcentaje de inóculo sobre la fase exponencial es que al existir una población mayor de bacterias inicial se requiere menos tiempo para alcanzar la población de bacterias máxima que puede existir en el medio de cultivo. Por otro lado, el resto de las fases debería de mantenerse igual.

La hipótesis que se plantea es que un aumento de la cantidad de inóculo (más del 5% v/v utilizado en anteriores experimentos) aumentará la producción de celulosa bacteriana debido a que se reducirá el tiempo en alcanzar una mayor población de bacterias que puedan producir la CB.

La variable que será modificada es el porcentaje de inóculo que se añadirá al medio de cultivo. Los valores que se tomaran son 5%, 10% y 30% v/v. Se realizará el experimento para ambos medios de cultivo. Las condiciones experimentales iniciales son un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm, una duración de 24 horas y 50 ml de medio de cultivo.

$$\% \frac{v}{v} \text{ de inóculo} = \frac{\text{Volumen inóculo}}{\text{Volumen muestra}};$$

$$\text{Conc. bacterias al } 5\% \frac{v}{v} \text{ de inóculo} = \frac{\text{Conc. inicial bacterias} \cdot V. \text{ de inóculo}}{V. \text{ muestra}}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. bacterias al } 5\% \frac{v}{v} \text{ de inóculo} &= \frac{0,23 \text{ g bacterias}}{100 \text{ ml disolución bact.}} \cdot [0,05 \cdot 50] \text{ ml inóculo} \\ &= \frac{0,115 \text{ mg bacterias}}{\text{ml de muestra}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. bacterias al } 10\% \frac{v}{v} \text{ de inóculo} &= \frac{0,23 \text{ g bacterias}}{100 \text{ ml disolución bact.}} \cdot [0,1 \cdot 50] \text{ ml inóculo} \\ &= \frac{023 \text{ mg bacterias}}{\text{ml de muestra}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. bacterias al } 30\% \frac{v}{v} \text{ de inóculo} &= \frac{0,23 \text{ g bacterias}}{100 \text{ ml disolución bact.}} \cdot [0,3 \cdot 50] \text{ ml inóculo} \\ &= \frac{0,69 \text{ mg bacterias}}{\text{ml de muestra}} \end{aligned}$$

### 6.8.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

El medio de cultivo complejo que se utilizará en esta optimización es el medio obtenido incorporando las mejoras encontradas en otras optimizaciones del medio complejo.

TABLA 25. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
Extracto de levadura	1,000%	10
Glucosa	19,994%	200
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,270%	2,7
Ácido cítrico	0,115%	1,15
Agua destilada	78,575%	786
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,00995%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00733%	7,34E-02
monohidrocloreto de L-Lisina	0,010%	0,10
Glicina	0,010%	0,1
L-Glutamina	0,010%	0,1

Para comprobar el efecto que tiene la variación de inóculo se realizará una fermentación para cada porcentaje de inóculo.

#### 6.8.1.1. RESULTADOS DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

TABLA 26. RESULTADOS DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

Nº Muestra	% INO	Δ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	5	5,2	0,0082	0,164	0,0820
2	15	5,7	0,0055	0,11	0,0550
<b>3</b>	<b>30</b>	<b>5,1</b>	<b>0,0219</b>	<b>0,438</b>	<b>0,2190</b>

La muestra que ha obtenido la mayor masa de CB ha sido la muestra con el 30% de inóculo con una concentración final de 0,438 g/l de CB. Por lo que se cumple la hipótesis planteada previamente.

En cuanto a la pureza de las muestras, la muestra 1 contiene todavía presencia de proteínas de las bacterias por lo que es necesario realizar otro lavado con NaOH 2M.

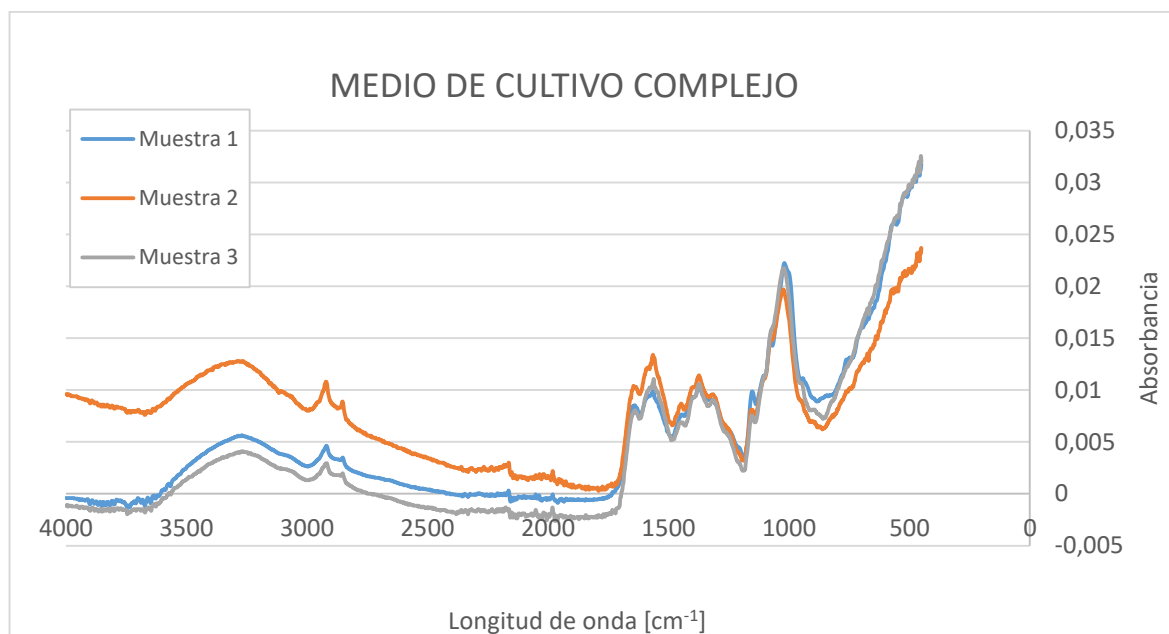


GRÁFICO 3. IR MUESTRAS DEL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

### 6.8.2. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

El medio utilizado se corresponde con el medio que obtuvo la mayor masa de celulosa bacteriana hasta el momento, encontrado en la optimización mediante oligoelementos (apartado 7.5.2).

TABLA 27. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE VARIACIÓN DE INÓCULO

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
Glucosa	2,00%	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,95%	9,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27%	2,7
Agua destilada	96,76%	967,63
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,010%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,007%	7,34E-02

#### 6.8.2.1. RESULTADOS DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

TABLA 28. RESULTADOS DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO

Nº Muestra	% INÓCULO	Δ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	5	1,04	0,0004	0,008	0,0040
2	15	1,83	0,0034	0,068	0,0340

<b>3</b>	<b>30</b>	<b>1,94</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,112</b>	<b>0,0560</b>
----------	-----------	-------------	---------------	--------------	---------------

La muestra que contenía el 30% de inóculo presenta al igual que para el medio complejo la mayor masa de CB obtenida de esta optimización por lo que se cumple la hipótesis planteada previa al experimento.

