

03072

11
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

“Aislamiento, selección y caracterización de
cepas de *Xanthomonas campestris*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A

MA. EUGENIA RAMIREZ GUAPO



CUERNAVACA, MORELOS, 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Aislamiento, selección y caracterización de cepas de *Xanthomonas campestris*"

Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología
presenta Biol. Ma. Eugenia Ramírez Guapo

RESUMEN

Xanthomonas campestris son bacterias fitopatógenas que producen la goma xantana, un biopolímero de gran importancia industrial. La goma xantana tiene variadas aplicaciones en las industrias alimentaria, petrolera, cosmética y agroindustrial, entre otras.

La tecnología de producción de este biopolímero podría ser mejorada si se contara con cepas nativas que proporcionen ventajas potenciales respecto a las de colección. El presente trabajo tuvo como principales objetivos el aislamiento, la selección y la caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* con el fin de ser utilizadas para la producción de goma xantana.

Se evaluaron 17 cepas nativas mediante pruebas de producción del biopolímero, en matraces bafleados. En todos los casos fueron comparados con una cepa derivada de la NRRLB-1459 (cepa de colección), la cual fue denominada E2.

El producto fue recuperado mediante la precipitación con alcohol isopropílico, evaluado reológicamente y mediante espectroscopía infrarroja.

Los resultados indicaron que la cepa clasificada con el número 12, producía 40% más de goma y un producto con mejores características reológicas (mayor viscosidad aparente-en un amplio rango de gradientes de deformación-, mayor K y un menor índice de pseudoplasticidad), que la cepa E2 e inclusive que un producto comercial. De acuerdo con la mayor capacidad de producción de goma y por las características reológicas que presentaron los productos al ser resuspendidos, en comparación con las de la cepa E2, se consideró cuatro cepas que presentaban potencial en la producción de goma. Estas fueron las clasificadas con los números 10, 11, 15 y 16.

Las cepas 10, 11, 12 y 16 fueron evaluadas en un fermentador de laboratorio de 1 litro. Se emplearon dos medios de producción con diferentes fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio o peptona). En el medio con peptona, se observó que las cepas 10, 11, y 12 presentaron una velocidad específica de crecimiento mayor a la de la cepa E2. Las cepas 10 y 11 presentaron ventajas en la producción de goma: mayor producción de polímero, mayor rendimiento y mejor productividad que la cepa E2. Sin embargo, los productos resuspendidos (soluciones al 1% de polímero y 1% de KCl), exhibieron (a todos los gradientes de deformación) menor viscosidad aparente, en comparación con el del producto de la cepa E2 y los del producto "Keltrol". Los polímeros presentaron un porcentaje muy bajo de radicales piruvatos y posiblemente tengan un peso molecular menor al de la cepa E2 y al "Keltrol".

En el medio que contenía peptona, se observó que el polímero de la cepa 12, presentó baja viscosidad aparente en el caldo de fermentación. El perfil de la viscosidad aparente en el caldo de fermentación de la cepa 12 de acuerdo con la concentración de polímero sintetizado durante la evolución de la fermentación, fué menor a lo

presentado por los polímeros de las cepas 10, 11, 16 y E2 durante la evolución de las fermentaciones con peptona. El producto resuspendido (1% b.s.) de la cepa 12, presentó índices reológicos menores a lo presentado por el polímero de la cepa E2 y los del "Keltrol". Esta baja viscosidad fué explicado por la baja pureza del producto de la cepa 12. Los datos analíticos mostraron un alto porcentaje de nitrógeno presente. En este producto se detectó un contenido muy bajo de radicales piruvatos. Los espectros de infrarrojo sugieren que los radicales pirúvicos se encuentran en asociación con compuestos nitrogenados.

La característica de baja viscosidad aparente del caldo de fermentación obtenida en el medio que contenía peptona, podría representar una ventaja potencial durante el proceso de fermentación, ya que se eliminarían los problemas inherentes del mezclado. La cepa 12 evaluada en el medio con sulfato de amonio, produjo 28% más de goma, presentó mayor productividad y mayor producción específica respecto a la cepa E2. Las características reológicas del producto son muy parecidas a las presentadas por el producto "Keltrol" y superiores a las de la cepa E2. En este producto no se detectaron radicales pirúvicos. La espectroscopía de infrarrojo sugiere que el producto puede ser de mayor peso molecular que el de la cepa E2.

Se cuenta con cepas nativas que presentan ventajas en la producción del biopolímero y que pueden ser susceptibles de ser empleadas en procesos de mayor escala.



VoBo
Dr. Enrique Galindo Fentanes
Director Tesis

INDICE GENERAL

	PAGINA
Indice general	i
Indice de figuras	v
Indice de tablas	x
Nomenclatura	xii
Presentación	1
RESUMEN	2
CAPITULO	
1 INTRODUCCION	4
2 ANTECEDENTES	5
2.1. Selección de microorganismos	5
2.2. Selección de microorganismos productores de polisacáridos	10
2.3. Descripción de género <i>Xanthomonas</i>	14
2.3.1. Características morfológicas	14
2.3.2. Características bioquímicas	16
2.3.3. Pigmentación	18
2.3.4. Patogenicidad	18
2.4. Características estructurales del polímero extracelular que produce <i>Xanthomonas</i>	19
2.5. Biosíntesis	25
2.6. Función biológica del polisacárido extracelular que produce <i>Xanthomonas campestris</i>	28
2.7. Producción de goma xantana por fermentación	30
2.8. Importancia industrial de la goma xantana	34
3 MATERIALES Y METODOS	
3.1. Estrategia experimental	36
3.2. Cepas	41
3.3 Métodos	
3.3.1. Técnicas analíticas	41

	PAGINA
3.3.1.1. Determinación de glucosa	41
3.3.1.2. Determinación de sacarosa	44
3.3.1.3. Determinación de radicales acetilos	44
3.3.1.4. Determinación de radicales pirúvicos	45
3.3.1.5. Determinación de humedad	45
3.3.1.6. Determinación de cenizas	46
3.3.1.7. Determinación de nitrógeno orgánico	46
3.3.1.8. Espectroscopia de infrarrojo	46
3.4 Metodologías generales	
3.4.1. Conservación de las cepas en tubo inclinado con agar suave	46
3.4.2. Determinación del crecimiento celular (D.O)	47
3.5 Procedimientos experimentales	
3.5.1. Pruebas de producción en matraces bafleados	47
3.5.2. Fermentación en equipo de 2 lts.	47
3.5.3. Tratamiento enzimático	49
3.5.4. Tratamiento térmico del caldo de fermentación	49
3.5.5. Determinación de viscosidad	49
3.5.6. Obtención del polímero en polvo	50
3.5.7. Determinación de la concentración del polímero	50
3.5.8. Determinación reogramas de soluciones de los productos resuspendidos	50
3.5.9. Determinación de los índices reológicos (n y K)	51
4 OBJETIVOS	53
5 RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1 Selección de cepas nativas de <i>Xanthomonas</i>	54
5.1.1 Caracterización de la producción de la goma xantana en matraces bafleados	54
5.1.2 Caracterización reológica de los polímeros en suspensión	62
5.1.3 Espectroscopía de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas de <i>X. campestris</i>	74
Conclusiones (sección 5.1)	92

5.2 Caracterización de cepas nativas de <i>X.campestris</i> en fermentador de 1 litro (Peptona como fuente de nitrógeno)	
5.2.1 Caracterización de la producción de goma xantana	83
5.2.2 Caracterización reológica de los polímeros producidos en el fermentador de 1L	97
5.2.3 Caracterización química de los polímeros producidos por las cepas nativas en el medio con peptona como fuente de nitrógeno	102
5.2.4 Espectroscopía de infrarrojo de los polímeros obtenidos con el medio de producción con peptona como fuente de nitrógeno	106
Conclusiones (sección 5.2)	111
5.3 Influencia del medio de producción en la capacidad de producción y las propiedades del producto de las cepas 12 y E2	
5.3.1 Evaluación de la producción del polímero empleando el medio que contenía sulfato de amonio y su comparación con lo obtenido en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno	113
5.3.2 Reología de los polímeros obtenidos en los medios que contenía peptona y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	154
5.3.3 Efecto de los tratamientos pos-fermentativos	132
5.3.4 Caracterización química de los polímeros de las cepas 12 y E2	136
5.3.5 Espectroscopía de infrarrojo de los polímeros obtenidos con los medios que contenían peptona y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	138
Conclusiones (sección 5.3)	147

6	CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	150
	Anexo 1. Descripción de reactivos, equipo y preparación de medios de cultivo	156
	Anexo 2. Espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas y E2 en matraces bafleados (sulfato de amonio como fuente de nitrógeno)	163
	Anexo 3. Análisis de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas obtenidos con el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno	175
	Anexo 4. Análisis de los espectros de infrarrojo de la cepa 12 y su comparación con el espectro de la cepa E2 obtenidos con el medio de producción que contenía sulfato de amonio en el fermentador de 1 L	191
	BIBLIOGRAFIA	201

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1 Esquema general para el desarrollo y obtención de un nuevo producto microbiano	7
2 Vista microscópica de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>	15
3 Estructura primaria de la goma xantana de acuerdo a Jansson <i>et al</i> , 1975	26
4 Ruta de la biosíntesis de la goma xantana	27
5 Representación esquemática de la interacción de la goma xantana con la galactomanana	29
6 Diagrama de flujo típico del proceso de producción de goma xantana 31	
7 Estrategia general en el desarrollo de este trabajo	37
8 Estrategia experimental en la selección de cepas nativas de <i>Xanthomonas campestris</i>	38
9 Estrategia experimental de la caracterización de cepas nativas de <i>Xanthomonas</i>	40
10 Viscosidad aparente final de los caldos de fermentación producidos por cada una de las cepas nativas. Antes y despues del tratamiento térmico	57
11 Viscosidad aparente final y concentración de goma producida por las cepas nativas seleccionadas y E2	59
12 Capacidad viscosificante del polímero en el caldo de fermentación de las cepas nativas y de la E2	61
13 Producción específica y productividad presentada por cada una de las cepas nativas seleccionadas y por la E2	64
14 Rendimiento en base al azúcar inicial y al azúcar consumida del polímero producido por las cepas nativas en las pruebas de producción en matraces bafleados	65

FIGURA

PAGINA

15 Reograma de los polímeros de las cepas nativas, correspondientes al pv. <i>campestris</i> y su comparación con el reograma del polímero de la cepa E2 y del producto "Keltrol"	67
16 Reograma de los polímeros de las cepas obtenidas en Tecoman y su comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto comercial "Keltrol"	68
17 Reograma de los polímeros de las cepas obtenidas en Tecoman y su comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto comercial "Keltrol"	69
18 Reograma del polímero producido por la cepa correspondiente al pv. <i>juglandis</i> y su comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto comercial "Keltrol"	70
19 Reograma de los polímeros producidos por las cepas <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> y <i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i> y su comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto comercial "Keltrol"	72
20 Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa <i>Xanthomonas campestris</i> E2	76
21 Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción del polímero de la cepa E2 y de la cepa 10. Peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L	85
22 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción del polímero de la cepa 11 Peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L	86
23 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción del polímero de la cepa 12 Peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L	88
24 Viscosidad aparente del caldo de fermentación generada por la concentración de polímero sintetizado en los caldos de fermentación. Cultivos	

de cepas nativas y E2, peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L	89
25 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción del polímero de la cepa 16. Peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L.	91
26 Viscosidad aparente del caldo de fermentación (a) y concentración de goma xantana (b) en cultivos de las cepas nativas y E2 en el fermentador de 1 L	94
27 Capacidad viscosificante del polímero en el caldo de fermentación (a) y (b) producción específica, productividad de cultivos con peptona como fuente de nitrógeno, desarrolladas en fermentador de 1 L	95
28 Rendimiento sobre azúcar inicial de las cepas nativas y su comparación con la cepa E2, obtenido en las fermentaciones realizadas con el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en el fermentador de 1 L	96
29 Reograma de las soluciones de los polímeros de la cepa nativa 10, 11, 16, E2 y "Keltrol" (Suspensiones al 1% de xantana y 1% de KCl)	98
30 Reograma del polímero que produce la cepa 12, E2 y "Keltrol" (Solución preparada con xantana al 1% y 1% de KCl)	100
31 Efecto del contenido de nitrógeno, acetilos y pirúvicos de los polímeros, en el índice de consistencia presentado en las suspensiones de los productos de las cepas nativas, E2 y el "Keltrol"	105
32 Cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y de producción del polímero de la cepa 12 y E2. Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y desarrollada en el fermentador de 1 L	115
33 Cinética de crecimiento de la cepa 12, con	

FIGURA	PAGINA
diferentes fuentes de nitrógeno: peptona o sulfato de amonio	117
34 Consumo de azúcar en la fermentación con la cepa 12, en el medio de producción que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	118
35 Viscosidad aparente del caldo de fermentación generado por el polímero de la cepa 12 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	119
36 Evolución de la concentración de polímero (a) y generación de viscosidad en el caldo de fermentación de acuerdo con la concentración de polímero sintetizado durante el cultivo de la cepa 12 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio. Fermentaciones realizadas en el fermentador de 1 L	120
37 Viscosidad aparente del caldo de fermentación de la cepa 12 y E2 obtenidos en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	123
38 Concentración de goma generada por las cepas 12 y E2 obtenidos en el medio que contiene peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	124
39 Producción específica de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	126
40 Productividad de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	128
41 Rendimiento del polímero en base al azúcar inicial de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	129
42 Rendimiento del polímero en base al azúcar consumido de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía	

FIGURA	PAGINA
peptona y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	130
43 Reogramas de los polímeros producido por la cepa 12 en los cultivos realizados con el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	131
44 Reogramas de los polímeros producidos por la cepa E2 en los cultivos realizados con el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	133
45 Reogramas de los polímeros producidos por la cepa 12 (en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno) en función de los distintos tratamientos post-fermentativos	135
46 Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa E2 en el medio que contenía sulfato de amonio y en el medio que contenía peptona como fuente nitrógeno. Ambos polímeros fueron sometidos al tratamiento térmico y enzimático	143
47 Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa 12 en el medio que contenía sulfato de amonio o en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno. Ambos polímeros fueron sometidos al tratamiento térmico y enzimático	144
48 Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa 12 en el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno. Con y sin tratamientos post-fermentativos	145

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
1 Procedimientos típicos en placas para la detección de metabolitos microbianos	8
2 Producción de polisacáridos extracelulares por varios microorganismos	12
3 Caracteres diferenciales de las especies del género <i>Xanthomonas</i>	17
4 Principales enfermedades producidas por <i>Xanthomonas</i> Enfermedades vasculares Enfermedades parenquimatosas	22
5 Constitución de diferentes tipos de polisacáridos producidos por las especies de <i>Xanthomonas</i>	24
6 Principales pathovares y origen de las cepas de <i>Xanthomonas campestris</i> , empleadas durante el desarrollo experimental	43
7 Características morfológicas de los diferentes pv. de <i>Xanthomonas campestris</i>	44
8 Resultados obtenidos de las pruebas de producción en matraces bafleados de las cepas nativas de <i>X. campestris</i>	56
9 pH de los caldos de fermentación obtenidos en matraces bafleados mediante el cultivo de las cepas nativas y su comparación con la cepa E2	
10 Índices reológicos de las soluciones de los polímeros obtenidos de las cepas nativas de <i>X. campestris</i> y su comparación con los índices del polímero de la cepa E2 y el polímero del producto "Keltrol"	73
11 Descripción del EI del polímero de <i>Xanthomonas campestris</i> E2	75
12 Diferencias en las bandas del EI del polímero de la cepa 10 con respecto al EI de la cepa E2	78
13 Velocidad específica y concentración máxima de células de las cepas nativas y E2	92

14	Indices reológicos de los productos generados por la cepas nativas 12, de la E2 y los del producto "Keltrol"	101
15	Evaluación química de los productos obtenidos de las cepas 10, 11, 12, 16, E2 y del "Keltrol"	103
16	Intensidad relativa en las principales bandas de los espectros de infrarrojo de las cepas nativas	108
17	Relación entre las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas	109
18	Velocidad específica de crecimiento de la cepa 12 y su comparación con la cepa E2 en los medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	122
19	Indices reológicos de los productos generados por las cepas 12, de la cepa E2 obtenidos con los medios que contenían peptona o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno	134
20	Análisis químico de los productos de las cepas 12 y E2 con los medios que contienen peptona y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	137
21	Intensidad relativa de las bandas del espectro de infrarrojo del polímero de las cepas 12 y E2	139
22	Relación entre las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de la cepa 12 y de la cepa E2 y su comparación con el "Keltrol"	141
23	Intensidad relativa de las bandas del espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 obtenido con el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno	146

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

X_{max}	Concentración máxima de células (g/L)
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)
K	Índice de consistencia (N s ⁿ cm ⁻²)
n	Índice de flujo o pseudoplasticidad (adimensional)

Capacidad viscosificante: viscosidad aparente generada por la concentración de polímero en el caldo de fermentación (log viscosidad/ g/L)

Productividad : concentración de polímero producido por el tiempo de fermentación del cultivo (g/L/ h).

Producción específica: viscosidad aparente generada por la biomasa celular (D.O.) (cps/D.O.).

Rendimiento sobre azúcar inicial: porcentaje de polímero generado en base a la concentración de azúcar inicial en el cultivo (%).

Rendimiento sobre azúcar consumida: porcentaje de polímero generado en base a la concentración de azúcar consumido (%).

E.I.: espectros de infrarrojo

PRESENTACION.

El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioingeniería del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CEINGEBI-UNAM). Actualmente Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), en Cuernavaca, Morelos.

El comité tutorial estuvo formado por el Dr Enrique Galindo Fentanes (tutor principal) y como co-tutores la Dra. Lidia Casas (CEINGEBI-UNAM), el Dr. Leopoldo Fucikovsky Z. (Colegio de Post-graduados de Chapingo) y el Dr. Federico García Jiménez (Instituto de Química-UNAM).

Durante la realización del presente trabajo se contó con una beca de maestría del CONACYT y un apoyo económico del proyecto D-GAPA (UNAM) IN- 302589.

RESUMEN

Xanthomonas campestris son bacterias fitopatógenas que producen la goma xantana, un biopolímero de gran importancia industrial. La goma xantana tiene variadas aplicaciones en las industrias alimentaria, petrolera, cosmetológica y agroindustrial, entre otras.

La tecnología de producción de este biopolímero podría ser mejorada si se contara con cepas nativas que proporcionen ventajas potenciales respecto a las de colección. El presente trabajo tuvo como principales objetivos el aislamiento, la selección y la caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* con el fin de ser utilizadas para la producción de goma xantana.

Se evaluaron 17 cepas nativas mediante pruebas de producción de goma xantana, en matraces bafleados. En todos los casos fueron comparados con una cepa derivada de la NRRLB-1459 (cepa de colección), la cual fue denominada E2.

El producto fue recuperado mediante la precipitación con alcohol isopropílico, evaluado reológicamente y mediante espectroscopía infrarroja.

Los resultados indicaron que la cepa clasificada con el número 12, producía 40% más de goma y un producto con mejores características reológicas (mayor viscosidad aparente -en un amplio rango de gradientes de deformación-, mayor K y un menor índice de pseudoplasticidad), que la cepa E2 e inclusive que un producto comercial. De acuerdo con la mayor capacidad de producción de goma y por las características reológicas que presentaron los productos al ser resuspendidos, en comparación con las de la cepa E2, se consideró cuatro cepas que presentaban potencial en la producción de goma. Estas fueron las clasificadas con los números 10, 11, 15 y 16.

Las cepas 10, 11, 12 y 16 fueron evaluadas en un fermentador de laboratorio de 1 litro. Se emplearon dos medios de producción con diferentes fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio o peptona). En el medio con peptona, se observó que las cepas 10, 11, y 12 presentaron una velocidad específica de crecimiento mayor a la de la cepa E2. Las cepas 10 y 11 presentaron ventajas en la producción de goma: mayor producción de polímero, mayor rendimiento y mejor productividad que la cepa E2. Sin embargo, los productos resuspendidos (soluciones al 1% de polímero y 1% de KCl), exhibieron (a todos los gradientes de deformación) menor viscosidad aparente, en comparación con el del producto de la cepa E2 y la del producto "Keltrol". Los polímeros presentaron un porcentaje muy bajo de radicales piruvatos y posiblemente tengan un peso molecular menor al de la cepa E2 y al "Keltrol".

En el medio que contenía peptona, se observó que el polímero de la cepa 12, presentó baja viscosidad aparente en el caldo de fermentación. El perfil de la viscosidad aparente en el caldo de fermentación del polímero de la cepa 12 (de acuerdo con la concentración del producto que produjo durante la fermentación), fué menor a lo presentado por los polímeros de las cepas 10, 11, 16 y E2. El producto resuspendido (1% b.s.) de la cepa 12, presentó índices reológicos menores a lo presentado por el polímero de la cepa E2 y los del "Keltrol". Esta baja viscosidad fué explicado por la baja pureza del producto de la cepa 12. Los datos analíticos mostraron un alto porcentaje de nitrógeno presente. En este producto se detectó un contenido muy bajo de radicales piruvatos. Los espectros de infrarrojo sugieren que los radicales pirúvicos se encuentran en asociación con compuestos nitrogenados.

La característica de baja viscosidad aparente del caldo de fermentación obtenida en el medio que contenía peptona, podría representar una ventaja potencial durante el proceso de fermentación, ya que se eliminarían los problemas inherentes del mezclado.

La cepa 12 evaluada en el medio con sulfato de amonio, produjo 28% más de goma, presentó mayor productividad y mayor producción específica respecto a la cepa E2. Las características reológicas del producto son muy parecidas a las presentadas por el producto "Keltrol" y superiores a las de la cepa E2. En este producto no se detectaron radicales pirúvicos. La espectroscopía de infrarrojo sugiere que el producto puede ser de mayor peso molecular que el de la cepa E2.

Se cuenta con cepas nativas que presentan ventajas en la producción del biopolímero y que pueden ser susceptibles de ser empleadas en procesos de mayor escala.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Xanthomonas campestris son microorganismos de gran importancia económica en dos áreas comunmente no afines: la biotecnología y la fitopatología.

Dentro del marco biotecnológico la bacteria produce la goma xantana, uno de los polímeros microbianos de mayor importancia a nivel industrial, por sus amplias aplicaciones en las industrias alimentaria, petrolera y farmacéutica, entre otras.

Debido a su amplia distribución mundial y a que infectan una gran diversidad de plantas, *Xanthomonas campestris* pertenece a uno de los 5 géneros más importantes de bacterias fitopatógenas. Se ha observado que existen ciertos parámetros de "calidad de la goma" (i.e. propiedades reológicas) que estan relacionados con la virulencia de las cepas. Ello ha sugerido que la virulencia pueda ser usada como criterio para la selección y el aislamiento de cepas productoras de goma xantana de "alta calidad" (Ramírez *et al*, 1988).

El aislamiento de cepas nativas de *Xanthomonas campestris*, resulta de gran importancia ya que se pueden obtener cultivos que presenten ventajas en la producción de la goma xantana y, en consecuencia, se podría mejorar la tecnología de producción de este biopolímero.

El presente estudio tuvo como principales objetivos el aislamiento, la selección y la caracterización de cepas nativas de *X. campestris* con el fin de ser empleadas para la producción de goma xantana.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

En un ecosistema definido, generalmente existen poblaciones microbianas casi siempre heterogéneas y bien estructuradas. Forman parte de una organización necesaria para subsistir en las condiciones particulares en las que se encuentran para poder aprovechar lo que el medio ambiente les ofrece. Así, las poblaciones microbianas generalmente viven en un equilibrio.

Varios microorganismos de importancia económica y de interés industrial se han obtenido directamente de los ecosistemas naturales tales como el suelo, los lagos, los pantanos, el mar u otras fuentes.

El aislamiento y selección de microorganismos o "screening" no es una actividad científica nueva. Edison probó cientos de materiales filamentosos en los bulbos de luz antes de descubrir que el bambú carbonizado podría funcionar satisfactoriamente por períodos prolongados. En la biotecnología, la primera cepa que fue cultivada en un fermentador agitado fue seleccionada de una toronja enmohecida que fue adquirida en Peoria (Illinois, USA) y el primer organismo productor de cefalosporinas fue obtenido del agua residual en Cerdeña (Italia). Actualmente, como un resultado del aislamiento de cepas de interés industrial se han logrado considerables avances de gran significado comercial (Cheetham, 1987).

2.1. "SCREENING" DE MICROORGANISMOS

El "screening" de microorganismos de interés ha sido definida como una actividad ardua y continua. Debido a que generalmente, no se puede asegurar que se pueda obtener el microorganismo deseado en un aislamiento primario. Como consecuencia, es necesaria la realización sucesiva del esquema general hasta obtener el microorganismo y/o metabolito de interés.

El esquema general que frecuentemente se emplea para la búsqueda y el aislamiento de microorganismos se presenta en la figura 1. Inicialmente se procede a realizar un aislamiento primario, en el que se detecta la presencia de los microorganismos de interés. Se eliminan todos aquellos microorganismos no deseados para permitir la selección y purificación de los aislamientos. Generalmente, los métodos para la obtención del o los aislamientos de particular interés, deben ser selectivos, rápidos, económicos y adaptables a muestras de gran tamaño (Elander, 1987).

Dado que los microorganismos son ubicuos, es factible seleccionar condiciones extremas y no comunes como agentes selectivos para la búsqueda de microorganismos con capacidades específicas, especiales y con características no comunes (Elander, 1987). Recientemente se han reportado varios ejemplos de este tipo de microorganismos que han sido obtenidos como biocatalizadores o como extractos enzimáticos de potencial aplicación industrial (Cheetham, 1987).

Los principales métodos del aislamiento y la selección de microorganismos se han basado en técnicas de enriquecimiento selectivo e inhibición. En la tabla 1 se listan algunos métodos en placas selectivas para la obtención de metabolitos con actividades específicas.

El conocimiento bioquímico claro y minucioso del o los metabolitos de interés es una guía útil para obtener y seleccionar el procedimiento para la obtención del o de los microorganismos (Elander, 1987). Sin embargo, en el caso de productos extracelulares tales como los polisacáridos microbianos no se han desarrollado técnicas directas para el aislamiento y selección de microorganismos productores.

La selección de este tipo de microorganismos se ha realizado de forma indirecta. Considerando ciertas características que se les asocian, tales como la naturaleza mucoide de las colonias (como en el caso de bacterias del género de las *Xanthomonas*). En bacterias del

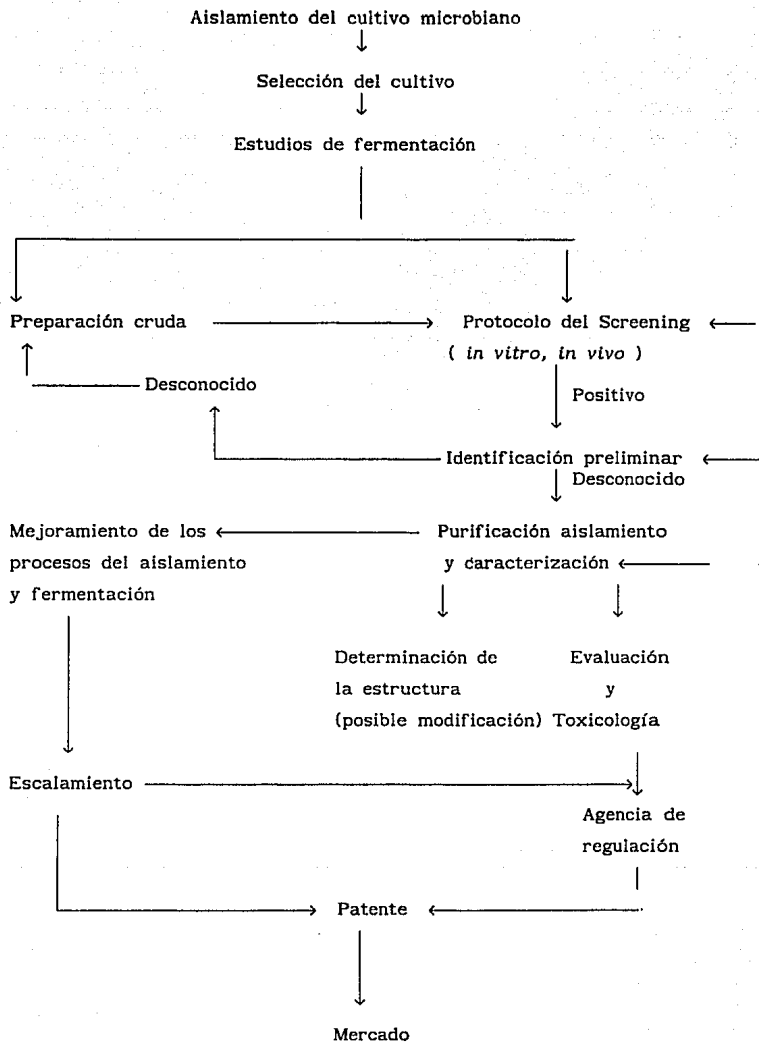


Figura 1. Esquema general para el desarrollo y obtención de un nuevo producto microbiano.

Fuente: Elander, 1987.

Tabla 1.

Procedimientos típicos en placas para la detección de metabolitos microbianos

Enzimas extracelulares.

Amilasa: Hidrólisis de almidón en agar simple demostrado por zonas claras después de la tinción con yodo.

Proteasa: Solubilización de la proteína específica del pH en suspensión de agar mostrada por zonas claras; licuefacción de gel de gelatina (colagenasas).

Lipasas: Digestión de lípidos emulsivos en agar demostrado por zonas claras o por precipitación de Ca^{2+} en agar liberando ácidos grasos.

Pectinasas: Licuefacción de pectatos de gel; pectatos de agar con indicadores (pH 5 o 7) con bromuro de cetiltrimetil de amonio (CTAB) por endopoligalacturosidadasa o pectato liasa respectivamente, la licuefacción se denota por las zonas claras.

Carboximetilcelulasa: Zonas claras en agar de carboximetil celulosa con CTAB (ver pectinasas).

Celulasa: Aclaramiento del tinte en el agar que contiene celulosa.

Xylanasa: Semejante a carboximetilcelulosa

Ureasa: Indicador pH (rojo fenol) en agar de urea

Nucleasa: Precipitación de ácido nucleico deshidrolizado (RNA, DNA) con HCl; fluorescencia ultravioleta del ácido nucleico deshidrolizado con anaranjado de acridina

Fosfatasa: Agar con difosfato de fenolftaleína combinado con substrato e indicador de pH.

Inhibidores enzimáticos.

En general, por procesos modificados de la misma manera en los casos anteriores.

Otros metabolitos.

Acido cítrico: Indicador pH o cubierta de papel; solubilización de CaCO_3 en agar.

tabla 1 (continuación).

Otros metabolitos.

Oestrógeno (Proviene de esteroides): color rojo con
p-nitrobenzenediazonium fluoroborato

NAD: Bioantografía usando microorganismos autótrofos
(auxanografía)

Para otros productos: De manera similar como se ha indicado,
identificando la actividad por colores
específicos, pH o reacciones de bioensayos.

Fuente: Elander, 1987.

tipo de la *E. coli*, las colonias parecen estar asociadas con la sensibilidad a la luz ultravioleta. Por otra parte, se ha sugerido el empleo de enzimas específicas para el reconocimiento de ciertos tipos de polisacáridos, como una posibilidad interesante para el desarrollo de programas de selección de microorganismos productores de polisacáridos extracelulares (Kidby *et al.*, 1977).

2.2 "SCREENING" DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE POLISACARIDOS

Los polisacáridos obtenidos de plantas o algas marinas -también llamadas gomas- se han usado industrialmente desde hace varias décadas. Sin embargo, varios factores aceleraron la búsqueda de fuentes alternas de producción. En la investigación continua de polisacáridos hidrosolubles, los polisacáridos extracelulares de origen microbiano proporcionaron una alternativa (Kang y Cotrell, 1979).

Los microorganismos productores de hexopolisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran en diferentes tipos de habitats, principalmente en donde el polisacárido juega un papel importante en la proliferación y/o supervivencia del microorganismo. Tal es el caso de superficies de adhesión, procesos de infección y procesos de desecación.

Los nichos ecológicos en los que se pueden encontrar son: vegetales enfermos, suelos, plantas de tratamientos de desechos, tractos gastrointestinales y habitats acuáticos (Wachenheim y Patterson, 1988).

El problema del aislamiento de nuevas cepas productoras de polisacáridos extracelulares en habitats naturales ha sido la falta del conocimiento de los requerimientos de crecimiento de los microorganismos y aquellos necesarios para la producción del polisacárido (Sutherland, 1983).

Aunque existen microorganismos que producen colonias gomosas sobre una superficie sólida, solo una pequeña proporción de estas producen

polisacáridos extracelulares en un caldo de cultivo.

Se han reportado varios microorganismos productores de exopolisacáridos (Tabla 2). Sin embargo, solo un número reducido de los microorganismos que producen exopolisacáridos presentan eficiencias de interés económico en la conversión del sustrato al polisacárido (Margaritis y Pace, 1985). Por otra parte, solo una pequeña fracción de estos microorganismos producen un producto con propiedades de posible interés comercial (McNeely y Kang, 1973).

Para que un polisacárido sea considerado como un producto de potencial aplicación industrial se ha considerado que debe de cumplir con las siguientes características: ser hidrosoluble, producir viscosidad en solución, presentar propiedades reológicas interesantes, ser compatibles con sales, mostrar estabilidad térmica, ácida y alcalina. Además, el microorganismo no debe ser patógeno y el producto no debe resultar tóxico (Kang *et al*, 1983).

Los nuevos polisacáridos que puedan ser descubiertos deberán presentar las propiedades que tienen los polisacáridos que actualmente se emplean en la industria, o bien mostrar nuevas propiedades que sean útiles para su empleo en aplicaciones específicas (Wachenheim y Patterson, 1988).

Los esfuerzos para desarrollar polisacáridos de origen microbianos se originaron con el descubrimiento de la dextrana, la cual fue empleada como sustituto del plasma sanguíneo durante la segunda guerra mundial. En los inicios de los años cuarentas el proceso fue desarrollado a nivel comercial. Actualmente, la dextrana se produce limitadamente, solo para sus usos farmacéuticos y analíticos (Sutherland, 1983).

El segundo polisacárido microbiano obtenido por fermentación fue la goma xantana. En la actualidad, es el biopolímero de mayor importancia a nivel industrial. El éxito comercial de la goma xantana se debe en gran medida a la gran eficiencia con que la bacteria la produce y a sus valiosas y en ocasiones únicas propiedades que presenta el polímero en solución.

Tabla 2.

Producción de polisacáridos extracelulares por varios microorganismos

Microorganismo	Substrato	Producto	Rendimiento (%)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Sacarosa	Alginato	5 Cultivo en lote.
<i>Xanthomonas fuscans</i>	Glucosa (2%)	Polímero de D-glucosa, manosa, ribosa, D-xilomano s. a.	25 Cultivo en lote 45 Continuo
<i>Alcaligenes faecalis</i>			
<i>var. mixogenes</i>	Glucosa (20%)	Tipo curdlana	50
<i>Erwinia tahitica</i>	Lactosa hidrolizada	Zanflo	No reportado
<i>Methilomonas mucose</i>	Metanol (4.5%)	Polímero D-glucosa, ramnosa L-glucosa, manosa galactosa	45.2
<i>Methilomonas methanolitica</i> M13V mutante	Metanol (0.3%)	Polisacárido	
<i>Pseudomonas</i> sp.		Goma PS-60 Glucosa 41%, ramnosa 30%	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Sacarosa 2%	Levanas	2
<i>Alcaligenes viscosus</i>	Lactosa (6 %)	Levanas	2.5
<i>Zooglea ramigera</i>	Lactosa (6%)	Galactoglucanos	55.6
<i>Pseudomonas elodea</i>	Carbohidratos	Goma gelana	
<i>Arthrobacter viscosus</i>	Lactosa (6%)	Polímero de galactosa, glucosa y ácido glucoronico.	0.7

Fuente: Margaritis y Pace, 1985.

EL desarrollo de la goma xantana fue un factor importante que incrementó el interés en el estudio de la producción de polisacáridos microbianos y motivó la investigación en el campo, en los últimos 10 años.

La goma xantana es un heteropolisacárido que es producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Esta bacteria presenta además, la particularidad de que es fitopatógena. Produce la enfermedad conocida como "podrición negra", especialmente en la familia de las crucíferas.

Aunque la mayor parte de los trabajos sobre la producción de goma xantana reportan el empleo de la cepa de colección *X. campestris* NRRLB-1459 de los Northern Regional Research Laboratories (Peoria, USA), se ha propuesto que otros pathovars de *Xanthomonas campestris* pueden ser empleados para la producción de la goma xantana.

Patton y Lindblom (1962) obtuvieron una patente del proceso de producción del polisacárido usando otras especies de *Xanthomonas*. Recientemente, Scamparini y Rosato (1987) reportaron la producción del polímero con diferentes cepas nativas de *Xanthomonas*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* produjo un polímero de propiedades reológicas interesantes.

La evaluación de cepas nativas de *Xanthomonas* ofrece una alternativa potencial para la producción de goma xantana. Aunque se ha remarcado la falta de técnicas para el aislamiento de cepas, en el caso particular de *Xanthomonas* se ha reportado que la sensibilidad a ciertos antibióticos (como la penicilina) podría ser un criterio útil para la selección de buenas cepas productoras de la goma (Torrestiana *et al*, 1990).

Por otra parte, se ha establecido que ciertas características del polímero extracelular que produce la bacteria (por ejemplo su capacidad viscosificante) están relacionadas con la virulencia de las cepas (Ramírez *et al*, 1988). Esto ha sugerido que la virulencia podría ser usada como un criterio para el aislamiento de buenas cepas productoras del biopolímero xantana.

2.3. DESCRIPCION DEL GENERO *Xanthomonas*.

Desde hace algunos años en la taxonomía de bacterias existe una tendencia hacia la disminución del número de especies de bacterias fitopatógenas, especialmente entre los géneros de las *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

De acuerdo con el manual de Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974), el género *Xanthomonas* incluye alrededor de 70 especies ciertas, 158 nominales y 44 dudosas. Las 70 especies ciertas han sido agrupadas en cinco: *Xanthomonas campestris* (con dos especies nominales), *Xanthomonas fragariae*, *Xanthomonas ampelina*, *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas axonopodis*. El grupo de especies nominales de *X. campestris* han sido formalmente designado como pathovar. Debido a su poca diferenciación morfológica, la diferencia de este grupo se ha basado principalmente en la especificidad vegetal y en sus efectos sobre la planta.

Existe una marcada diferencia en la velocidad de crecimiento en las especies de *Xanthomonas*. El grupo de *X. campestris* son relativamente de un crecimiento más rápido que las otras *Xanthomonas* y producen colonias de 1-3 mm de diámetro después de 3 a 5 días de incubación sobre un medio nutritivo que contenga glucosa o sacarosa. Las otras cuatro taxoespecies crecen más lentamente, sobre todo a partir de su primer aislamiento de plantas infectadas. Después de 4 a 14 días de incubación se pueden obtener colonias de 1 mm de diámetro (Buchanan y Gibbons, 1974).

2.3.1. Características morfológicas

Se ha establecido que las *Xanthomonas* son microorganismos bacilares de 0.2-0.8 por 0.6-2.0 μm . Presentan un flagelo polar. *X. fragariae* y el grupo de *X. campestris* están rodeadas de una capa mucosa constituida por polisacáridos extracelulares. Vistas al microscopio electrónico se observan como en la figura 2.