En cuanto a la pureza las tres muestras presentes no contienen trazas de proteínas de las bacterias por lo que el lavado es suficiente para purificar la CB.

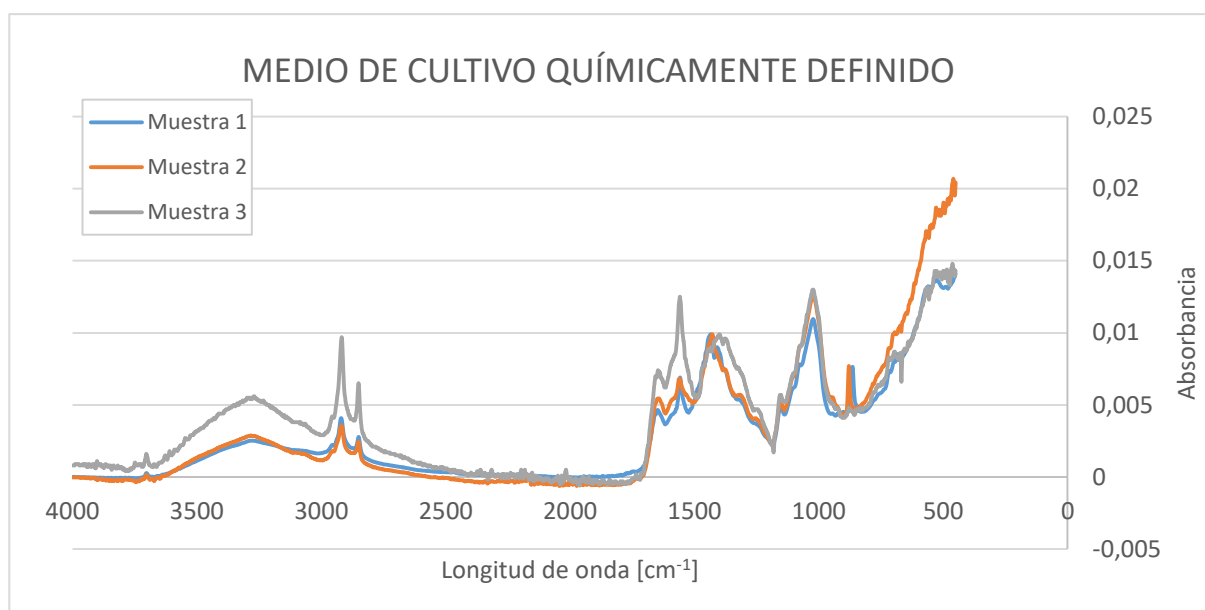


GRÁFICO 4. IR MUESTRAS DEL MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA VARIACIÓN DE INÓCULO



## 6.9. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO MEDIANTE LA ADICIÓN DE VITAMINA B1

Los resultados obtenidos del medio químicamente no son similares a los resultados obtenidos del medio complejo por ello hay que añadirle algún factor de crecimiento indispensable para el crecimiento bacteriano y la producción de CB. El factor de crecimiento ha de estar presente en el extracto de levadura y estos son principalmente vitaminas del grupo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento como metales.

Dentro de las vitaminas del grupo B existe la vitamina B1, tiamina, que participa como coenzima en la degradación de los hidratos de carbono que puede ser la responsable de mejorar el rendimiento de la fermentación en el medio complejo. Por tanto, en esta optimización se añadirá 0,1 g/l de tiamina en su forma clorhidruo de tiamina [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>OS·HCl].

En cuanto a la hipótesis de esta optimización es que la vitamina B1 favorece la degradación de la glucosa presente en el medio por parte de las bacterias mejorando su crecimiento y la producción de CB. Esta hipótesis también ha sido planteada por Chen et al, 2011.

La variable que será modificada es la concentración de vitamina B1 que se añadirá al medio de cultivo siendo 0,1 g/l las muestras en las que está presente y 0 g/l las muestras en las que no está presente. Se realizará el experimento para el medio químicamente definido.

Las condiciones experimentales iniciales son un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm, una duración de 24 horas y 50 ml de medio de cultivo. Además de la vitamina B1 también se analizará la influencia de la concentración de inóculo siendo 5%, 10% y 30% v/v las posibilidades.

El medio de cultivo es el mismo que para el apartado anterior:

TABLA 29. MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE VITAMINA B1

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
Glucosa	2,00%	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,95%	9,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27%	2,7
Agua destilada	96,76%	967,63
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,010%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,007%	7,34E-02

### 6.9.1.1. RESULTADOS DEL MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE VITAMINA B1

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la optimización mediante la adición de vitamina B1 y también los resultados obtenidos en la anterior optimización para el medio químicamente definido para poder ser comparados y contrastar el efecto de la vitamina B1.

TABLA 30. RESULTADOS DEL MQ PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE VITAMINA B1

Nº Muestra	Vitamina B1	% INÓCULO	$\Delta$ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
1	SI	5	1	0,0032	0,064	0,0320
2	SI	15	1,36	0,0091	0,182	0,0910
<b>3</b>	<b>SI</b>	<b>30</b>	<b>1,62</b>	<b>0,0138</b>	<b>0,276</b>	<b>0,1380</b>
1	NO	5	1,04	0,0004	0,008	0,0040
2	NO	15	1,83	0,0034	0,068	0,0340
3	NO	30	1,94	0,0056	0,112	0,0560

A través de estos resultados es posible ver una gran mejoría en la producción de celulosa alcanzando 0,276 g/l de CB para la muestra que contiene el 30% de inóculo. En comparación entre ambas optimizaciones se muestra un aumento del doble en los resultados con presencia de vitamina B1 frente a las muestras que no la presenta. Por tanto, se cumple la hipótesis ya que la vitamina B1 favorece la producción de CB frente a las muestras que no la contienen. Esta mejora también fue contratada por Chen et al 2011 para una bacteria del género *Acetobacter* aunque en el caso de este autor la mejora no era tan considerable ya que el medio de cultivo utilizado era complejo y ya había presencia de vitaminas del compuesto peptídico que utilizaba.

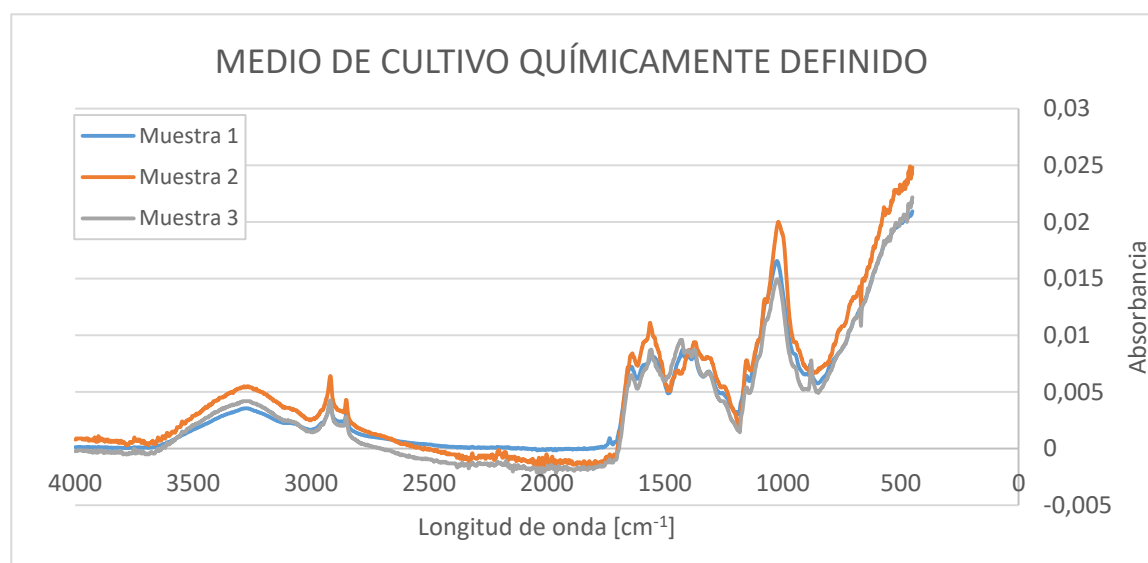


GRÁFICO 5. IR MUESTRAS DEL MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO PARA LA OPTIMIZACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE VITAMINA B1

En cuanto a la pureza, todas las muestras presentan los picos en las bandas correspondientes a la celulosa bacteriana aunque la muestra número 1 presenta ciertas impurezas proteínicas.

## 6.10. FERMENTACIÓ EN ESCALA PLANTA PILOTO (10L)

En esta prueba a escala de planta piloto realizada en un bioreactor de tanque agitado de un volumen de 10 litros se pondrán a prueba todas las optimizaciones realizadas hasta el momento y la evolución de los resultados frente a la anterior prueba en el bioreactor de 1 litro. Del mismo modo que en la prueba de escala pre-planta piloto solo se realizará la prueba para el medio de cultivo complejo. El bioreactor utilizado para esta prueba cuenta con las siguientes características, algunas de ellas pertenecen a la primera prueba realizada

- **Bioreactor de vidrio:** de 10L de volumen de tipo cilíndrico.
- **Sistema de agitación:** se dispone de dos hélices con 4 palas inclinadas, cada una de ellas de 6 palas que se dispondrán a  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  del fondo del bioreactor para asegurar una buena agitación. Además de las hélices, el reactor dispone de baffles en las paredes del reactor para aumentar la turbulencia durante la agitación. Para disminuir la espuma generada se le añade 0,05 ml de un antiespumante de tipo silicona
- **Sistema de aireación:** el reactor dispone de un motor externo que insufla aire atmosférico de manera constante a través de un distribuidor de burbujas de aire. De esta manera se provee al bioreactor del suficiente oxígeno y en burbujas suficientemente pequeñas para mejorar su disolución en el medio de cultivo y al alcance de las bacterias.
- **Sistema de entrada/salida:** el bioreactor cuenta con una sola salida/entrada por la parte superior por donde será introducido el medio de cultivo y el inóculo y dará comienzo a la prueba que durará 5 días. Esta misma entrada será destinado a extraer el medio de cultivo, población de bacterias y la celulosa bacteriana obtenidas al final de la fermentación.

Las condiciones iniciales de fermentación son un pH de 6, temperatura ambiente alrededor de 25°C, una concentración de inóculo correspondiente al 30% v/v y una duración de 4 días.

Para la purificación de la celulosa se realizará mediante el proceso de liofilización explicado en anteriores apartados.

En cuanto al medio de cultivo complejo se utilizará será el obtenido tras las numerosas optimizaciones realizadas y que mejoraban la productividad de la CB. El medio de cultivo complejo es el siguiente:

TABLA 31. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO PARA LA PRUEBA A ESCALA PLANTA PILOTO

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
Extracto de levadura	1,000%	10
Glucosa	19,994%	200
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,270%	2,7
Ácido cítrico	0,115%	1,15
Agua destilada	78,575%	786
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,00995%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00733%	7,34E-02
monohidrocloruro de L-Lisina	0,010%	0,1
Glicina	0,010%	0,1
L-Glutamina	0,010%	0,1