En cajas con un medio de cultivo que incluye extracto de levadura, las colonias se tipifican por sus características morfológicas. Se

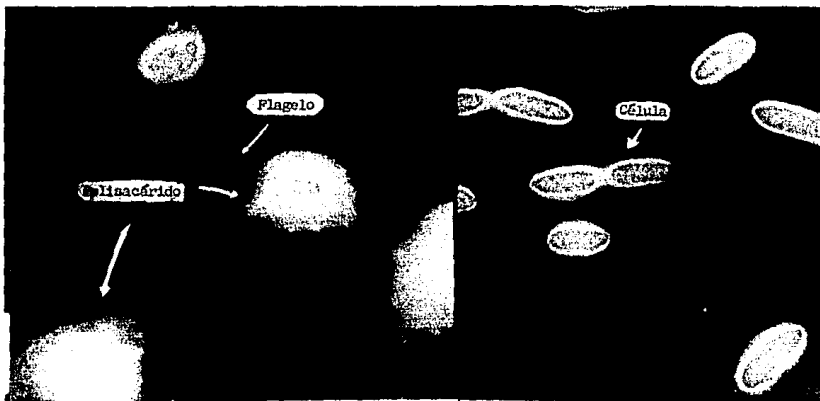


Figura 2. Vista microscópica de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

manifiestan como colonias de color amarillo y brillantes, viscosas y con bordes lisos que, medidos a las 48 h de incubación (a 29°C), son de un diámetro aproximado de 4 mm.

2.3.2. Características bioquímicas

Las *Xanthomonas* son gram negativas, estrictamente aeróbicas y son quimioorganotótrofos. Presentan un metabolismo respiratorio en donde el oxígeno molecular es el último aceptor de electrones. Son catalasa positivas, la reacción de oxidasa es negativa o de efecto retardado (15-60). Los nitratos no son reducidos a nitritos y no producen acetoina o indol. Muchas especies hidrolizan la gelatina, el almidón y el Tween 80 rápidamente. El sulfuro de hidrógeno es producido de la cisteína y en muchas especies puede ser generado del tiosulfato y de la peptona.

Los requerimientos nutricionales son complejos y usualmente incluyen metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico en varias proporciones. El contenido G + C en el DNA de 29 especies nominales de *X. campestris* se encuentran en el rango de 63.5 - 69.2 mol % y para otras especies de 63.9 - 71.6 mol %. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 29°C. Ninguna crece a 5°C, muchas crecen a 7°C pero algunas son incapaces de crecer a 9°C. Todas crecen a 30°C. El crecimiento en un medio con agar es usualmente de color amarillo.

Las *Xanthomonas* son de lento crecimiento y poseen un DNA con el siguiente porcentaje de G + C: *X. albilineans* 63.1 - 63.5; *X. ampelina* 66.9; *X. axonopodis* 62.6 - 62.4 y *X. fragariae* 62.6.

No se han observado fimbrias en las células bacterianas, con la excepción de *X. manihotis*. En *X. manihotis* y *X. albilineans* se han formado en un medio con poly-β-hidroxibutirato (Buchanan y Gibbons, 1974).

Las características bioquímicas que diferencian a las especies del género *Xanthomonas* se presentan en la tabla 3.

Tabla 3.

Caracteres diferenciales de las especies del género *Xanthomonas*

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Desarrollo a 35 °C	+ ^a	+	+	+	- ^a
Hidrólisis de esculin ^b	+	+	+	+	-
Crecimiento mucoide sobre agar glucosado	+	+	-	-	-
Licuefacción de gelatina	+	+	d ^a	-	-
Proteólisis de la leche	+	-	-	-	-
Peptona con agua	+	-	-	+	d
Ureasa	-	-	-	-	+
Tolerancia al NaCl.%	2.0-5.0	0.5-1.0	<0.5	1.0	1.0
Producción de ácido ^c :					
Arabinosa	+	-	-	-	+
Glucosa	+	+	+	+	-
Manosa	+	+	+	-	-
Galactosa	+	-	d	-	+
Trehalosa	+	-	-	+	-
Celobiosa	+	-	-	-	-

(+^a) El 90% o más son positivos en esta característica.

(-) El 90% o más son negativos en esta característica.

(d) algunas (menos del 90%) son positivos, otros negativos.

b Algunas reacciones retardadas

c Durante 21 días por los métodos de Dye (1962)(Citado en Buchanan y Gibbons, 1974).

(1) *X. campestris*, (2) *X. fragariae*, (3) *X. albilineans*, (4) *X. axonopodis*, (5) *X. ampelina*.

Fuente: Buchanan y Gibbons, 1974.

2.3.3. Pigmentación

El pigmento amarillo de 19 miembros del grupo de *Xanthomonas* se ha caracterizado como un carotenoide no soluble al agua. Es soluble en eter de petróleo, metanol y benceno y tienen su máximo de absorción en el metanol en los 420, 441, y 468 nm de longitud de onda. En el eter de petróleo tiene un espectro de absorción con un máximo a 418, 437 y 463 nm (Starr *et al*, 1977).

Los pigmentos son ésteres de metil-arilpolieno-bromado (xanthomonadinos). Se ha asumido que los areloctanos bromados constituyen los pigmentos específicos del grupo en el género *Xanthomonas*. No se conoce que los pigmentos de este tipo ocurran en otras bacterias. Dentro del género, existen cepas albinas que no sintetizan el pigmento. Algunos aislamientos de *X. recinti* son pigmentadas y otras no. Se ha encontrado variaciones similares en *X. uppalli*, *X. zaderachtal*. Los aislamientos de *X. manihotis* y *X. pedalli* no presentan pigmentos (Buchanan y Gibbons, 1974).

Algunos miembros del grupo *X. campestris* producen un pigmento café que se difunde en el medio de cultivo. Una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo produce inhibición de la producción del pigmento, aparentemente por el efecto de represión de la glucosa en la síntesis o secreción de la tirosinasa ó enzimas relacionadas (Buchanan y Gibbons, 1974).

2.3.4. Patogenicidad

Se ha reconocido que todas las especies de *Xanthomonas* son patógenas a las plantas. Se les puede encontrar asociadas en las plantas o con el material vegetal y aún no se han confirmado otros hábitats (Buchanan y Gibbons, 1974).

Muchas especies causan enfermedades relacionadas con el sistema vascular, pero otras especies de *Xanthomonas* producen enfermedades en

el parénquima. En la tabla 4 se presenta un compendio de las principales enfermedades ocasionadas por las especies de las *Xanthomonas*, el hospedante, así como los síntomas que se presentan.

2..4. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DEL POLIMERO EXTRACELULAR QUE PRODUCE *X. campestris*.

Una gran proporción de especies del género *Xanthomonas* producen polisacáridos. La naturaleza mucoide de las colonias es una función de la producción extracelular del polisacárido, las cuales dan soluciones de alta viscosidad.

Nueve de doce *Xanthomonas* estudiadas se ha reconocido que producen polisacáridos, los cuales están constituidos principalmente de ácido glucorónico, glucosa y manosa. Dos especies de *Xanthomonas* no producen cantidades apreciables de polisacáridos (tabla 5) (Gorin y Spencer, 1961).

Aunque se ha estudiado la constitución de los exopolisacáridos, solo el polímero que produce *Xanthomonas campestris* pv *campestris* ha sido estudiado y caracterizado. El polímero que produce *X. campestris* pv *campestris* se ha reconocido como un heteropolisacárido de origen extracelular, polianiónico y de alto peso molecular (Cottrell y Kang, 1978).

La estructura del polisacárido ha sido propuesta por Jansson *et al.* (1975). Es un polímero ramificado constituido por unidades monoméricas repetidas que contienen dos unidades de β -D glucosa, dos de D-manosa y una unidad de ácido glucorónico y cuya relación molar es de 2.8:3:2. La molécula presenta además sustituyentes de ácido pirúvico y residuos O-acetálicos en diferentes proporciones.

La cadena principal está formada por monómeros de β -D-glucosa unidos con enlaces glicosídicos β (1,4). La cadena lateral ramificada está integrada por el monosacárido D-manosa unido a la glucosa con un enlace glicosídico (1,3), la cual a su vez está unida con el β -D ácido glucorónico por un enlace β (1,2). El ácido glucorónico está unido con

Tabla 4.

Principales enfermedades producidas por *Xanthomonas*.

ENFERMEDADES VASCULARES

PATOGENO	HOSPEDANTE	ENFERMEDAD	SINTOMAS
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Cruciferea</i>	Pudrición negra	Enegrecimiento de venas. Clorosis en forma de V.
<i>X. campestris</i> pv. <i>hyacinthi</i>	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Amarilla del Jacinto	Pudrición de bulbo puntas de las hojas decoloradas, cafés, inflorescentes.
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoricae</i>	<i>Armoricae rusticana Iberis amara</i> Frijol		Manchas foliares, verde oscuro, tornándose café con bordes negros.
<i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i>	<i>Methiola</i> Sp.		En hojas maduras cercanas al suelo se presentan áreas verdes oscuras lineales al tallo principal.
<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculatorum</i>	Caña de azúcar Palma royal <i>Dyctiosperma album</i>	Gomosa de la caña de azúcar	Franjas amarillas pálidas cafés en las hojas y en algunas especies de la planta se tornan rojas.

Tabla 4 (continuación)

ENFERMEDADES VASCULARES

PATOGENO	HOSPEDANTE	ENFERMEDAD	SINTOMAS
<i>X. campestris</i> pv. <i>nigromaculans</i>	<i>Articulum lappa</i>		Manchas angulares de color negro en las hojas.
<i>X. campestris</i> pv. <i>papavericola</i>	<i>Papaver orientale</i>		Manchas negras.
<i>X. campestris</i> pv. <i>gummisudans</i>	<i>Gladiola</i>	Roya bacteriana de la <i>gladiola</i>	Manchas rectangulares verdes oscuras
<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus</i> sp.	Mancha bacteriana del durazno y ciruelo	En frutos y hojas manchas, en brotes lesiones rugosas.
<i>X. campestris</i> pv. <i>cassava</i>	<i>Cassava mantschurica</i>	Manchas de la hoja	Manchas circulares amarillo café, venas decoloradas.
<i>X. campestris</i> pv. <i>pelargo</i>	Pelargonio Geranio		Manchas foliares, pequeñas, cafés; redondas ó angulares. Necrosis.
<i>X. campestris</i> pv. <i>corylinia</i>	<i>Corylus</i>		Mancha angular negra en brotes y hojas.

TABLA 4 (continuación)
 ENFERMEDADES PARENQUIMATOSAS.

PATOGENO	HOSPEDANTE	ENFERMEDAD	SINTOMAS
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i>	Citricos	Cáncer del cítrico	En frutos maduros se observan costras café rodeados por márgenes café oscuro brillante.
<i>X. campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglandis</i> sp.	Tizón del nogal	Manchas negras irregulares en hojas y peciolos, en frutos manchas negras.
<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	Malva	Mancha angular	Manchas foliares café oscuro
	Algodón	"Blackarn" Putrefacción del algodón. Roya bacteriana del algodón	Tallo con manchas negras. Bollo (cápsula) con manchas negras verduscas.
<i>X. campestris</i> pv. <i>translucens</i>	Cebada, trigo y centeno	Franja bacteria- na de la cebada, trigo y centeno. Paja negra del centeno	Hojas en franjas translúcidas. Es- tiga amarilla que se torna café. Con exudado bac- teriano se forman incrustaciones ama- rillas.

Tabla 4 (continuación)

ENFERMEDADES PARENQUIMATOSAS

PATOGENO	HOSPEDANTE	ENFERMEDAD	SINTOMAS
<i>X. campestris</i> <i>pv vesicatoria</i>	Tomate Pepino	Mancha costrosa del tomate y pepinos	Costras y manchas hojas, tallos y frutos de color café, negro con bordes amarillos.
<i>X. campestris pv.</i> <i>ricinicola</i>	<i>Ricinus</i> <i>communis</i>		Manchas cafés en hojas.
<i>X. campestris pv.</i> <i>begoniae</i>	<i>Begonia soco-</i> <i>trance</i> <i>Begonia degrei</i>		Manchas en hojas y marchitamiento.
<i>X. campestris pv.</i> <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulga-</i> <i>ris</i>	Roya del frijol	Manchas foliares
<i>X. albilineans</i>	Caña de azúcar	Gomosa Java	Líneas blancas con zonas amarillas que se vuelven rojas.
<i>X. axonopodis</i>	<i>Axonopus</i> <i>scobartius</i>	Gomosis pasto de forraje	Tallos prematura- mente elongados, hojas con franjas blancas, amarillas con líneas rojas.

Fuente: Agrios, 1978

Tabla 5.

Constitución de diferentes tipos de polisacáridos producidos por las diferentes especies de *Xanthomonas*.

CONSTITUCION DE POLISACARIDOS		
Acido aldobiurónico glucosa, manosa	Acido aldobiurónico galactosa, glucosa	No producen polisacáridos
<i>X. campestris</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. beticola</i>
<i>X. carotal</i>		<i>X. vasculorum</i>
<i>X. hijacinthi</i>		
<i>X. maculofoliigardeniae</i>		
<i>X. malvacearum</i>		
<i>X. phaseoli</i>		
<i>X. translucens</i>		
<i>X. vignicola</i>		

Fuente: Gorin y Spencer, 1961.

la β -D manosa terminal por un enlace β (1,4). La cadena lateral está unida al tercer carbón de la glucosa, en forma alterada en la cadena principal.

En la D-manosa inicial de la cadena ramificada se encuentra unido un grupo acetilo en la posición del sexto carbono. La mitad de los residuos terminales de la β -D manosa se encuentran unidos cetálicamente a un residuo de ácido pirúvico en el cuarto y sexto carbono de la manosa. En la figura 3 se esquematiza la unidad monomérica de la xantana.

La manera en que está conformado el polímero ha sido el motivo más importante de su resistencia al ataque enzimático y de sus propiedades físicas, químicas y reológicas (Kelco,1981).

2.5. BIOSINTESIS

La biosíntesis del polímero es un área que ha sido relativamente poco explorada. Los reportes de la literatura se basan en una ruta propuesta por Ielpi y colaboradores (Betlach *et al*, 1987). En esta ruta (figura 4), las unidades pentaméricas repetidas son ensambladas sobre un acarreador, que es un lípido isoprenoide, representado en este caso como C55. Los cinco azúcares son donados por azúcares nucleotídicos fosfatados, vía la enzima específica 5-glicosiltransferasa. Las unidades repetidas son acetiladas por una enzima específica, la acetilasa, utilizando acetil-coenzima-A como sustrato donador. Estas cadenas también son piruviladas por una catalasa específica utilizando fosfoenolpiruvato.

Para la polimerización, se cree que la molécula activada de la xantana se ensambla a las unidades repetidas mediante el lípido. Posteriormente, el lípido acarreador se desprende de la molécula y es reciclado mediante una etapa de desfosforilación. Finalmente el polímero es liberado fuera de la célula.

Betlach y colaboradores (1987) realizaron estudios bioquímicos y

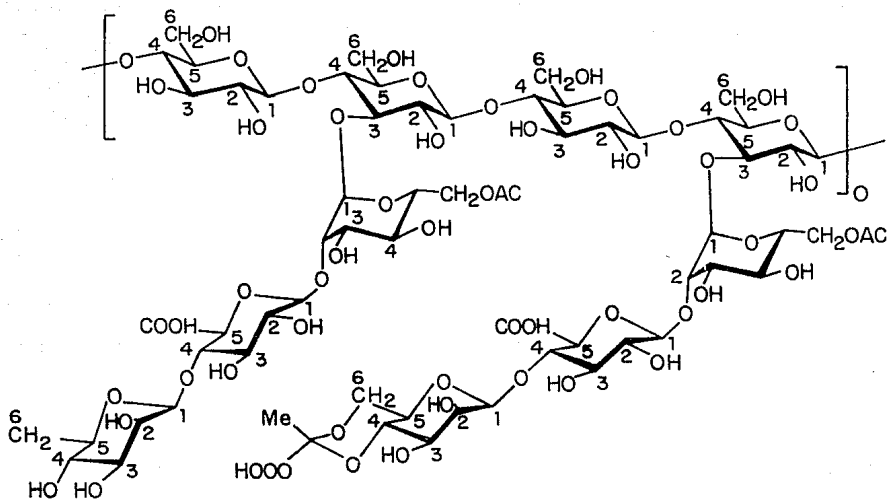


Figura 3. Estructura primaria de la goma xantana de acuerdo a Jansson *et al*, 1975.

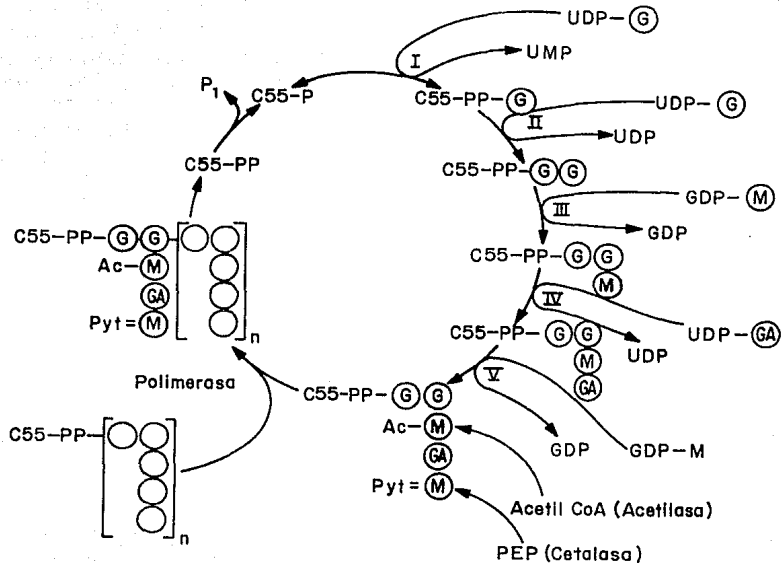


Figura 4. Ruta de la biosíntesis de la goma xantana.

UDP-C=Uridina 5'-Difosfoglucosa; GDPM= Guanidina 5'Difosfomanosa;
 UDP-GA= Uridina 5'Acido Difosfogluconico; GC= Celobiosia; C55=
 Acarreador Lípido Isoprenoide; PEP= Fosfo(enol) piruvato; Acetil CoA=
 Acetil coenzima A; I-V= Glicosil Transferasas I-V; Ac= Acetato y
 PYR= Piruvato.

Fuente: Betlach *et al*, 1987.

genéticos sobre la biosíntesis de la goma y descubrieron que mediante mutaciones en el genoma de *X. campestris* es posible obtener diferentes variedades de goma, compuestas por unidades repetidas de trisacáridos que podrían llegar a formar una familia de "xantanas"

2.6. Función biológica del polisacárido extracelular que produce *Xanthomonas campestris*

Los polisacáridos extracelulares desempeñan funciones importantes para las células microbianas así como en la interacción de los microorganismos con su alrededor. Sirven como barreras de protección ante condiciones ambientales desfavorables, mantienen la humedad del microorganismo en su microambiente; funcionan como barrera física contra bacteriófagos y proporcionan protección a fagocitosis y ataques amibianos (Powell, 1979).

En cuanto a la interacción de microorganismos con su medio ambiente, Sutton y Williams (1970) demostraron que el polisacárido extracelular que produce *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo en el laboratorio es el mismo que produce en el tejido vascular de la planta infectada.

Se ha planteado que puede existir un cierto reconocimiento molecular, que ayude a la bacteria a acoplarse dentro del hospedero. Este reconocimiento puede estar determinado por la composición del exopolisacárido que produce la bacteria y de un área particular de las células de la planta.

Bajo condiciones fisiológicas, el polímero extracelular muestra evidencias de interacción molecular con las galactomananas. La interacción galactomanana-xantana, involucra la asociación de las regiones no substituídas de las mananas en la galactomanana con la forma ordenada de la xantana (figura 5).

Estudios de rotación óptica y difracción de rayos X del proceso de interacción galactomanana-xantana han mostrado que los geles se forman como resultado de la interacción. Además, en conjunto con la galactomananas, la goma xantana presenta un incremento sinérgico en la

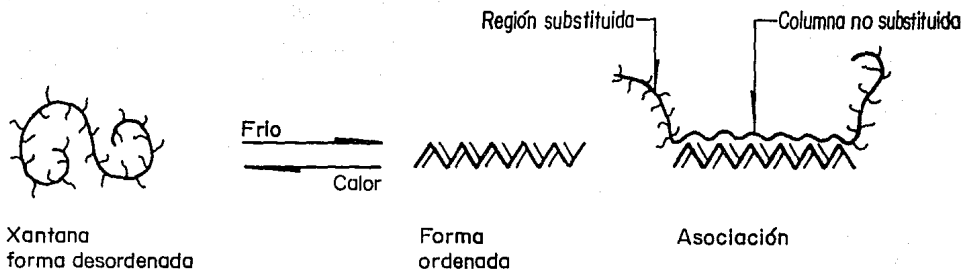


Figura 5. Representación esquemática de la Interacción de la goma xantana con la galactomanana.

viscosidad (esto es, que la viscosidad de la mezcla es mayor que la suma de las viscosidades de cada uno de los componentes).

Se cree que el significado biológico de estas interacciones está relacionado con los daños provocados por la bacteria en el tejido de las hojas de las crucíferas, las cuales presentan una pared celular constituida de celulosa y galactoglucomanas. Además, este tejido vegetal contiene elementos fibrilares embebidos en una matriz amorfa o de hemicelulosa que puede incluir ciertos elementos de forma ordenada así como sustancias pépticas (Bacon, 1979).

2.7. PRODUCCION DE LA GOMA XANTANA POR FERMENTACION.

La goma xantana es un polisacárido que se produce durante la fermentación de un carbohidrato con cultivos puros de *Xanthomonas campestris*. La producción se realiza en tanques de fermentación que han sido previamente esterilizados e inoculados, y que están dotados de suministro de aire estéril y de agitación mecánica.

El diagrama de flujo del proceso típico se presenta en la figura 6. Este proceso consiste de varias etapas, las cuales se describen a continuación:

a) Microorganismo.

Xanthomonas campestris es la bacteria que representa el centro del proceso de producción y se ha establecido como uno de los aspectos críticos del proceso (Galindo, 1985). La bacteria presenta la característica de ser inestable genéticamente (Cadmus et al, 1976). Esta característica genotípica puede conducir a la "degeneración celular" y a ocasionar cultivos que pierden la capacidad de producción de la goma e inclusive la pérdida de la viabilidad. Por estas razones es importante mantener las características de la cepa en el corto, mediano y largo plazo. Es fundamental garantizar que la bacteria preserve las características de producción, mediante métodos idóneos (Salcedo *et al*, 1992). Es importante tener un control de calidad de las

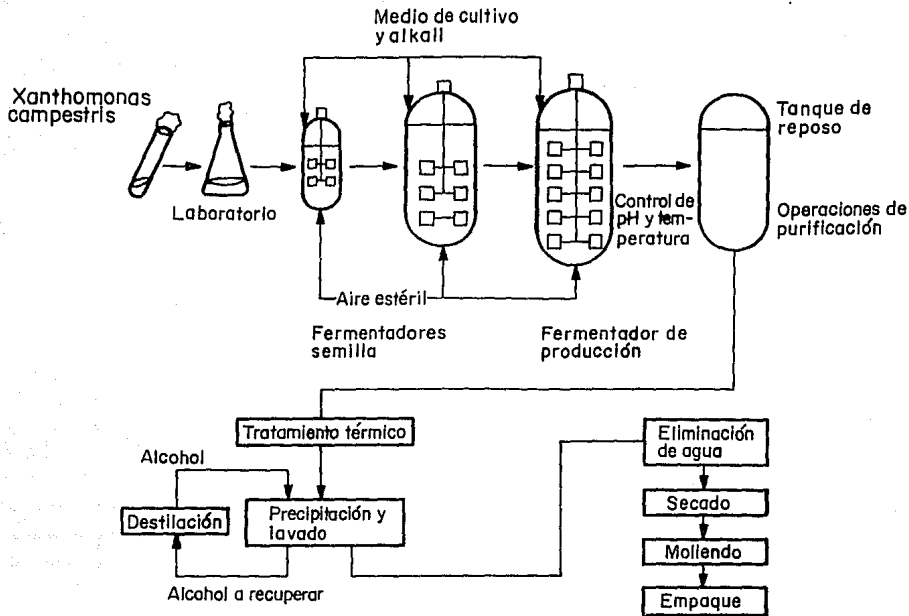


Figura 6. Diagrama de flujo típico del proceso de producción de goma xantana.

cepas empleadas para asegurar el éxito de la fermentación y consecuentemente de la producción de goma.

Entre los criterios "de calidad" que se han propuesto se encuentran: aspectos morfológicos, sensibilidad a fármacos (Torrestiana *et al*, 1990 ; Marquet *et al*, 1989; Tait *et al*, 1986), la virulencia fitopatológica (Ramírez *et al*, 1988), pruebas bioquímicas (Quintero *et al*, 1984 a, b), pruebas denominadas "de producción" en matraces agitados (Galindo *et al*, 1992).

b) Desarrollo de inóculos

Una vez evaluada la cepa y satisfechos los requerimientos de control de calidad de la cepa, se procede al desarrollo del cultivo para su empleo como inóculos para los tanques semilla. El medio de cultivo que se emplea en este paso tanto en los inóculos como en los tanques semillas es un medio rico y complejo. Está diseñado únicamente para la generación de la biomasa microbiana.

El cultivo se inicia en matraces agitados e incubados por 48 h, posteriormente estos inóculos se transfieren en un 5 a 10 % (en volumen) a los tanques semilla. En fermentadores, la producción de los inóculos dura entre 12 y 24 horas.

d) Fermentación

El proceso de fermentación se lleva a cabo en tanques equipados con suministro de aire estéril, agitación mecánica con impulsores cuya geometría permita la eficiencia en la transferencia de oxígeno y el mezclado , control de temperatura y de pH (Galindo, 1985).

El medio de cultivo que se emplea en esta etapa es un medio químicamente definido. Está diseñado de tal manera que satisface los requerimientos para la producción de biomasa pero principalmente para maximizar la producción de la goma.

El medio de cultivo se compone principalmente de una fuente de carbono. Se ha reportado que la glucosa o la sacarosa son las mejores

fuentes de carbono. A concentraciones del 4 % se pueden obtener los mejores rendimientos del polímero (Souw y Demain, 1979). En concentraciones mayores de 50 g/L se observa un efecto de inhibición tanto en el crecimiento como en la producción de goma (Funahashi *et al*, 1987).

Se ha indicado que las mejores fuentes de nitrógeno son el nitrato de sodio y el nitrato de amonio, debido a que producen mejores rendimiento (Souw y Demain, 1979). Se han empleado además otras fuentes de carbono complejas como las vinazas, la peptona, el licor de maíz, harina de semillas de algodón y extractos de plantas (Cadmus *et al*, 1971; Moraine y Rogovin, 1971 y 1973; Souw y Demain, 1979; Patton y Dugar, 1981). El medio de cultivo contiene además fósforo, sales minerales y elementos trazas.

Durante el proceso de fermentación, el pH del medio decrece debido a la formación de ácidos. Si el pH del medio alcanza un valor de 5, la producción de goma decrece drásticamente. Un pH neutro permite que la síntesis de la goma continúe hasta que la fuente de carbono se agote, indicando el término de la fermentación (Moraine y Rogovin, 1971).

En el transcurso de la fermentación el caldo se vuelve más pseudoplástico y se va incrementando la viscosidad. El incremento en la viscosidad del caldo de fermentación trae como consecuencia problemas en la transferencia de masa. Ocasionados por un mezclado deficiente (Galindo, 1985).

La fermentación puede durar entre 50 y 70 horas, la concentración de polímero que se puede alcanzar al final de la fermentación se encuentra entre 18 y 25 g/L, con viscosidades aparentes en el caldo de fermentación de 7, 000 a 20, 000 cps.

d) Esterilización

Una vez finalizada la fermentación se procede a la esterilización del caldo de fermentación. Este proceso se realiza con dos finalidades: la de eliminar la bacteria y la de mejorar las características reológicas de la goma en solución.

e) Recuperación de la goma

La goma se recupera del caldo de fermentación mediante la precipitación con alcohol. Dependiendo del uso final de la goma se puede emplear alcohol etílico o isopropílico.

f) Eliminación de agua

Este paso se realiza con el fin de eliminar el exceso de agua-etanol mediante la centrifugación o mediante filtros.

g) Secado

Las fibras deben ser secadas para mejorar la manipulación de ellas y se recomienda un nivel máximo del 10 %. Se recomienda el uso de secadores de charolas.

h) Molido

La reducción del tamaño de partícula se realiza para mejorar la dispersabilidad del polímero en la solución acuosa. Para esto se emplean molinos que proporcionen una adecuada distribución del tamaño de la partícula.

2.9. IMPORTANCIA INDUSTRIAL DE LA GOMA XANTANA

La goma xantana, al igual que las gomas naturales, sintéticas o semisintéticas, se usan extensivamente en la industria. Esto se debe principalmente a su capacidad de alterar las propiedades de flujo del agua ya sea como viscosificante, gelificante, texturizante o como agente suspendedor. Las principales aplicaciones comerciales de la goma xantana se encuentran en la industria alimentaria y en la industria petrolera.

En la industria petrolera se destaca su empleo en la formulación de lodos de perforación , lodos de reparación y lodos de terminación de pozos petroleros. Se usa como agente controlante de la movilidad en la recuperación asistida de petróleo (Sandvic y Maercker, 1977; Paul *et al*, 1986).

En la industria alimentaria se ha empleado por su capacidad de suspensión, estabilidad térmica y química, por tener un elevado poderviscosificante y por las propiedades pseudoplásticas ("adelgazantes") de sus soluciones.

Las principales aplicaciones de la goma xantana en la industria alimentaria son: como aditivo en pastelería, alimentos enlatados, bebidas, alimentos congelados, jugos de frutas, aderezos, sazonadores, salsas, mayonesa, jarabes, entre otros. En este sector la goma xantana tiene especial aplicación, esencialmente porque imparte a los productos elaborados mejor calidad en su sabor, consistencia, olor y gusto al paladar. También produce mejoras en su proceso de elaboración. Las soluciones viscosas de goma xantana, presentan elevada estabilidad a la temperatura, pH y concentración de sales, además de ser compatibles con una gran variedad de sales (Kennedy y Bradshaw, 1984).

Las aplicaciones industriales son numerosas. En la industria textil se emplea para evitar que se corran los colorantes; en la agroindustria se utiliza como agente que permite suspender y aplicar adecuadamente agroquímicos (tales como herbicidas, fungicidas, etc.), en cerámica se usa para suspender los componentes de los barnices; se emplea como aditivo en agentes limpiadores para prolongar el tiempo de contacto, como base para explosivos y como aditivo en adhesivos (Galindo, 1985). En la industria farmacéutica se aplica como agente suspensor de medicamentos y como texturizador de medicamentos (Galindo, 1985).

MATERIALES Y METODOS

Los reactivos, el equipo y los medios de cultivo que se emplearon para la realización del presente trabajo se describen en el anexo 1.

3.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental en el desarrollo del presente trabajo se esquematiza en la figura 7. Debido a la época en el que se inició el presente estudio (primavera), se procedió inicialmente al estudio de 17 aislamientos de *Xanthomonas campestris* de la colección de bacterias fitopatógenas del Dr. Leopoldo Fucikovski del Colegio de Posgraduados.

Posteriormente se llevó a cabo un muestreo en el estado de Colima, y el material foliar fue procesado para la obtención de las cepas (figura 7). Se obtuvieron cerca de 30 cepas. Las cepas presentaban características morfológicas que sugerían la producción de goma. Se evaluó la producción de en fermentaciones desarrolladas en matraces bafleados. Sin embargo, estas cepas no produjeron goma en cantidades apreciable (datos que no se presentan en el este estudio).

Posteriormente, se evaluó la producción de goma en un fermentador de 2 L de cinco de las cepas nativas más prometedoras.

El procedimiento experimental que se siguió para la selección de las cepas nativas de *Xanthomonas* se presenta en la figura 8. La selección de las cepas se realizó en base a "pruebas de producción" de goma, desarrolladas mediante fermentaciones en matraces bafleados y con el medio de producción reportado por Quintero *et al* (1984 b). Al final de la fermentación se determinó la viscosidad del caldo de fermentación, se precipitó la goma, la cual se secó y se molió. Se

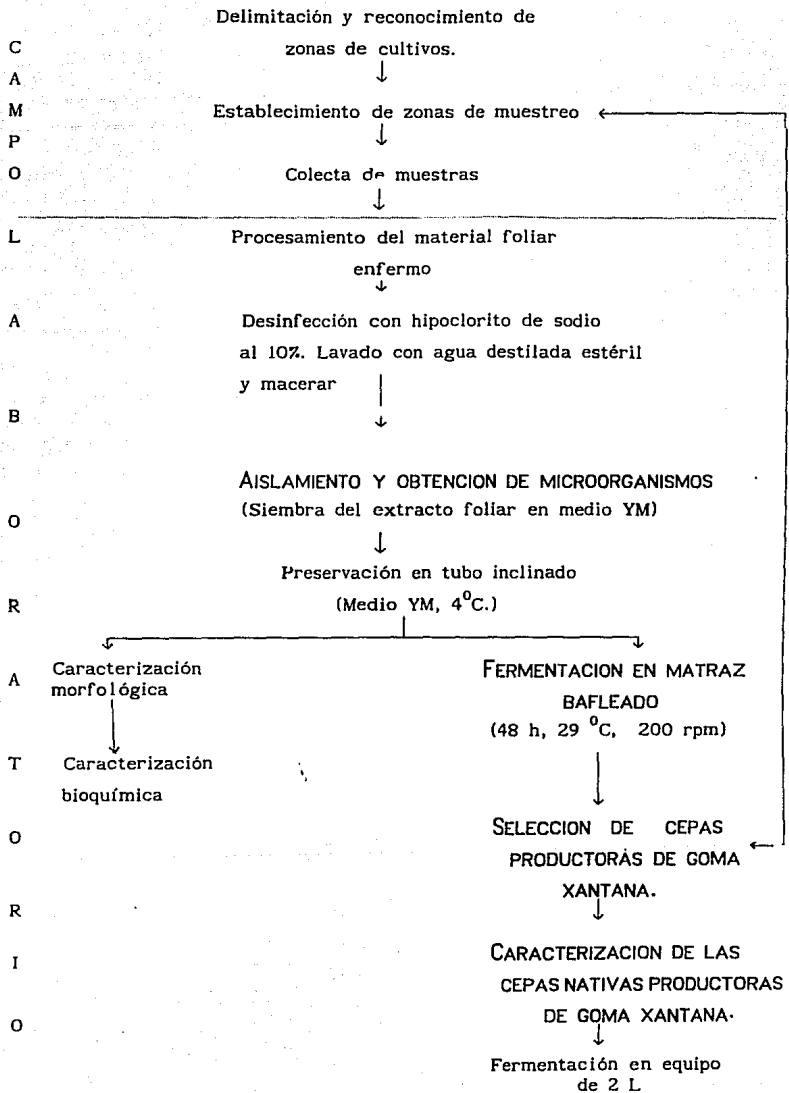


Figura 7. Estrategia general en el desarrollo de este trabajo.

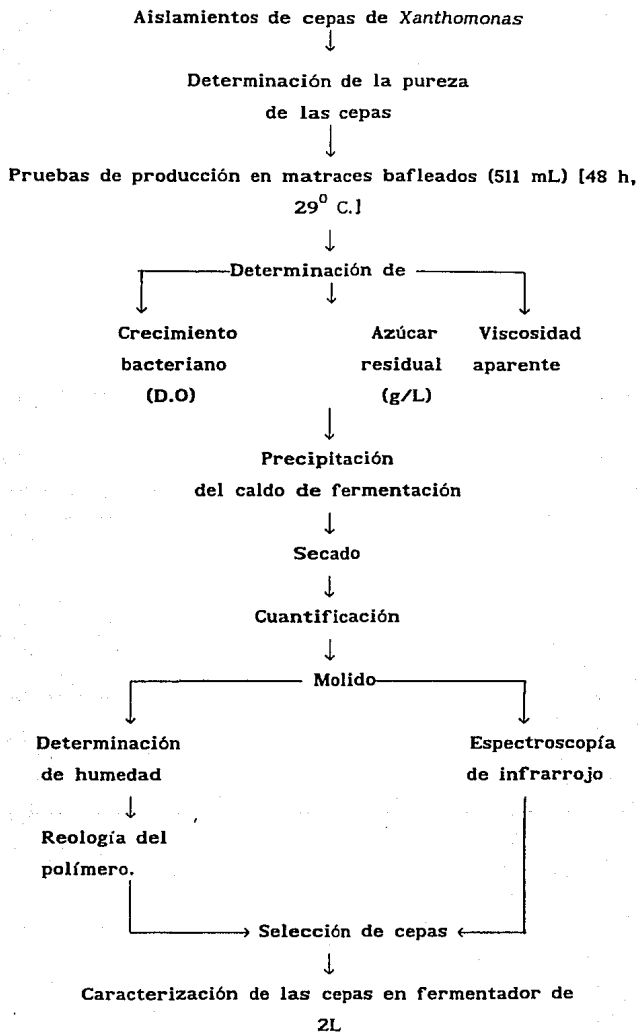


Figura 8. Estrategia experimental realizada en la selección de cepas nativas de *Xanthomonas campestris*.

evaluó la reología del polímero y los polímeros fueron analizados mediante espectroscopía de infrarrojo (figura 8).

Para la caracterización de las cepas nativas, se realizaron fermentaciones en un tanque de 2L (figura 9). Las fermentaciones se efectuaron con dos medios de producción. La diferencia en su composición fué básicamente la fuente de nitrógeno: en uno se usó peptona y en el otro sulfato de sodio. El ajuste de pH se realiza con Hidróxido de amonio e Hidróxido de potasio para cada medio respectivo. Durante el transcurso de la fermentación se tomaron muestras periódicamente con el fin de determinar la cinética de producción de la goma (figura 9).

Al término de la fermentación se determinó la viscosidad del caldo de fermentación. Se realizó el tratamiento enzimático para eliminar células y posteriormente se llevó a cabo el tratamiento térmico. Se precipitó la goma y las fibras se sometieron a dos lavados, con el fin de eliminar sales y restos celulares que pueden coprecipitar con la goma. Las fibras se secaron y se molieron. Cada polímero se evaluó químicamente y sus soluciones se caracterizaron reológicamente (figura 9).

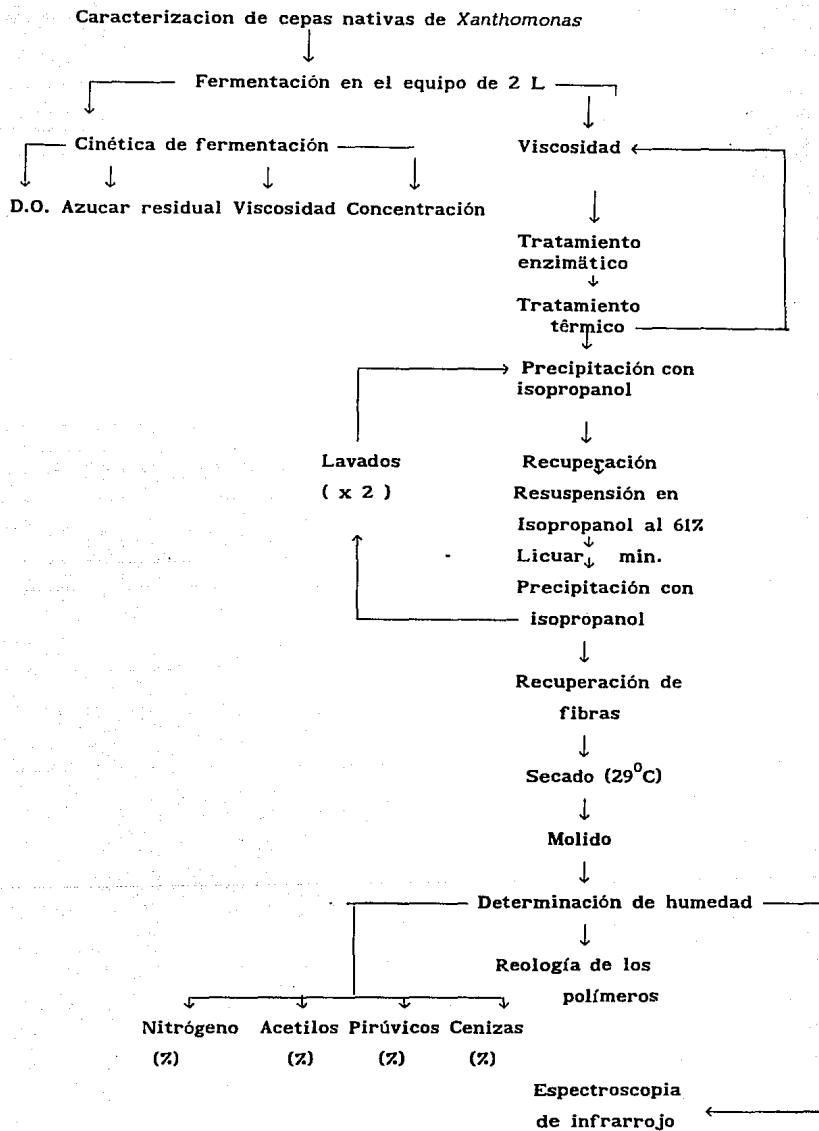


Figura 9. Estrategia experimental de la caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas*.

3.2. CEPAS.

Se empleó la cepa *Xanthomonas campestris* E2-CEINGEBI/UNAM como un cepa control para la comparación de la producción de goma. Esta cepa fue obtenida de la cepa NRRL B-1459 de la NRRL (Northern Regional Research Laboratories, USA.). La cepa fue obtenida mediante un programa de almacenamiento y selección. Presenta características que la hacen que se le considere como una subcepa de la original (Galindo et al, 1992).

Los aislamientos de *Xanthomonas campestris* que fueron evaluados se presentan en la tabla 6. En esta misma se indica el pathovar, el hospedero, la ubicación y el año en que fueron obtenidos.

Nueve de las cepas de *Xanthomonas campestris* pertenecen al pathovar (pv.) *campestris*, dos al pv. *juglandis*, una al pv. *manihotis*, y una al pv. *pruni*. En cuatro de estas se desconoce el pv. al que pertenecen, por lo que fueron identificadas arbitrariamente con los números 10, 11, 12 y 13. De acuerdo con sus características morfológicas, las cepas pueden agruparse dentro del género de las *Xanthomonas* (Tabla 7).

Las cepas evaluadas fueron obtenidas de la colección del laboratorio de Fitobacterias del Departamento de Fitopatología, del Colegio de Posgraduados (Montecillos, Texcoco).

3.3. METODOS.

3.3.1. Tecnicas analíticas

3.3.1.1. Determinación de azúcar residual

Determinación de glucosa

La determinación de glucosa se realizó mediante el kit del método de Merck test. La determinación de glucosa por este método se encuentra descrito en cada kit.

Tabla 6

Principales pathovares y origen de las cepas de *Xanthomonas campestris*, empleadas en este trabajo

Notación *	Pathovar	Hospedero	Estado	Año
1	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
2	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
3	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
4	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
5	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
6	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
7	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
8	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
9	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	México	1984
10	?	<i>Citrus aureantifolia</i>	Colima	1985
11	?	<i>Citrus aureantifolia</i>	Colima	1985
12	?	<i>Citrus aureantifolia</i>	Colima	1985
13	?	<i>Citrus aureantifolia</i>	Colima	1985
14	<i>juglandis</i>	<i>Juglandis sp.</i>	México	1983
15	<i>juglandis</i>	<i>Juglandis sp.</i>	Tabasco	1983
16	<i>manihotis</i>		Morelos	1985
17	<i>pruni</i>	<i>Prunus sp.</i>	Morelos	1982

* Esta es la notación que se empleará en el capítulo 6.

Tabla 7

Características morfológicas de los diferentes pv. de *Xanthomonas campestris*

Cepa (pv)	Características de las colonias		
	Tipo	Color	Diámetro* (cm)
1-10 (<i>campestris</i>)	Viscosa, convexa bordes lisos	Amarillo brillante	0.2 - 0.4
14-15 (<i>juglandis</i>)	Viscosa, convexa bordes lisos	Amarillo brillante	0.3 - 0.4
16 (<i>manihottis</i>)	Viscosa, convexa, bordes lisos	Crema brillante	0.3 - 0.4
17 (<i>pruni</i>)	Viscosa, convexa, bordes lisos	Amarillo brillante	0.4
10 (?)	Viscosas convexas bordes lisos	Amarillas brillantes	0.1 - 0.3
11 (?)			
13 (?)			
12 (?)	Viscosa, poco convexa bordes lisos	Amarillo opaco	0.05 - 0.1

* Determinados en cajas petri con medio YM, a las 48 h de incubación.

3.3.1.2 Determinación de sacarosa (Metodo DNS, β -fructosidasa)

La sacarosa, o azúcar de caña, es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa. A diferencia de muchos disacáridos y oligosacáridos, la sacarosa no contiene átomo de carbono anomérico libre. La sacarosa, por tanto, no experimenta mutarrotación ni reacciona con la fenilhidracina para formar osazonas y no es un azúcar reductor. Sin embargo, presenta la ventaja que se hidroliza con mayor facilidad que otros disacáridos.

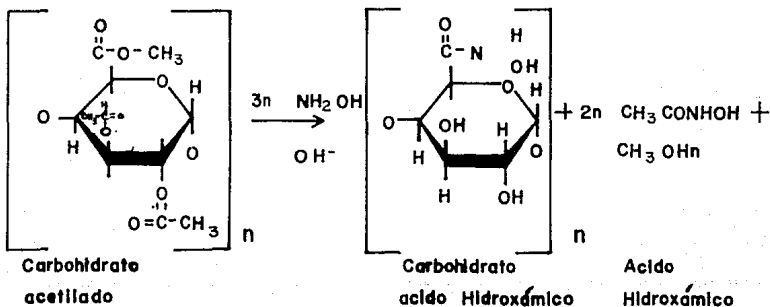
Este método se basa en la hidrólisis enzimática del disacárido para producir una molécula de glucosa y una de fructosa. El monosacárido se cuantifica colorimétricamente a una longitud de onda de 540 nm después de la adición del reactivo cromogénico.

Los detalles de esta técnica se encuentra descritos por Galindo *et al* (1986).

3.3.1.3 Determinación de radicales acetilos

Reacción acida hidroxámica (Mc Comb y Mc Cready, 1957)

Esta técnica se basa fundamentalmente en la determinación colorimétrica del ácido acetohidroxámico que se forma por las siguientes reacciones:

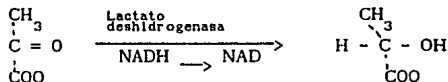


A temperaturas bajas, el grupo éster del carbohidrato con la hidroxilamina alcalina produce ácido hidroxámico. El carbohidrato ácido hidroxámico forma con los iones férricos un complejo insoluble. Cuando el ácido acetohidroxámico se produce por los grupos acetilos secundarios, se forma un complejo rosa soluble que se detecta colorimétricamente. Esta técnica es aplicable en general a polímeros acetilados.

La manera de preparar los reactivos y la descripción detallada de la técnica ha sido publicado por Mc Comb y Mc Cready (1957) y por Ramírez (1987).

3.3.1.4. Determinación de ácido pirúvico

El ácido pirúvico se determina enzimáticamente, mediante el decremento en la absorbancia a 340 nm por el NAD^+ formado cuando se reduce una mol de piruvato al lactato, en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa:



La forma detallada de llevar a cabo esta técnica se encuentran descritas en las publicaciones de Hadjivassiliou y Rieder (1968) y de Ramírez (1987).

3.3.1.5. Determinación de humedad

La determinación de humedad se realizó como lo ha descrito Galindo *et al* (1986).

3.3.1.6. Determinación de cenizas

La determinación de las cenizas se realizó como se describe en la referencia de Galindo *et al* (1986).

3.3.1.7. Determinación de nitrógeno

La determinación del nitrógeno se realizó mediante la técnica del Micro Kjeldahl. El procedimiento detallado se puede consultar en el reporte de Galindo *et al* (1986).

3.3.1.8. Espectroscopía de infrarrojo.

Cada polímero fue analizado mediante espectroscopía de infrarrojo, mediante el método de la pastilla de bromuro de potasio. Detalles de la técnica se encuentran descritos en la literatura (Ramírez *et al*, 1988).

3.4. METODOLOGÍAS GENERALES

3.4 .1. Conservación de las cepas en tubo inclinado con agar suave

1. Preparar un tubo con 20 mL del medio YM y dejar que solidifiquen en posición inclinada.
2. Preparar 5 mL del medio YM agar suave (0.8 %) y esterilizar.
3. Agregar 5 mL de agar suave al tubo inclinado y dejar solidificar en posición inclinada.
4. Tomar 3 azadas de la muestra y estriar sobre el agar suave del tubo.
5. Incubar a 29°C durante 48 h.

3.4.2. Determinación de biomasa (D.O.)

- a) En un matraz aforado de 50 mL se pesa 1 g del caldo de fermentación (antes del tratamiento térmico) se afora y se agita.
- b) La densidad óptica se lee en el espectrofotómetro a 565 nm. de absorbancia, utilizando agua destilada como blanco.
- c) Se toman 5 mL de ésta muestra y se centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos.
- d) El sobrenadante se lee en el espectrofotómetro, como se indica en el paso b.
- e) A ésta lectura se le resta la primera y el resultado representa la densidad óptica debido a las células bacterianas.

3.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.5.1. Pruebas de producción en matraz bafleado

- a) Se siembra la bacteria en un matraz de 250 mL que contenga 50 mL de medio YM estéril.
- b) Se deja crecer durante 48 h a 29°C y 200 rpm.
- c) Se toma una azada de inóculo y se estría en cajas con medio YM sólido para corroborar que el inóculo no se encuentre contaminado.
- d) Al inóculo del matraz Erlenmeyer se transfieren 10 mL en un matraz bafleado de 500 mL que contiene 100 mL de medio de producción.
- e) Se incuba a 29°C por 48 h a 200 rpm y se repite el paso c.
- f) Se mide la viscosidad del caldo de fermentación en el viscosímetro Brookfield.
- g) Se procesa el caldo de fermentación para la obtención y cuantificación del polímero.

3.5.2. Fermentación en equipo de 2 Litros

a) Obtención de inóculos

De la cepa almacenada en tubos inclinados (slant) se tomaron tres azadas y se inocularon en un matraz de 500 mL con 104.5 mL de medio YPD

(para conocer la composición del medio ver anexo 1)(10 % del volumen de trabajo en el fermentador de 2 litros) previamente esterilizado.

Después de incubar los matraces, se tomó una muestra en condiciones de esterilidad, a la que se le determinó la densidad óptica. Para comprobar la pureza del cultivo de cada matraz, se les realizó una tinción de Gram para su observación en el microscopio.

El criterio para la selección del inóculo en cada fermentación fue el siguiente: la densidad óptica total del cultivo debería estar en el rango de 0.17 - 0.20 (1 g de caldo/ 50 mL de agua) y las tinciones de Gram deberían presentar estrictamente un cultivo uniforme de bacilos gram negativos típicos de *X. campestris*.

b) Fermentación

Una vez seleccionado el inóculo, este se transfirió en condiciones estériles al fermentador, el cual tenía medio de producción previamente esterilizado. El volumen total del fermentador fue de 1045 mL.

Las condiciones generales de operación fueron las siguientes: Temperatura 29°C, pH.7 (controlado con NH₄OH al 50 % o con KOH dependiendo del medio empleado), Agitación: 100 a 1000 rpm, Aireación: 1.0 vvm.

El seguimiento de las fermentaciones se realizó mediante muestreos a intervalos de entre 6 y 12 horas.

Como criterio para suspender las fermentaciones se consideró lo siguiente:

- El nivel de la concentración residual de sacarosa en el medio de cultivo (2 +/- 1 g/L).
- Estabilización de las lecturas de viscosidad del caldo de fermentación.
- La tendencia del pH: incrementarse por arriba del neutro sin la adición de hidróxido de amonio.
- Disminuciones drásticas de la D.O.

3.5.3. Tratamiento enzimático

Una vez finalizada la fermentación, el caldo de fermentación fué sometido a un tratamiento enzimático, el cual se llevo a cabo en las siguientes condiciones.

pH: 7.0 - 8.0

Temperatura: 45°C

Agitación: 500 - 100 rpm

Una vez alcanzada la temperatura, se agrega 0.5 g de la enzima HT-proteolítica y 0.5 g de clearenzime (Galindo *et al*, 1986).

3.5.4. Tratamiento térmico del caldo de fermentación

Después del tratamiento enzimático, se ajustó el pH a 5.5, el caldo se sometió a un tratamiento térmico a 110°C durante 15 minutos. Este, por una parte, pasteuriza el caldo, desactiva a las enzimas y también confiere mejores propiedades reológicas al producto.

3.5.5. Determinación de viscosidad aparente en el viscosímetro Brookfield

La viscosidad se define como la resistencia a fluir y es causada por la fricción interna del fluido. El viscosímetro Brookfield basa su funcionamiento en el principio de la viscosimetría rotacional; es decir, que la viscosidad es medida por la fuerza rotacional requerida para hacer girar una aguja que se encuentra sumergida en un fluido a una velocidad constante. La fuerza rotacional es proporcional a la resistencia sobre el vástago sumergido.

Procedimiento:

- a) Se coloca en el viscosímetro (Brookfield modelo LVT) la aguja número 4 para determinaciones de soluciones con viscosidades altas.
- b) Se coloca en una probeta de 4 mL el caldo proveniente de la

- c) Se sumerge la aguja dentro de la muestra cuidando que el nivel de ésta coincida con el nivel que tiene marcado la aguja.
- d) Se prende el viscosímetro con el clutch sostenido y después de encendido, se suelta.
- e) Se deja que el señalador se estabilice en la lectura.
- f) Se sostiene el clutch nuevamente para mantener el señalador en la lectura, se apaga y se toma la lectura que indica el señalador y se suelta el clutch.
- g) Con el clutch sostenido, se sube la aguja para sacar la muestra y se lava con agua destilada.
- h) La lectura obtenida se multiplica por un factor (200 para 30 rpm), que fué calculado por el fabricante en función la geometría de la aguja para obtener la viscosidad aparente en centipoises (cps).

Nota:

Las mediciones de viscosidad del caldo de fermentación se efectúan a 30 rpm.

3.5.6. Obtención del polímero en polvo

Para la determinación de la concentración total del producto al final de la fermentación, el caldo se sometió a un tratamiento de purificación (ver sección 3.5.3), posteriormente se precipitó en presencia de 2 % (peso/peso polímero) de KCl como electrolito. Las fibras se lavaron, secaron, molieron y finalmente se tamizaron (malla 60: 0.25 mm; 100: 0.14 mm; 200: 0.07 mm).

3.5.7. Determinación de la concentración del polímero

- a) El caldo de fermentación se ajusta a pH de 6.
- b) Se toman 10 mL del caldo de fermentación y se agrega KCl al 2 % en relación con el rendimiento promedio de goma.
- c) Se agregan (con agitación constante) 20 mL de alcohol isopropílico.
- d) Con ayuda de una coladera, se escurre completamente la goma.

- e) Se seca en la estufa.
- f) Se pesa en balanza analítica.

3.5.8. Determinación de reogramas de soluciones de productos resuspendidos

Se preparan soluciones de goma xantana al 1 % (base seca) y como electrolito se agregó KCl también al 1 % (peso/volumen). Para efectos de comparación se preparó una solución de "Keltrol" (goma xantana comercial) a la misma concentración de goma y electrolito.

A estas soluciones se les determinó la viscosidad en el viscosímetro Brookfield LVT usando la aguja número 3. Las determinaciones de cada muestra se realizaron en todo el rango de velocidades disponibles en el viscosímetro (0.3, 0.6, 1.5, 3, 6, 12, 30 y 60 rpm.). La lectura obtenida para cada velocidad en % de la carátula, se multiplico por un factor de conversión a centipoises (cps), el cual es una función de la geometría del viscosímetro y está dado por el fabricante.

3.5.9 Determinación de los índices reológicos (n y K).

Los índices reológicos de las soluciones de xantana resuspendida, se obtuvieron empleando el programa de computadora "Reología de fluidos, Ley de la potencia; software" (Brito, 1988). Este programa considera la geometría de las agujas del viscosímetro Brookfield (LVT), realiza un análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos del viscosímetro y efectua el cálculo de los índices de acuerdo a la ecuación de la "Ley de la potencia".

Para efectuar el programa se indicó los siguientes datos:

Constante del instrumento: 673.7

Número de datos: 2 < N < 6

Nivel de confianza: 99

Valor de T-alpha/2: 3.717

Long. efect.

Aguja # 1.....7.453

Aguja # 2.....6.121

Aguja # 3.....4.846

Aguja # 4.....3.396

Radio del bob (cm):

Aguja # 1.....0.9421

Aguja # 2.....0.5128

Aguja # 3.....0.2941

Aguja # 4.....1. 588

Una vez introducido los valores de las velocidades (rpm) y de las lecturas, el programa calculó los índices, indicándose de la siguiente manera:

Fluido:

Ley de Potencia: Índice de consistencia $K= 7.837238 N \cdot s^n/m^2$

Índice de flujo $n= .3462109$

Coef. de correlación $r=0.9976412$

Vel(RPM)	Lect	v(s-1)	T(N/m2)	visco(Pa.s)
.3	3.3	.1814501	4.13173	23.92101
.6	4.8	0.3629	6.00979	15.2044
1.5	5.8	0.9072505	7.26183	8.352192
3	7.8	1.814501	9.765908	5.308727
6	9.5	3.629002	11.89438	3.374273
12	12.8	7.258004	16.02611	2.144718
30	17.2	18.14501	21.53508	1.178152
60	21.4	36.29003	26.79365	0.7488436

CAPITULO 4

OBJETIVOS

General:

Aislamiento, selección y caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas campestris* (X. c.)

Particulares:

- Aislamiento, selección e identificación de los microorganismos productores de goma xantana.
- Evaluación de cepas nativas mediante pruebas de producción en matraces.
- Caracterización de las cepas más prometedoras así como de sus polímeros en fermentadores de 2 L.

RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 SELECCION DE CEPAS NATIVAS DE *Xanthomonas*.

5.1.1 Caracterización de la producción de la goma xantana en matraces bafleados.

Las bacterias del género de las *Xanthomonas* son fitopatógenos que presentan la mayor incidencia en el huésped durante la época de alta humedad. Por ello, su aislamiento y consecuentemente el reconocimiento como agente se restringe solo a temporadas de alta precipitación pluvial (Kuan *et al*, 1986).

En vista de que el presente estudio se inició durante la primavera, época en la cual no se presenta precipitación pluvial, se inició el estudio evaluando 17 aislamientos de bacterias del género de las *Xanthomonas* de la colección del proyecto de fitobacterias del Colegio de Posgraduados. La evaluación de las cepas nativas se realizó mediante pruebas denominadas "de producción" en matraces bafleados.

En un estudio previo se reportó la producción de goma xantana en matraces Fernbach de 2 cepas nativas (Torrestiana *et al*, 1990). Sin embargo, se ha establecido que la producción del polímero así como de las características reológicas de los productos obtenidos en matraces bafleados son particularmente más parecidos a lo que se obtiene en un fermentador agitado (Galindo *et al*, 1992). El empleo de los matraces bafleados ofrece además, las siguientes ventajas : incremento en la producción de la goma debido a la mayor eficiencia en el mezclado y mayor transferencia de oxígeno (Galindo *et al*, 1992; Yamada *et al*, 1978). El empleo de este tipo de matraces es más adecuado para los estudios de escalamiento. Por otra parte se pueden realizar un mayor número de pruebas en poco espacio (Galindo *et al*, 1992).

En la producción de polisacáridos se presenta una profunda interrelación e interdependencia entre la reología, los fenómenos de transporte y las condiciones ambientales que determinan la cinética de producción (Galindo, 1985). La caracterización de los parámetros de la producción así como de las características reológicas del producto son de vital importancia, con el fin de seleccionar cepas que puedan ser potencialmente empleadas en escalas piloto y/o industrial.

En la tabla 8 se muestran los resultados de las pruebas de producción en matraces bafleados para cada una de las cepas. En la figura 10 se muestran, de forma comparativa, los resultados de la viscosidad aparente final del caldo de fermentación (con y sin tratamiento térmico) de las 17 cepas evaluadas y su comparación con la cepa E2. Se obtuvo un amplio rango en los valores de viscosidad aparente. Las cepas podrían agruparse en tres grupos: las que producen polisacáridos con viscosidades aparentes en el caldo de fermentación entre 200 y 400 cps; las cepas que producen de 500 a 900 cps y aquellas que producen más de 900 cps. Dentro de éstas últimas solo se encuentran la cepa E2 y la cepa 12. Es importante denotar que la cepa 12 fué la única cepa nativa que produjo un caldo cuya viscosidad aparente fué superior al de la cepa E2.

La cepa E2 ha sido caracterizada como una cepa productora de alta concentración de polímero (Galindo *et al*, 1992).

De acuerdo con los resultados (Tabla 8, figura 10), se procedió a seleccionar las cepas que podrían ser consideradas como potenciales productoras. Se ha indicado que el valor de la viscosidad aparente del caldo de fermentación, obtenido en matraces puede ser un parámetro para la selección inicial de cepas productoras de goma xantana (Cooke y Broderick, 1989).

La selección inicial de las cepas se llevó a cabo considerando la viscosidad aparente del caldo de fermentación. Se seleccionaron aquellas cepas cuya viscosidad final fuera mayor o igual a 900 cps. Se consideró también la concentración final de goma, la cual debería ser igual o mayor a la producida por la cepa E2. Tomando en cuenta ambos parámetros, las cepas seleccionadas se muestran en la figura 11.

Tabla 8

Resultados de las pruebas de producción en matraces bafleados de las cepas nativas de *X. campestris*.

Cepa No.	pathovar	Viscosidad aparente C/rr (cps)	Viscosidad aparente C/rr (cps)	Concentración (g/L)	Producción específica (cps/D.O)	Productividad (g/L/h)	Rendimiento sobre Asúcar Asúcar (%)	Rendimiento sobre Asúcar consumida (%)
1	<i>campestris</i>	453 * 52	1,040 * 160	6.6 * 0.4	17,561 *3,026	0.11 *0.02	27 *0.5	23.7
2	<i>campestris</i>	120	200	3.4 * 0.5	2,683 *274	0.05	16.3	16.3
3*	<i>campestris</i>	730 *230	1,580 *220	7.9 *1.3	63,605 *48,724	0.16 *0.3	31 *6.3	34 *9
4	<i>campestris</i>	720 *40	1,300 *100	8.7 *0.3	23,208 *542	0.18 *0.005	36.4 *1	52 *1
5	<i>campestris</i>	783 *57	1,366 *206	8.8 *0.2	26,742 *5,565	0.182	36.5 *0.6	65 *4
6	<i>campestris</i>	460 *220	1,180	7.7 *0.6	673,735 *63735	0.16 *0.02	32 *3	49 *1
7	<i>campestris</i>	433 *340	1,110 *410	5.6 *0.1	10,871 *4054	0.1 *0.015	23.1 *0.4	36 *9
8	<i>campestris</i>	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>campetris</i>	400	1,680	8.9	5,298	0.13	37	
10 ^b	?	910 *137	1,880 *300	9 *1.8	7,223 *2000	0.16 *	39 *8	62 *10
11	?	900 *80	3,200 *746	11 *0.4	10,659 *100	0.22	46 *2	52.3 *2
12 ^b	?	3,700 *20	4,800 *27	15.3 *0.2	91,366 *634	0.225	63.75	66.52
13	?	700 *20	1680	9 *0.5	19,405 *1845	0.19	38 *2	45 *24
14	<i>juglandis</i>	-	-	-	-	-	-	-
15*	<i>juglandis</i>	993 *82	1,330 *350	7.26 *0.6	16,864 *226	0.12	30 *2	41.5 *6
16	<i>manihotis</i>	930 *150	2,400	8.96 *0.3	12,470 *1930	0.186	37.32 *2	50 *2
17	<i>pruni</i>	320 *20	710 *10	7.36	4,929 *334	0.108	30.66	
E2	<i>campestris</i>	1,140 *580	2,400	9.95 *2	19,954 *5,500	0.207 *0.04	41.54 *8.4	66.11 *2

Número de pruebas por experimento: dos, con la excepción de:

* triplicados

^b cuádruplicados

Los parámetros en donde no se indica la desviación estándar, no presentaron diferencias en los valores.

(-) No presentó crecimiento en la prueba de producción.

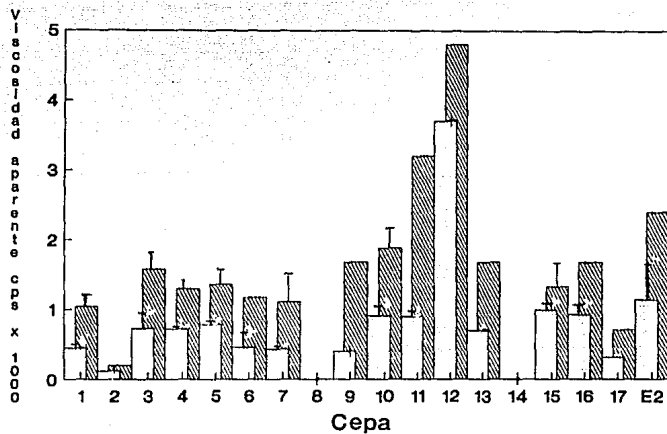


Figura 10.

Viscosidad aparente final de los caldos de fermentación producidos por las cepas nativas. Antes del tratamiento térmico (□). Después del tratamiento térmico (▨).

Destaca la cepa 12 ya que el caldo de fermentación presentó una viscosidad aparente tres veces superior que la del caldo de la cepa E2.

Otra cepa que es interesante resaltar es la 11 (figura 11). La viscosidad aparente del caldo producido por esta cepa, después del tratamiento térmico, se incrementó considerablemente. Superando el valor del caldo de fermentación de la cepa E2, el cual fue tratado bajo las mismas condiciones.

Con respecto a la concentración de polímero, la cepa 12 sobresale debido a que produce aproximadamente 40 % más que la E2 (figura 11).

La cepa 16, la cual corresponde al *pv. manihotis*, fué considerada debido a las características morfológicas que presenta (tabla 7) y por que produce un caldo de fermentación color crema y un producto más blanco. Al ser resuspendido, la suspensión de este polímero presenta mayor claridad. Estas características hacen que el producto pueda tener alguna ventaja en su aplicación final. Sin embargo, esta cepa no representa tener ninguna ventaja (en términos de producción de goma) con respecto a la cepa E2 debido a que produce menor cantidad del polímero (figura 11).

Debido a que la viscosidad final del caldo de fermentación (y en general de soluciones de polisacáridos) son una función de la concentración del polímero y de las características químicas y moleculares de la cadena polimérica (peso molecular, y su distribución, radicales pirúvicos y/o acetilos), se determinó el poder viscosificante del producto de cada una de las cepas como un criterio adicional de selección.

La capacidad viscosificante se ha empleado como un índice de la calidad de la goma xantana producidas por varias cepas (Torrestiana *et al*, 1990; Ramírez *et al*, 1987). La capacidad viscosificante se ha definido como la viscosidad generada por unidad de concentración de goma. Sin embargo, como la viscosidad es una función exponencial de la concentración (por lo menos en el rango de concentraciones por debajo de los 15 g/L) (Galindo, 1985). El índice de capacidad viscosificante

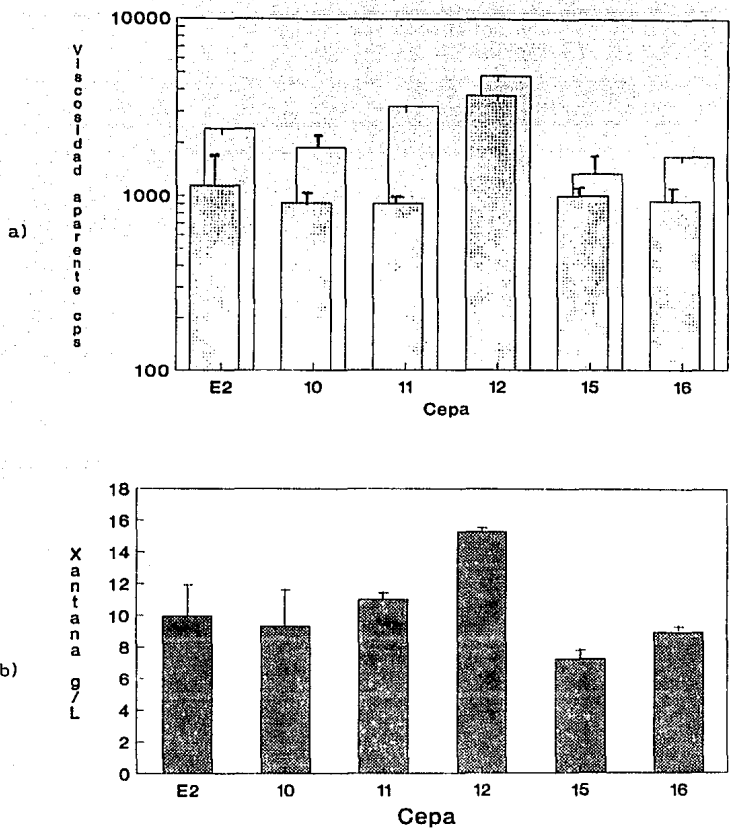


Figura 11.

a) Viscosidad aparente final del caldo de fermentación. (▨) Antes del tratamiento térmico; (□) Después del tratamiento térmico.

b) Concentración de xantana, producida por las cepas nativas seleccionadas y de la cepa E2.

se expresará como el logaritmo de la viscosidad dividido entre la concentración de goma (Galindo *et al*, 1992; Salcedo *et al*, 1992).

La figura 12 muestra los valores de la capacidad viscosificante de las cepas nativas. Los polímeros de las cepas 15 y 16 muestran valores mayores respecto al de la cepa E2. El polímero de la cepa 10 presentó prácticamente la misma capacidad viscosificante que la cepa E2. La cepa 12, presentó caldos con la capacidad viscosificante más baja.

En polímeros como la xantana, la gelana, el alginato el hialurinato y la rhamsana, la "calidad reológica" puede estar asociada a cambios en el peso molecular, al índice de polidispersidad, a la rigidez de la cadena , así como de la fuerza iónica de la solución (Smidsrod y Haug, 1971; Morris y Ross-Murphy, 1989).

Se ha demostrado que la fuerza iónica no cambia durante la corrida de una fermentación cuando no se adicionan iones para el control del pH (Torres,1990). En las pruebas de producción en matraces bafleados el pH no se controla durante el transcurso de la fermentación, por lo que es factible que los resultados obtenidos de la capacidad viscosificante esten determinados por los pesos moleculares de los polímeros.

Por otra parte, datos no publicados han indicado que la capacidad viscosificante es un buen índice de calidad solo para concentraciones menores a los 8 g/L, aún cuando se ajuste la fuerza iónica. En este sentido, la capacidad viscosificante como un índice de "calidad reológica" fue de valor muy limitado para la caracterización del polímero de las cepas nativas. Hubiera sido necesario realizar una dilución y llevar a cabo las determinaciones de viscosidad en el rango adecuado de concentraciones.

La producción de xantana en matraces bafleados puede ser considerado como un método rápido y sencillo para el "screening" de diferentes cepas productoras de exopolímeros. Sin embargo, en tales condiciones no es posible controlar el pH de la fermentación. Es bien conocido que es muy importante controlar el pH durante el transcurso de la fermentación, ya que afecta importantemente la concentración del polímero producido (Moraine y Rogovin, 1971).

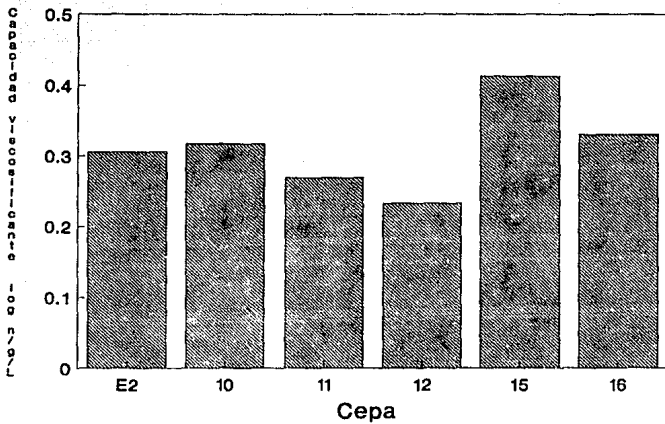


Figura 12.

Capacidad viscosificante (log viscosidad/ concentración de goma) del polímero en el caldo de fermentación de las cepas nativas y de la cepa E2.

En la Tabla 9 se muestran los valores finales del pH de los caldos de fermentación de las diferentes cepas. Con excepción del caldo de fermentación de la cepa E2, el pH final de los caldos fué entre 5.5 y 6.5. Esto sugiere que es posible mejorar la producción de la goma, en fermentaciones donde se controle el pH.

Con respecto a la producción específica (viscosidad generada por D.O de células bacterianas), la cepa 12 presentó valores superiores a los de la cepa E2. Las otras 4 cepas mostraron valores inferiores (figura 13). En la figura 13 se indica además la productividad (g de xantana/litro de caldo-h de fermentación) de cada una de las cepas. En este parámetro, se distinguen las cepas 11 y 12, ya que fueron superiores a la presentada por la cepa E2. Estas dos cepas también presentaron mayor rendimiento en base al azúcar inicial (figura 14).

De acuerdo con el rendimiento del producto en base al azúcar consumida, las cepas 12 y 10 mostraron el mismo porcentaje que la cepa E2 (Figura 14). Las cepas 11, 15 y 16 presentaron menor rendimiento del producto (entre el 17 y 32 % menos) que la cepa E2 (figura 14).

5.1.2 Caracterización reológica de los polímeros en suspensión.

El polímero que produce *Xanthomonas campestris* (goma xantana) imparte propiedades no-Newtonianas a la solución cuando se le disuelve en agua. Genera fluidos de comportamiento pseudoplástico ó adelgazante. Es decir, la viscosidad decrece con el incremento en la rapidez de deformación. Dentro de ciertos rangos de temperatura, pH y concentración de sales, la viscosidad aparente del polímero en solución presenta una elevada estabilidad (Margaritis y Pace, 1985; Galindo, 1985; Galindo et al, 1989).

Se caracterizó la reología de los productos resuspendidos de cada una de las cepas. La comparación se llevó a cabo respecto al producto de la cepa E2 y a un producto comercial ("Keltrol").

Tabla 9

pH de los caldos de fermentación obtenidos en matraces bafleados mediante el cultivo de las cepas nativas y de la cepa E2

Cepas	pv	pH*
E2	<i>campestris</i>	7.0
10	?	6.8 ± 0.2
11	?	6.8
12	?	6.5 ± 0.2
15	<i>juglandis</i>	5.8 ± 0.5
16	<i>manihotis</i>	5.9

*Obtenido en el medio de producción, incubados a 29 °C, 48 h a 200 rpm.

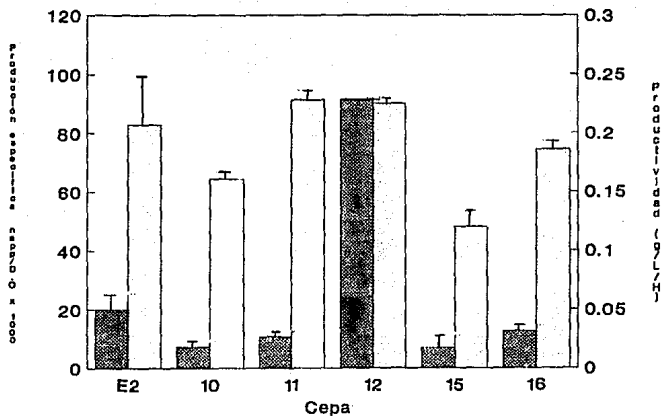


Figura 13.

Producción específica (■) y productividad (□) presentada por las cepas nativas seleccionadas y por la cepa E2.

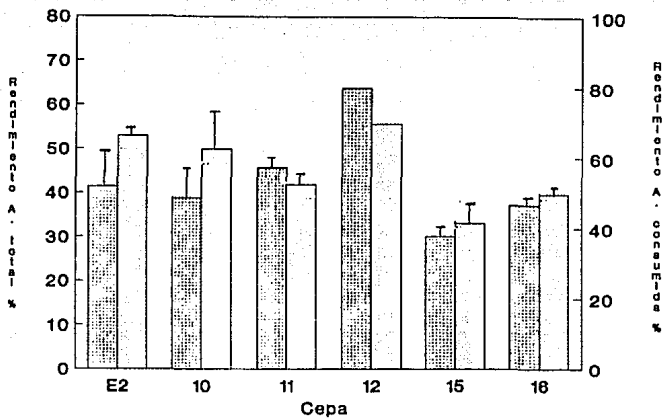


Figura 14.

Rendimiento (en base al azúcar inicial y al azúcar consumida) del polímero producido por las cepas nativas y de la cepa E2, en las pruebas de producción en matraces bafleados. En base al azúcar total (▨). En base al azúcar consumida (□).

En la figura 15 se presentan los perfiles de la viscosidad aparente a diferentes gradientes de deformación de los polímeros de las cepas correspondientes al *pv. campestris*. Los productos de la cepas 3 y 4 presentaron perfiles con viscosidades menores a las de la cepa E2. El polímero de la cepa 1 presenta un perfil de viscosidad mayor al de la cepa E2, especialmente en altos gradientes de deformación. Sin embargo, con esta cepa no se obtuvieron resultados satisfactorios en las pruebas de producción, debido a la baja concentración del polímero producido y la baja viscosidad generada en el caldo de fermentación (600 cps).

En la figura 16 se muestran los resultados de los productos de las cepas obtenidas de los aislamientos de Tecoman, Colima (cepas 10 y 11). Ambos productos presentaron prácticamente las mismas viscosidades aparentes que la cepa E2. Adicionalmente, los productos presentaron viscosidades aparentes más altas a los diferentes gradientes de deformación que el producto comercial "Keltrol".

El perfil de viscosidades del polímero de la cepa 13 fué similar al de la cepa E2 (figura 17). Por otra parte, el producto de la cepa 12 presentó valores superiores de viscosidad aparente, sobre todo en el rango de gradientes de deformación bajos. Para gradientes de deformación altos, las viscosidades aparentes fueron similares a las del producto de la cepa E2. El producto de la cepa 12 presentó además, un perfil de viscosidades aparentes superior al del producto comercial "Keltrol".

En la figura 18 se presenta el reograma del polímero de la cepa 15, que corresponde al *pv. juglandis*. A bajos gradientes de deformación, el perfil de viscosidades es ligeramente mayor al de la cepa de trabajo. Sin embargo, a altos gradientes de deformación, la viscosidad aparente es menor que la del polímero de la cepa E2.

Los perfiles de viscosidad del producto de la cepa 16 (correspondiente al *pv. manihotis*) y de la cepa 17 (que pertenece al *pv. pruni*) se presentan en la figura 19. A bajos gradientes de deformación, las viscosidades aparente del producto de la cepa 17, fueron inferiores a los que presentó el producto de la cepa E2 y el

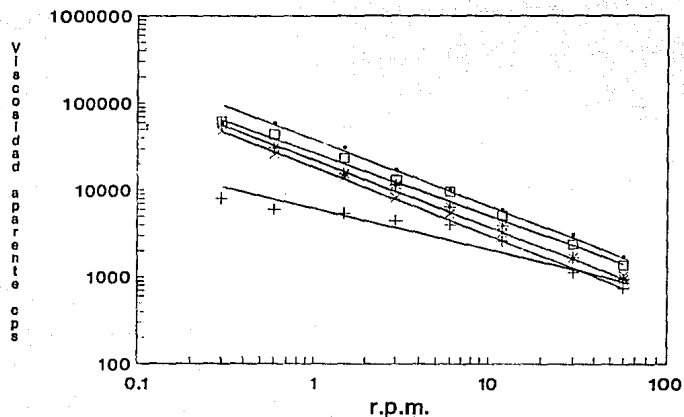


Figura 15.