FIGURA 32. BIOREACTOR ANTES DEL MONTAJE A LA IZQUIERDA Y UNA VEZ MONTADO A LA DERECHA

### 6.10.1. RESULTADOS FERMENTACIÓN A ESCALA PLANTA PILOTO (10L)

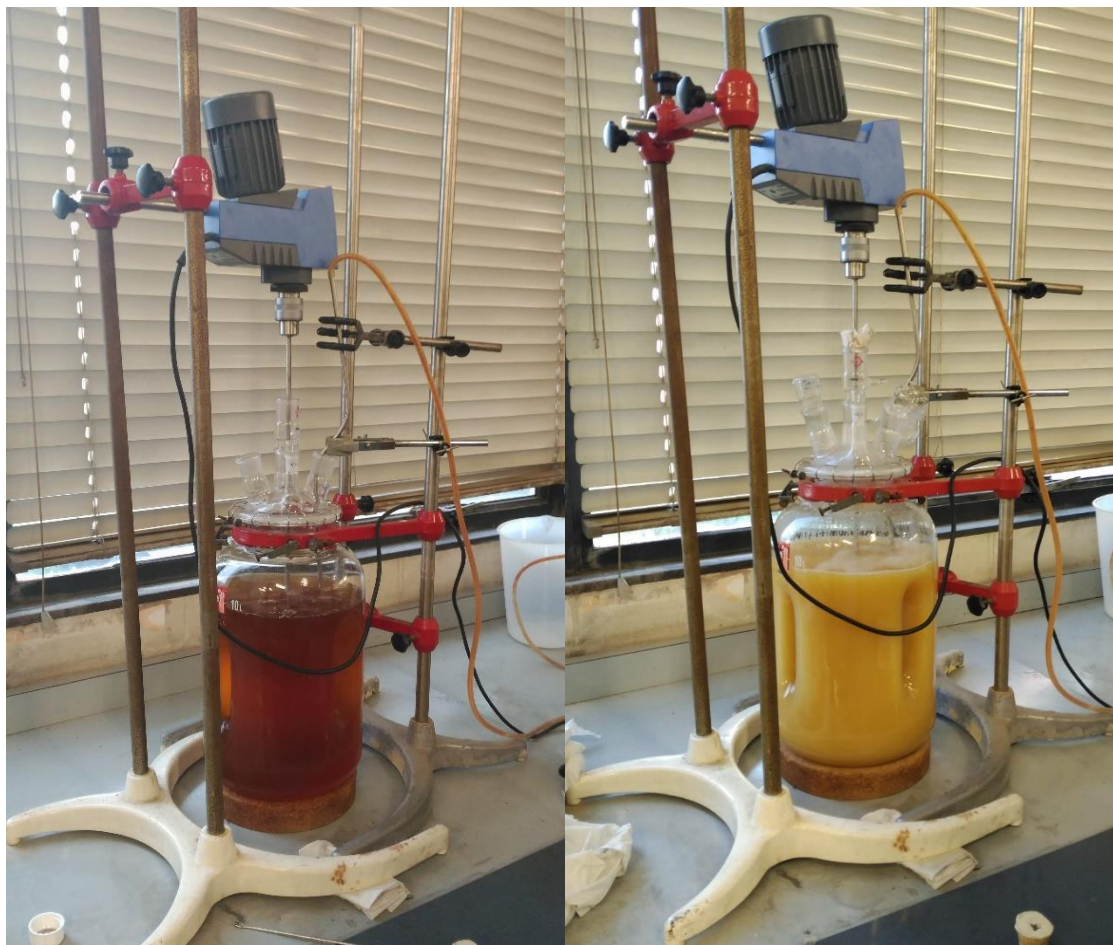


FIGURA 33. FERMENTACIÓN DE LA CB. A LA IZQUIERDA EL INICIO Y A LA DERECHA PASADOS 4 DÍAS

TABLA 32. RESULTADOS DE LA PRUEBA A ESCALA PLANTA PILOTO PARA EL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

	Método de purificación	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
MUESTRA 1	LIOFILIZACIÓN	6,226	0,623	0,156

Comparando el resultado obtenido en la prueba a escala piloto frente a los resultados obtenidos durante las optimizaciones ha habido un decrecimiento en la productividad obtenida. Este hecho puede ser debido a que una parte de la glucosa utilizada se encontraba parcialmente oxidada por el tiempo que llevaba en el laboratorio de ETSEIB, además de esta razón al incrementarse el volumen de medio de cultivo y solo disponer de un motor que insuflara aire al medio de cultivo es posible que no fuera suficiente como para mantener una buena aireación del medio.

En cuanto a la purificación llevada a cabo mediante la liofilización solo ha sido necesario un día para lograr secar la celulosa bacteriana. En la siguiente figura es posible ver la evolución de la CB.



FIGURA 34. CB ANTES DE LA LIOFILIZACIÓN A LA IZQUIERDA Y POSTERIOR A LA LIOFILIZACIÓN A LA DERECHA

Como conclusión de este experimento es posible predecir la importancia que tiene la aireación para la fermentación de la celulosa bacteriana mediante la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*.

## 6.11. COMPARACIÓ DE RESULTADOS

En este apartado se comparará las productividades de CB obtenidas a lo largo de las optimizaciones realizadas. Se diferenciarán los dos medios de cultivo y se verá cómo han evolucionado la síntesis de CB. Además de esto se hará una comparativa general de ambos medios de cultivo.

De carácter general se han tratado ambos medios bajo las mismas condiciones experimentales iniciales que han sido un pH de 6, temperatura ambiente, alrededor de 25°C, una agitación de 130 rpm. Estas variables quedan fuera del alcance de este proyecto así como el volumen de medio de cultivo y tiempo de fermentación utilizado durante las optimizaciones.

### 6.11.1. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

El medio complejo obtenido definitivamente ha sido el desarrollado a través de la incorporación de los elementos que mejoraban la productividad de cada optimización, siendo la concentración de inóculo el 30% v/v y el medio de cultivo de cultivo complejo definitivo el siguiente:

TABLA 33. MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO DEFINITIVO

Compuesto	Cantidad [%]	Concentració [g/l]
Extracto de levadura	1,000%	10
Glucosa	19,994%	200
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,270%	2,7
Ácido cítrico	0,115%	1,15
Agua destilada	78,575%	786
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,00995%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00733%	7,34E-02
monohidrocloruro de L-Lisina	0,010%	0,1
Glicina	0,010%	0,1
L-Glutamina	0,010%	0,1

En la siguiente tabla se muestran los valores que han presentado la mejor productividad en cada optimización.

TABLA 34. COMPARACIÓN DE LAS OPTIMIZACIONES PARA EL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

Optimización	$\Delta$ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]	Incremento
Muestra de control	0,50	0,0641	0,427	0,085	-
Oligoelementos	0,49	0,1337	0,891	0,178	109%
Aminoácidos y concentración de glucosa	5,3	0,0433	0,619	0,206	141%
Concentración de inóculo	5,1	0,0219	0,438	0,219	156%

Desde el inicio de este trabajo hasta su finalización se ha incrementado el rendimiento de la síntesis de celulosa bacteriana en un 156% a través de las diferentes optimizaciones realizadas.