Reograma de los polímeros de las cepas nativas, correspondientes al *pv campestris* [Cepas (•) 1, (+) 3 y (*) 4] y su comparación con el reograma del polímero de la cepa E2 (□) y del producto comercial "Keltrol" (×). (Los polímeros de las cepas nativas y de la E2 no fueron sometidos a ningún tratamiento de purificación. Soluciones al 1% del polímero y 1% de KCl.)

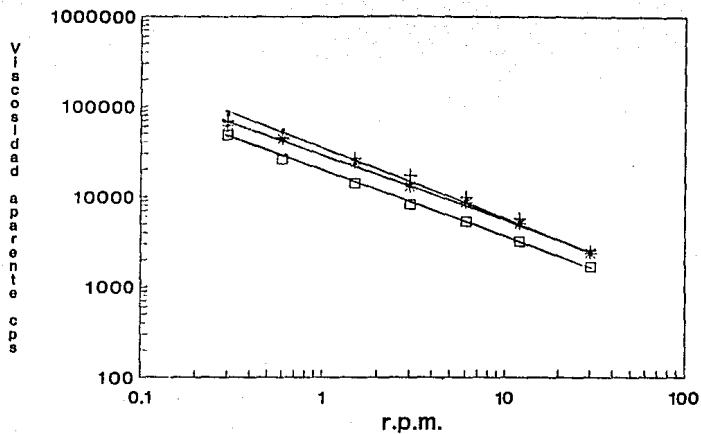


Figura 16.

Reograma de los polímeros de las cepas obtenidas en Tecoman, Colima [cepas 10 (·), 11 (+)] y su comparación con el polímero de la cepa E2 (*) y el producto comercial "Keltrol" (□) (Los polímeros de las cepas nativas y de la E2 no fueron sometidos a ningún tratamiento de purificación. Soluciones al 1% del polímero y 1% de KCl.)

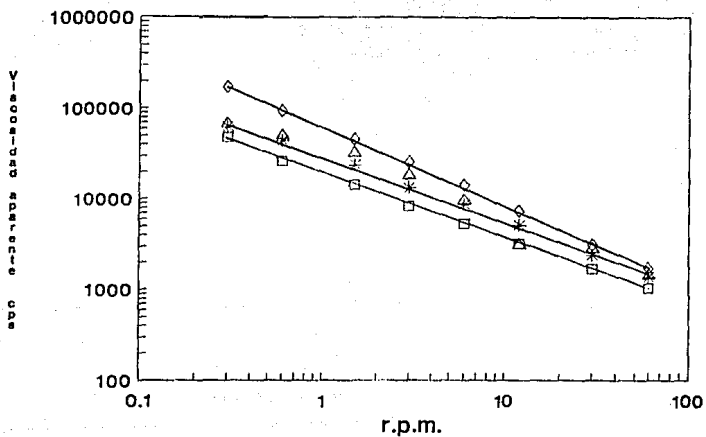


Figura 17.

Reograma de los polímeros de las cepas obtenidas en Tecoman, Colima [cepas 12 (◇), 13 (△)] y su comparación con el polímero de la cepa E2 (*) y el producto comercial "Keltrol" (□) (Los polímeros de las cepas nativas y de la E2 no fueron sometidos a ningún tratamiento de purificación. Soluciones al 1% del polímero y 1% de KCL).

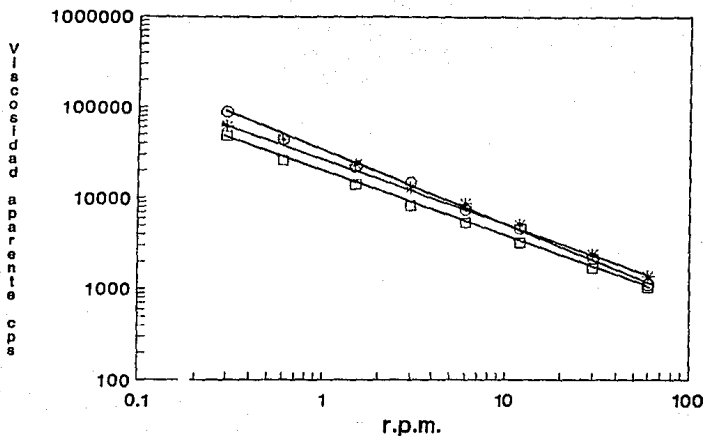


Figura 18.

Reograma del polímero producido por la cepa correspondiente al pv. *Juglandis* (Cepa 15 (○) y su comparación con el polímero de la cepa E2 (*) y el producto comercial "Keltrol" (□) (Los polímeros de las cepas nativas y de la cepa E2 no fueron sometidos a ningún tratamiento de purificación. Soluciones al 1% del polímero y 1% de KCL).

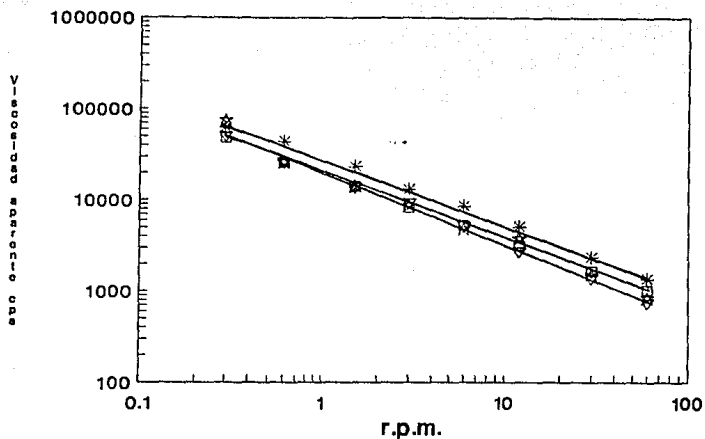


Figura 19.

Reograma de los polímeros producidos por las cepas *X. campestris* pv. *manihotis* [16 (Δ)] y *X. campestris* pv. *pruni* [17 (★)] y su comparación con el polímero de la cepa E2 (○) y el producto comercial "Keltrol" (□) (Los polímeros de las cepas nativas y de la E2 no fueron sometidos a ningún tratamiento de purificación. Soluciones al 1% del polímero y 1% de KCL).

producto comercial "Keltrol". A altos gradientes de deformación, las viscosidades aparentes fueron similares a las del producto "Keltrol". El polímero de la cepa 16 presentó el fenómeno contrario, a gradientes de deformación bajos se presentaron valores de viscosidad aparente muy similares a las del producto "Keltrol". A gradientes de deformación altos, la viscosidad aparente fué menor a la del producto "Keltrol". Sin embargo, ambos perfiles mostraron viscosidades aparentes inferiores a las del producto de la cepa E2 (figura 19).

El comportamiento reológico de la goma xantana, puede ajustarse al modelo reológico de la "ley de la potencia", que establece :

$$\tau = K \dot{\gamma}^n$$

Donde τ es el esfuerzo de corte (din/cm^2), $\dot{\gamma}$ es la rapidez de deformación (seg^{-1}), K el índice de consistencia ($\text{din}/\text{seg}^n / \text{cm}^2$) y n es el índice de flujo o pseudoplasticidad (adimensional). Mientras más grande es el valor de K más viscoso es el fluido, a menor valor de n el fluido es más pseudoplástico (se adelgaza más con respecto a la rapidez de deformación) (Galindo, 1985; Galindo *et al.*, 1989).

Para caracterizar completamente la reología de los polímeros en suspensión, se procedió a obtener el índice de consistencia ("K") y el índice de flujo o pseudoplasticidad ("n"). En la tabla 10 se indican estos valores para las suspensiones de los polímeros producidos por las cepas seleccionadas.

El polímero de la cepa 12 presentó un valor superior de K y un valor inferior de n con respecto al polímero de la cepa E2. Esto significa que el polímero de la cepa 12 es un producto que produce mayor viscosidad y que genera un fluido mas adelgazante o pseudoplástico que el producto de la cepa E2.

Los polímeros de las cepas 10, 11 y 13 también presentaron índices reológicos superiores a los del polímero de la cepa E2 (Tabla 10). El polímero de la cepa 15 presentó el mismo valor en el índice de consistencia (K) que la cepa E2. Sin embargo, de acuerdo con el índice de flujo (n), el valor indica que el polímero de la cepa 15 es más

Tabla 10

Indices reológicos de las soluciones de los polímeros obtenidos de las cepas nativas de *X. campestris* y de la cepa E2.

Cepas (pv)	Indices reológicos*	
	K (N s ⁿ / m ²)	n (-)
E2	6.6	0.37
10	7.2	0.21
11	7.5	0.25
12	11.9	0.12
15 (<i>Juglandis</i>)	6.6	0.19
16 (<i>manihottis</i>)	3.7	0.32

*Determinados con el programa de computadora que realiza un análisis estadístico de los datos experimentales del viscosímetro y calcula los índices de acuerdo a la "Ley de la potencia" (Brito, 1988). Los polímeros obtenidos de las cepas nativas y de la E2 no fueron sometidos al tratamiento de purificación. Soluciones preparadas al 1% del polímero y 1% de KCl.

pseudoplástico que el producto de la cepa E2 (Tabla 10).

Con respecto al producto de la cepa 16 se observa que el índice de consistencia (K) es menor al del producto de la cepa E2, lo que significa que el polímero de la cepa 16 genera una viscosidad aparente menor que el polímero de la cepa E2. Además, que es un producto menos pseudoplástico debido a que presenta un valor de n mayor que el del producto de la cepa E2 (Tabla 10).

5.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas de *X. campestris*

La espectroscopía de infrarrojo (E.I) ha sido considerada como una herramienta potencial para el "screening" de microorganismos productores de polímeros (Ramírez, *et al*, 1988).

La principal finalidad de llevar a cabo la E.I fué la de inferir, de una forma rápida la posible conformación molecular así como la posible composición de los polímeros en cuestión. En la tabla 11 se presentan los números de onda correspondientes a las principales bandas que describen la vibración de los grupos funcionales del polímero de la cepa E2. En el espectro mostrado en la figura 20 se indican respectivamente los grupos funcionales que corresponden a cada banda.

En el anexo 2 se presenta detalladamente las principales diferencias entre las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas 10, 11, 12 , 15, 16 en comparación con el espectro de infrarrojo del polímero de la E2.

De acuerdo con el análisis de los espectros de infrarrojo se observó, que los polímeros de las cepas nativas presentaron bandas similares (en todo el rango de números de onda) a las que presentó el polímero de la E2. Esto sugirió que los polímeros de las cepas nativas pueden considerarse como xantanas "típicas"

En todos los espectros de las cepas denotadas como 10, 11 y 12, se observó mayor intensidad en la banda que corresponde al grupo funcional

Tabla 11

Descripción del E.I. del polímero de *Xanthomonas campestris*-E2.

Número de onda (cm^{-1})	Vibración del grupo funcional
1727	Carbonilo de acetilos
1629	Carbonilo de ácidos carboxílicos libres
1560-1511	Carbonilo de ácido pirúvico CH_3 del acetilo
1248	Vibración asimétrica del OH del CH_2OH terminal de los azúcares y probablemente indique además, la ramificación de la cadena principal.
1113	Asociación intermolecular (interacción entre grupos funcionales de diferentes cadenas).
1069	Interacción intramolecular (asociación entre grupos funcionales de la misma cadena).

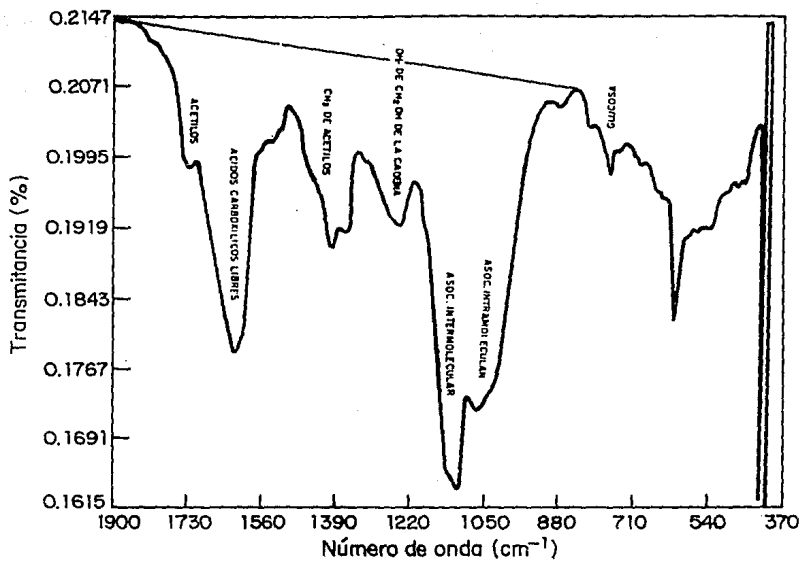


Figura 20.

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa *Xanthomonas campestris* E2.

de los radicales acetilos (1727 cm^{-1}), lo que sugiere que estos productos pueden contener mayor cantidad de estos radicales. Por otra parte, se sugiere que estos productos presenten una mayor asociación intramolecular (ver anexo 2; Tabla A-1, A-2 y A-3).

Tako y Nakamura (1984) establecieron, que los radicales acetilos contribuyen a una mayor asociación intramolecular de la cadena polimérica.

La fuerte asociación intramolecular producida por los radicales acetilos contribuyen al comportamiento no-Newtoniano en un amplio rango de concentraciones de la goma xantana. Las cadenas poliméricas se mantienen rígidas por la asociación intramolecular a bajos gradientes de deformación. La débil asociación intermolecular se puede mantener por la atracción de la asociación intramolecular, aún en altas concentraciones. Con el incremento en los gradientes de deformación, esta fuerte asociación disminuye (Tako y Nakamura, 1984). El incremento de la viscosidad aparente y de la viscoelasticidad dinámica con la temperatura puede deberse a la eliminación de la asociación intramolecular y a la formación de una asociación intermolecular temporal entre las cadenas (Tako y Nakamura, 1984).

Finalmente, a los espectros de infrarrojo se les realizó un análisis detallado, determinando cocientes entre las bandas de mayor frecuencia. Con esto se pretendió establecer las principales diferencias sobre una base más cuantitativa. Se midió la intensidad de las bandas a 1737 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} y 1026 cm^{-1} , las cuales se designan como bandas A, B y C, respectivamente. La relación A/B permite establecer un parámetro útil, ya que está relacionada con la proporción entre grupos acetato y carboxilos de la molécula. El coeficiente B/C establece una relación entre los carboxilos de la molécula y el número de unidades de carbohidrato de la misma. En la tabla 12 se presenta el resultado de este análisis.

En una primera aproximación, se asumirá que mientras más cercanos estén estos datos a los de referencia, las muestras serán más parecidas y sean posiblemente de mejor calidad. Es evidente de los datos de la tabla 12, que los espectros de las cepas provenientes de Tecoman

Tabla 12

Análisis de los espectros de infrarrojo de los polímeros obtenidos en matraz bañeado de cepas nativas y su comparación con el polímero de la cepa E2.

Cepas (pathovar)	Relación de bandas			Banda 1065 cm ⁻¹ Area (cm ²)
	A/B	B/C	D/C	
<i>campestris</i> E2	0.38	0.81	1.08	33.6
10	0.68	0.90	1.07	51.0
11	0.43	0.88	1.15	36.5
12	0.65	0.64	1.10	13.7
15 (<i>juglandis</i>)	0.28	0.84	1.18	30.3
16 (<i>manihotis</i>)	-	-	-	-

A = Acetilos

B = Carboxilatos

C = Banda C-O Azúcares

D = CH₃ (Acetilos, pirúvicos)

(Colima) presentan valores iguales o superiores a los presentados por la cepa E2. Ello implica que podrían ser similares en su composición e inclusive que podrían presentar mayor concentración de ciertos radicales como es el caso de acetilos (relación de bandas A/B).

El área de la banda 1065 cm^{-1} da una idea de la asociación intramolecular; es decir, la interacción que existe entre grupos funcionales de la misma cadena. En la tabla 18 se observa que el área de la banda de los 1065 cm^{-1} es mayor para el polímero de la cepa 10 y que es menor en el de la cepa 12. Además, en el polímero de la cepa 10, presenta mayor interacción intermolecular (figura A-1).

Los resultados de esta primera etapa de caracterización indicaron de manera general, que las cepas analizadas tenían potencial para la producción de goma xantana.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Conclusiones (sección 5.1)

De acuerdo con las evaluaciones de las cepas nativas en las pruebas de producción empleando matraces bafleados, fué posible establecer lo siguiente:

1.- Se distingüé la cepa 12, la cual fue obtenida en Tecoman (Colima). Sin embargo, se desconoce el pv. al cual pudiera pertenecer dentro del género *Xanthomonas*, e inclusive debe confirmarse si pertenece a tal género. Las ventajas que presenta, con respecto a la producción del polímero son:

i) Produce 40% más de polímero con respecto a la cepa E2.

ii) Presenta mayor producción específica y mas alta productividad que la cepa E2.

iii) Presenta un perfil de viscosidades superior al que presenta el polímero de la cepa E2 e inclusive a un producto comercial, tanto a bajos como a altos gradientes de deformación.

iv) El polímero presenta un índice de consistencia (K) y un índice de flujo (n), mayor que el de la cepa E2. Por lo que genera un fluido más viscoso y más pseudoplástico.

v) De acuerdo a su espectro de infrarojo, el polímero puede presentar elevados contenidos de radicales acetilos.

2.- Se pueden considerar, además, las siguientes cepas como potenciales productoras de polímero:

a) Cepa 15 (pv. *Juglandis*).

Su producto al ser resuspendido, presenta elevada viscosidad a bajos gradientes de deformación y viscosidades iguales a la que presenta el producto comercial "Keltrol" en altos gradientes de deformación.

- b) Cepa 10 (Tecoman)
Cepa 11 (Tecoman-1)

Producen mayor concentración de polímero, mayor rendimiento y mejor productividad (11). Presentan perfiles de viscosidades igual al polímero de la cepa E2. Generan un fluido con índices de consistencia (K) ligeramente superiores al de la cepa E2.

- c) Cepa 16 (*manihotis*)

Aunque los datos referentes a la concentración de goma y viscosidad aparente del caldo de fermentación obtenidos de la fermentación en matraz son menores a la cepa E2, es posible considerarla como potencial debido a que produce un polímero que no presenta la pigmentación típica de la goma xantana, lo que podría proporcionar ventajas en su aplicación final.

3.- El análisis de los espectros de infrarojos indicó:

- a) Que los productos de las cepas provenientes de Tecoman, (Colima) presentan los mismos perfiles de bandas que se presentan en la cepa E2. Ello que implica que los productos pudiesen ser considerados como xantanas "típicas".
- b) Las cepas provenientes de Tecoman, presentan mayor intensidad relativa en la banda de los 1711 cm^{-1} . Banda que representa la vibración molecular de los radicales acetilos, lo que indica que los productos podrían presentar mayor porcentaje de tales radicales.
- c) Los productos de las cepas 10, 11 y 12 no presentan bandas definidas en el número de onda correspondiente a la vibración molecular de los radicales pirúvicos, lo que implica que estos productos o no contienen piruvato o presentarían niveles muy bajos de tales radicales

- d) La espectroscopía de infrarojo podría ser una herramienta útil para ser empleada como un método rápido para la identificación de bacterias productoras de goma xantana. Con estudios más detallados con diferentes géneros de *Xanthomonas*, se podrían generar diversos patrones de los E.I. y estos utilizarse para diferenciar a nivel de géneros.

5.2. CARACTERIZACION DE CEPAS NATIVAS DE *X. campestris* EN FERMENTADOR DE 1 LITRO (PEPTONA COMO FUENTE DE NITROGENO).

5.2.1 Caracterización de la producción de goma xantana.

Durante el transcurso de la fermentación para la producción de goma xantana se presentan cambios drásticos en la reología del caldo de fermentación. El comportamiento de flujo del caldo de fermentación es determinada importantemente por la concentración de goma. Al inicio de la fermentación, el fluido es prácticamente Newtoniano; esto es, la viscosidad es independiente de la rapidez de deformación. Conforme avanza la fermentación, el caldo se vuelve más viscoso y no-Newtoniano. En las etapas finales de la fermentación, el caldo es de tipo pseudoplástico (Galindo *et al*, 1989).

La importancia de las características reológicas del caldo de fermentación, se debe a que los cambios reológicos durante el cultivo afectan otros parámetros como la transferencia de masa, el mezclado y el consumo de energía en el tanque así como en el escalamiento del proceso (Margaritis y Zajic, 1978).

Una vez determinadas las cepas que podrían ser consideradas como potenciales productores de goma, se decidió evaluarlas bajo condiciones más controladas de agitación, aireación y pH, en un fermentador de 1 litro de capacidad de trabajo.

La evaluación de la producción de goma se realizó en las cepas 10, 11, 12, 16 y se comparó con la producción de la cepa E2. Debido a que la cepa 15 (*pv. juglandis*) perdió la viabilidad, no fue posible realizar su caracterización en el fermentador de 1 L.

En estudios previos, se determinó la composición del medio para la producción de goma xantana (Quintero *et al*, 1984b). En un estudio reciente, se establecieron modificaciones en la composición del medio de producción, con el fin de incrementar la concentración de xantana al término de la fermentación (Flores, 1989). En este medio, se sustituyó la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio por peptona), el control de pH se realizó con hidróxido de amonio y la concentración

inicial de glucosa fué 24 g/L.

A continuación se presentarán las cinéticas de crecimiento y de producción de goma xantana de cada una de las cepas.

En la figura 21 se presenta la cinética de la fermentación de la cepa E2. Se observó que el patrón de crecimiento (D.O.) presenta las fases típicas del crecimiento microbiano. Durante las primeras cuatro horas, se manifiesta una fase de acondicionamiento. Posteriormente, se presenta la fase exponencial o logarítmica. Cuando el crecimiento exponencial llega al máximo, el azúcar se encuentra en concentraciones bajas (1 g/L) por lo que no se observa la fase estacionaria. Al concluir la fase exponencial, se presentó la fase de muerte celular (lisis celular).

La viscosidad, se incrementó (debido al incremento de la concentración de la goma) de forma exponencial a partir de las 30 h de fermentación. La producción de la goma estuvo parcialmente asociada al crecimiento de la bacteria. Cuando se agotó la fuente de carbono, la bacteria dejó de producir el polímero (figura 21). La viscosidad final del caldo de fermentación fué de 4, 250 cps y la concentración de goma fué de 16 g/L.

La cinética de crecimiento y de producción presentaron el mismo comportamiento que el que ha sido reportado en estudios previos empleando este medio (Flores, 1989).

En la figura 21 se presenta comparativamente la cinética de la cepa 10. La bacteria no presentó fase lag ni fase estacionaria en su crecimiento. La cinética de producción de goma fué similar a la presentada por la cepa E2.

En la figura 22 se presenta la cinética de fermentación de la cepa 11. La cepa 11 no presentó fase lag. Además, la fase estacionaria fue evidente y más definida, durando aproximadamente 20 h. Los perfiles del consumo de azúcar fueron similares a los que presentó la cepa E2. De la misma manera que en la cepa E2, la producción del polímero estuvo parcialmente asociada al crecimiento.

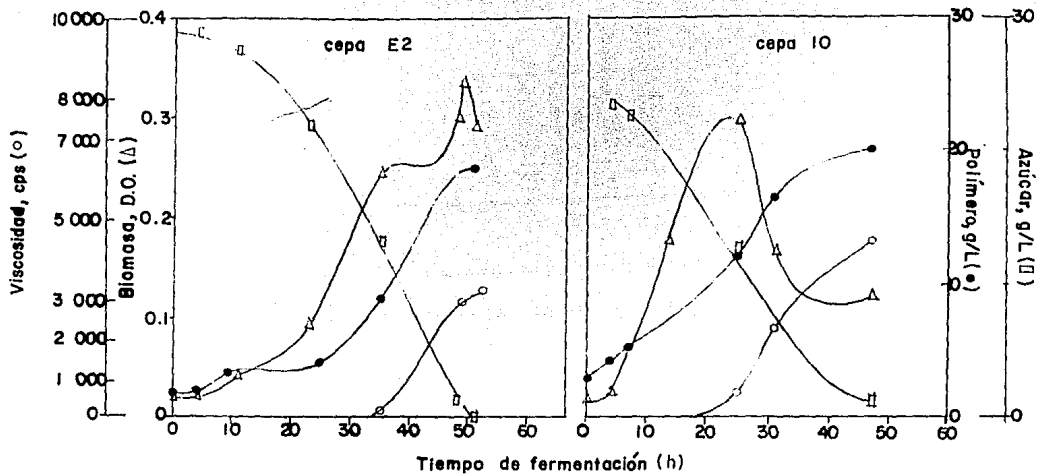


Figura 21

Cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de polímero de las cepas E2 y 10. Peptona como fuente de nitrógeno y desarrollada en fermentador de 1 L.

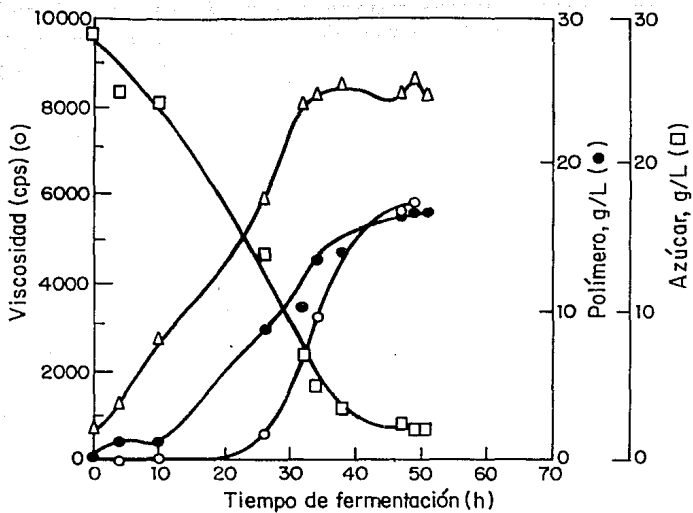


Figura 22

Cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de polímero de la cepa II. Peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en fermentador de 1 L.

En la figura 23 se presenta la cinética de la cepa 12. No se presentó fase lag, ni fase estacionaria. Una vez concluida la fase exponencial, el cultivo entró directamente a la fase de muerte (lisis celular).

De acuerdo con el crecimiento microbiano, se esperaba obtener viscosidades y concentraciones de goma dentro del rango de las otras cepas nativas (entre 2, 000 y 5, 000 cps con una concentración de goma de entre 13 y 19 g/L). Para la concentración final que sintetizó la cepa 12 (14 g/L) se debería obtener viscosidades superiores a los 2000 cps. Sin embargo, se obtuvieron caldos de fermentación con viscosidades aparentes bajas.

En la figura 24 se presenta de manera comparativa, la viscosidad aparente del caldo de fermentación que se genera de acuerdo a la concentración de polímero que sintetizan las cepas nativas y la E2 en el caldo de fermentación. De acuerdo con los resultados se observó que el polímero de la cepa 12 presentó un perfil de viscosidad aparente en el caldo de fermentación baja con respecto a la concentración de goma y comparada con lo generado por la cepa E2 y el de las cepas nativas 10, 11 y 16.

En los cultivos de las cepas 10, 11, 16 y E2 se observó, que conforme se incrementa la concentración de la goma, la viscosidad aparente de los caldos de fermentación se incrementa. (figura 24).

Se ha reportado que en cultivos con cepas productoras de goma xantana cuando se incrementa la concentración de la goma, el caldo de fermentación se vuelve más viscoso y no-Newtoniano. En las etapas finales de la fermentación el fluido es de tipo pseudoplástico y presenta un punto de cedencia (Galindo *et al*, 1989).

Es importante resaltar que estas fermentaciones fueron realizadas con peptona, una fuente compleja de nitrógeno.

Se ha establecido que las fuentes complejas de nitrógeno (como la peptona y el licor de maíz), permiten obtener altos rendimientos de producto y tiempos cortos de fermentación. Sin embargo, la reología de

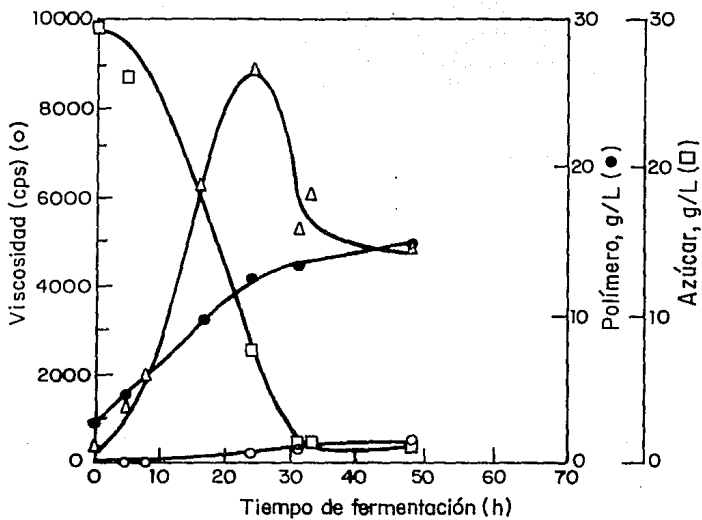


Figura 23

Cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de polímero de la cepa 12. Peptona como fuente de nitrógeno.

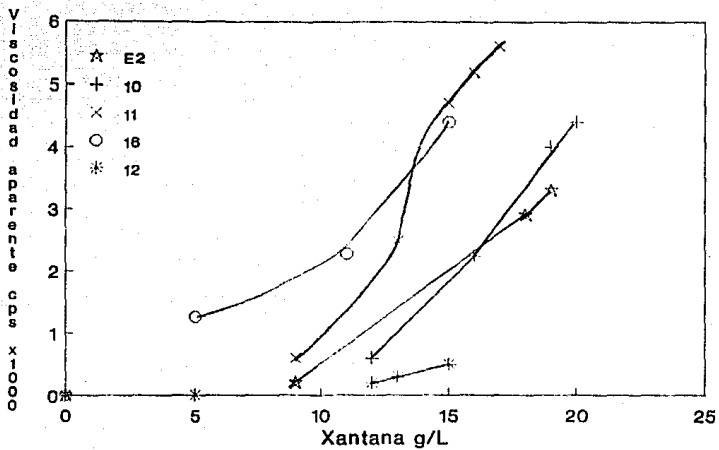


Figura 24

Viscosidad aparente del caldo de fermentación generada por la concentración de polímero sintetizado en los caldos de fermentación. Cultivos de cepas nativas y E2, peptona como fuente de nitrógeno, en fermentador de 1L

estos productos se ha reportado como inferior cuando se produce con altas concentraciones de estas fuentes complejas de nitrógeno (Kennedy *et al*, 1982). El comportamiento reológico de estas soluciones fué explicado en términos del alto porcentaje de células microbianas que fueron co-precipitadas y consecuentemente a la baja pureza de los productos finales. Además, se reportó una posible variación estructural del polímero sintetizado (Kennedy *et al*, 1982).

Pinches y Pallet (1986) demostraron que, tanto en fuentes de nitrógeno complejas como químicamente definidas la fase de crecimiento, el rendimiento y la velocidad de producción de goma son independientes de la concentración inicial de nitrógeno. Cuando el microorganismo se encuentra en la fase estacionaria (aunque la velocidad de producción sigue siendo independiente de la fuente), el rendimiento es dependiente de la concentración de nitrógeno.

En el caso de la cepa 12, se observó que la peptona (como fuente de nitrógeno), estimuló la producción de biomasa, en comparación con las otras cepas (Tabla 13). En consecuencia, su productividad y producción específica son bajos (figura 27).

En la figura 25 se muestra, de forma comparativa, la cinética de crecimiento y de producción de la cepa 16 (*X. campestris* *pv. manihotis*). Este cultivo presentó una fase lag prolongada (mayor de 20 h), lo que ocasionó que el tiempo total de la fermentación se incrementara.

En la tabla 13 se presenta, de forma comparativa, las constantes cinéticas de crecimiento de las cepas nativas y de la cepa E2. La cepa 10 presentó la velocidad específica de crecimiento más alta. La cepa 12 también presentó una velocidad específica del doble de la que presentó la cepa E2. La cepa 12 presentó además, la concentración más alta de biomasa. Estos datos confirman que el medio favorece el crecimiento de la bacteria.

El tiempo de fermentación de la cepa E2 fué en promedio de 60 h, con una producción de goma de 16.0 g/L. El tiempo de fermentación fue menor en las cepas 10, 11 y 12 (48, 49 y 45 h respectivamente). Sin

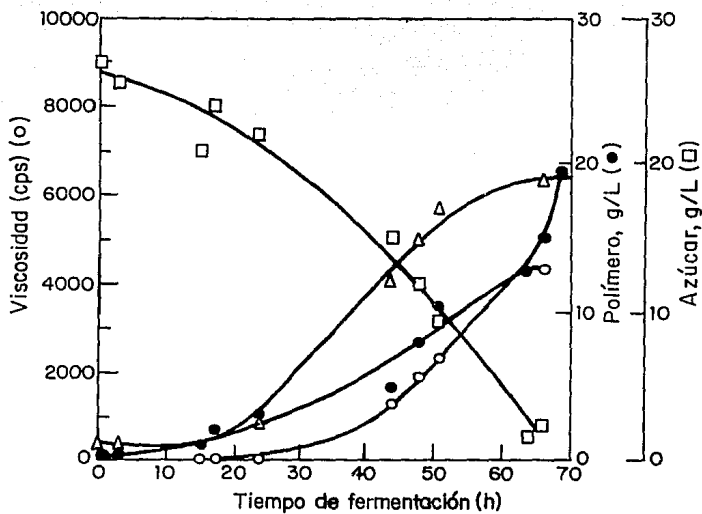


Figura 25

Cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de polímero de la cepa 16. Peptona como fuente de nitrógeno y desarrollada en fermentador de 1 L.

Tabla 13

Velocidad específica de crecimiento y concentración máxima de células de las cepas nativas y de la cepa E2.

Parámetro	Cepa				
	E2	10	11	12	16
<u>Crecimiento</u>					
μ (h^{-1})	0.105	0.57	0.16	0.2	0.12
X_{max} (D.O.)	0.33	0.3	0.35	0.40	0.25

embargo, con la cepa 16 (*pv. manihottis*) el tiempo de fermentación fue hasta de 68 h.

La figura 26 muestra los resultados promedios de viscosidad y concentración de polímero de las fermentaciones. La figura 26a presenta la viscosidad aparente final del caldo de fermentación. La cepa 11 produjo la viscosidad aparente más alta. La cepa 12 produjo un caldo con la menor viscosidad aparente final. La cepa 10 y 11 produjeron mayor concentración de goma que la cepa E2 (figura 26b).

En la figura 27a, se muestran los valores de la capacidad viscosificante de los polímeros en el caldo de fermentación. La cepa 16 mostró una capacidad viscosificante mayor al de la cepa E2, la cepa 10 produjo un polímero con la menor capacidad viscosificante. El polímero de la cepa 12 presentó la misma capacidad viscosificante que la cepa E2. Sin embargo, de acuerdo con los datos de viscosidad aparente en el caldo de fermentación, el producto de la cepa E2 generó un polímero que presentó alta viscosidad aparente en el caldo de fermentación (> 4000 cps) en comparación con la viscosidad del polímero de la cepa 12. Como se estableció en el capítulo 5.1, este índice de "calidad reológica" fue de un valor limitado. Hubiese sido adecuado haber realizado diluciones de los caldos a fin de ajustar la concentración de la goma (> 8 g/L), para llevar a cabo las determinaciones de viscosidad en el rango adecuado de concentración, para la determinación de este índice.

En la figura 27b, se consignan los valores de la producción específica de cada una de las cepas. Ninguna cepa presentó valores superiores al que presentó la cepa E2. En la figura 27b se presentan además, los datos de productividad. Las cepas 10 y 11 y 12 presentaron productividad superiores que la cepa E2. Finalmente, la figura 28 consigna los resultados con respecto al rendimiento. La cepa 10 presentó un rendimiento superior con respecto a la cepa E2. La cepa 11 mostró además, mayor rendimiento que la cepa E2.

Considerando que fue reproducible la obtención de baja viscosidad del caldo de fermentación en las fermentaciones realizadas con la cepa 12, con peptona como fuente de nitrógeno. Además, que no era posible comparar la viscosidad aparente de soluciones que no tenían la misma

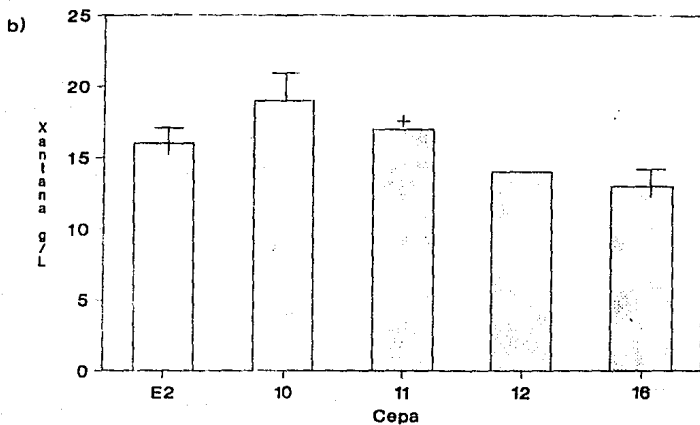
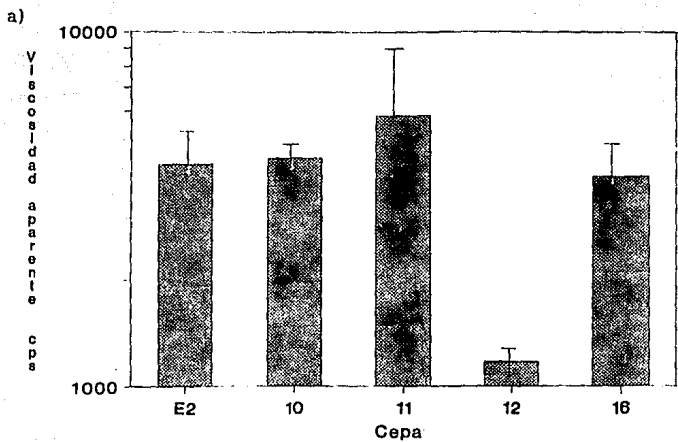


Figura 26

(a) Viscosidad aparente del caldo de fermentación y (b) Concentración de goma xantana, en cultivos de las cepas nativas y la E2 en fermentadores de 1 L.

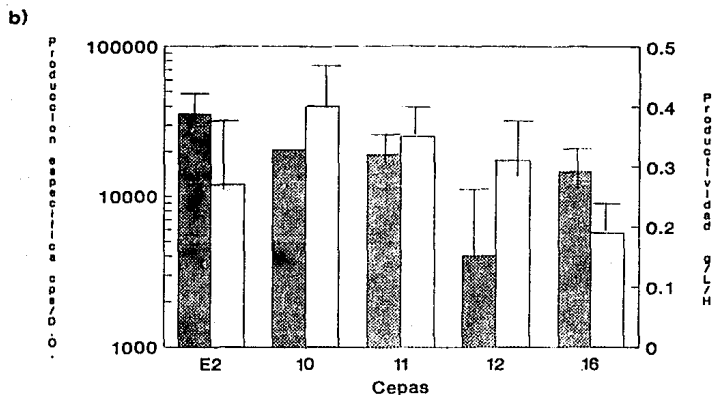
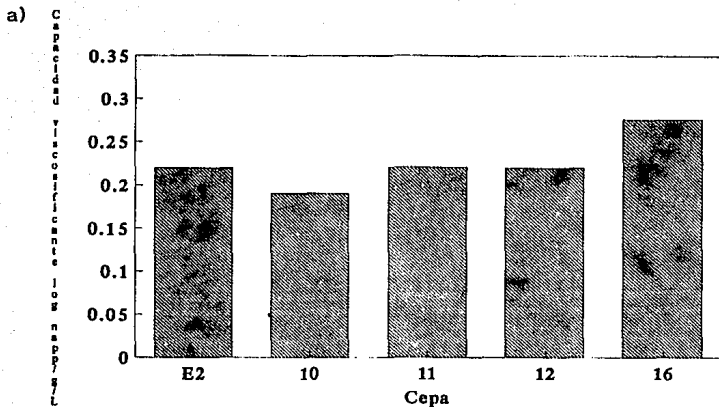




Figura 27

a) Capacidad viscosificante del polímero (log viscosidad / concentración de goma) en el caldo de fermentación y (b)Producción específica [] y productividad [] de las cepas nativas y de la E2 de cultivos con peptona como fuente de nitrógeno, desarrolladas en fermentador de 1 L.

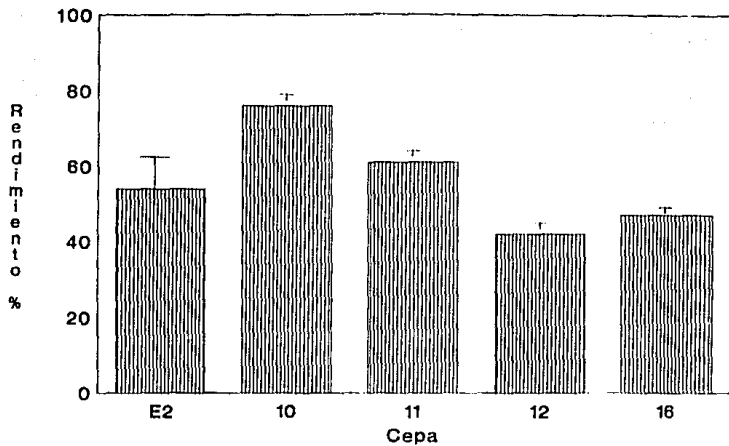


Figura 28

Rendimiento sobre azúcar inicial de las cepas nativas y de la E2 de cultivos con peptona como fuente de nitrógeno y desarrolladas en fermentador de IL.

concentración de goma. Debido, a que se encontraban disueltos sales y posiblemente otros componentes del medio de cultivo que no fueron consumidos en su totalidad, la alta concentración de células en suspensión y que en su conjunto podían estar afectando las características reológicas del producto, en el caldo de fermentación. Se procedió a analizar la reología del polímero en suspensión (posteriormente de los tratamientos post-fermentativos: térmico, enzimático y lavados del productos)

5.2.2 Caracterización reológica de los polímeros producidos en el fermentador de 1 L.

Una vez producida la goma, el caldo de fermentación fué sometido al tratamiento enzimático, posteriormente al tratamiento térmico. Los productos fueron lavados dos veces con alcohol al 60%, para eliminar sales y restos celulares. El producto se recuperó y se evaluó la viscosidad del producto resuspendido.

La viscosidad aparente de los productos resuspendidos se comparó con la del producto de la cepa E2, así como con un producto comercial ("Keltrol").

En la figura 29 se presentan los reogramas de las cepas 10, 11, 16 y su comparación con el reograma de la cepa E2 y el del producto "Keltrol". El polímero de la cepa E2 presentó valores de viscosidad aparente muy similares a las del producto "Keltrol", a todos los gradientes de deformación. Los valores de viscosidad aparente de los productos de las cepas 10 y 11 fueron ligeramente menores a los obtenidos en el producto comercial y en el polímero de la cepa E2.

En todo el rango de gradientes de deformación, el producto de la cepa 16 (correspondiente al *pv. manihotis*) presentó valores de viscosidad aparente más bajos que aquellos para el producto de la cepa E2 y el producto "Keltrol" (figura 29).

Aunque con la cepa 12 se obtuvo una baja viscosidad aparente en el caldo de fermentación, se determinó caracterizar el comportamiento reológico del polímero resuspendido. El reograma se presenta en la

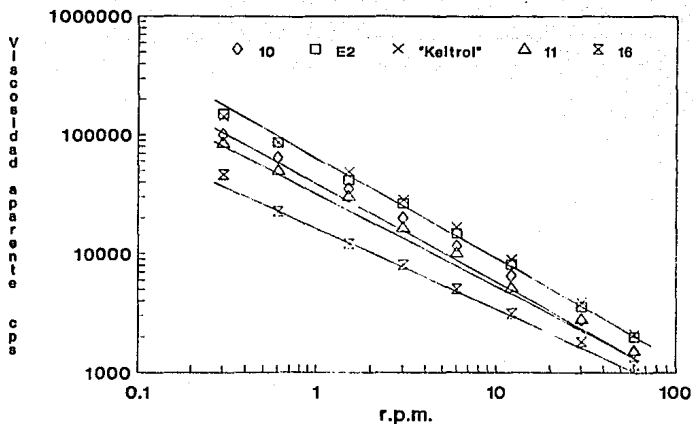


Figura 29

Reograma de las soluciones de los polímeros de las cepas 10, 11, 16, E2 y el del producto "Keltrol". Los productos fueron sometidos al tratamiento enzimático, térmico y fueron lavados dos veces [Suspensiones realizadas con 1% de xantana (b.s.) y 1% de KCl].

figura 30. El producto resuspendido presentó valores de viscosidad aparente inferiores a los del polímero de la cepa E2 y a los del producto "Keltrol".

El polímero de la cepa 12 en el caldo de fermentación presentó una viscosidad aparente menor que el polímero de la cepa E2, (figura 24). Fué interesante observar que después de los tratamientos post-fermentativos, el polímero de la cepa 12 no presentó gran diferencia en la viscosidad aparente (a todos los gradientes de deformación), con respecto a la viscosidad aparente que produjo el producto de la cepa E2.

Estos resultados pueden sugerir que la molécula polimérica podría estar asociada con complejos que se encuentran en el medio de cultivo. Cuando el polímero se somete al tratamiento enzimático y se lava con alcohol, es posible que se eliminen parte de estos potenciales complejos.

En la tabla 14 se presentan los valores del índice de consistencia "K" y del índice de flujo o pseudoplasticidad "n". Los polímeros de las cepas 10 y 11 presentaron un índice de consistencia menor al que presentó la cepa E2 y el producto "Keltrol". Con respecto al índice de flujo, ambos productos presentaron valores muy semejantes al producto "Keltrol".

El polímero de la cepa 12 presentó un valor de K menor al de la cepa E2 y al del producto "Keltrol", lo que significa que genera un fluido con menor viscosidad que los productos de comparación. Además, el fluido se adelgaza menos con respecto a la rapidéz de deformación, que el producto "Keltrol" y que el de la cepa E2 (n es mayor que el de ambos productos) (Tabla 14).

El polímero de la cepa 16 presentó el valor mas bajo del índice de consistencia (K) y el valor más alto del índice de flujo (n) comparado con todas las otras cepas nativas e inclusive que el producto de la cepa E2 y el "Keltrol". Esto indica que el producto presenta menor viscosidad y se adelgaza menos.

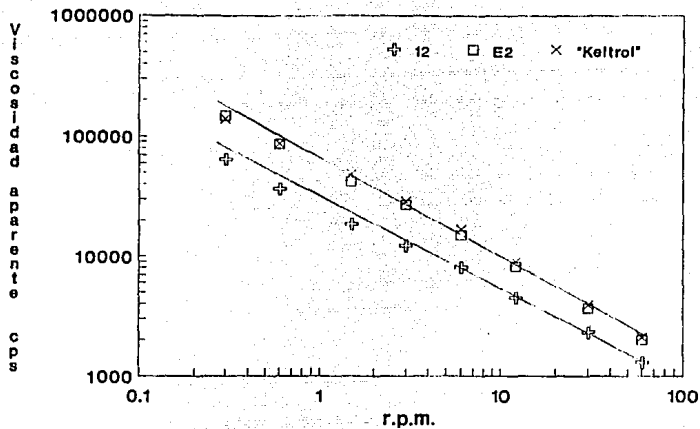


Figura 30

Reogramas de las soluciones de los polímeros de las cepas 12, E2 y del producto "Keltrol". Los productos fueron sometidos al tratamiento enzimático, térmico y fueron lavados dos veces [Soluciones preparadas con xantana al 1% (b.s.) y 1% de KCl].

Tabla 14

Indices reológicos de las soluciones de los productos de las cepas nativas, de la cepa E2 y los del producto "Keltrol".

Productos	Indices reológicos*	
	K ($N \cdot s^n / m^2$)	n (-)
10	8.9	0.21
11	8.6	0.23
12	5.7	0.25
16	4.2	0.32
E2	12.0	0.18
Keltrol	12.7	0.2

- * Determinados con el programa "Reología de fluidos, Ley de la potencia; software" (Brito, 1988), en soluciones preparadas con 1% de xantana (b.s.) y 1% de KCl.

Se ha establecido que las características reológicas del caldo de fermentación cambian drásticamente en el transcurso de la fermentación. El mezclado es eficiente solo en las primeras etapas de la fermentación. A medida que transcurre la fermentación, la naturaleza pseudoplástica del fluido crea zonas muertas ó estáticas en el fermentador (Galindo, 1985).

La baja viscosidad aparente del caldo de fermentación de la cepa 12, podría eliminar los problemas de mezclado que se presentan en el transcurso de la fermentación. Aunque, se generaría un producto que al ser resuspendido presentaría menor viscosidad aparente que el polímero de la cepa E2.

5.2.3. Caracterización química de los polímeros producidos por las cepas nativas en el medio con peptona como fuente de nitrógeno

Los productos recuperados fueron analizados químicamente. Se les determinó: cenizas, humedad, radicales acetilos, radicales pirúvicos, y su contenido de nitrógeno. En la tabla 15 se presentan los valores analíticos de estos parámetros para las cepas 10, 11, 12 , 16, cepa E2 y los del producto "Keltrol". Es interesante resaltar que los productos de las cepas 10 y 11 presentaron bajos contenidos de pirúvico (si se comparan con la cepa E2) e inclusive con respecto al producto "Keltrol". La cepa 12 presentó un porcentaje de radicales pirúvicos muy bajos (0.03%).

Con respecto al contenido de acetilos, los productos de las cepas 10 y 11 presentaron el mismo porcentaje que el de la cepa E2 y que el producto "Keltrol". El polímero de la cepa 12 presentó menor contenido que el producto de la cepa de E2 (4%).

Debido a que el caldo de fermentación fue sometido a un tratamiento de purificación, se determinó el porcentaje de nitrógeno presente en el producto. Los resultados de la tabla 15 manifiestan que los polímeros de las cepas 10 y 11 no fueron purificados completamente. Curiosamente, el producto de la cepa 12 presentó el más alto porcentaje de nitrógeno (2.9%). Estos datos sugieren que la biomasa (u otros

Tabla 15

Evaluación química de los productos obtenidos de las cepas 10, 11, 12, 16, E2 y del producto "Keltrol".

Producto de las cepas*	Pirúvico (%)	Acetilo (%)	Cenizas (%)	Nitrógeno (%)	Humedad (%)
10	0.75	5.0	2.3	1.8	15
11	0.21	5.7	4.0	1.9	15
12	0.03	4.0	4.4	2.9	12
16	4.2	4.1	5.6	1.0	13
E2	2.14	5.0	5.4	0.5	15

"Keltrol"	4.3	5.8	8.8	0.5	8

* Obtenidos de cultivos en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno.

compuestos nitrogenados) no fueron eliminados por completo. Esto posiblemente apoyaría la hipótesis de una posible interacción de ciertos complejos nitrogenados con el polímero, la cual pueda afectar la capacidad de generar la viscosidad aparente.

De acuerdo con lo anterior fue posible inferir que la reología estaba afectada por la pureza del producto (contenido de nitrógeno), por los radicales acetilos y/o pirúvicos. En la figura 31 se presentan los valores consignados del contenido de nitrógeno (a), en relación con los valores del índice de consistencia (K). Radicales pirúvicos (31b) y radicales acetilos (31c) de los polímeros de las cepas con respecto al contenido de nitrógeno. El contenido de los radicales pirúvico (31d) y radicales acetilos (31e) en relación con los valores del índice de consistencia (K) de los polímeros de las cepas nativas y de la E2.

En la figura 31(a) se observa de una manera general, una tendencia lineal del porcentaje de nitrógeno en los polímeros y el índice de consistencia. Productos con menor contenido de nitrógeno presentan el valor más alto en el índice de consistencia y productos con mayor contenido de nitrógeno presentan un índice de consistencia bajo. La cepa 12 contiene el más alto porcentaje de nitrógeno y el índice más bajo. Esta tendencia indica que los productos con menor contenido de nitrógeno son más puros y que en igualdad de peso en polvo, contendrá más polímero y consecuentemente su solución será más viscosa. Aunque, el producto de la cepa 16 no se encuentra dentro de esta tendencia, es posible inferir que el índice de consistencia puede estar afectado por otros parámetros. Este producto presentó además, el más bajo porcentaje de radicales acetilos de todos los polímeros de las cepas evaluadas (Tabla 15, figura 31c).

En la gráfica 31b se muestra que la pureza del producto puede estar influyendo en los radicales pirúvicos. Los productos de las cepas nativas que contenían el más alto porcentaje de nitrógeno presentan valores bajos en el contenido del radical pirúvico. En productos con el mismo porcentaje de nitrógeno, la diferencia en el contenido del pirúvico pudo estar relacionado con la cepa empleada. En relación al contenido de acetilos se observó que el contenido de nitrógeno no

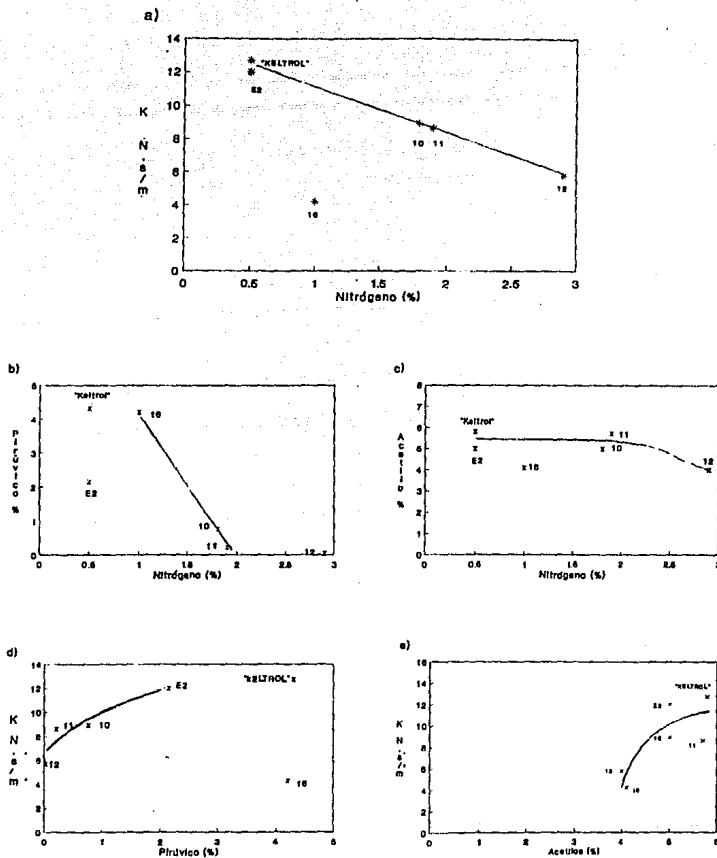


Figura 31

Efecto del contenido del nitrógeno, con el índice de consistencia "K" presentado en las suspensiones de los productos de las cepas nativas, E2 y "Keltrol" (a). Contenido de los radicales pirúvico (b) y acetilos (c), con relación al porcentaje de nitrógeno presente en los productos de las cepas evaluadas. Relación del contenido de radicales pirúvicos (d) y acetilos (e) con el índice de consistencia de los polímeros de las cepas nativas, E2 y "Keltrol".

influye en este parámetro (figura 31c).

El contenido de radicales pirúvico podría no estar influyendo en la reología de los productos. Productos que presentan alto contenido de radicales pirúvico pueden presentar alto o bajos índices de consistencia. El "Keltrol" presentó un porcentaje alto de radicales pirúvicos y el valor más alto de K, mientras que el producto de la cepa 16 presentó un porcentaje similar de radicales pirúvicos al del "Keltrol" y presentó el valor más bajo en el índice de consistencia que el "Keltrol" e inclusive que el de las otras cepas nativas (figura 31d). Con respecto al contenido de radicales acetilos y la relación con el índice de consistencia (K), se observó que estos radicales influyen en la reología. Productos con el menor contenido de radicales presentan el valor más bajo en el índice de consistencia que los productos con mayor contenido de acetilos (figura 31e).

5.2.4. Espectroscopía de Infrarrojo de los polímeros obtenidos con el medio de producción con peptona como fuente de nitrógeno.

Los espectros de infrarrojo de los polímeros producidos por cada cepa nativa, fueron cotejados con aquellos del producto obtenido con la cepa E2 y con el producto "Keltrol". Los resultados detallados y comparativos de cada uno de los espectros de los polímeros de las cepas nativas se presentan en el anexo 3.

Las principales diferencias que se observaron en el E.I. del polímero de la cepa 10 con el producto de la cepa E2 y del producto "Keltrol" sugieren que ese producto pueda ser de un peso molecular menor, de menor ramificación, con un menor contenido de radicales acetilos y pirúvicos que el producto de la cepa E2 y del producto "Keltrol". Sin embargo, lo anterior no concuerda con los datos analíticos de los radicales acetilos. La cepa 10 presentó los mismos porcentajes de acetilos que el polímero de la cepa E2 y que el "Keltrol".

Con respecto al pirúvico, la menor intensidad en la banda correspondiente a la vibración molecular del metilo del radical piruvato (1371 cm^{-1}) sugiere que el polímero presenta bajos contenidos

de este radical. Esto concuerda con los resultados analíticos (0.75%).

Las diferencias observadas con el polímero de la cepa 11 sugieren que el producto puede ser de menor peso molecular, menor ramificación y presentar menor porcentaje de radicales pirúvicos que la cepa E2 y que el producto "Keltrol". Los datos analíticos mostraron que el producto presentó menor porcentaje de radicales piruvatos que la cepa E2 y que el producto "Keltrol".

El espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 sugiere que el producto puede presentar menor cantidad de radicales acetilos y pirúvicos que la cepa E2 y el producto "Keltrol". Esto concuerda con los datos analíticos. Es interesante remarcar que este producto presentó un porcentaje muy bajo de radicales pirúvicos (0.03%).

En el producto de la cepa 12 se remarca la presencia de la banda de los 1542 cm^{-1} . La cual no se presenta en el E. I. del producto de la cepa E2 ni en el "Keltrol". Esto sugiere la posible presencia de de compuestos aminados en asociación con la cadena polimérica.

Finalmente, el E.I. del polímero de la cepa 16 (correspondiente al pv. *manihotis*) mostró que, en comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto "Keltrol", las principales diferencias estriban en la intensidad de las bandas, las cuales son de menor intensidad y sugieren que los radicales acetilos (1725 cm^{-1}) se encuentran en menor porcentaje, lo que concuerda con los datos analíticos. Se infiere una menor proporción de CH_2OH en la cadena (1250 cm^{-1}), lo cual implicaría que fuese menos ramificada que el producto de la cepa E2 y el producto "Keltrol".

Las principales diferencias que se observaron en los E.I. de los productos de las cepas nativas con respecto al polímero de la cepa E2 e inclusive al del "Keltrol", radicaron en las intensidades de las bandas en todo el rango de los números de onda en el que se presentan los grupos funcionales que constituyen la molécula polimérica. Para establecer estas diferencias cuantitativamente, se determinó la intensidad de las bandas, de acuerdo a su altura relativa. En la tabla 16 se indica la intensidad relativa de las bandas de los espectros de

Tabla 16

Intensidad relativa en las principales bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas.

Cepa	Intensidad relativa de las bandas (cms)				
	A	B	C	D	E
E2	<u>5.1</u>	<u>8.71</u>	<u>3.7</u>	<u>6.3</u>	<u>6.2</u>
10	4.4	7.6	13.4	4.5	4.5
11	4.6	6.5	14.1	4.3	4.6
12	4.8	8.3	14.0	4.8	5.0
16	2.5	9.4	13.2	4.8	4.5
Keltrol	5.0	14.5	13.9	6.2	5.9

A = Banda correspondiente a la vibración molecular de los radicales acetilos (1727 cm^{-1}).

B = Banda correspondiente a la vibración molecular de los ácidos carboxílicos libres (1062 cm^{-1}).

C = Banda que sugiere la asociación intramolecular (1060 cm^{-1}).

D = Banda correspondiente al metilo de los radicales acetilos (1404 cm^{-1}) y carbonilo del ácido pirúvico (1372).

E = OH de CH_2OH de la cadena (1250 cm^{-1}).

los polímeros de las cepas nativas, de la cepa E2 y del producto "Keltrol".

La baja intensidad relativa que presentaron las bandas de los espectros de los productos de las cepas 10, 11, 12 y 16 implicaría que estos productos pueden presentar un peso molecular menor que el producto de la cepa E2 y que el producto "Keltrol".

Tratando de realizar un análisis de los espectros, en la tabla 17 se presenta la relación entre las bandas de los espectros de infrarrojo y su comparación con el polímero de la cepa E2 y el producto "Keltrol". En los productos de las cepas nativas, la relación A/B es mayor o igual a la del producto de la cepa E2 e inclusive a la del producto "Keltrol". La única excepción la constituye el producto de la cepa 16, cuya relación es muy baja (presentó un área muy pequeña en los 1725 cm^{-1} que corresponde a la vibración molecular de los grupos acetilos).

Con respecto a la relación entre las bandas B/C, todos los productos presentaron valores muy similares al presentado por el producto "Keltrol" y por el producto de la cepa E2. Esto sugiere que la relación entre los carboxilatos y C-O de los azúcares es muy semejante entre los polímeros de las cepas nativas. En la relación D/E, se observa que los valores son menores con respecto al producto "Keltrol", lo que significa que existe una menor relación de radicales piruvato y acetilos en la cadena polimérica de las cepas nativas, si se compara con el producto "Keltrol".

Tabla 17

Relación entre las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de las cepas nativas.

Polímeros de las cepas	Relación entre bandas			Banda 1065 cm^{-1} Area (cm^2)
	A/B	B/C	D/E	
E2	0.39	0.30	0.86	34.9
10	0.59	0.47	0.96	26.1
11	0.41	0.35	0.93	27.1
12	0.35	0.49	1.34	29.4
16	0.1	0.43	1.5	31.0
Keltrol	0.33	0.49	1.87	29.2

A/B = Acetilos/carboxilato

B/C = Carboxilato/banda C-O azúcares

D/E = CH_3 acetilos-pirúvicos/OH de CH_2OH de la cadena

Conclusiones (sección 5.2)

Los resultados de la caracterización de las cepas nativas permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Con respecto a la cinética de fermentación de las cepas nativas:
 - a) En la cinética de crecimiento, las cepas 10 y 11 no presentaron fase lag. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue mayor a la de la cepa E2. Con respecto en la cinética de producción, se observó que está parcialmente asociada al crecimiento (como en la cepa E2).
 - b) La cepa 12 no presentó fase lag. Mostró una velocidad específica de crecimiento (μ) mayor a la de la cepa E2. La evolución de viscosidad fué diferente a la de la cepa E2. Se obtuvieron valores inferiores de viscosidad aparente en el caldo de fermentación.
2. Respecto a la producción de la goma:
 - a) La cepa 11 produce un caldo con mayor viscosidad aparente, mayor concentración final de goma y la productividad fue mayor respecto a la cepa E2.
 - b) La cepa 10 produjo más polímero, una productividad más alta y presentó mayor rendimiento del producto que la cepa E2.
3. Los reogramas de las soluciones de los productos resuspendidos, se puede establecer lo siguiente:
 - a) Los polímeros de las cepas 10 y 11 presentaron -en todas las velocidades de deformación- viscosidades aparentes menores a las del producto de la cepa E2 y a las del producto "Keltrol".

- b) Aunque el polímero de la cepa 12 presentó valores inferiores de viscosidad aparente en todos los gradientes de deformación (respecto a los del producto de la cepa E2 y al del producto "Keltrol"). Es posible considerar este producto como potencial. Debido a que presentó una baja pureza (el contenido de nitrógeno fué alto 2.9%), el producto en igualdad de peso representó menor cantidad de polímero y consecuentemente su solución fué menos viscosa.

4. Los resultados analíticos indicaron lo siguiente:

- a) Que los productos de las cepas 10, 11 y 12 presentan muy bajos porcentajes de radicales pirúvicos.
- b) Aunque se detectaron muy bajos porcentajes de radicales pirúvicos en el producto de la cepa 12, es posible inferir que este sustituyente no está involucrado en la reología del producto, ya que el polímero de la cepa 16 presentó un alto contenido de radicales pirúvicos y presentó valores bajos en los índices reológicos.

5. De acuerdo con los espectros de infrarrojo:

- a) Se infiere que los polímeros de las cepas 10 y 11 pueden presentar menor peso molecular que el polímero de la cepa E2 y que el del producto "Keltrol".
- b) Es posible inferir que el polímero de la cepa 12 se encuentre en interacción con compuestos aminados o nitrogenados, debido a la presencia de la banda a los 1542 cm^{-1} . Además, este producto presentó los valores más altos de nitrógeno.

5.3 INFLUENCIA DEL MEDIO DE PRODUCCION EN LA CAPACIDAD DE PRODUCCION Y LAS PROPIEDADES DEL PRODUCTO DE LAS CEPAS 12 Y E2

5.3.1. Evaluación de la producción del polímero empleando el medio que contenía sulfato de amonio y su comparación con lo obtenido en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno

La composición del medio de cultivo para la producción de goma xantana puede influir en las características finales del producto. Existen pocos estudios sobre este tema (Tait, *et al*, 1986; Cadmus *et al*, 1978; Kennedy *et al*, 1982).

En medios químicamente definidos, en medios complejos y en medios definidos que combinan una fuente compleja de nitrógeno, se ha observado que una mayor concentración de nitrógeno inicial produce concentraciones más elevadas de biomasa celular. Este incremento promueve altos rendimientos del producto, tiempos cortos de fermentación y por lo tanto una productividad mayor (Kennedy *et al*, 1982; Norton *et al*, 1979; Marquet *et al*, 1989; Cadmus *et al*, 1978).

Los resultados referentes a la producción de goma de la cepa 12 a nivel de matraces bafleados, con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, indicaron que la cepa presentaba ventajas en la producción de goma con respecto a la cepa E2. Entre las que se obtuvieron: que la cepa produjo 40 % más de polímero, mayor producción específica que la cepa E2. Un polímero que presentó un perfil de viscosidad superior [en todo los gradientes de deformación y a la misma concentración de goma (1% b.s.)] e índices reológicos superiores a los que presentó el producto de la cepa E2.

Se ha establecido que la fuente de nitrógeno puede afectar la calidad del polisacárido producido (Cadmus *et al*, 1978). En vista que la evaluación en matraces bafleados se llevó a cabo con un medio de cultivo que contenía sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se evaluó también la producción de goma con este medio en fermentadores

En la figura 32 se presentan las cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de la producción de la goma de la cepa E2 y de forma comparativa las cinéticas de la cepa 12.

La cinética de crecimiento de la cepa E2 presentó una fase lag de 4 horas y una fase exponencial de aproximadamente 26 horas. La fase estacionaria fué de aproximadamente 5 horas, está fase no se observó en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno. A partir de las 48 h, se inició la fase de lisis. La producción del polisacárido estuvo parcialmente asociada al crecimiento.

El crecimiento de la cepa 12 no presentó fase "lag". Inició el crecimiento exponencial desde las primeras horas de la fermentación y muestra la fase de lisis celular cuando finalizó el crecimiento. La producción de la goma fué parcialmente asociada al crecimiento. Se observó mayor generación de la viscosidad aparente en el caldo de fermentación y mayor producción de goma que la cepa E2 (figura 32).

De las fuentes de nitrógeno orgánico que se han estudiado, se ha establecido que la peptona es una fuente que genera los más altos rendimientos de goma xantana. Sin embargo, un incremento en su concentración inicial (hasta 8.8 g/L) genera productos con índices reológicos inferiores a los que presenta el producto comercial "Kelzan" (Kennedy *et al*, 1982).

En el medio de producción cuya fuente de nitrógeno fue la peptona, la cepa 12 generó un caldo de fermentación de baja viscosidad aparente durante la evolución de la fermentación, en comparación con las cepas nativas y la cepa E2.

En esta sección se presentarán, de forma comparativa, los resultados de la producción de polímero y de las propiedades que presenta el producto de la cepa 12, obtenido en los dos medios: 1) medio de producción con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y 2) medio de producción modificado II, que contenía peptona como fuente

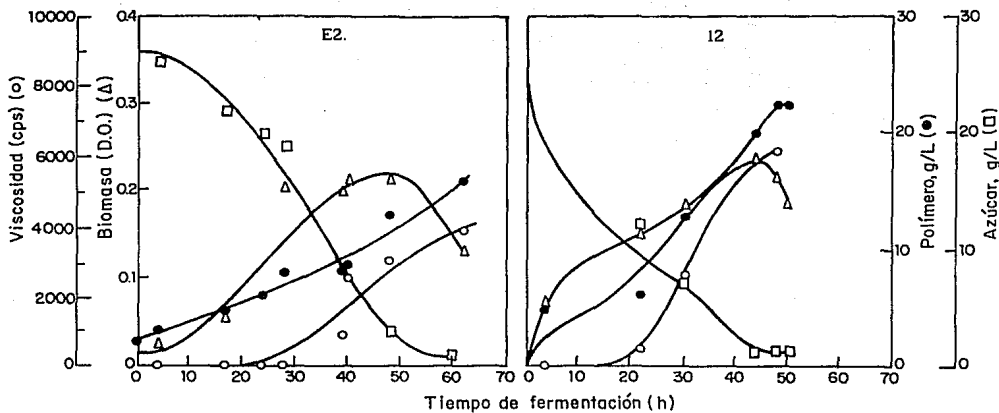


Figura 32

Cinéticas de crecimiento, de consumo de sustrato y de producción de polímero de las cepas 12 y E2. Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y desarrolladas en fermentador de 1 L.

de nitrógeno.

En ambos medios el control del pH se realizó con dos álcalis diferentes. En el medio que contenía peptona, se empleó hidróxido de amonio. En el medio con sulfato de amonio, se utilizó hidróxido de potasio.

Debido a que el amonio puede ser consumido como fuente adicional de nitrógeno para el crecimiento celular, se ha observado que la productividad se incrementa cuando el pH se controla con hidróxido de amonio. (Moraine y Rogovin, 1973).

En la figura 33 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa 12. En el medio con peptona como fuente de nitrógeno, el crecimiento fué mayor al que presentó en el medio con sulfato de amonio. Una vez terminada la fase exponencial, se observó que la bacteria presentó la fase de lisis, sin presentar fase estacionaria.

En la figura 34 se presenta el consumo de sustrato en ambos medios. En el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno, la velocidad de consumo fué mayor (durante las primeras cuarenta horas) que en el que contenía sulfato de amonio.

La figura 35 presenta la evolución de la viscosidad aparente del caldo de fermentación, con ambas fuentes de nitrógeno. En el medio con peptona, el polímero generó menor viscosidad aparente en todo el transcurso de la fermentación. En el medio con sulfato de amonio, la bacteria produjo un polímero con mayor viscosidad aparente.

En el medio que contenía peptona, la cepa 12 generó menor concentración de polímero, que en el medio que contenía sulfato de amonio (figura 36 a). Sin embargo, la evolución del polímero durante el cultivo de la cepa 12 en ambos medios fué similar. De acuerdo con la concentración del polímero sintetizado durante el cultivo de la cepa, se observó que el polímero en el medio que contenía peptona generaba menor viscosidad aparente en el caldo de fermentación, en comparación con las viscosidades aparentes que presentó en el caldo de fermentación

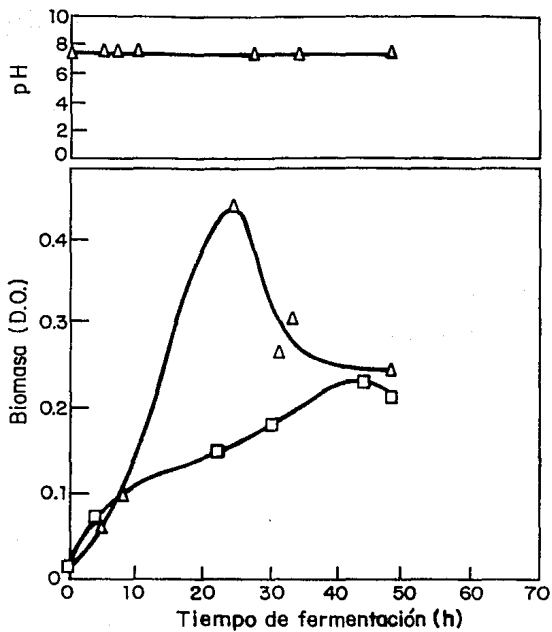


Figura 33

Cinética de crecimiento de la cepa 12, con diferentes fuentes de nitrógeno: peptona (Δ) y sulfato de amonio (\square). Fermentador de 1 L.

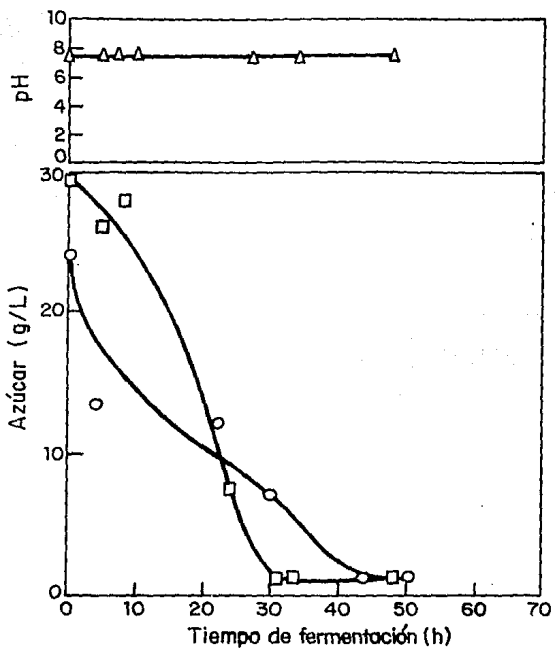


Figura 34

Consumo de azúcar en la fermentación con la cepa 12, en el medio de producción que contenía peptona (□) o sulfato de amonio (○) como fuente de nitrógeno.

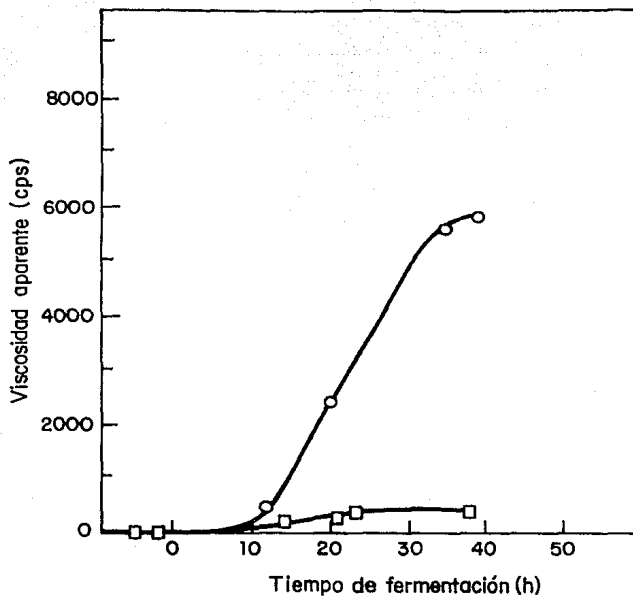


Figura 35

Viscosidad aparente del caldo de fermentación de la cepa 12 en el medio que contenía peptona (□) o sulfato de amonio (○) como fuente de nitrógeno.

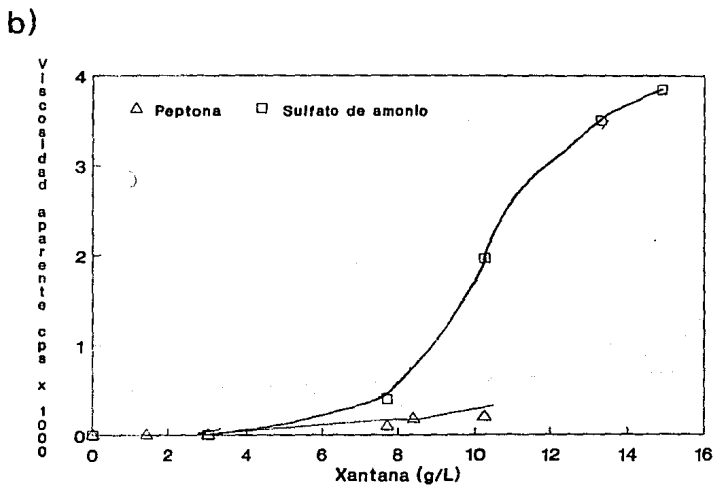
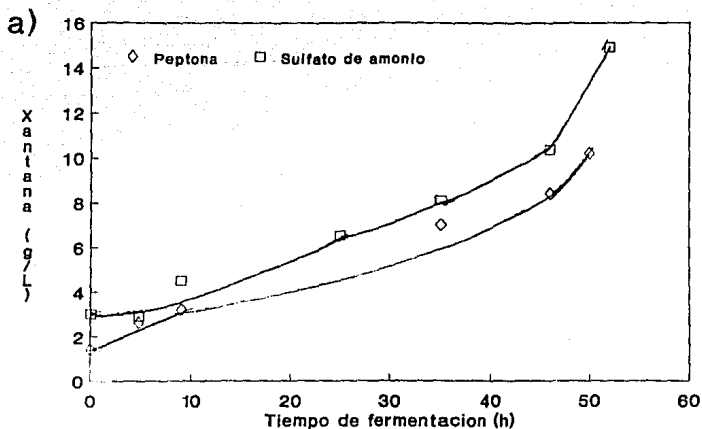


Figura 36

a) Evolución de la concentración de polímero y (b) generación de viscosidad en el caldo de fermentación de acuerdo con la concentración de polímero sintetizado durante el cultivo de la cepa 12 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio. Fermentaciones realizadas en fermentador de 1 L.

del cultivo con sulfato de amonio. En el medio que contenía peptona y de acuerdo con la concentración de polímero sintetizado, la viscosidad aparente fué 100 veces menor, que lo obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio (figura 36b).

Aunque no se conoce la razón de la baja viscosidad aparente en el medio que contiene la peptona como fuente de nitrógeno, los resultados analíticos y de infrarrojo sugieren que, en este medio, el polímero puede presentar interacción con compuestos nitrogenados presentes en el medio. Esta interacción podría modificar la estructura molecular de la goma, de tal manera que su capacidad de generar viscosidad en el caldo de fermentación sea baja.

Se ha establecido que *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* consume el nitrógeno principalmente para la producción de biomasa. La bacteria, cuando finaliza la etapa exponencial de crecimiento, consume la mitad de la concentración del nitrógeno inicial. El otro 50% no se consume y queda disuelto en el medio de cultivo (Moraine y Rogovin, 1973).

En la tabla 18 se presenta la velocidad específica de crecimiento de las cepas E2 y 12, en ambos medios. La cepa 12 presentó una velocidad específica de crecimiento mayor en el medio con peptona y también una mayor concentración máxima de células, con respecto a la cepa E2. Interesantemente, la velocidad específica de crecimiento de la cepa E2 fué prácticamente la misma en ambos medios.

En la figura 37 se presentan los valores de viscosidad aparente del caldo de fermentación obtenido en los dos medios de producción, con las cepas E2 y 12. El polímero de la cepa 12 generó un caldo con mayor viscosidad aparente (cuatro veces más) en el medio con sulfato de amonio, en comparación con el medio que contenía peptona. La viscosidad aparente del caldo de fermentación de la cepa E2 en ambos medios, fue prácticamente la misma.