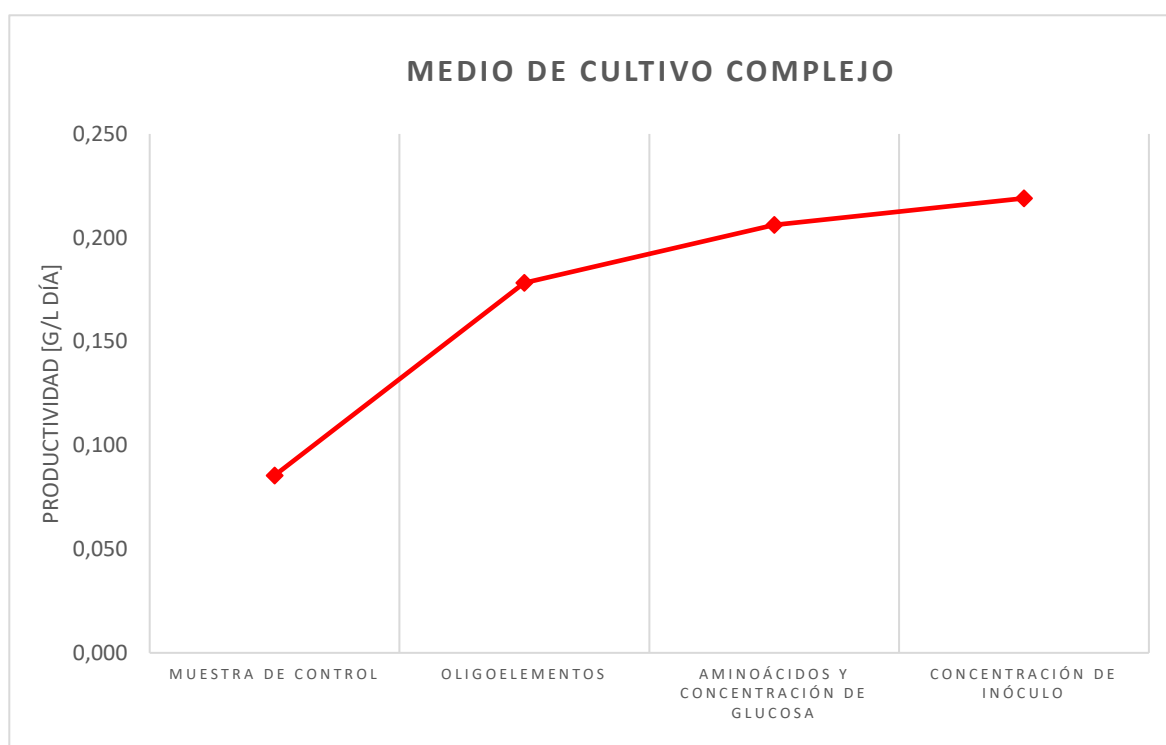


GRÁFICO 6. COMPARATIVA DE LAS DIFERENTES OPTIMIZACIONES PARA EL MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO

### 6.11.2. MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

El medio de cultivo químicamente definido obtenido definitivamente ha sido el desarrollado a través de la incorporación de los elementos que mejoraban la productividad de cada optimización, siendo la concentración de inóculo el 30% v/v y el medio de cultivo definitivo el siguiente:



TABLA 35. . MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO DEFINITIVO

Compuesto	Cantidad [%]	Concentración [g/l]
Glucosa	2,00%	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,95%	9,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,27%	2,7
Agua destilada	96,76%	967,63
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,010%	9,96E-02
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,007%	7,34E-02

En la siguiente tabla se muestran los valores que han presentado la mejor productividad en cada optimización a excepción de la optimización mediante el uso de aminoácidos y variación de la concentración de glucosa en la que no se pudo obtener CB.

TABLA 36. COMPARACIÓN DE LAS OPTIMIZACIONES PARA EL MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

Optimización	$\Delta$ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l-día]	Incremento
Muestra de control	0,09	0,0055	0,037	0,007	-
Oligoelementos	0,05	0,019	0,127	0,025	245%
Aminoácidos y concentración de glucosa	-	-	-	-	-
Concentración de inóculo	1,94	0,0056	0,112	0,056	664%
Vitamina B1	1,62	0,0138	0,276	0,138	1782%

Para el caso del medio de cultivo químicamente definido se ha incrementado el rendimiento de la síntesis de celulosa bacteriana en un 1782% con respecto a la muestra de control. Aún así el rendimiento del medio de cultivo químicamente definido queda por detrás en términos productivos con respecto al medio de cultivo complejo aunque la ventaja que tiene es una ganancia en conocimiento del medio de cultivo y en la respuesta a esperar por parte de las bacterias ya que en este medio es posible conocer tanto cualitativamente como cuantitativamente todos los compuestos que lo componen.

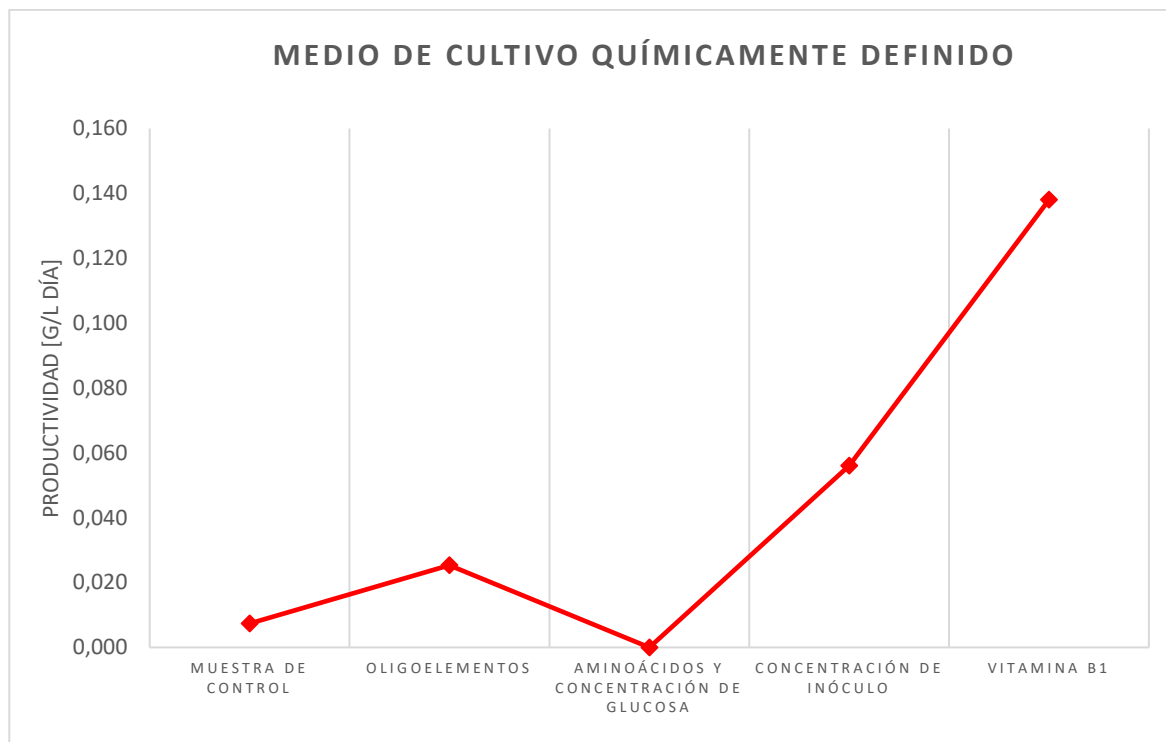


GRÁFICO 7. COMPARATIVA DE LAS DIFERENTES OPTIMIZACIONES PARA EL MEDIO DE CULTIVO QUÍMICAMENTE DEFINIDO

### 6.11.3. COMPARACIÓN GLOBAL

Por último, se realiza una comparación de los mejores resultados obtenidos para los dos medios de cultivo estudiados:

TABLA 37. COMPARACIÓN GLOBAL DE RESULTADOS ENTRE LOS DOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo	$\Delta$ Absorbancia	Masa CB [g]	Concentración [g/l]	Productividad [g/l·día]
Complejo	5,1	0,0219	0,438	0,219
Químicamente definido	1,62	0,0138	0,276	0,138
Resultados bibliografía	-	-	-	0,23

A través de estos resultados es posible observar que el medio de cultivo complejo obtiene mejores productividades que el medio químicamente definido. Y la ratio entre ambos medios es de 1,59 veces mayor productividad en el medio complejo que en el medio químicamente definido.

$$\frac{\text{Medio de cultivo definido}}{\text{Medio de cultivo químicamente definido}} = \frac{0,219}{0,138} = 1,59$$

Pese a este resultado, el medio de cultivo químicamente definido presenta ventajas frente al medio de cultivo complejo como son la posible estandarización en los compuestos químicos que forman el medio.

## 7. MORFOLOGIA DE LA CELULOSA BACTERIANA OBTENIDA

Para analizar el tamaño y la morfología de las muestras que se han ido obteniendo en las diferentes pruebas piloto realizadas durante la elaboración de este trabajo, se analizan mediante la microscopia electrónica de transmisión. La hipótesis que se planteaba era que las fibrillas de celulosa bacteriana producida por estas bacterias es de tamaño nanométrico, por lo que, a través de fotos mediante un microscopio electrónico de transmisión comprobaremos el tamaño real obtenido.

### 7.1. PRUEBA PILOTO 1: REACTOR 1 LITRO PURIFICACIÓ MEDIANTE LIOFILIZACIÓ

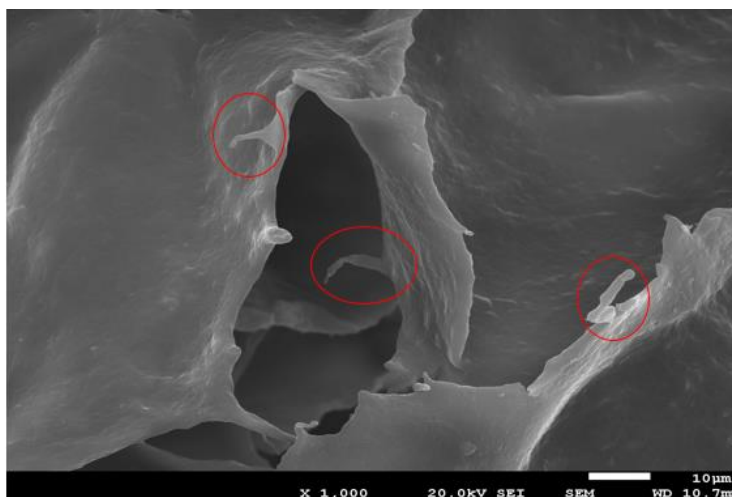


FIGURA 35. FOTO REALIZADA CON MET PARA EL REACTOR 1L PURIFICACIÓ MEDIANTE LIOFILIZACIÓ

A través de esta foto es posible observar varias fibrillas de celulosa bacteriana nanométricas aunque la mayoría de las estructuras presentes no presentan el tamaño nanométrico esperado. También es posible observar que el tipo de secado es uniforme en toda la superficie presente de la celulosa debido a que la liofilización es menos agresiva.

## 7.2. PRUEBA PILOTO 2: REACTOR 1 LITRO PURIFICACIÓN MEDIANTE SECADO EN ESTUFA

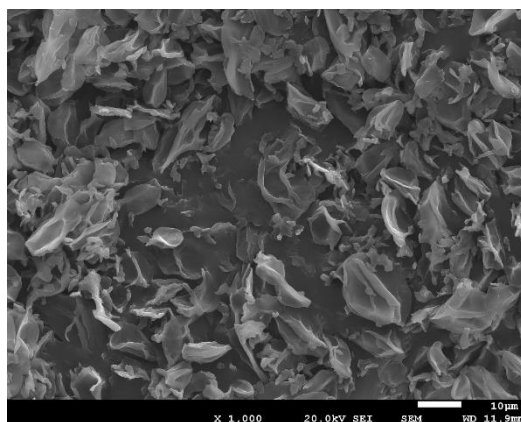


FIGURA 36. FOTO REALIZADA CON MET PARA EL REACTOR 1L PURIFICACIÓN MEDIANTE SECADO EN ESTUFA

Es posible observar en la foto de la segunda prueba piloto que la estructura no es uniforme, esto es debido al método de secado en estufa que llegó a calcinar parte de esta celulosa bacteriana. Al igual que para la muestra anterior, la mayoría de superficies y fibras que se observan no son del tamaño nanométrico esperado.

## 7.3. PRUEBA PILOTO 3: REACTOR 10 LITROS PURIFICACIÓN MEDIANTE LIOFILIZACIÓN

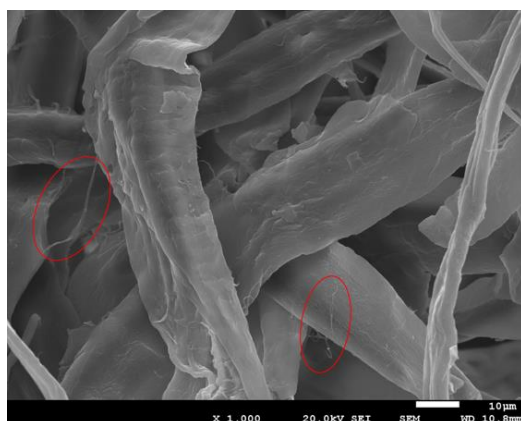


FIGURA 37. FOTO REALIZADA CON MET PARA EL REACTOR 10L PURIFICACIÓN MEDIANTE LIOFILIZACIÓN

En esta foto es posible observar más claramente las fibrillas de celulosa bacteriana formadas, también presenta una estructura más homogénea y son de un tamaño menor a las observadas anteriormente. De igual modo que anteriores fotos, en esta caso tampoco se observan en la gran mayoría de las fibras tamaños nanométricos aunque si aumenta su proporción.

## Conclusiones

En este apartado se tratan las conclusiones alcanzadas durante la realización de este trabajo final de máster en el que se ha llevado a cabo la optimización de la biosíntesis de nanocelulosa bacteriana por fermentación. Esta optimización se ha basado en la adición de nuevos compuestos que pudieran mejorar la producción de celulosa por parte de las bacterias. Para ello se ha estudiado previamente el posible efecto que tendrían estos compuestos y se ha comparado con las hipótesis planteadas al inicio de cada experimento. Al igual que durante todo este proceso se ha diferenciado entre los dos medios de cultivo utilizados, a la hora de exponer las conclusiones alcanzadas también se realizan de manera diferenciada.

Las conclusiones obtenidas para la mejora del medio de cultivo complejo son que la adición de los oligoelementos hierro y calcio mejoraban la productividad de la celulosa bacteriana alcanzando un valor de 0,178 g/l·h, un incremento del 109% con respecto de la muestra control, también la adición de aminoácidos monohidrocloreto de L-Lisina, Glicina y L-Glutamina producía un incremento de la productividad del 141% con respecto de la muestra control alcanzando una productividad de 0,206 g/l·h y, por último, en cuanto a la mejora durante la operación de fermentación se puede concluir que las bacterias utilizadas son dependientes del oxígeno disuelto, por ello, la utilización de un sistema de agitación que mejore la transferencia de oxígeno atmosférico insuflado al medio de cultivo incrementa la productividad de la celulosa bacteriana como fue demostrado en la prueba a escala pre-planta piloto. En cuanto a la concentración óptima de inóculo a utilizar se demostró que incrementarla al 30% v/v acortaba los tiempos adaptación y se lograba un aumento del 156% en la productividad en la celulosa.