La figura 38 muestra que la cepa 12 generó una mayor concentración de polímero en el medio con sulfato de amonio. Por el contrario, la

Tabla 18

Velocidad específica de crecimiento y concentración máxima de células de las cepas 12 y E2 en los medios que contenían peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Parámetro	Cepas			
	1459-E2		12	
	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄
μ (hr ⁻¹)	0.105	0.12	0.26	0.08
X _{max} (D.O.)	0.30	0.20	0.40	0.22

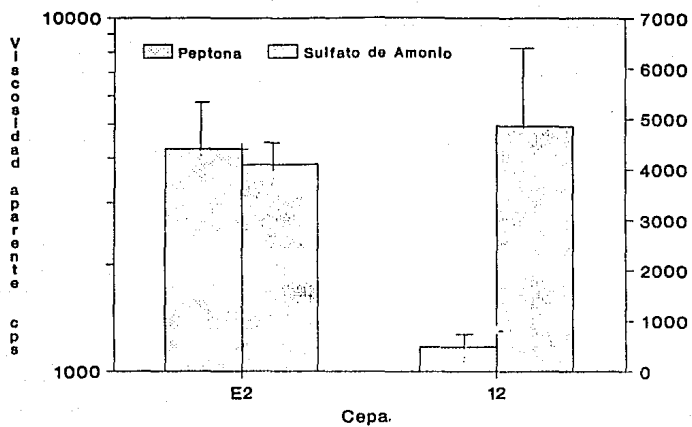


Figura 37

Viscosidad aparente del caldo de fermentación de la cepa 12 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

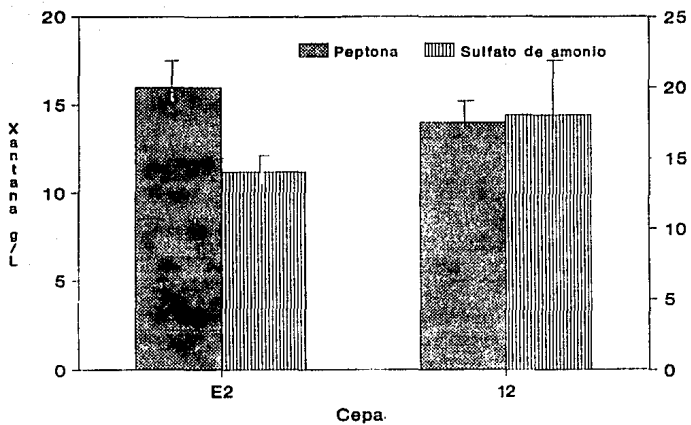


Figura 38

Concentración final de goma de los cultivos de las cepas 12 y E2, obtenidos en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

cepa E2 produjo concentraciones ligeramente más elevadas de goma en el medio que contenía peptona, respecto al que contenía sulfato de amonio.

En el fermentador la cepa 12 produjo solo 1.3 veces más de goma que la E2 (figura 38). De acuerdo con la evaluación en matraces la cepa produjo 60% más que la cepa E2 (Capítulo 5.1).

Es posible establecer que la cepa 12 generó mayor producción de polímero en los matraces, debido a una mayor transferencia de oxígeno durante el cultivo de la cepa. El desarrollo de fermentaciones en matraces bafleados, se han caracterizado y propuesto para el escalamiento de cepas productoras de exopolisacáridos, debido a que pueden proporcionar mayor transferencia de oxígeno (Galindo, *et al*, 1992). Se ha comprobado que el $k_L a$ puede ser mayor en matraces bafleados que en el fermentador (Delgado *et al*, 1989)

Existe además, la posibilidad de considerar la inestabilidad de la cepa, la cual podría estar jugando un papel importante. Es decir, que la bacteria probablemente hubiese disminuido la capacidad de producción de goma.

Se ha reportado que *Xanthomonas* llega a perder sus características originales y en algunas ocasiones, desarrolla formas variantes (Cadmus *et al*, 1976), que puede presentar una disminución en la producción de goma xantana (Cooke and Broderick, 1989).

Norton *et al* (1979) al incrementar el 50% de nitrógeno inicial en el medio de cultivo, observaron mayor producción de biomasa y una baja viscosidad aparente final del caldo de fermentación (2,900 cps con respecto a lo obtenido de 4,000 cps).

En la figura 39 se indican los valores de la producción específica de las cepas E2 y 12, en ambos medios. La cepa E2 presentó mayor producción específica en el medio que contiene peptona. La cepa 12

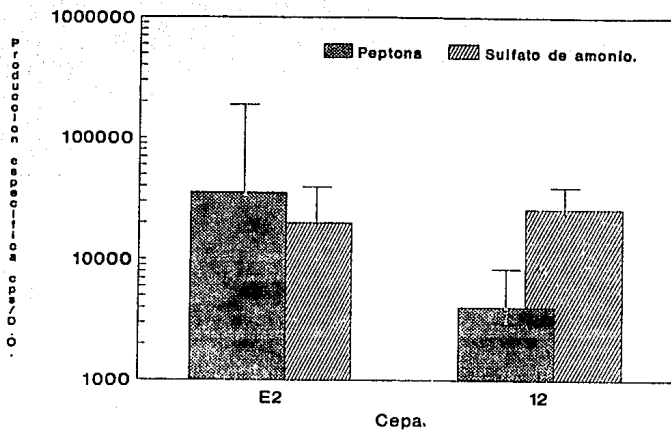


Figura 39

Producción específica de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

presentó mayor producción específica en el medio que contiene sulfato de amonio (en comparación con el que contiene peptona). Los valores de producción específica de la cepa 12 en el medio con sulfato de amonio fué menor a la que presentó la cepa E2 en el medio con peptona.

La cepa 12 presentó mayor productividad en el medio con sulfato de amonio que en el medio con peptona. Por el contrario, la cepa E2 presentó mayor productividad en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno (figura 40).

Esta misma tendencia se observó con respecto al rendimiento de polímero (tanto en base a azúcar inicial como en base a azúcar consumida) para las cepas 12 y E2 (figuras 41 y 42). La cepa 12 presenta el más alto porcentaje tanto en el rendimiento en base a azúcar consumida como en base al azúcar inicial en el medio con sulfato de amonio que la cepa E2 (figura 42).

5.3.2 Reología de los polímeros obtenidos en los medios que contenían peptona y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Los reogramas de las soluciones del polímero de la cepa 12 obtenido en ambos medios de cultivo, se muestran en la figura 43.

El polímero de la cepa 12 obtenido con el medio que contiene sulfato de amonio, se obtiene un producto con viscosidades aparentes muy semejante al que presentó el producto "Keltrol" (figura 43).

Debido al bajo grado de pureza del producto de la cepa 12, obtenido en el medio que contenía peptona, la solución del producto resuspendido presentó -en todo el rango probado de velocidades de deformación- viscosidades aparentes menores a las del producto de la cepa E2 y a las del producto "Keltrol".

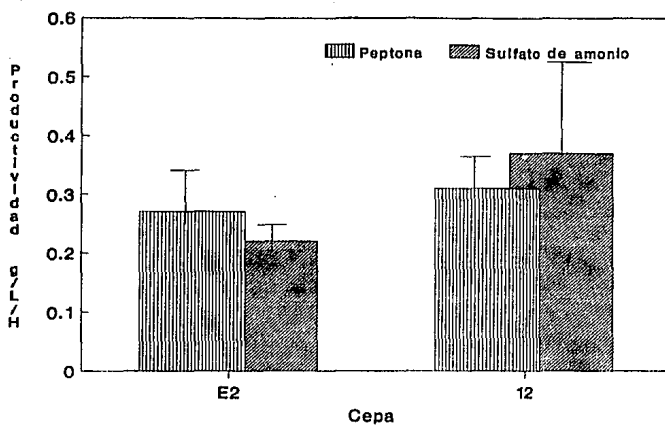


Figura 40

Productividad de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

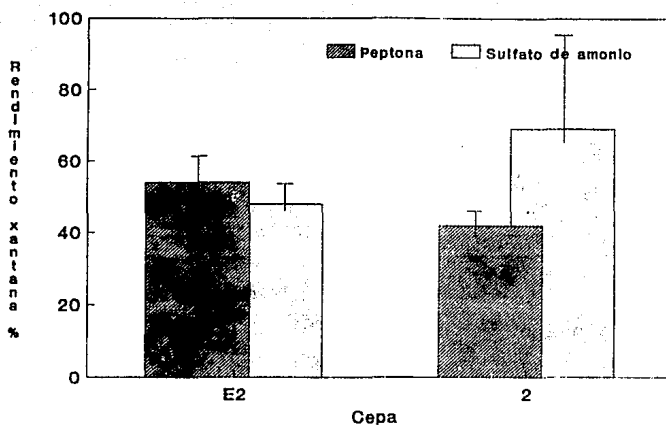


Figura 41

Rendimiento del polímero en base al azúcar inicial de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

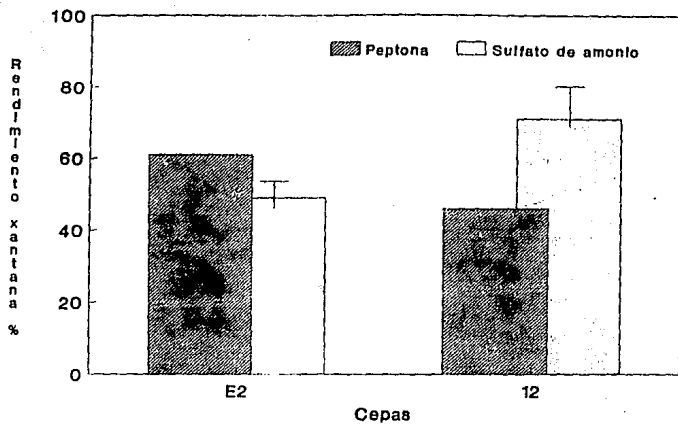


Figura 42

Rendimiento del polímero en base al azúcar consumido de las cepas 12 y E2 en el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

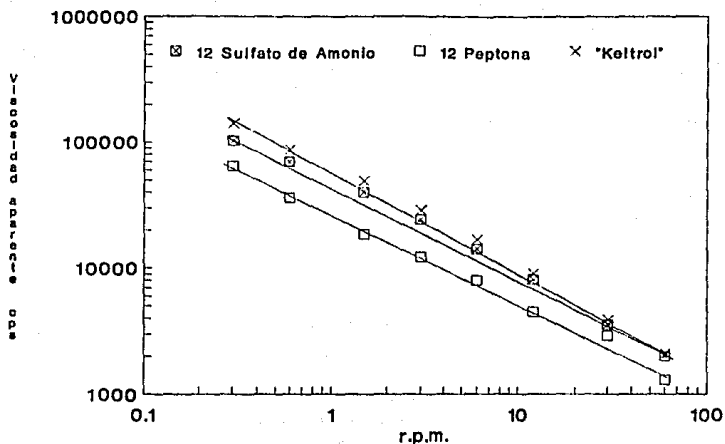


Figura 43

Reogramas de los polímeros producido por la cepa 12 en los cultivos realizados con el medio que contenía peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Los productos fueron sometidos al tratamiento enzimático, térmico y lavados dos veces con alcohol isopropílico. Soluciones de polímero al 1% (b.s.) y 1% de KCl.

Con la cepa E2 se observó (figura 44) que el polímero generado en el medio que contenía sulfato de amonio, a bajas velocidades de deformación generó valores de viscosidades aparentes menores que el del "Keltrol". En el medio que contenía peptona presentó (a todas las velocidades de deformación) valores de viscosidades aparentes muy similares al que presentó el "Keltrol".

En la tabla 19 se presentan los índices reológicos de los polímeros de las cepas 12 y E2, obtenidos en los medios que contenían peptona y sulfato de amonio. El polímero de la cepa 12 obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio, presentó un índice de consistencia más alto y un menor índice de pseudoplasticidad, si se compara con aquellos obtenidos con los productos generados. El polímero de la cepa 12, generado con el medio conteniendo sulfato de amonio, presentó mejores características reológicas si se compara con el polímero de la cepa E2.

El polímero de la cepa E2 mostró los mejores índices reológicos (índice de consistencia más alto e índice de flujo más bajo), en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno.

5.3.3 Efecto de los tratamientos post-fermentativos

Se evaluaron las propiedades reológicas de las soluciones del polímero de la cepa 12 en función de los distintos tratamientos post-fermentativos. El objetivo de lo anterior fué determinar si los tratamientos (térmico o enzimático) influían en la capacidad de generación de viscosidad en el producto resuspendido.

En la figura 45 se presentan los reogramas de las soluciones del polímero de la cepa 12, obtenido con el medio que contenía peptona y obtenido bajo dos condiciones a) sin ningún tratamiento, b) con los tratamientos térmico y enzimático. El principal efecto en el cambio de la reología lo constituyó el tratamiento enzimático-térmico.

Se ha reportado que el tratamiento térmico causa diferentes

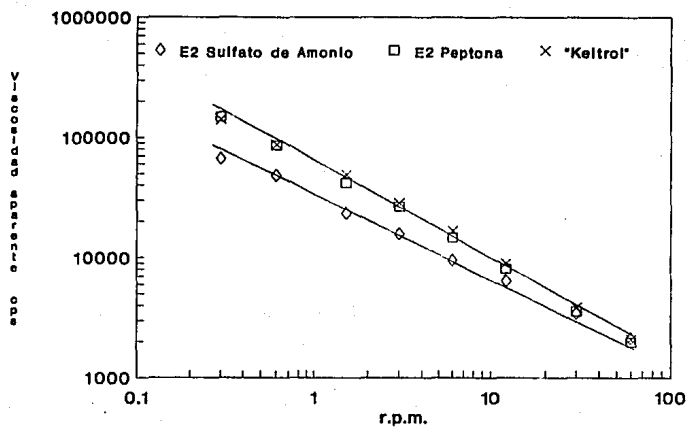


Figura 44

Reogramas de las soluciones de los polímeros producidos por la cepa E2 en el medio que contenía peptona ó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Los productos fueron sometidos al tratamiento enzimático, térmico y lavados dos veces con alcohol isopropílico. Soluciones de polímero al 1% (b.s.) y 1% de KCl.

Tabla 19

Indices reológicos de las soluciones de los productos generados por las cepas 12 y E2, obtenidos en los medios que contenían peptona ó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Productos	Peptona		Sulfato de amonio	
	K ($n.s^n / m^2$)	n (-)	K ($n.s^n / m^2$)	n (-)
12	5.68	0.25	10.3	0.27
E2	11.99	0.18	7.8	0.34
	K (Ns^n / m^2)		n (-)	
Keltrol		12.7		0.20

Los índices K y n fueron determinados con el programa "Reología de fluidos, Ley de la potencia; software" (Brito, 1988). Los productos fueron sometidos al tratamiento enzimático, térmico y lavados dos veces con alcohol isopropilico. Soluciones al 1% (b.s) de polímero y 1% de KCL.

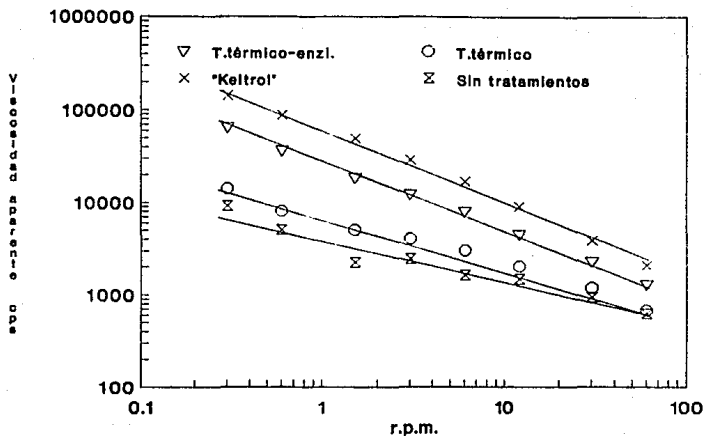


Figura 45

Reogramas de las soluciones de polímeros producidos por la cepa 12 (en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno), en función de los distintos tratamientos post-fermentativos. Soluciones de polímero al 1% (b.s.) y 1% de KCl.

efectos en los polímeros de diferentes orígenes. El contenido de radicales piruvatos en el polímero determina el nivel de cambio en la viscosidad aparente debido al tratamiento térmico (Tako y Nakamura, 1988). En general, el incremento en la viscosidad debido al tratamiento térmico es de menor magnitud en polímeros con más alto contenido de radicales piruvatos (Galindo *et al*, 1989).

Datos analíticos, indicaron que para el polímero de la cepa 12 obtenido en el medio con peptona como fuente de nitrógeno, el contenido de radicales piruvatos muy bajo (Tabla 20).

Se ha sugerido que la asociación inter e intramolecular entre las cadenas poliméricas juega un papel importante en los cambios que se pueden presentar en la reología de soluciones de goma xantana. Estas asociaciones moleculares son intermediadas por los radicales acetilos y el radical piruvato, así como la fuerza iónica determinada por el polímero en forma de sal (Ca^{2+} , K^{2+} , Na^{2+}) (Tako y Nakamura, 1984; 1987 y 1988).

5.3.4. Caracterización química de los polímeros de las cepas 12 y E2

La caracterización química de los polímeros de las cepas 12 y E2, obtenidos en ambos medios de cultivo se presenta en la tabla 20. En el producto de la cepa 12 obtenido con el medio que contenía sulfato de amonio, no se detectaron radicales piruvatos (tabla 20). Con el medio que contenía peptona, el contenido de este radical fue muy bajo.

En el polímero de la cepa 12 producido en el medio que contenía sulfato de amonio, el contenido de radicales acetilo fue mayor (5.3%) que en el producto obtenido en el medio con peptona.

En la cepa E2 se observó que el pirúvico es mayor en el polímero obtenido en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno (2.14%) respecto al que contenía sulfato de amonio (0.14%).

El polímero de la cepa E2 presentó menor contenido de acetilos en

Tabla 20

Análisis químico de los productos de las cepas 12 y E2 obtenidos en los medios que contenían peptona ó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

	C E P A			
	12		E2	
	Peptona	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Peptona	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Pirúvicos (%)	0.03	0.0	2.14	0.7
Acetilos (%)	4.0	5.3	5.0	2.5
Cenizas (%)	4.4	5.7	5.4	7.1
Nitrógeno (%)	2.9	1.4	0.5	1.3

el medio que contenía sulfato de amonio (2.5%) respecto al que contenía peptona (5%).

Para la cepa 12, el contenido de nitrógeno del producto obtenido con el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno fué mayor respecto al formulado con sulfato de amonio. Esto sugiere que puede establecerse una interacción entre compuestos nitrogenados con la molécula del polímero de la cepa 12. Ello explicaría la presencia de la banda de los 1560-1543 cm^{-1} en el espectro de infrarrojo.

5.3.5. Espectroscopía de infrarrojo, de los polímeros obtenidos con los medios que contenían peptona o sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Se llevó a cabo la espectroscopía de infrarrojo a los productos en los diversos pasos de los tratamientos post-fermentativos. Es decir, sin ningún tratamiento y con los tratamientos enzimático y térmico. Ello se llevó a cabo con la principal finalidad de poder indagar cual de estos pasos producían cambios importantes en los polímeros. En el anexo 4 se presentan los espectros de infrarrojo y el análisis cada uno de ellos.

Las principales diferencias del polímero de la cepa E2, obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio, con respecto al "Keltrol" fueron las intensidades de las bandas (tabla 21). El producto de la cepa E2 presentó bandas con intensidades menores que en el producto "Keltrol". Esto sugiere que tal producto presenta menor porcentaje de radicales acetilos, y pirúvicos. Ello concuerda con los datos analíticos (ver tabla 20). También sugiere una menor cantidad de ácidos carboxilos libres (1615 cm^{-1}) y posiblemente indique que pueda ser de un peso molecular menor que el producto "Keltrol".

Con respecto al producto de la cepa 12, obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio (fermentador de 1 L), se observaron cambios en las intensidades de las bandas de los 1407 cm^{-1} y 1373 cm^{-1} así como la ausencia de la banda de los 1541 cm^{-1} con el tratamiento post

Tabla 21

Intensidad relativa de las principales bandas de los espectros de infrarrojo del polímero de las cepas 12 y E2*.

Cepas	Intensidad relativa (cms)				
	A	B	C	D	E
E2*(ST)	3.4	6.8	13.1	4.2	3.8
E2*(TT-TE)	3.4	6.8	13.7	4.3	4.0
12*(ST)	3.5	12.1	13.4	3.7	3.5
12*(TT-TE)	5.4	7.3	13.6	5.0	5.2
Keltrol	5.0	14.5	13.9	6.2	5.9

A = Banda correspondiente a la vibración molecular de los radicales acetilos (1727 cm^{-1}).

B = Banda correspondiente a la vibración molecular de los ácidos carboxílicos libres ($1620 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$).

C = Banda de la inferencia de la asociación intramolecular (1060 cm^{-1}).

D = Banda correspondiente al metilo de los radicales acetilos (1404 cm^{-1}) y carbonilo del ácido pirúvico (1372).

E = OH de CH_2OH de la cadena (1250 cm^{-1}).

ST= Sin ningún tratamiento.

TT-TE= Tratamiento térmico y tratamiento enzimático.

*Polímeros obtenidos de fermentaciones en el medio de producción que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

fermentativo. Esto sugiere que el producto presenta cambios conformacionales así como una posible interacción con productos nitrogenados.

Al realizar la comparación de los polímeros con tratamiento térmico, se observó que la banda de los 1726 cm^{-1} es más intensa (tabla 21) lo cual indica un mayor porcentaje de radicales acetilos y esto concuerda con los resultados analíticos.

La comparación del espectro del polímero de la cepa 12, obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio (fermentador 1 L) y el producto "Keltrol", indicó una diferencia en la menor intensidad de la banda de 1614 cm^{-1} , lo que significa que el polímero puede presentar menor cantidad de ácidos carboxílicos libres. Se observa también una mayor intensidad en la banda 1248 cm^{-1} (ver tabla 21) (vibración molecular de los OH de los CH_2OH de la cadena) y posiblemente indica que la molécula puede presentar mayor ramificación que el producto "Keltrol".

Es importante remarcar que el perfil de las bandas del espectro de la cepa 12, obtenido con el medio que contenía sulfato de amonio, es muy semejante al producto comercial. Esto podría sugerir que la constitución química del polímero de la cepa 12 es prácticamente idéntica a la del "Keltrol" por lo que se le podría considerar una xantana "típica". El polímero de la cepa 12 presenta cambios importantes con los tratamientos post fermentativos.

En la tabla 22 se presentan las relaciones entre las intensidades de las bandas, comparadas con el producto de la cepa E2 y con el "Keltrol". Con los tratamientos post fermentativos, el polímero de la cepa E2 (obtenido con el medio que contenía sulfato de amonio) no presentó diferencias significativas en el área de las bandas. Sin embargo, como resultado de los tratamientos post-fermentativos en el producto de la cepa 12 se observó un incremento en la relación de bandas A/B y un decremento en la relación B/C con respecto al producto que no se le realizó ningún tratamiento. Se observó también un incremento en el área de la banda 1065 cm^{-1} , respecto al producto que

Tabla 22

Relación entre las bandas de los espectros de infrarrojo de los polímeros de la cepa 12 y de la cepa E2* y las del producto "Keltrol"

Cepa	Relación de bandas			Banda 1065 cm ⁻¹
	A/B	B/C	D/E	Area (cm ²)
E2*(ST)	0.29	0.36	1.10	23.6
E2*(TT-TE)	0.31	0.32	1.16	30.1
12*(ST)	0.14	0.64	1.25	27.5
12*(TT-TE)	0.42	0.28	1.33	33.3
Keltrol	0.34	1.04	1.05	

A/B = Acetilos/carboxilato

B/C = Carboxilato/banda C-O azúcares

D/E = Ch₃ acetilos-pirúvicos/OH de CH₂OH de la cadena

ST = Sin ningún tratamiento.

TT-TE = Tratamiento térmico-tratamiento enzimático.

* Polímeros obtenidos con el medio que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

no se le realizó ningún tratamiento, lo que sugiere que se presenta mayor asociación intramolecular en el polímero de la cepa 12 de acuerdo con los tratamientos post-fermentativos.

Los espectros de infrarrojo de los productos obtenidos en los dos medios de cultivo se presentan de forma comparativa en las figuras 46 a la 48.

En la figura 46 se muestra el espectro del polímero de la cepa E2 obtenido en el medio que contenía peptona y sulfato de amonio. Las principales diferencias se encuentran en las bandas de los 1727 cm^{-1} , 1624 cm^{-1} , 1404 cm^{-1} y 1248 cm^{-1} . Todas ellas son más intensas en el producto obtenido con el medio que contenía peptona. Ello implica un mayor contenido de radicales acetilos y pirúvicos así como una mayor cantidad de ácidos carboxílicos libres. También implica una mayor ramificación y posiblemente, en su conjunto, un mayor peso molecular. Esto podría explicar las mejores características reológicas del producto, obtenido con el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno.

Con respecto al producto de la cepa 12, la figura 47 indica que, el polímero obtenido en el medio que contenía sulfato de amonio, la intensidad de todas las bandas fue mayor si se compara con el producto generado en el medio que contenía peptona. Lo anterior podría sugerir un mayor peso molecular. Lo que a su vez podría explicar las mejores características reológicas del producto.

En la figura 48 se muestra los espectros de infrarrojo para los productos de la cepa 12 obtenidos en el medio que contenía peptona y después de cada uno de los tratamientos post-fermentativos. Las intensidades de las bandas de los 1627 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , 1407 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} y 1248 cm^{-1} se reducen con el tratamiento térmico y se reducen aún más cuando además el producto se trata enzimáticamente (ver tabla 23). Es notable, un cambio en las intensidades de las bandas de los 1407 cm^{-1} y 1373 cm^{-1} . Esto sugiere cambios en la conformación y la posible eliminación de los compuestos nitrogenados que podrían estar asociados con el polímero.

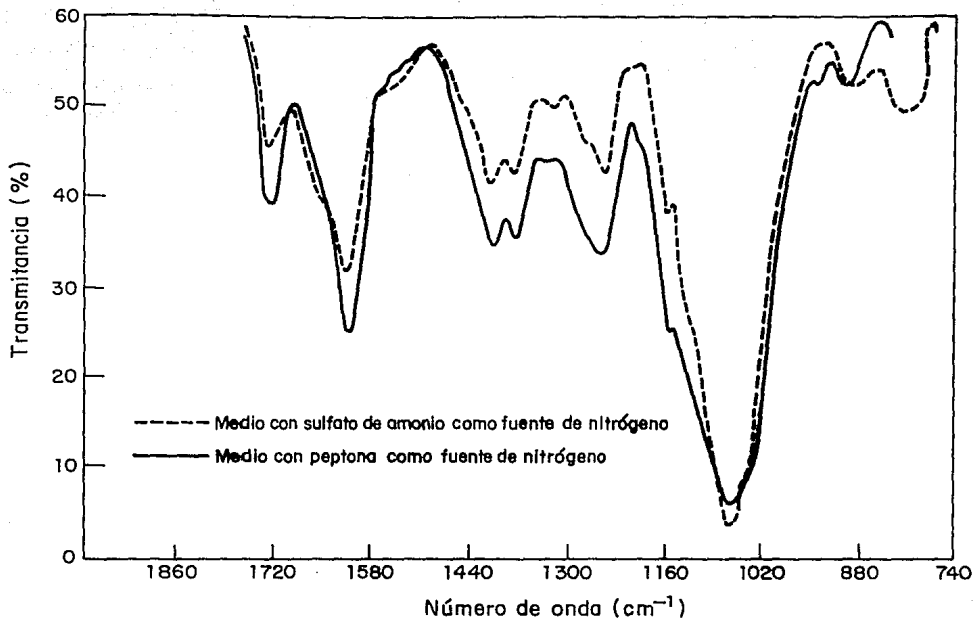


Figura 46

Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa E2 en el medio que contenía sulfato de amonio o peptona como fuente de nitrógeno. Ambos polímeros fueron sometidos a los tratamientos térmico y enzimático.

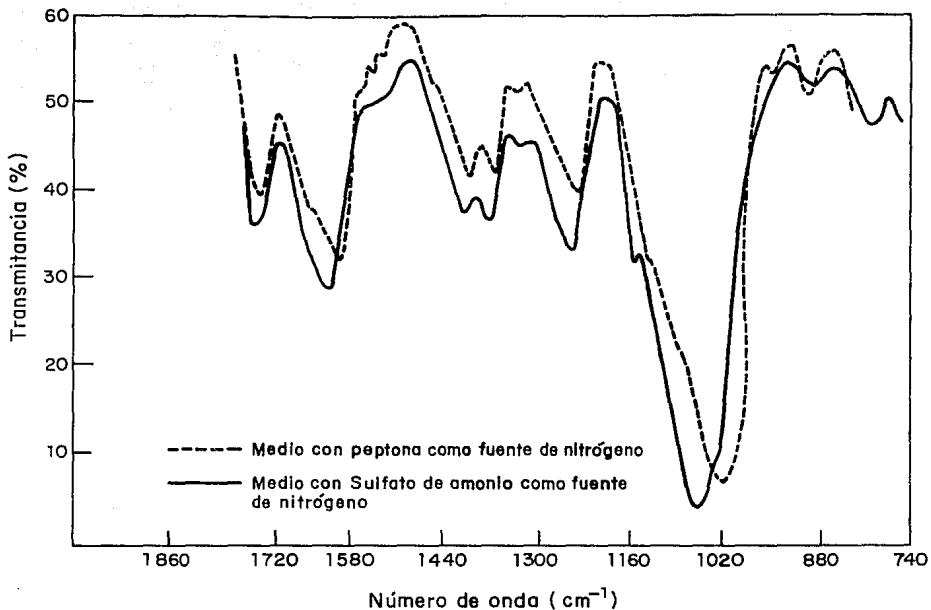


Figura 47

Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa 12 en el medio que contenía sulfato de amonio o peptona, como fuente de nitrógeno. Ambos polímeros fueron sometidos a los tratamientos térmico y enzimático.

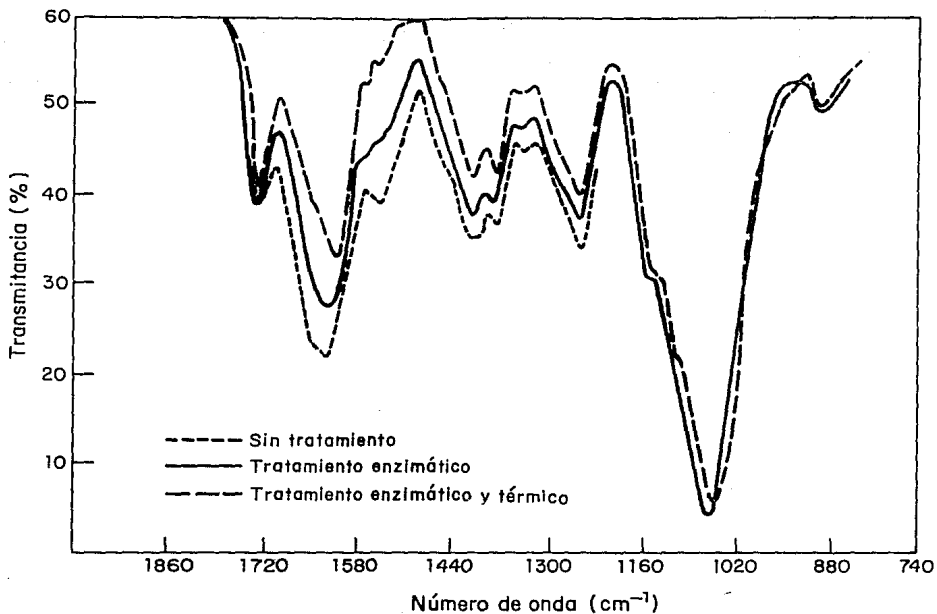


Figura 48

Espectros de infrarrojo del polímero producido por la cepa 12 en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno. Con y sin tratamientos post-fermentativos.

Tabla 23

Intensidad relativa de las bandas del espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12, obtenido en el medio que contenía peptona como fuente de nitrógeno

Condiciones del tratamiento	Intensidad relativa (cm)				
	A	B	C	D	E
ST	5.3	15.6	13.0	5.7	5.3
TE	4.7	7.9	12.9	5.0	4.6
TT-TE	4.7	6.5	12.8	5.9	3.8

A = Banda correspondiente a la vibración molecular de los radicales acetilos (1727 cm^{-1}).

B = Banda correspondiente a la vibración molecular de los ácidos carboxílicos libres ($1620 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$).

C = Banda de la inferencia de la asociación intramolecular (1060 cm^{-1}).

D = Banda correspondiente al metilo de los radicales acetilos (1404 cm^{-1}) y carbonilo del ácido pirúvico (1372).

E = OH de CH_2OH de la cadena (1250 cm^{-1}).

ST = Sin tratamiento.

TE = Tratamiento enzimático

TE-TT = Tratamiento enzimático - tratamiento térmico

CONCLUSIONES (sección 5.3)

1. a) La cinética de producción de goma xantana de la cepa 12 se vió afectada por los componentes del medio, principalmente por la peptona.
b) La velocidad específica de crecimiento de la cepa 12 es mayor en el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno. Se obtuvo mayor concentración de células.
c) En el medio que contiene peptona, el polímero de la cepa 12 generó una viscosidad aparente baja en el caldo de fermentación.
d) La producción específica, el rendimiento (en base al azúcar inicial y consumida) de la cepa 12, fué menor al que presentó la cepa E2, en el medio que contiene peptona. Sin embargo, la cepa 12 presentó mayor productividad que la cepa E2.
2. Con respecto a la producción del polímero de la cepa 12 en el medio que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno:
a) Se observó que se obtiene mayor concentración de goma (28%), mayor productividad y mayor rendimiento con respecto a la cepa E2.
b) La cepa produce un caldo de fermentación con una viscosidad aparente mayor a la que se presenta en la fermentación con peptona como fuente de nitrógeno.
- 3.-Respecto a la reología del producto resuspendido:
a) El polímero de la cepa 12, obtenido en el medio con peptona, generó una viscosidad aparente menor a la que presentó en el polímero de la E2.

- b) En el medio que contiene el sulfato de amonio, la cepa 12 produce un polímero que, al ser resuspendido, presentó (en todos los gradientes de deformación) mayor viscosidad aparente, con respecto al producto de la cepa E2. Viscosidades aparentes (en todos los gradientes de deformación) similares al del producto Keltrol. Presentó un índice de consistencia mayor al de la cepa E2 y un índice de pseudoplasticidad menor al de la cepa E2.
- c) En la cepa E2 se observó que el polímero obtenido con el medio con peptona presentó valores de viscosidades aparentes muy semejantes a las del producto "Keltrol". Este producto, sin embargo, presentó un índice de consistencia (K) menor, pero fue más pseudoplástico (n menor), que el producto "Keltrol". El polímero de la cepa E2 obtenido con el medio que contiene sulfato de amonio presentó valores inferiores en los índices reológicos con respecto al producto "Keltrol" y al producto obtenido en el medio con peptona.

4.-Los resultados de las pruebas analíticas indicaron que:

- a) En el polímero de la cepa 12 obtenido con el medio con sulfato de amonio, no se detectaron radicales de ácido pirúvico. El contenido de radicales acetilos es mayor que en el producto obtenido en el medio con peptona.
- b) El producto de la cepa 12 obtenido en el medio con peptona, presenta mayor contenido de nitrógeno. Este valor confirmaría la posibilidad de que la molécula polimérica se encuentra asociada con un complejo nitrogenado. Esta interacción se establece con los radicales piruvatos, de tal forma que la cuantificación con el método enzimático pudiera ser inadecuada.

5.-Los espectros de infrarrojo indicaron:

- a) La cepa E2 sintetizó, en el medio con peptona, un polímero de mayor peso molecular. El peso molecular del producto, podría estar involucrado en las mejores características reológicas del producto resuspendido.
- b) La cepa I2 sintetizó, en el medio con sulfato de amonio, un polímero que presentó mayor intensidad relativa en las bandas, lo cual indicaría que fuese de mayor peso molecular que el producto sintetizado en el medio con peptona. Este peso molecular más elevado explicaría también las mejores características reológicas del producto.
- c) En el polímero de la cepa I2 obtenido en el medio con peptona, los tratamientos post-fermentativos reducen la interacción molecular de los compuestos nitrogenados y radicales piruvatos de la cadena polimérica. Esto se apoya por la reducción (hasta la desaparición) de la banda de los 1541 cm^{-1} . La cual representa la vibración molecular del complejo de los grupos piruvatos y su asociación con grupos nitrogenados.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Con respecto a la selección de cepas nativas evaluadas en matraces bafleados.
 - a) Se seleccionaron las cepas denominadas 10, 11, 12, 15 y 16, las cuales presentaron mayor producción de polímero, mayor rendimiento y mejores productividades en la producción de goma con respecto a la cepa E2.
 - b) De las cepas seleccionadas, se destacó la cepa 12 dado que produjo:
 - i) 40% más de polímero que la cepa E2.
 - ii) Mayor producción específica y más alta productividad, con respecto a la cepa E2.
 - iii) El producto resuspendido presentó valores de viscosidad aparente superiores al producto de la cepa E2 y al Keltrol [Soluciones preparadas al 1% de producto (b.s.)].
 - iv) Índice de consistencia más alto que el de la cepa E2 y índice de pseudoplasticidad más baja que de la cepa E2.
 - v) El análisis en el espectro de infrarrojo sugirió que el producto podría contener altos valores de radicales acetilos, lo cual fue confirmado con los análisis químicos.

2. Respecto a la producción de goma de las cepas nativas seleccionadas y evaluadas en el fermentador de 1 L con el medio que contiene peptona como fuente de nitrógeno:

a) Las cepas 10, 11 y 12 presentaron una velocidad específica de crecimiento mayor a la que presentó la cepa E2.

b) Las cepas 10, 11 y 12 no presentaron fase de acondicionamiento o fase "lag" en el crecimiento.

c) Las cepas 10 y 11 presentaron ventajas en la producción de goma: mayor productividad, mayor concentración de goma y mejores rendimientos con respecto a la cepa E2. Las soluciones de los polímeros de estas cepas [1% (b.s) de polímero] -en todos los gradientes de deformación- presentaron valores de viscosidad aparente menor al del producto "Keltrol". Los productos presentaron bajo contenido de ácido pirúvico. Los espectros de infrarrojo sugieren que los productos de ambas cepas pueden ser de menor peso molecular con respecto al producto sintetizado por la cepa E2. El bajo peso molecular de estos productos podría explicar los bajos índices reológicos obtenidos de las suspensiones realizadas, en comparación con los índices reológicos obtenidos del producto de la cepa E2 y los del producto "Keltrol".

d) Durante el cultivo de la cepa 12 se observó, que el polímero presentó baja viscosidad aparente en el caldo de fermentación (en relación a la concentración sintetizada y la generación de viscosidad aparente determinada en el caldo de fermentación, durante el cultivo de la cepa y su comparación con lo presentado por los polímeros de las cepas evaluadas). En soluciones preparadas con el 1% (b.s.), el polímero, presentó en un rango amplio de velocidades de deformación, valores de viscosidades aparentes menores a las que presentó el producto de la cepa E2 y el "Keltrol". Los valores menores en

los índices reológicos del producto de la cepa 12 fué explicado por la baja pureza que contenía el producto, debido a que presentó un alto porcentaje de nitrógeno. Presentó un bajo contenido de radicales piruvatos. De acuerdo con el espectro de infrarrojo, es posible inferir que los radicales piruvatos esten en interacción con compuestos aminados. Lo cual esta apoyado por la presencia de la banda de los 1541 cm^{-1} asi como por los altos contenidos de nitrógeno medidos analíticamente.

Es importante resaltar que este fenómeno (generación de viscosidad aparente baja en el caldo de fermentación) no ha sido reportado y que ofrecería ventajas potenciales en el proceso de la producción del polímero. Ello permitiría eliminar los problemas inherentes del mezclado y transferencia de masa, durante el proceso de la fermentación.