Las conclusiones para el medio de cultivo químicamente definido primeramente ha sido el desarrollo con éxito de un nuevo medio de cultivo de composición conocida en el cual se logró sustituir elementos complejos como el extracto de levadura por el sulfato de amonio y vitamina B1 alcanzando productividades cercanas.

En cuanto a las mejoras de este medio de cultivo la adición de hierro y calcio incrementa la productividad hasta 0,025 g/l·h, un incremento del 245% con respecto de la muestra control, mientras que el uso de aminoácidos y una concentración elevada de glucosa produce un decrecimiento de la productividad de celulosa bacteriana. En referencia a la mejora durante la operación de fermentación, la utilización de una concentración de inóculo del 30% v/v produjo un incremento de la productividad de celulosa bacteriana en un 664% alcanzando 0,056 g/l·h.

Por último, la adición al medio de vitamina B1 demuestra un gran incremento de la productividad de celulosa bacteriana alcanzando un valor de 0,138 g/l·h, un valor más próximo a los resultados obtenidos en el medio de cultivo complejo.

Las conclusiones alcanzadas después de la realización de las pruebas piloto es la demostración de la gran necesidad de oxígeno que tienen las bacterias ya que se alcanzan productividades mayores en bioreactores con un sistema de aireación incorporado que en los experimentos realizados en un erlenmeyer sin sistema de aireación. En cuanto al método de purificación y secado de muestras, la liofilización conserva mejor la estructura de la celulosa que el secado en estufa aunque requiere mayores tiempos de operación.

El tamaño de fibras obtenidas de celulosa bacteriana no han alcanzado el tamaño nanométrico esperado en todos los casos estudiados, si que existe presencia de este tipo de fibrillas pero no predominan la estructura de la celulosa, por tanto, la agitación a la cual ha sido sometidas estas fermentaciones hacen que la producción de celulosa bacteriana sea de un tamaño micrométrico.

## Bibliografia

- [1] Dubey, vinita, et al. Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and purification technology*, 2002, vol. 27, no 2, p. 163-171. l'estil de citació que es recomana seguir és chicago manual of style o iso 690 en català o castellà.
- [2] Almeida, denise milleo, et al. Minerals consumption by acetobacter xylinum on cultivation medium on coconut water. *Brazilian journal of microbiology*, 2013, vol. 44, no 1, p. 197-206.
- [3] Anon (2005) *European coatings journal*, 12, 36–41.
- [4] Azeredo, h.m.c., et al., nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Ind. Crops prod.* (2016).
- [5] Azeredo, henriette mc; rosa, morsyleide f.; mattoso, luiz henrique c. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial crops and products*, 2017, vol. 97, p. 664-671.
- [6] Bae, sangok; shoda, makoto. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology progress*, 2004, vol. 20, no 5, p. 1366-1371.
- [7] Basta, a. H.; el-saied, h. Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of applied microbiology*, 2009, vol. 107, no 6, p. 2098-2107.
- [8] Bogolitsyn, k. Cellulose and cellulose derivatives: physicochemical aspects and industrial applications. Woodhead pub. Ltd, 1995, p. 499-506.
- [9] Borzani, walter; souza, silvio j. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnology letters*, 1995, vol. 17, no 11, p. 1271-1272.
- [10] Carreño pineda, luz dary, et al. Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana. 2011. Tesis doctoral. Universidad nacional de colombia.
- [11] Carreño pineda, luz dary; caicedo mesa, luis alfonso; martínez riascos, carlos arturo. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y ciencia*, 2012, vol. 8, no 16.
- [12] Chao, yaping, et al. Bacterial cellulose production by acetobacter xylinum in a 50-l internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 2000, vol. 68, no 3, p. 345-352.
- [13] Chao, yaping, et al. Effect of addition of water-soluble polysaccharides on bacterial cellulose production in a 50-l airlift reactor. *Biotechnology progress*, 2001, vol. 17, no 4, p. 781-785.
- [14] Chávez-pacheco, juan luis, et al. Celulosa bacteriana en gluconacet luconacetobacter xylinum. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 2004, vol. 7, no 1, p. 18-25.
- [15] Chávez-pacheco, juan luis, et al. Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 2004, vol. 7, no 1.
- [16] Cheng, kuan-chen; catchmark, jeff m.; demirci, ali. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of biological engineering*, 2009, vol. 3, no 1, p. 12.
- [17] CHEN, Xiao-Hong, et al. Optimization of culture conditions to produce high yields of active Acetobacter sp. CCTCC M209061 cells for anti-Prelog reduction of prochiral ketones. *BMC biotechnology*, 2011, vol. 11, no 1, p. 110.

- [18] Ciechanska, d. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres text east eur*, 2004, vol. 12, no 4, p. 69-72
- [19] Çoban, esin poyrazoğlu; biyik, halil. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *acetobacter lovaniensis* hbb5. *African journal of biotechnology*, 2011, vol. 10, no 27, p. 5346-5354.
- [20] Credou, julie; berthelot, thomas. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of materials chemistry b*, 2014, vol. 2, no 30, p. 4767-4788.
- [21] Cruz, cristian grande. Desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas. 2014. Tesis doctoral. Facultat de ciències químiques.
- [22] Czaja, wojciech, et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no 2, p. 145-151.
- [23] Dahman, yaser. Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2009, vol. 9, no 9, p. 5105-5122.
- [24] Dary, luz, et al. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. 2012.
- [25] De oliveira, sabrina alves, et al. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *International journal of biological macromolecules*, 2017, vol. 97, p. 642-653.
- [26] Emil, ott; spurlin, harold m.; mildred, w. Cellulose and cellulose derivatives. Vol. II, 1954
- [27] Festucci-buselli, reginaldo a.; otoni, wagner c.; joshi, chandrashekhar p. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 2007, vol. 19, no 1, p. 1-13.
- [28] Fiedler, s., fiissel, m. *And sattler, k., zentrulbl. Microbiof.*, 1989, 144, 473.
- [29] Fu, lina; zhang, jin; yang, guang. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate polymers*, 2013, vol. 92, no 2, p. 1432-1442.
- [30] Gatenholm, paul; klemm, dieter. Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications. *Mrs bulletin*, 2010, vol. 35, no 3, p. 208-213.
- [31] Gayathry, g. Bioconversion and value addition of mature coconut water and cashew apple juice into bacterial cellulose using *gluconacetobacter* sp. 2013. Tesis doctoral. Tamil nadu agricultural university coimbatore
- [32] Gea, saharman, et al. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 19, p. 9105-9110.
- [33] George, johnsy, et al. Characterization of chemically treated bacterial (*acetobacter xylinum*) biopolymer: some thermo-mechanical properties. *International journal of biological macromolecules*, 2005, vol. 37, no 4, p. 189-194.
- [34] Grant, c. L.; pramer, david. Minor element composition of yeast extract. *Journal of bacteriology*, 1962, vol. 84, no 4, p. 869.
- [35] Habibi, youssef; lucia, lucian a.; rojas, orlando j. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews*, 2010, vol. 110, no 6, p. 3479-3500.
- [36] Hestrin, s.; schramm, m. Synthesis of cellulose by *acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical journal*, 1954, vol. 58, no 2, p. 345.
- [37] Higuchi, takayoshi (ed.). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Elsevier, 2012.
- [38] [Http://www1.lsbu.ac.uk/water/cellulose.html](http://www1.lsbu.ac.uk/water/cellulose.html) 29/04/2017



- [39] Huang, yang, et al. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 2014, vol. 21, no 1, p. 1-30.
- [40] Iguchi, m.; yamanaka, s.; budhiono, a. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of materials science*, 2000, vol. 35, no 2, p. 261-270.
- [41] Jonas, rainer; farah, luiz f. Production and application of microbial cellulose. *Polymer degradation and stability*, 1998, vol. 59, no 1-3, p. 101-106
- [42] Jorfi, mehdi; foster, e. Johan. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of applied polymer science*, 2015, vol. 132, no 14.
- [43] Jozala, angela faustino, et al. Bacterial cellulose production by *gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, vol. 99, no 3, p. 1181-1190.
- [44] Keshk, s. M. Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J bioprocess biotech*, 2014, vol. 4, no 02.
- [45] Keshk, sherif mas; razek, taha ma; sameshima, kazuhiko. Bacterial cellulose production from beet molasses. *African journal of biotechnology*, 2006, vol. 5, no 17.
- [46] Klemm, d., schmauder, h.-p., and heinze, t. (2005) cellulose. *Biopolymers online*, 275–287.
- [47] Klemm, dieter, et al. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in polymer science*, 2001, vol. 26, no 9, p. 1561-1603.
- [48] Kongruang, sasithorn. Bacterial cellulose production by *acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2008, vol. 148, no 1-3, p. 245.
- [49] Kouda, tohru, et al. Characterization of non-newtonian behavior during mixing of bacterial cellulose in a bioreactor. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1996, vol. 82, no 4, p. 382-386.
- [50] Lee, y. K.; craig, j. D. *Acs symposium series. 1982 - cellulose chemistry and technology* arthur jett
- [51] Lin, dehui, et al. Production of bacterial cellulose by *gluconacetobacter hansenii* cgmcc 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource technology*, 2014, vol. 151, p. 113-119.
- [52] Lin, shin-ping, et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2013, vol. 20, no 5, p. 2191-2219.
- [53] Maneerung, thawatchai; tokura, seiichi; rujiravanit, ratana. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 2008, vol. 72, no 1, p. 43-51.
- [54] Masaoka, s., ohe, t. And sakota, n., j. *Ferment. Bioeng*, 1993, 75, 18
- [55] Matsuoka, masanobu, et al. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1996, vol. 60, no 4, p. 575-579.
- [56] Mohammad, s., et al. An overview of biocellulose production using *acetobacter xylinum* culture. *Advances in biological research*, 2014, vol. 8, no 6, p. 307-13.
- [57] Mohite, bhavna v.; salunke, bipinchandra k.; patil, satish v. Enhanced production of bacterial cellulose by using *gluconacetobacter hansenii* ncim 2529 strain under shaking conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013, vol. 169, no 5, p. 1497-1511.
- [58] Mondal, subrata. Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials. *Carbohydrate polymers*, 2017, vol. 163, p. 301-316.

- [59] Naritomi, takaaki, et al. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1998, vol. 85, no 1, p. 89-95.
- [60] Nguyen, vu tuan, et al. Characterization of cellulose production by a gluconacetobacter xylinus strain from kombucha. *Current microbiology*, 2008, vol. 57, no 5, p. 449.
- [61] Okiyama, atsushi, et al. Bacterial cellulose i. Two-stage fermentation process for cellulose production by acetobacter aceti. *Food hydrocolloids*, 1992, vol. 6, no 5, p. 471-477.
- [62] Oksman, kristiina; sain, mohini (ed.). *Cellulose nanocomposites: processing, characterization, and properties*. American chemical society, 2006.
- [63] Panesar, p. S., et al. Evaluation of acetobacter strain for the production of microbial cellulose. *Asian j. Chem*, 2009, vol. 21, no 10, p. 99-102.
- [64] Rani, m. Usha; appaiah, ka anu. Production of bacterial cellulose by gluconacetobacter hansenii uac09 using coffee cherry husk. *Journal of food science and technology*, 2013, vol. 50, no 4, p. 755-762.
- [65] Römling, ute. *Molecular biology of cellulose production in bacteria*. *Research in microbiology*, 2002, vol. 153, no 4, p. 205-212.
- [66] Salas, carlos, et al. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. *Current opinion in colloid & interface science*, 2014, vol. 19, no 5, p. 383-396.
- [67] Serafica g, mormino r, bungay h (2002) inclusion of solid particles in bacterial cellulose. *Appl microbiol biotechnol* 58(6):756–760.
- [68] Sharma, pawan kumar; chand, duni. Purification and characterization of thermostable cellulase free xylanase from pseudomonas sp. Xpb-6. *Advances in microbiology*, 2012, vol. 2, no 01, p. 17.
- [69] Shoda, makoto; sugano, yasushi. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 2005, vol. 10, no 1, p. 1.
- [70] Son, hong-joo, et al. Increased production of bacterial cellulose by acetobacter sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource technology*, 2003, vol. 86, no 3, p. 215-219.
- [71] Son, hong-joo, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated acetobacter. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2001, vol. 33, no 1, p. 1-5.
- [72] Sturcova a, his i, apperley dc, sugiyama j, jarvis mc (2004) structural details of crystalline cellulose from higher plants. *Biomacromolecules* 5:1333-1339.
- [73] Toyosaki, hiroshi, et al. Screening of bacterial cellulose-producing acetobacter strains suitable for agitated culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1995, vol. 59, no 8, p. 1498-1502.
- [74] Vandamme, e. J., et al. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer degradation and stability*, 1998, vol. 59, no 1-3, p. 93-99
- [75] Vandamme, e. J., et al. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer degradation and stability*, 1998, vol. 59, no 1-3, p. 93-99.
- [76] Verschuren, peter g., et al. Location and limitation of cellulose production by acetobacter xylinum established from oxygen profiles. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2000, vol. 89, no 5, p. 414-419.
- [77] Watanabe, k. And yamanaka, s., biosci. Biotech. Biothem, 1995, 59, 65.
- [78] Wei, haoran, et al. Environmental science and engineering applications of nanocellulose-based nanocomposites. *Environmental science: nano*, 2014, vol. 1, no 4, p. 302-316.

- [79] Weimer, p. J.; Zeikus, J. G. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, vol. 33, no 2, p. 289-297.
- [80] Wüstenberg, Tanja. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2014.
- [81] Yamanaka, S., et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 1989, vol. 24, no 9, p. 3141-3145.