3. De acuerdo con la evaluación de la producción de goma de la cepa 12, empleando el medio que contenía sulfato de amonio como fuente de nitrógeno:

- a) La cepa 12 presentó una velocidad específica menor al de la cepa E2.
- b) Produce 28% más de goma, mayor producción específica mejores rendimientos y mayor productividad que la cepa E2.
- c) La reología del producto resuspendido (1% de polímero b.s.) presentó viscosidades aparentes muy similares a las del "Keltrol" y valores superiores al producto de la cepa E2. Los índices reológicos fueron más altos que el polímero de la cepa E2 y más bajos que para el "Keltrol". En este producto no se detectaron radicales piruvatos. Del espectro de infrarrojo se infiere que el radical pirúvico podría estar asociado con compuestos aminados, esta interacción podía interferir en la acción enzimática y en consecuencia no detectarse con el método empleado. Además fué posible inferir cambios en la conformación

del producto con los tratamientos post-fermentativos.

El polímero de la cepa E2 obtenido con el medio que contiene sulfato de amonio, presentó valores inferiores en los índices reológicos con respecto al producto "Keltrol" y al producto obtenido en el medio con peptona. De acuerdo con los análisis de los espectros de infrarrojo se observó que el producto de la cepa E2 puede presentar menor peso molecular que el "Keltrol" y esto podría explicar los bajos valores de los índices reológicos.

Durante el desarrollo del presente estudio se han evaluado cepas nativas potenciales para la producción de goma xantana. Estas cepas nativas presentan ventajas en la producción de goma así como en el producto resuspendido en comparación con el producto de la cepa E2 e inclusive al producto "Keltrol".

La posibilidad de la producción de la goma xantana, con caldos de fermentación de viscosidades aparentes bajas, proporcionaría ventajas en el proceso de producción debido a que se eliminarían problemas de mezclado.

Se ha establecido que la cepa 12 proporcionaría ventajas en la producción de goma y representa una cepa de gran potencialidad con respecto a la cepa E2.

RECOMENDACIONES

En el presente estudio se han descrito y caracterizado cepas potenciales para la producción de goma xantana. Estas cepas nativas no solo incrementan una colección de cultivos microbianos sino que son un potencial para la realización de estudios básicos referentes a la genética, biosíntesis, producción, constitución y reología de los productos.

-Se propone realizar un estudio taxonómico exhaustivo para identificar las cepas nativas 10, 11 y 12, estableciendo (si fuera posible) el pv. de cada una.

-La espectroscopía de infrarrojo de los polímeros sintetizados por las cepas nativas ha sugerido la posibilidad de emplear esta herramienta como un método potencial para la identificación taxonómica de cepas productoras de goma xantana. Por lo que se recomendaría realizar un estudio comparativo de espectroscopía de infrarrojo de diferentes polímeros cuyas fuentes sean cepas de colección o cuya identificación taxonómica sea reconocida. Formar familias de acuerdo con las agrupaciones de las bandas características que se presentan en los diferentes número de onda. De esta manera comparar con los espectros de la cepas nativas en las que se desconoce la especie e inclusive el pv.

-El género *Xanthomonas* se ha caracterizado por su inestabilidad genética. Se han reportado cambios morfológicos, pérdida en la capacidad de producción de goma, así como cambios en la composición molecular del polímero. Por ello, se sugiere que se realicen estudios integrales acerca de la estabilidad o inestabilidad de las cepas nativas potenciales 10, 11, 16 y sobre todo de la cepa 12.

-Se sugiere llevar a cabo fermentaciones a nivel de planta piloto (fermentadores de 25 L, 100 L o 500 L) y caracterizar la producción de goma así como de los productos obtenidos. Realizar estudios sobre la reproducibilidad química y reológica de los lotes de goma generada en diversos lotes de fermentación.

-Evaluar la producción y las características de los productos generados con la cepa 12 obtenidos con diferentes condiciones de aireación.

-Es posible que la composición de los azúcares sea diferente en los polímeros de las cepas nativas 10, 11, 12 y 16. Por lo que sería interesante realizar un estudio químico detallado sobre la composición de los productos.

-Los espectros de infrarrojo sugieren que los polímeros de las cepas 10, 11 y 12 puedan ser de menor peso molecular, lo cual debería comprobarse con una evaluación experimental.

-La presencia y ausencia de la banda de los 1541 cm^{-1} con el tratamiento térmico sugiere que el producto sintetizado por la cepa 12, podría contener radicales piruvatos. Posiblemente estos radicales interaccionen con compuestos nitrogenados. Esta asociación molecular podría interferir en la cuantificación enzimática y por lo tanto es posible que este método no se el más adecuado. Por lo que se propone emplear espectroscopía de masas para establecer evidencias de la presencia del radical. Además, realizar un estudio de hidrólisis química para cuantificar el contenido de radical piruvato.

-Realizar estudios de reología de los productos de las cepas 12, 10, 11 y 16 de soluciones diluidas de goma xantana. Evaluar además, la estabilidad a diferentes pH, temperaturas y concentraciones de sales.

ANEXO I

DESCRIPCION DE REACTIVOS Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

REACTIVOS

A continuación se enlistan los productos químicos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo:

Nombre comercial	Procedencia
Acetona	Laboratorios Laitz S.A.
Antiespumante (silicón)	Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.
Agua	(filtrada por ósmosis reversa)
Agar	Difco
Acido acético J.T. Baker	
Acido bórico	J.T. Baker
Acido cítrico	J.T. Baker
Acido clorhídrico	J.T. Baker
Alcohol isopropílico	(Grado industrial)
Bacto agar	Difco
Bacto dextrosa	Difco
Bacto peptona	J.T. Baker
Carbonato de calcio	J.T. Baker
Cloruro férrico	J.T. Baker
Cloruro de potasio	J.T. Baker
Cristal violeta	Laboratorios Laitz, S.A.
Carbonato de calcio	J.T. Baker
Dextrosa	J.T. Baker
Etanol	J.T. Baker
Extracto de levadura	Difco
Extracto de malta	Difco
Fosfato de amonio monobásico	J.T. Baker
Fosfato de potasio	J.T. Baker

Goma xantana "Keltrol"	Kelco, Co.
Hidróxido de amonio.	J.T. Baker
Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Hipoclorito de sodio	Cloralex
Kit para la determinación de glucosa (Merckotest GOD-PAP 3393)	Merck
Lugol	Laboratorios Laitz. S.A.
Oxido de zinc	J.T. Baker
Peptona	Difco
Safranina	Laboratorios Laitz, S.A.
Sulfato de amonio	J.T. Baker
Sulfato de magnesio	J.T. Baker

EQUIPO.

Nombre

Proveedor y/o modelo

Agitador de aspas	Marca "CAFRAMO" Warton, Ont. Canada Tipo stirrer RZRI-04
Autoclave	FAMSA
Balanza analítica	Bosch S 200
Balanza granataria	Ohaus Brainweigh B 5000
Bomba de vacío	Feli Welch, modelo FE-1400
Campana de flujo laminar	Velco modelo GHFL-12
Centrífuga (0-5,000 rpm)	Solvat, Aparatos científicos
Centrífuga (0-14,000 rpm)	Sorvall RC-5B (rotor SS-34)
Espectrofotómetro	Beckman, modelo 35
Estufa	Felisa, modelo 2914
Fermentador de 2 L.	s/marca (más detalles en la figura A-1) Componentes y características: Flecha: barra de acero inoxidable de 0.9 mm de diámetro. Motor eléctrico de 1 Hp. Sello : sistema de cierre hermético (shaf

seal).

Tanque de vidrio, diámetro 11 cm, altura 22 cm. espesor del vidrio 0.5 cm.

Los controles empleados para realizar fermentaciones con el equipo de 2 lts. fueron los siguientes:

Temperatura : mediante un termomix (Colora ET 5) sumergido dentro de la tina del fermentador.

Agitación : mediante un reóstato adaptado al motor, calibración con tacómetro óptico (Uveeder-Root 6611).

Aireación : mediante un rotámetro (Cole- Parmer, modelo 3217-45) flujo de aire humedo 0.25-1 $\frac{yvm}{2}$, presión de entrada de aire: 1 kg/cm .

pH : controlador de pH (CI - UNAM), electrodo de pH (Ingold), bomba peristáltica para la adición de base o ácido (MasterFlex 7014 20).

Espuma : Control manual mediante la inyección de silicón

Homogenizador	Caframo Wlarton, Ont. 60
Impulsores	Turbinas tipo Rushton s/marca
Incubadora -Agitadora	New Brunswick Scientific
Manómetro	Metron
Matraces	Erlenmeyer 500 ml.Pyrex
Parrilla agitadora	Corning PC 353
Potenciómetro	Corning pH meter 3D
Rotámetro	Cole-Parmer modelo 3217-45
Sistema de filtración	Millipore (membranas de poro de 0.45 micras)
Viscosímetro	Brookfield, modelo LVT
Olla expres	Presto, modelo 21 L
Super Mixer, Vortex	Lab-Line Inst.

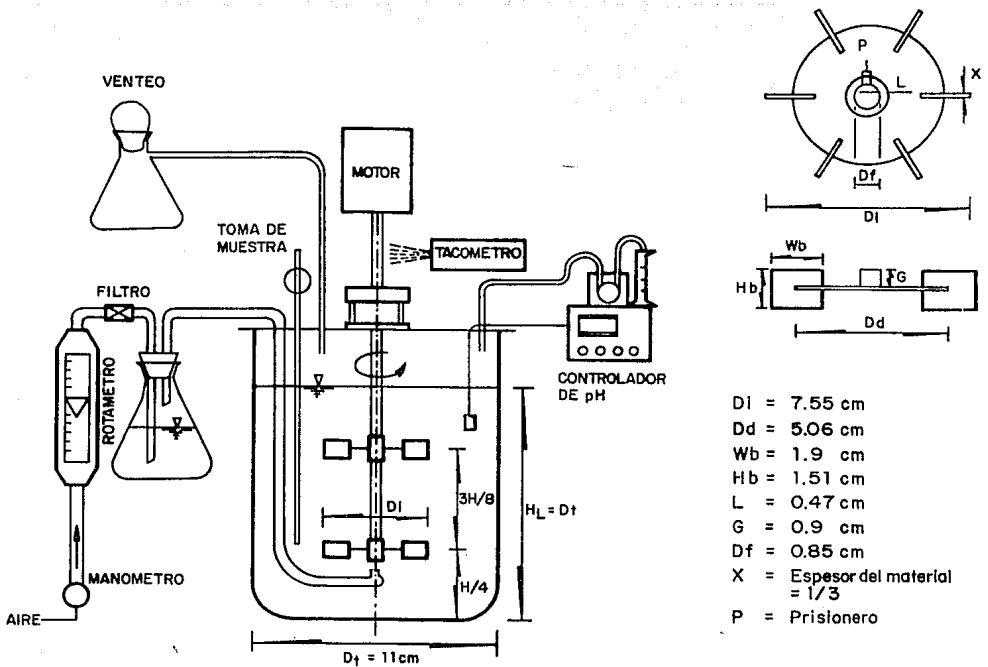


Figura A-1. Diagrama y componentes del fermentador, volúmen de trabajo de 1L.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio YPD

MEDIO DE EXTRACTO DE LEVADURA MALTA
(YM).

(Jeans *et al* , 1976)

<u>Componente</u>	<u>g/L</u>	<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
Glucosa	20	Extracto de levadura	3
Extracto de levadura	10	Extracto de malta	3
Peptona	20	Peptona	5
pH (con NaOH)	7	Glucosa	10
Agar	20 (cuando se requiere).		

Preparación

Se pesan cada uno de los componentes de los medios, se disuelven con agua y se aforan a la cantidad deseada con agua destilada. Posteriormente se esterilizan en el autoclave a 15 lb/pul² (120°C) de presión durante 15 min.

En el caso de medio sólido, una vez estéril el medio y con una temperatura moderada (antes de solidificarse el agar) se vacía en cajas de Petri estériles (aproximadamente 20 ml. de medio en cada caja).

Medio de producción (Quintero, *et al*, 1984b).

<u>Componente</u>	<u>g/L</u>
Sacarosa	24
NH ₄ (SO) ₂	0.23
Mg SO ₄	1.3
Ac. cítrico	3.9
KH ₂ PO ₄	0.0024

<u>Componente</u>	<u>g/l</u>
CaCO ₂	0.0048
HBO ₃	0.0072
ZnO	0.0014
FeCl ₃	0.0014
pH	7.1

Preparación

Se pesa la sacarosa y se disuelve en el 10 % del volumen total del medio a preparar en agua destilada. Los demás componentes se pesan y se disuelven en el 90 % del volumen restante, se ajusta el pH con lentejuelas de NaOH. Se esteriliza la sacarosa disuelta y los componentes del medio, ambos en su matraz correspondiente a 120°C por 15 min. Antes de inocular se mezcla la solución de la sacarosa estéril con el medio.

MEDIO DE PRODUCCION MODIFICADO.

En el presente trabajo se empleó otro medio que se le denominó medio modificado el cual fue previamente reportado (Flores, 1989) . La modificación que se realizó fue en base a la concentracion en la fuente de carbono. La fuente original de nitrógeno (sulfato de amonio) se sustituyó por peptona.

Componente	g/L
Sacarosa	24
Peptona	2
Fosfato de amonio monobásico	0.69
Fosfato de potasio	3.07
Acido cítrico	1.3

Componente	g/l
Sulfato de magnesio	0.23
Cloruro férrico	0.0014
Carbonato de calcio	0.0024
Acido bórico	0.0048
Oxido de zinc	0.0072
pH (con NaOH concentrado)	7.0

Preparación

El medio se prepara de la misma forma que el medio de producción. El ajuste del pH del medio debe realizarse en ausencia de la peptona. Una vez ajustado el pH, se agrega la peptona al medio.

ANEXO 2

ESPECTROS DE INFRARROJO DE LOS POLIMEROS DE LAS CEPAS NATIVAS Y E2 OBTENIDOS EN MATRACES BAFLEADOS (SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITROGENO)

En las figuras A-1 a la A-5 se presentan los espectros de los polímeros de las cepas identificadas como 10, 11, 12, 15 y 16. En cada caso , la comparación se realizó con el EI del polímero de la cepa E2.

En la figura A-1 se presenta el espectro del polímero de la cepa 10. Este polisacárido presentó las mismas bandas que el polisacárido de la cepa E2, aunque las bandas son de mayor intensidad . Esto sugiere que el polímero podría ser de mayor peso molecular. La intensidad superior de la banda de los 1727 cm^{-1} (vibración de los carbonilos de los radicales acetilos), implica que el polímero podría contener mayor cantidad de radicales acetilos. La presencia de un solo hombro a los $1560\text{-}1511\text{ cm}^{-1}$ (vibración molecular del carbonilo del metilo presente en el radical ácido pirúvico) indica un bajo contenido de este radical.

Las principales diferencias del EI del polímero de la cepa 10 con respecto al de la cepa E2, se presentan en la tabla A-1. En vista de que el espectro presentó el mismo perfil de bandas que el producto de la cepa E2, este polímero puede considerarse como una xantana "típica".

En la figura A-2 se presenta el espectro del polímero de la cepa 11. Las bandas que se presentan en todo el rango de los números de onda fueron similares a las que se observaron en el polímero de la cepa E2. En la tabla A-2 se muestran las diferencias en las bandas del espectro del producto de la cepa 11 con respecto al polímero de la cepa E2 . Es posible considerar al producto de la cepa 11, como otra xantana "típica".

En la figura A-3 se presenta el espectro de la cepa 12 y su comparación con el de la cepa E2. En la tabla A-3 se indican las principales diferencias que mostró el polímero proveniente de esta cepa respecto al de la cepa E2. Es importante remarcar que este polímero

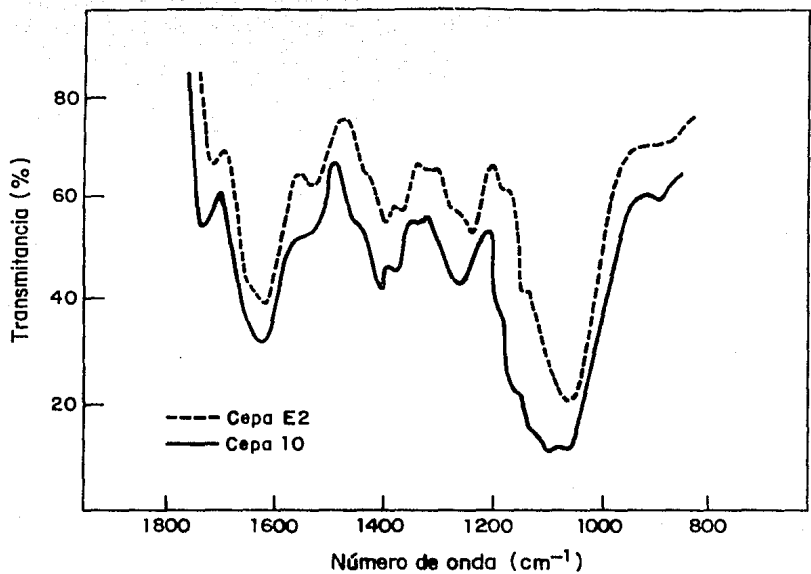


Figura A-1

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 10 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A-1

Diferencias en las bandas del E.I del polímero de la cepa 10 con respecto al E. I. de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1727	Mayor intensidad en la banda, lo que sugiere mayor concentración de radicales acetilos
1624-1629	Mayor intensidad, lo que sugiere mayor cantidad de ácidos carboxílicos libres.
1560-1511	La presencia de un solo hombro sugiere un bajo porcentaje de ácido pirúvico.
1404	Las dos bandas en esta longitud de onda, indicarían que los piruvatos se podrían localizar en varias partes de la cadena.
1297-1248	Mayor intensidad, mayor cantidad de CH_2OH libres y una posible mayor ramificación.
1067	Mayor intensidad, lo que sugiere que prevalece la asociación intramolecular.

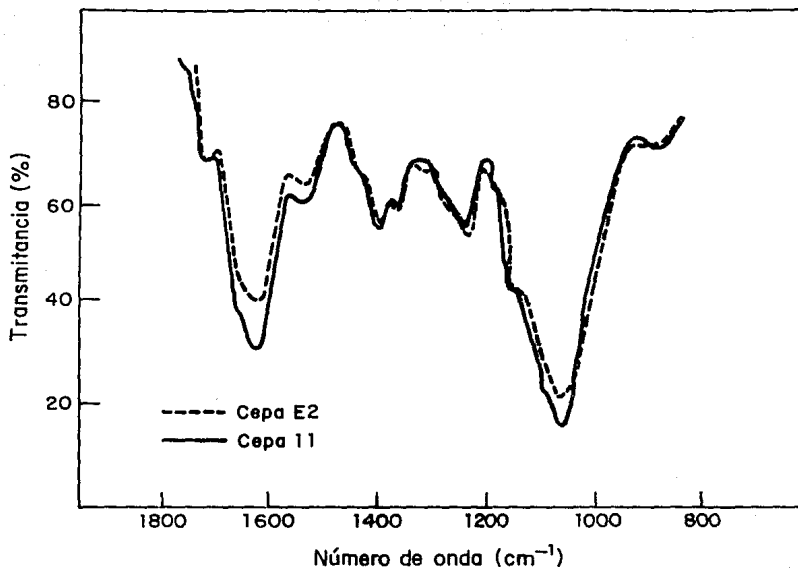


Figura A-2

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 11 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A-2

Diferencias en las bandas del E.I del polímero de la cepa 11 con respecto al E. I. del polímero de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1629	Mayor intensidad, lo que sugiere una mayor cantidad de ácidos carboxílicos libres.
10067	Esta banda predomina, lo que implica que el polímero presenta fuerte asociación intramolecular.

Tabla A-3

Diferencias en las bandas del E.I del polímero de la cepa 12 con respecto al polímero de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1727	Mayor intensidad, lo que sugiere mayor concentración de acetilos.
1560-1511	No se presenta, lo que sugiere que este polímero no podría contener radicales pirúvicos.
1246-1248	Mayor intensidad. Sugiere que existe mayor cantidad de CH_2OH libres y una posible mayor ramificación.
1067	Se presenta como banda única, lo que implicaría que prevalece la asociación intramolecular.

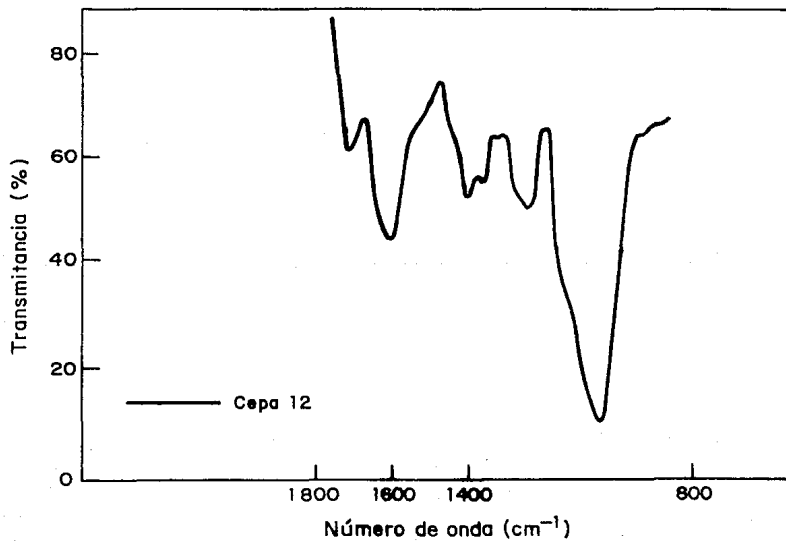
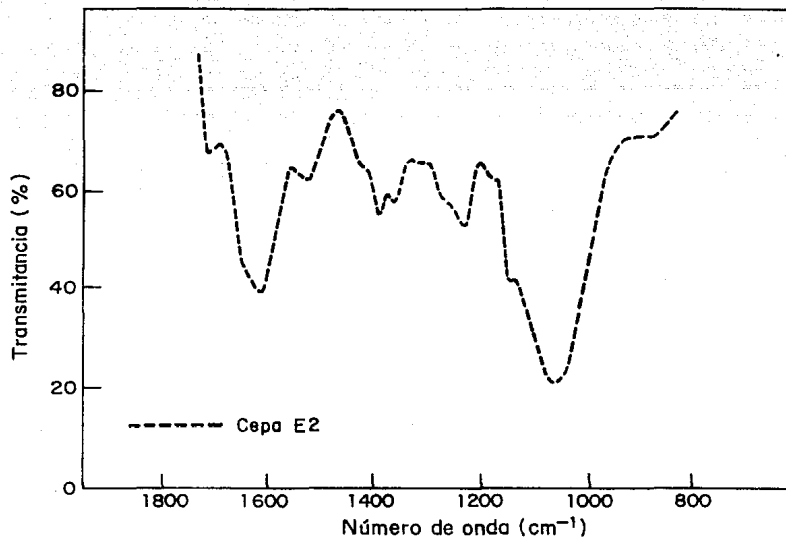


Figura A-3

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

también podría considerarse como una xantana "típica". Por otra parte y de acuerdo con el E.I., es posible indicar que este no contenga radicales piruvatos.

En la figura A-4 se presenta el espectro de la cepa *X. campestris* pv. *juglandis* (15). En la tabla A-4 se presentan las diferencias con respecto al E.I. del polímero de la cepa E2. Es posible indicar que el polímero presenta mayor porcentaje de radicales pirúvicos.

En la figura A-5 se muestra el espectro de la cepa *X. campestris* pv. *manhotis* (16) y en la tabla A-5 se presentan las principales diferencias respecto al espectro de la cepa E2. Este polímero (16) también presentó mayor intensidad relativa en las bandas, lo que sugiere que el polímero podría presentar mayor peso molecular.

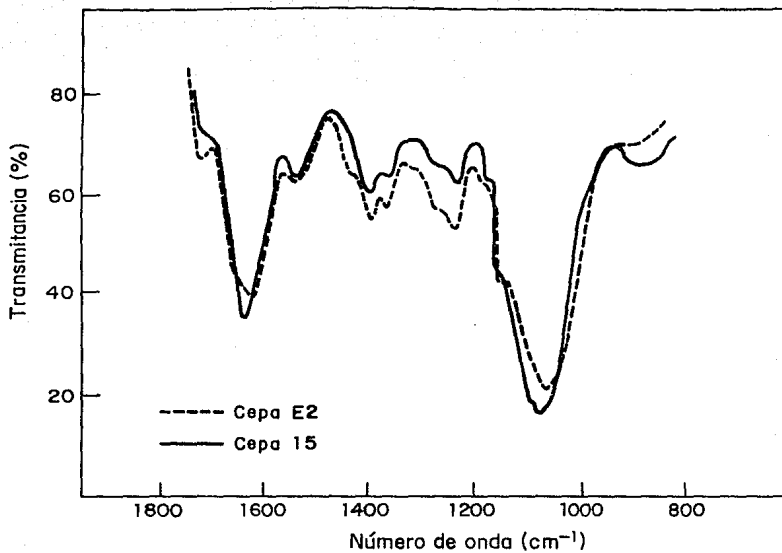


Figura A-4

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 15 (pv. *juglandis*) y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A-4

Diferencias en las bandas del E.I. de la cepa 15 (pv. *juglandis*) con respecto al E.I. de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1727	Presencia de un solo hombro. Implicaría menor porcentaje de radicales acetilos.
1560-1511	Mayor presencia de la banda, lo que implica la presencia de mayor número de radicales de ácidos pirúvico.
1248-1211	Menor intensidad, implicaría menor cantidad de CH_2OH libres y menor ramificación.

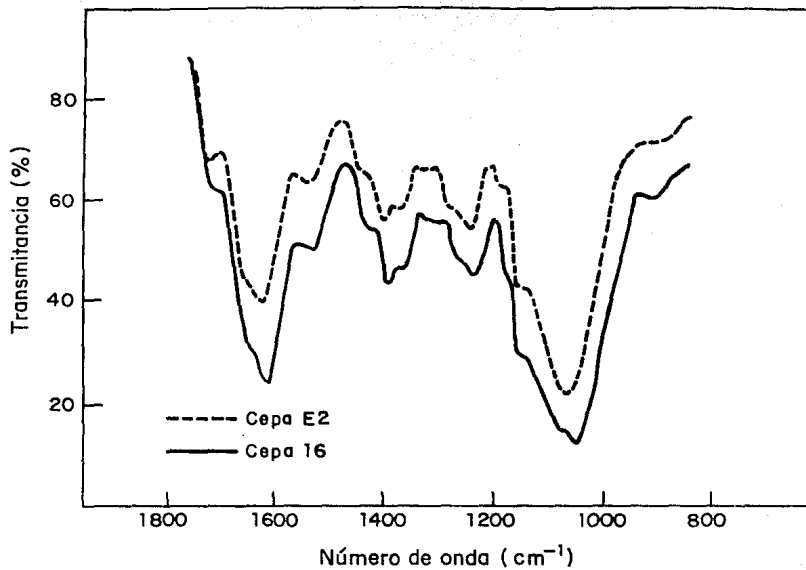


Figura A-5

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 16 (pv. *manihotis*) y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A-5

Diferencias en las bandas del E.I. de la cepa 16 (pv. *manihottis*) con respecto al E. I. de la cepa E2.

Número de onda (cm ⁻¹)	Comentario
1727	Presencia de un hombro. Implicaría menor porcentaje de radicales acetilos.
1624	Mayor intensidad. Posiblemente indique una mayor cantidad de ácidos carboxílicos libres.
1248	Mayor cantidad de CH ₂ OH terminal de los azúcares.
113	Presencia de esta banda como un hombro. Implicaría que existe asociación entre grupos funcionales de diferentes cadenas.
1069	La presencia de esta banda sugiere una fuerte interacción intramolecular.

ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE INFRARROJO DE LOS POLÍMEROS DE LAS CEPAS NATIVAS OBTENIDOS CON EL MEDIO QUE CONTIENE PEPTONA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

El análisis de los espectros de infrarrojo, se realizaron con el producto obtenido de la cepa E2 y con el producto "Keltrol".

En la figura A3-1 se presentan de forma comparativa los espectros de los polímeros obtenidos en dos lotes de fermentación de la cepa E2. En el polímero de la cepa E2 (lote 1) la banda de los 1612 cm^{-1} es de mayor intensidad que en el duplicado, lo que sugiere que puede contener más ácidos carboxílicos libres. En el producto del lote 1, se observa también mayor intensidad en la banda de los 1408 y 1371 cm^{-1} , lo cual implicaría mayor contenido de radicales piruvatos y acetatos que en el polímero del lote 2.

Para fines comparativos se empleará el espectro del polímero de la cepa E2 del lote 1. En la figura A3-2 se presenta la comparación con el producto "Keltrol". La banda correspondiente al hidroxilo de los CH_2OH de la cadena se encuentra en mayor intensidad relativa que en el producto "Keltrol" (ver tabla 19) lo cual probablemente indique una cadena de mayor longitud que la del producto "Keltrol".

En la figura A3-3 se muestra el espectro del polímero de la cepa 10. Las principales diferencias con respecto a la cepa E2 se enlistan en la tabla A2-1. En la figura A3-4 se presentan de forma comparativa los espectros de la cepa 10 y el del producto "Keltrol". En la tabla A2-1 se indican las principales diferencias entre ambos. Las intensidades relativas de las bandas también son menores que en el producto "Keltrol".

En la figura A3-5 se presenta el E.I. del polímero de la cepa 11. En la tabla A2-3 se indican las principales diferencias con respecto a la cepa E2. La baja intensidad relativa presentada en las bandas implicaría que este producto puede presentar un peso molecular menor que el producto de la cepa E2. Su comparación con el producto comercial

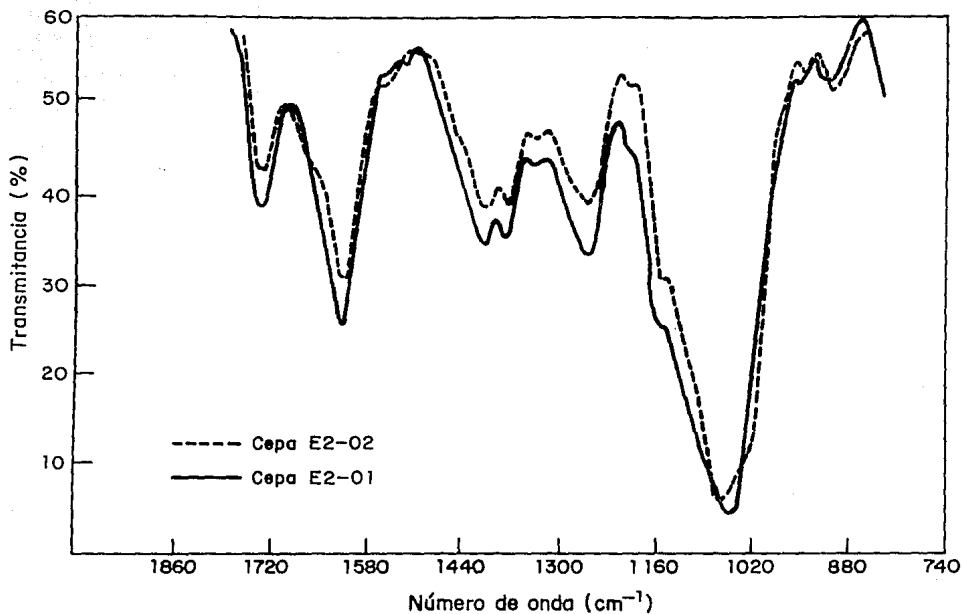


Figura A3-1

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa E2, obtenidos en dos lotes de fermentación.

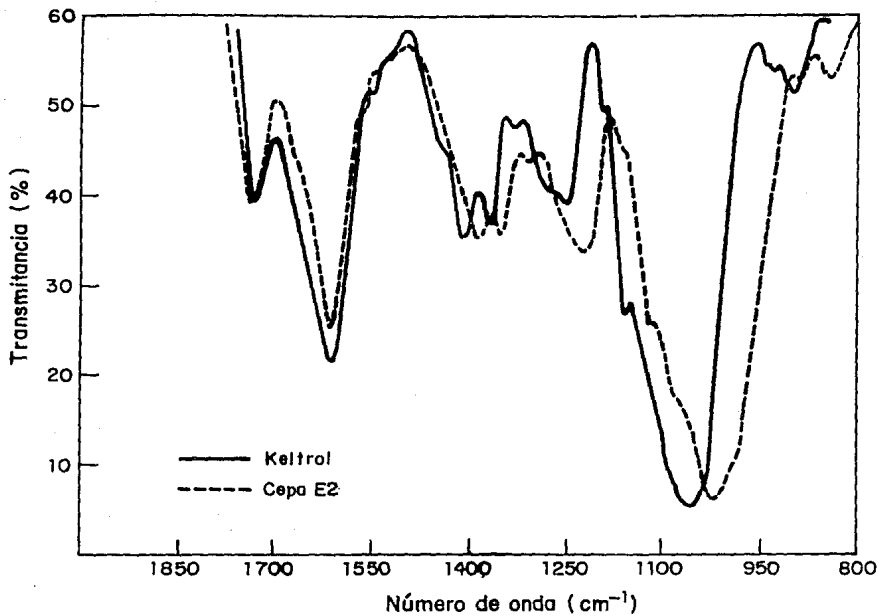


Figura A3-2

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa E2 y su comparación con el espectro del polímero del "Keltrol".

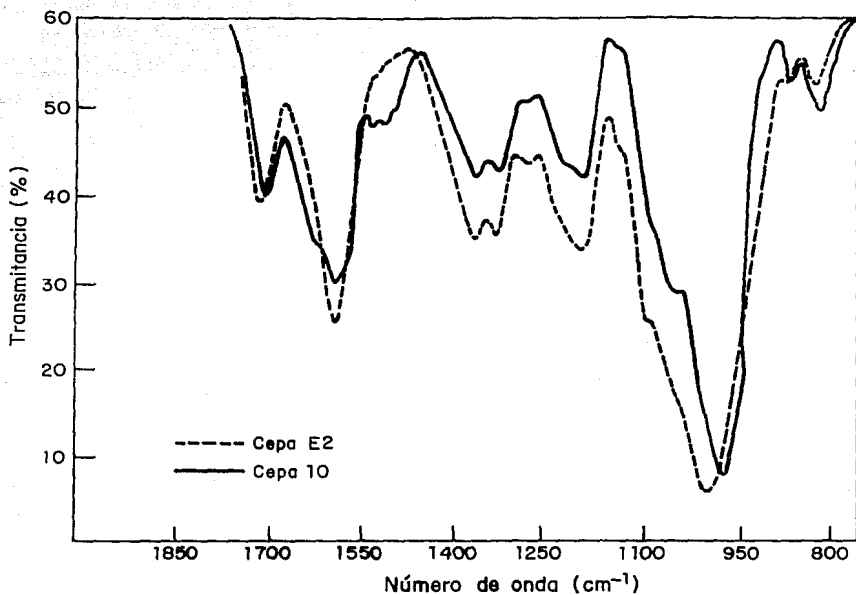


Figura A3-3

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 10 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A2-1

Diferencias en las bandas del espectro de infrarrojo de la cepa 10 con respecto al de la cepa E2

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1729, 1720	La presencia de ambas bandas (que no se presentan en el polímero de la cepa E2) correspondientes a los acetilos. Sugieren que este radical puede estar asociado en diferentes lugares de la cadena polimérica.
1560-1541	Estas bandas que no se presentan en el E.I. de la cepa E2, pueden estar asociadas con el pirúvico o representar compuestos aminados.
1410-1371	Bandas que representan los metilos de los radicales acetilo y carbonilo del ácido pirúvico. La menor intensidad de esta banda con respecto al del polímero de la cepa E2 podría sugerir menor porcentaje de ambos radicales.

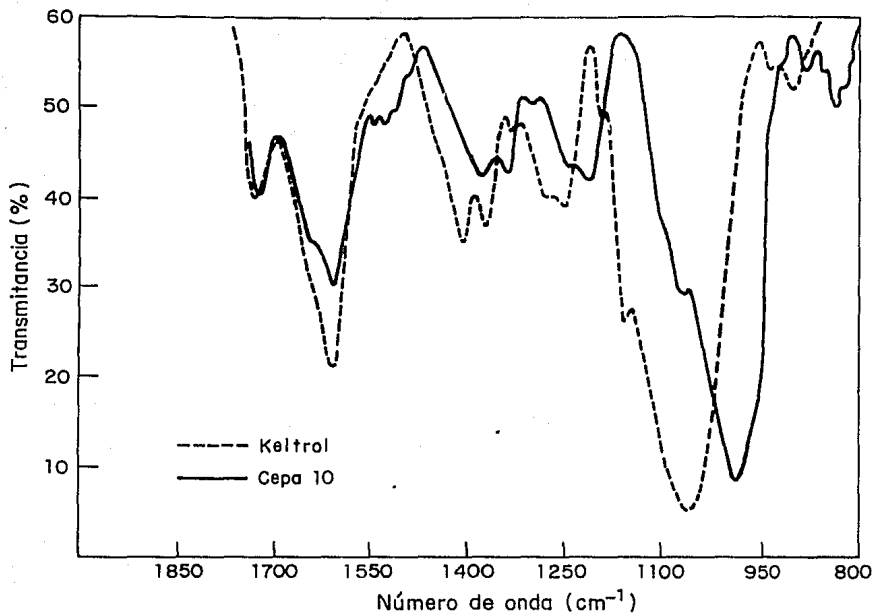


Figura A3-4

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 10 y su comparación con el espectro del producto "Keltrol".

Tabla A2-2

Diferencias en las bandas del E. I. de la cepa 10 con respecto al del producto "Keltrol"

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1724 y 1720	La presencia de ambas bandas implicaría que los radicales acetilos podrían estar asociados en diferentes lugares en la cadena polimérica.
1560-1541	La presencia de esta banda sugiere la asociación con compuestos animados.
1405-1371	Banda de menor intensidad, lo cual implicaría menor porcentaje de radicales acetilos y pirúvico, lo cual concuerda con los datos analíticos.
1252	Banda de menor intensidad lo cual implicaría probablemente que es un polímero de menor ramificación por la menor presencia del CH_2OH terminal de los azúcares.

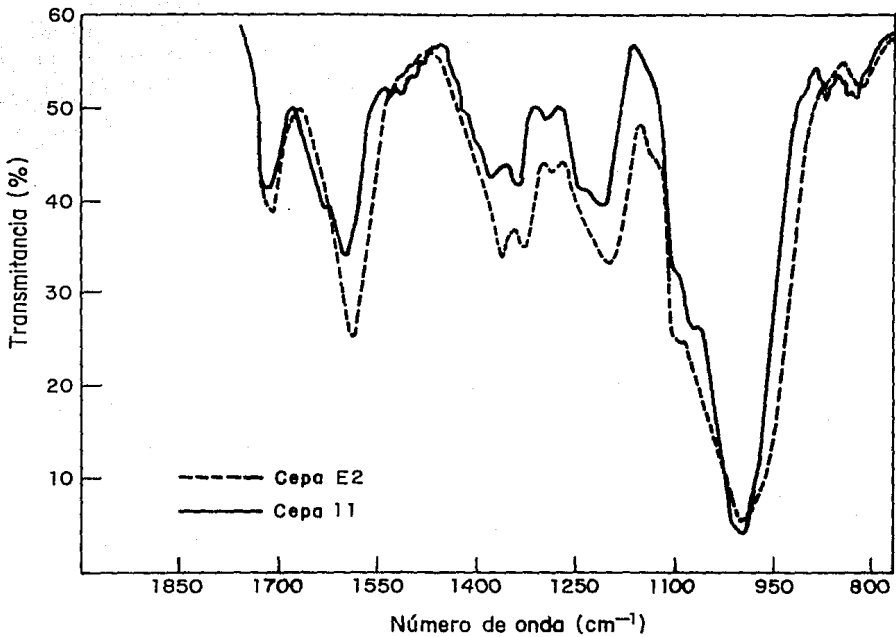


Figura A3-5

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 11 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A2-3

Principales diferencias en el E. I. del polímero de la cepa 11 en comparación con el E. I. del polímero de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1644-1614	Dos bandas más que sugieren que existen distintos grupos carboxilatos, la baja intensidad sugiere pocos ácidos carboxílicos libres.
1544-1533	Bandas -aunque de una intensidad menor- sugieren la presencia de grupos pirúvicos distribuidos en distintas partes del polímero así como baja concentración de estos radicales.
1405-1312	La baja intensidad de ambas bandas sugiere bajo contenido de radicales acetilos y piruvatos.
1250	La baja intensidad en esta banda implicaría un polímero de poca ramificación.
1126-1116	La presencia de estas dos bandas implica la asociación intermolecular en las cadenas poliméricas.

(figura A3-6) muestra que el polímero de la cepa 11 también puede ser de menor peso molecular, menor ramificación y menor porcentaje de radicales pirúvicos. Lo que concuerda con los datos analíticos.

El espectro de infrarojo del polímero de la cepa 12 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2 indica que el producto puede presentar menor cantidad de radicales acetilos y pirúvicos (figura A3-7 y tabla A2-4). Los datos analíticos indicaron que en el producto se presentan bajos porcentajes de radicales pirúvicos, así como de radicales acetilos.

La presencia de la banda de los 1542 cm^{-1} en el E. I. del polímero de la cepa 12 posiblemente indique que se encuentren asociados compuestos aminados en la cadena polimérica .

Como se podrá denotar en la figura A3-8 el polímero de la cepa 12 presenta bajas intensidades en las bandas que el producto "Keltrol". En este producto se observaron las mismas diferencias que con respecto al polímero de la cepa E2.

Finalmente, el E.I. del polímero de la cepa 16 (pv. *manihotis*) se muestra en la figura A3-9. La comparación con el polímero de la cepa E2 indicó que las principales diferencias estriban en la intensidad de las bandas, las cuales son de menor intensidad e indican que los radicales acetilos (1725 cm^{-1}) se encuentran en menor proporción, lo que concuerda con los datos analíticos. Se observa además, menor proporción de CH_2OH en la cadena (1250 cm^{-1}), lo cual implicaría que fuese menos ramificada.

En la figura A3-10 se presenta la comparación con el producto "Keltrol", en donde se observaron las mismas diferencias que con respecto a la comparación del producto de la cepa E2.

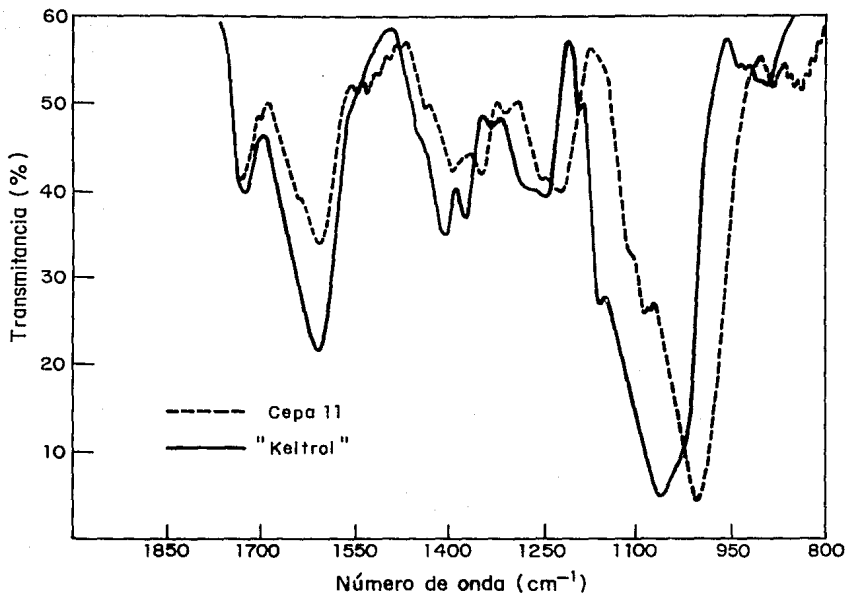


Figura A3-6

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 11 y su comparación con el espectro del producto "Keltrol".

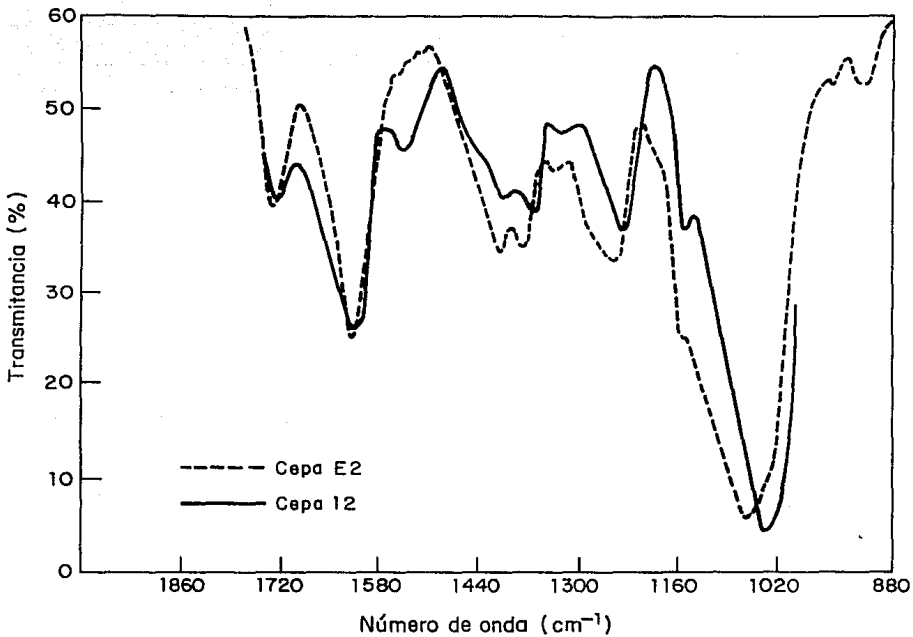


Figura A3-7

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

Tabla A2-4

Principales diferencias en el E. I. del polímero de la cepa 12 en comparación con el E. I. del polímero de la cepa E2.

Número de onda (cm^{-1})	Comentario
1542	Banda de gran intensidad la cual esta asociada con los radicales piruvato. Sin embargo los datos analíticos indican una baja presencia de estos radicales. Esta banda también se encuentra relacionada con compuestos aminados.
1467-1372	Bandas de menor intensidad. Implicaría menor porcentaje de radicales acetilos y pirúvicos. Lo que concuerda con los datos analíticos.

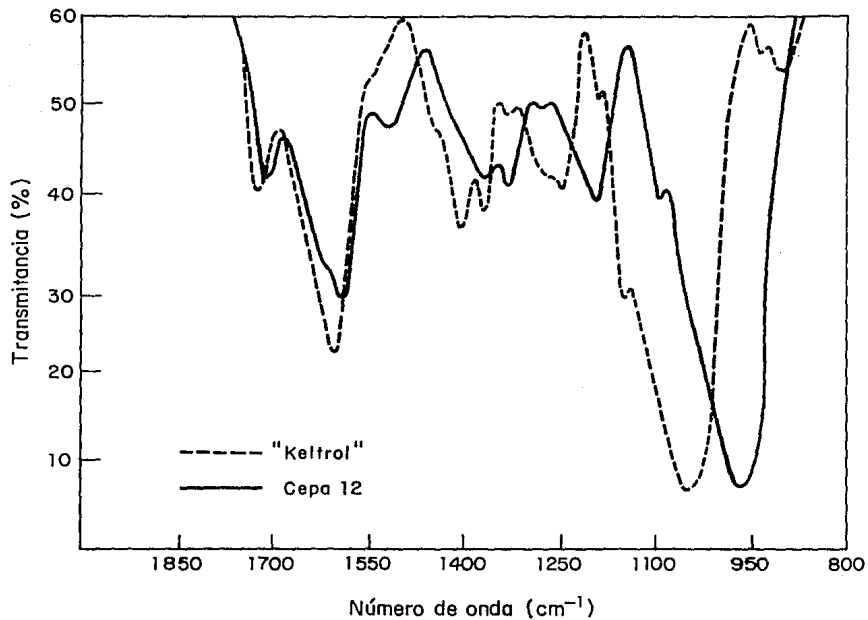


Figura A3-8

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y su comparación con el espectro del producto "Keltrol".

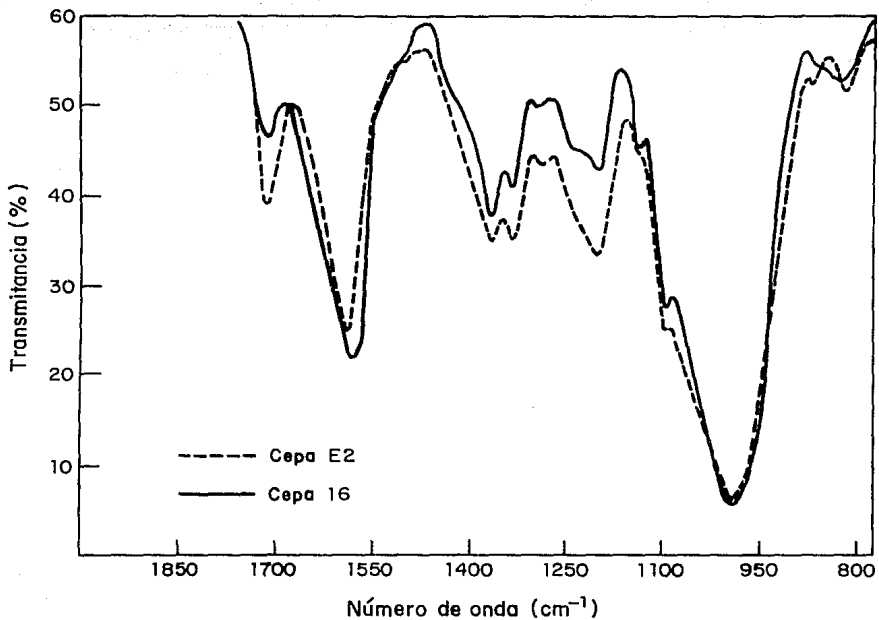


Figura A3-9

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 16 y su comparación con el espectro del polímero de la cepa E2.

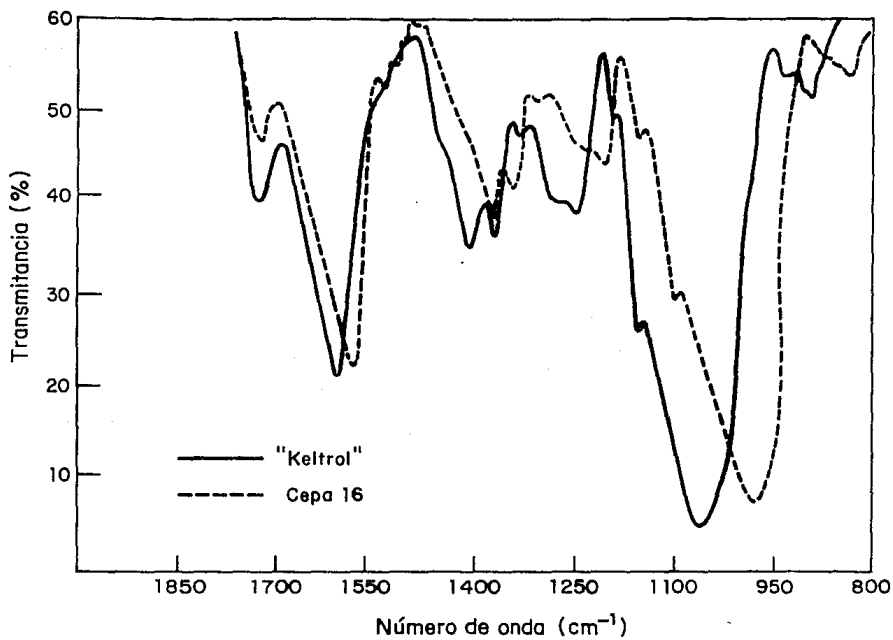


Figura A3-10

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 16 y su comparación con el espectro del producto "Keltrol".

ANEXO 4

ANALISIS DE LOS ESPECTROS DE INFRARROJO DEL PRODUCTO DE LA CEPA 12 Y SU COMPARACION CON EL ESPECTRO DEL PRODUCTO DE LA CEPA E2, OBTENIDOS CON EL MEDIO DE PRODUCCION QUE CONTENIA SULFATO DE AMONIO EN EL FERMENTADOR DE 1 L.

En la figura A4-1 se presenta el espectro del polímero de la cepa E2, con y sin tratamiento térmico. En ambos casos el espectro es muy similar. En las bandas de los 1407 cm^{-1} y 1371 cm^{-1} se observó un cambio en las intensidades de las bandas, con una tendencia a igualarse. Este cambio es un posible reflejo de los cambios que suceden en la conformación del polímero debido al tratamiento térmico.

En la figura A4-2 se presenta, de forma comparativa, el espectro del polímero de la cepa E2 y el del producto "Keltrol". Las principales diferencias se indicaron en la tabla A3-1. Las intensidades en las bandas son menores que las del producto "Keltrol", lo cual implica que este producto presenta menor porcentaje de radicales acetilos y pirúvicos. Ello concuerda con los datos analíticos (ver tabla. 20 capítulo 5.3.4). También sugiere menor cantidad de ácidos carboxalicos libres (1615 cm^{-1}) y posiblemente indique que pueda ser de un peso molecular menor que el producto "Keltrol".

Con respecto al producto de la cepa 12, en la figura A4-3 se muestran los espectros de los polímeros sin ningún tratamiento y con tratamiento enzimático y térmico. Son notables los cambios en las intensidades de las bandas de los 1407 cm^{-1} y 1373 cm^{-1} (tabla A3-2), así como la ausencia de la banda de los 1541 cm^{-1} con el tratamiento post-fermentativo. Esto sugeriría que el producto presenta cambios conformacionales así como la asociación con productos nitrogenados. Es posible que esto interfiera en la detección de los radicales piruvatos en la molécula.

Al realizar la comparación con el espectro del polímero de la cepa E2 sin ningún tratamiento (figura A4-4) con respecto al espectro del

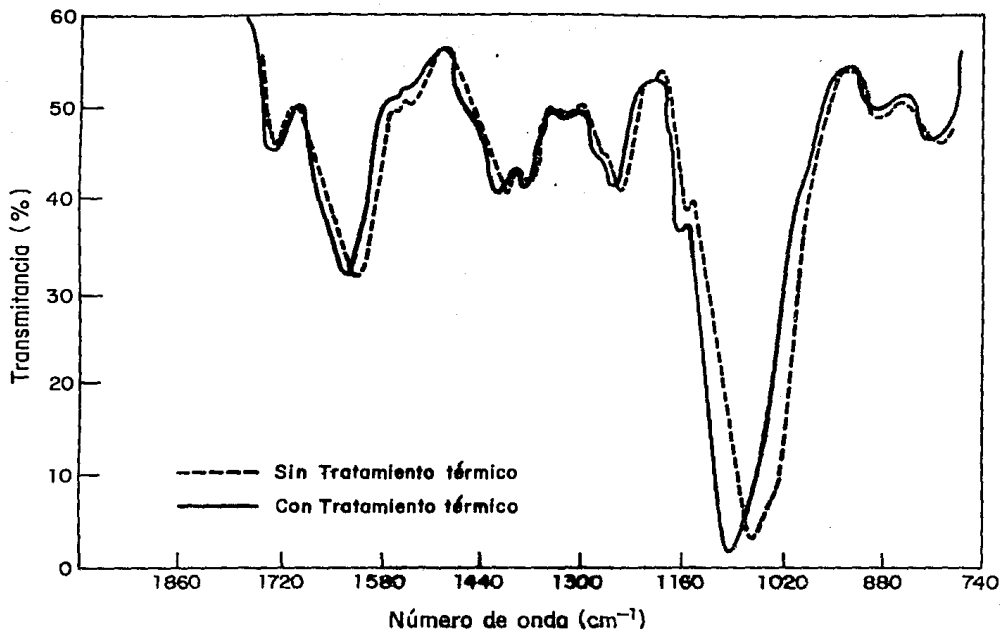


Figura A4-1.

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa E2 con y sin tratamiento térmico.

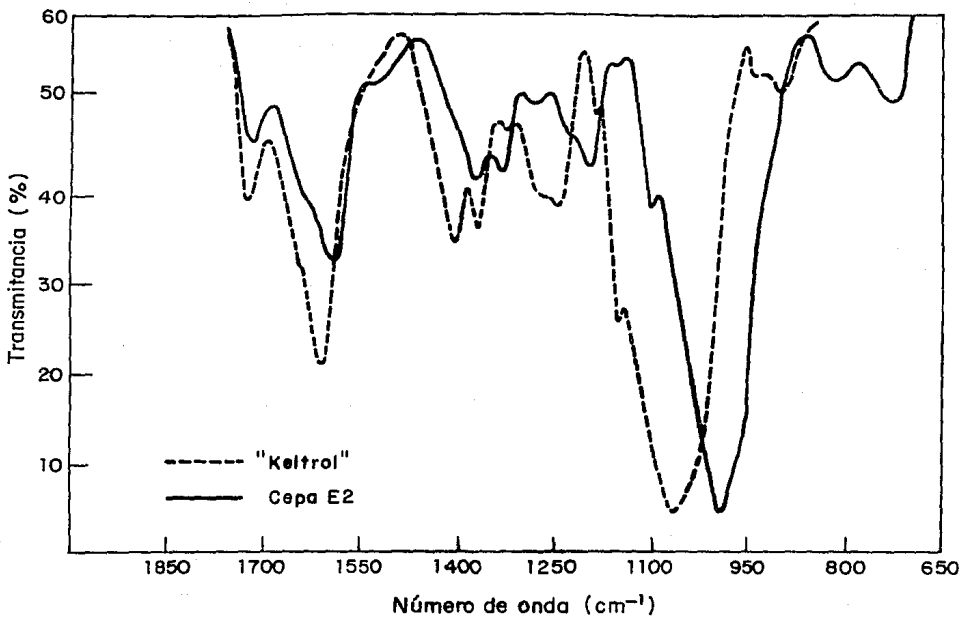


Figura A4-2.

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa E2 y su comparación con el espectro del producto "Keltrol".

Tabla A3-1

Diferencias de las bandas de los espectros de infrarrojo del polímero de la cepa E2 y su comparación con el producto "Keltrol".

Número de onda (cm^{-1})	Principales diferencias de la banda con respecto al producto comercial.
1727	Menor intensidad relativa. Ello indicaría que presenta menor cantidad de radicales acetilos. Se confirma con los datos analíticos.
1615	Menor intensidad relativa. Sugiere que existen menos ácidos carboxilos libres.
1408-1312	Menor intensidad. Implicaría menor relación de acetilos/pirúvicos.
1246	Menor intensidad. Sugiere una menor cantidad de CH_2OH de la cadena.

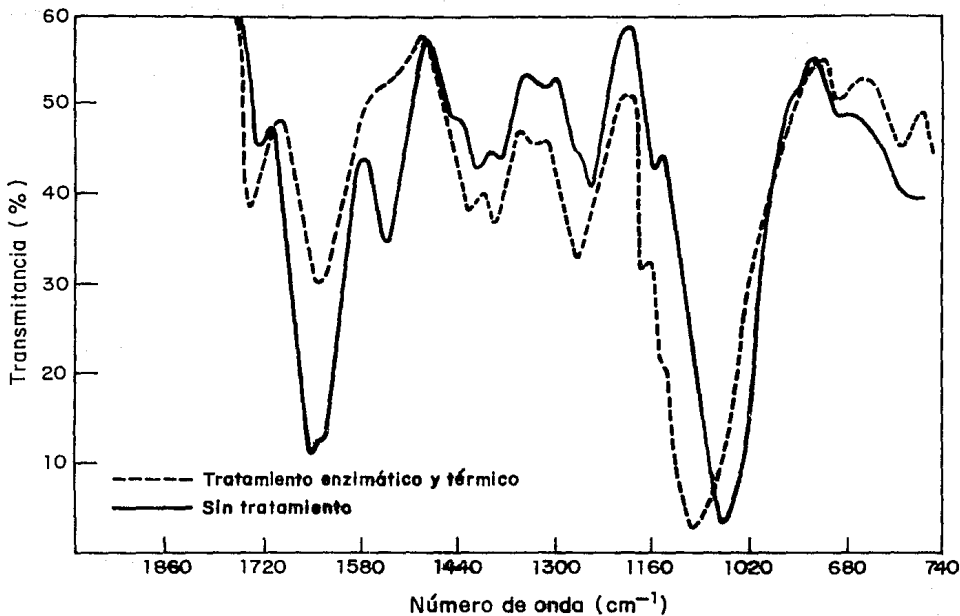


Figura A4-3.

Espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12 sin ningún tratamiento y con tratamiento térmico y enzimático.

Tabla A3-2

Diferencias en el espectro de infrarrojo del polímero de la cepa 12, con y sin tratamientos post-fermentativos.

Número de Onda (cm^{-1})	Comentario
1726	La intensidad de la banda es mayor. Sugiere mayor cantidad de radicales acetilos. Esto concuerda con los datos analíticos.
1614	Menor intensidad en la banda. Implicaría que existen menos ácidos carboxílicos libres
1407-1709	Mayor intensidad. Esto sugiere cambios conformacionales y una posible interacción con compuestos nitrogenados.
1248	Mayor intensidad. Ello implicaría mayor cantidad de CH_2OH de la cadena

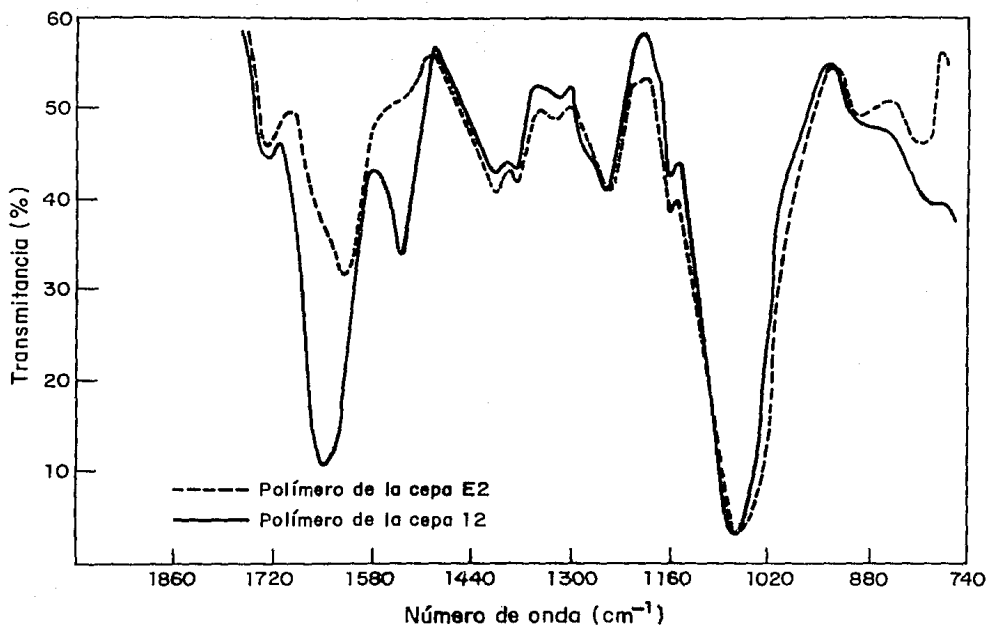


Figura A4-4.

Espectros de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y de la cepa E2 sin ningún tratamiento post-fermentativo.

polímero de la cepa 12 se observa que la única diferencia se presenta en la banda de los 1541 cm^{-1} y en los 1650 cm^{-1} ya que el producto de la cepa 12 presenta mayor intensidad, lo cual implicaría la presencia de una mayor cantidad de ácidos carboxílicos libres.

La comparación con los polímeros con tratamiento térmico se presenta en la figura A4-5. La banda de los 1726 cm^{-1} es más intensa lo cual indica mayor porcentaje de radicales acetilos y esto concuerda con los resultados analíticos.

En la figura A4-6 se muestra la comparación del espectro del polímero de la cepa 12 y el del producto "Keltrol". Es evidente una menor intensidad en la banda 1614 cm^{-1} , lo que significa que el polímero puede presentar menor cantidad de ácidos carboxílicos libres. Se observa también una mayor intensidad en la banda 1248 cm^{-1} (ver tabla A3-2) (vibración molecular de los OH de los CH_2OH de la cadena) y posiblemente indica que la molécula puede presentar mayor ramificación que el producto "Keltrol".

El perfil de las bandas del espectro de la cepa 12 es muy semejante al producto "Keltrol". El polímero de la cepa 12 presenta cambios importantes con los tratamientos post fermentativos.

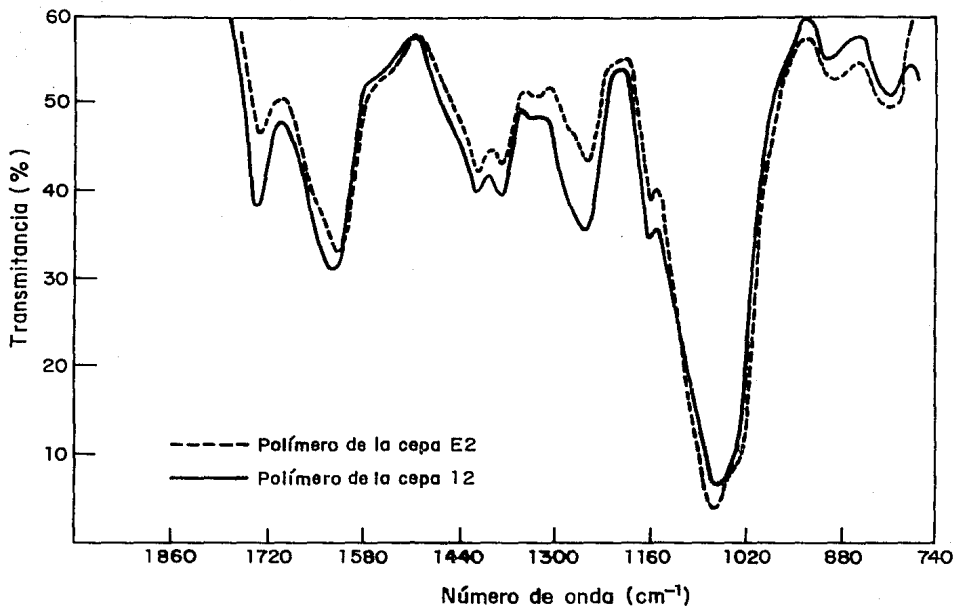


Figura A4-5

Espectros de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y de la cepa E2 con tratamiento térmico y enzimático.

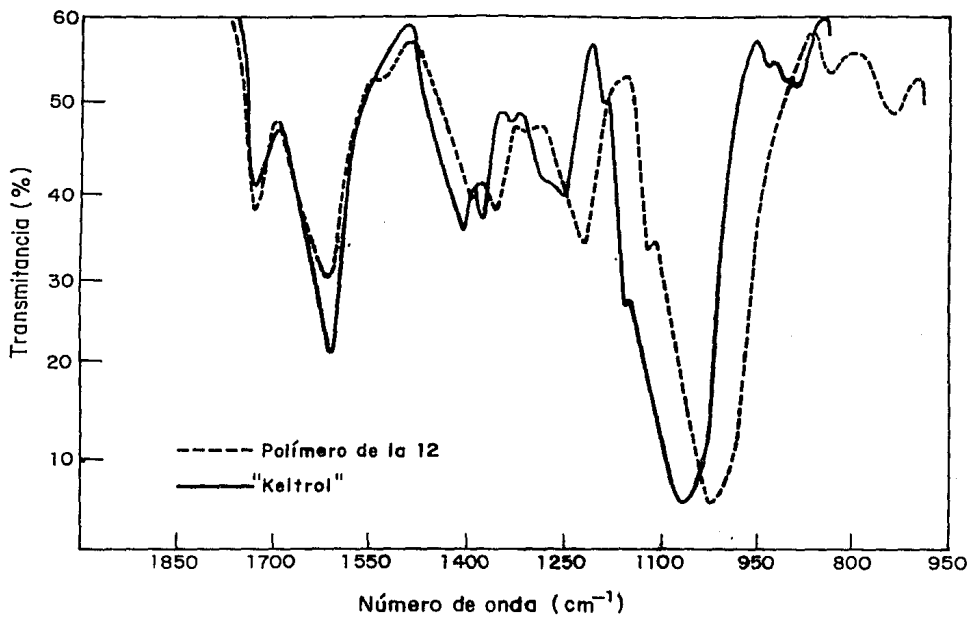


Figura A4-6.

Espectros de infrarrojo del polímero de la cepa 12 y el producto "Keltrol".

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, N. G. (1978) **Plant pathology**. 2ed. Academic Press, New York.
- Bacon, D.S. (1979) Factors limiting the action of polysaccharide degrading enzymes. En: **Microbial polysaccharides and polysaccharases**. Society for General Microbiology, Berkeley, R. C. W., Gooday, G.W., Ellwood, D. C. (Ed.). Academic Press, London, pp. 268-284.
- Betlach, M.R., Capage, M.A., Doherty, D.H., Hassler, R.A., Henderson, N.M., Vanderslice, R.W., Marcelli, J.D., and Ward, M.B. (1987) Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis. En: **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications**, M. Yalpani (Ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. pp.35-50.
- Brito, E. (1988) **Reología de fluidos, Ley de potencia: software**. Departamento de alimentos, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (Ed.) (1974) **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8th Edn. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Cadmus, M. C., Marvin, O., Morton B., Burton, K. A. and Wolf, I. A. (1971). Nitrogen source for improved production of microbial polysaccharides. **United States Patent, No. 3**.
- Cadmus, C. M., Knutson, C. A., Lagoda, A. A., Pittsley, E. J and Burton, K. A.(1978). Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 1003-1014.

- Cadmus, M.C., Rogovin, S.P., Burton, K.A., Pittsley, J.E., Knutson, C. A. and Jeanes, A. (1976) Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Can. J. Microbiol.** 22: 942-948.
- Cooke M. and Broderick A. (1989) The selection of lactose utilizing, polysaccharide producing strains of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol. Techniques** 3 (6): 375-380.
- Cottrell, I.W. and Kang, K.S. (1978) Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Develop. Ind. Microbiol.** 9: 117-131.
- Cheetham, J.S.P. (1987) Screening for novel biocatalysts. **Enzyme. Microbial. Technol.**, 9: 191-213.
- Dea, M.C. and Morris, E.R. (1977). Extracellular polysaccharides. En: **American Chemical Society, Symposium. Series.** Sandford y Laskin, No. 45: p.p. 174-182.
- Delgado, G., Topete, M. and Galindo, E. (1989) Interaction of cultural conditions and end-product distribution in *Bacillus subtilis* grown in shake flasks. **Appl. Microbiol. Biotechnol** 3 : 288-292.
- Elander, P.R. (1987). Microbial screening, selection and strain improvement. En: **Basic Biotechnology.** Bu'lock, J. y Kristiansen, B.(Eds) Academic Press, New York, pp. 217-251.
- Flores, J.F. (1989). Estrategias para incrementar la concentración de producto (goma xantana) en la fermentación de *Xanthomonas campestris*. Tesis Profesional. Universidad Autonoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Funahashi, H., Yoshida, T. and Taguchi, H. (1987) Effect of glucose on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. **J. Ferment. Technol.** 65 (5): 603-606

- Galindo, E. (1985) Polisacáridos microbianos. En: **Prospectiva de la biotecnología en México**. Quintero R.(compilador). Fundacion Javier Barros Sierra - CONACYT, México, D.F. pp. 65-92.
- Galindo, E., Ramírez, Ma. E., Flores, F., Torres, J., Brito, E. y García-Jimenez, F. (1986) Desarrollo de un proceso a nivel semi-piloto para la producción de goma xantana grado alimenticio. Informe técnico al CONACYT. Clave PVT/AI/NAL/85/2745.
- Galindo, E., Salcedo, G., Flores, C. and Ramírez, M. E. (1992) Improved shake flask test for the screening of xanthan producing microorganisms. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 122-124.
- Galindo, E., Torrestiana, B., and García-Rejón A. (1989) Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions. **Biopr. Eng.** 4: 113-118.
- Gorin, J.A.P. and Spencer, T.F. (1961) Estructural relationship of extracellular polysaccharides from phytopathogenic *Xanthomonas sp.* Part. 1. Structure of extracellular polysaccharide from *X. stewartii*, **Can. J. Chem.** 39: 2282-2289.
- Hadjivassiliou, A. A. and Rieder, S.V. (1968) The enzymatic assay of piruvic and lactic acids: a definitive procedure, **Clin. Chim. Acta** 9: 357-361.
- Jansson, P.E., Keene, L. and Lenberg, B. (1975) Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, **Carbohydr. Res.** 45: 275-282.
- Jeanes, S.A., Rogovin, P., Cadmus, M.C., Silman, R.W. and Knutson, G.A. (1976) Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Procedures of culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. **Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. Bulletin No. ARS-NO-51.**

- Kang, K. S. and Cotrell, I. W. (1979) Microbial polysaccharides, En: **Microbial Technology**, 2 Ed., Vol 1, Pepler, H.J., Perlman, D. (Eds.), Academic Press, New York.
- Kang, S.K., Veeder, T.G. and Cottrel, W.I. (1983) Some novel bacterial polysaccharides of recent development. En: **Progress in Industrial Microbiology**. Bushell, M.E (Ed.), vol. 18. Elsevier, pp. 231-252.
- Kennedy, J. F. and Bradshaw, I. J. (1984) Production, properties and applications of xanthan,. **Prog. Ind. Microbiol.** 9: 319-371.
- Kennedy, F. J., Jones, P. and Barker, A. S. (1982) Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme Microbial Technol.**, 4: 39-43
- Kidby, D., Sandford, P.,Herman, A. and Cadmus, M.C. (1977) Procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Appl. Environ. Microbiol.** 33 (4): 840-945.
- Kelco, Division of Merck & Co. Inc. (1981). **Goma xantica/Keltrol/Kelzan**. Un biopolisacárido natural para el control científico del agua. 2 ed.
- Kuan, L.T., Minsavage, G.V. and Shaad, N.W. (1986) Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*, **Plant Disease** 71: 409-413.
- Margaritis, A. and Pace, G. W. (1985). Microbial polysaccharides, En:**Comprehensive Biotechnology**, Moo-Young (Ed.), Vol. III, Pergamon Press, New York. pp. 1005-1041.
- Margaritis, A. and Zajic, J. E. (1978) Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations, **Biotechnol. Bioeng.** 21: 939-1001.

- Marquet, M., Mickolajczal, M., Thorne, L. and Pollok, J. T. (1989) Improved strains for production of xanthan gum by fermentation of *Xanthomonas campestris*. *J. Industrial Microbiol.* 4: 55-64.
- Mc Comb, E.A. and Mc Cready, R.M. (1957) Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction, *Anal. Chem.* 29: 819-821.
- Mc Neely, W. H. and Kang, S. K. (1973) Xanthan and other biosynthetic gums, En: **Industrial gums**, Whistler, L. R. and BeMiller N. J. (Eds). Academic Press, New York. pp. 473-497.
- Moraine. A. and Rogovin, P. (1971) Growth of *Xanthomonas campestris* is not simply nutrient-limited, *Can. J. Microbiol.* 7: 1473-1474.
- Moraine, R.A. and Rogovin, P. (1973) Kinetics of the xanthan fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 5: 225-237.
- Morris, R. E. and Ross-Murphy B. S. (1989) Chain flexibility of polysaccharides. **Techniques in Carbohydrate Metabolism**. 13316: 1-46.
- Norton, J. C., Falk, O. D., Luetzilschwab, E. W. (1979) Xanthan biopolymer semipilot fermentation. Society of Petroleum Engineers of AIME. SPE 8420. American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers Inc (Eds) SPE 8420, pp. 1-12.
- Patton, J.T. and Dugar, S.K. (1981) Growth kinetics of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, **Process Biochemistry**, Aug/Sept.
- Patton, J. T. and Lindblom, G. P.(1962) Process for synthesizing polysaccharides. *U. S. Pat.* 3, 020, 206.
- Paul, F., Morin, A. and Monsan, P. (1986) Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications, *Biotechnol. Adv.* 4: 245-259.

- Pinches, A. and Pallet, C, J. (1986) Rate and yields relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media, *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1484-1496.
- Powell, D. A. (1979) Structure, solution properties and biological interactions of some microbial extracellular polysaccharides, En *Microbial polysaccharides and polysaccharases*, Society for General Microbiology, Berkeley, R. C. W., Gooday, G. W., Ellwood, D. C. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 117-159.
- Quintero, R. Galindo, E., Casas, L., Torrestiana, B., Ramírez, Ma. E., Rufz, m., Serrano, F. Maya, M., Maldonado, G., Jaramillo, A., Muro, J., Torres, J., Brito, E. y García-Jimenez, F. (1984a) Escalamiento del proceso de producción de un biopolímero. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Informe único al IMP del convenio modificadorio. Julio-Octubre de 1984, 195 p.
- Quintero, R.E. Galindo, E., Torrestiana, B., Ramírez, Ma. E., Rufz, m., Serrano, F. Maya, M., Maldonado, G., Jaramillo, A., Muro, J., Fucickovsky, L., Torres, J., Brito, E. y García-Jimenez, F. (1984b) Escalamiento del proceso de producción de un biopolímero. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Reporte técnico # 3 al IMP. Dic. 1983 a Marzo 1984. 106 p.
- Ramírez, M.E. (1987). Algunos aspectos fitopatológicos de *Xanthomonas campestris* con relación a las propiedades del polímero que produce. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Iztacala, UNAM.
- Ramírez M.E., Fucikovsky L., García-Jiménez F., Quintero R. and Galindo E. (1988) Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 29: 5-10.
- Salcedo, G., Ramírez, Ma. E., Flores, C. and Galindo E. (1992) Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 723-727.

- Sandvick, E. I. and Maerker, J. M. (1977) Extracellular polysaccharides. *American Chemical Society Symposium Series 45*, Sandford and Laskin (Eds.), pp. 242-264.
- Scamparini, A. R., and Rosato, Y. B. (1987) Production of xanthan gum by different isolates of *Xanthomonas campestris*, *Proceedings 4 th European Congress on Biotechnology*, vol 1, Niessel, D. M., VanderMeer, R. R. and Luyben Kch. A. M. (Eds), Elsevier, Amsterdam.
- Smidsrod, O. and Haug, A. (1971) Estimation of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths, *Biopolymers* 1: 1213-1227.
- Souw, P. and Demain, A.L. (1979) Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B 1459, *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1186-1192.
- Starr, M. P., C. L. Jenkins, L. B. Bussey and A. G. Andrews. (1977) Chemotaxonomic significance of the xanthomonads, novel brominated arylpolyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*, *Arch. Microbiol.* 3: 1-9.
- Sutherland, W. I. (1983) Extracellular polysaccharides, En: *Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 volumes*. Rehm, J. H. and Reed, G. (Eds). Verlag Chemie, Weinheim, pp. 531-574 .
- Sutton, J.C. and Williams, P.M. (1970) Comparison of extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris* from culture and from infected cabbage leaves, *Can. J. Bot.* 48: 645-751.
- Tait, I. M., Sutherland, W. I. and Clarke-Sturman. (1986) Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide, *J. Gen. Microbiol.* 32:1483-1492

- Tako, M. and Nakamura, S. (1984) Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media, *Agric. Biol. Chem.* 48(12): 2987-2993.
- Tako, M. and Nakamura, S. (1987) Rheological properties of Ca salt of xanthan in aqueous media, *Agric. Biol. Chem.* 5 (11): 2919-2923.
- Tako, M. and Nakamura, S. (1988) Rheological properties of depyruvated xanthan in aqueous media, *Agric. Biol. Chem.* 52(6): 1585-1586.
- Torres, B., L. (1990). Difusión de amonio en soluciones diluidas de goma xantana. *Tesis de Maestría*. Unidad Academica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado. Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Torrestiana, B., Fucickovsky, L. and Galindo, E. (1990) Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates, *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 81-83
- Wachenheim, D.E. and Patterson, J.A. (1988) Potential for industrial polysaccharides from anaerobes, *Enzyme Microbial. Technol.* 0: 56-57.
- Yamada, S., Wada, M. and Chibata, I. (1978) Oxygen transfer in shaken flask cultures and the conversion of sorbitol to sorbose by *Acetobacter suboxydans*, *J. Ferment. Technol.* 56(1): 20-28.