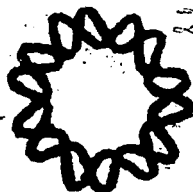




03072  
22  
2Ej

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional  
y Posgrado del Colegio de Ciencias y  
Humanidades



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

## FALLA DE ORIGEN

"CARACTERIZACION DE LA FERMENTACION Y DEL  
POLIMERO PRODUCIDO POR CEPAS SELECTAS DE  
*Xanthomonas*"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A :  
I.Q. Adriana Dolores Sánchez López



## **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.

## DEDICATORIAS

A DIOS

¡por darme esta segunda oportunidad de superarme!

A ERICK

Por todo el amor y apoyo incondicional que siempre me has brindado y ¡por todos estos años de felicidad!

A ALEXA

Por todo el tiempo, que muy a mi pesar, le he negado y por ser el principal aliciente para mejorar día con día.

A MIS PADRES PAULA Y FAUSTINO

por haberme dado la vida y las armas necesarias para salir adelante, GRACIAS por que todo lo que soy se los debo a ustedes.

A MI ABUELITO RAMÓN

por que siempre estará en mi corazón.

A MI ABUELITA MANUELA

por ser el último pilar que nos sostiene y por todo su amor.

A MI ABUELITA DELIA

Por todo el cariño y ayuda que siempre me ha brindado.

A MI ABUELITO ADOLFO

Por su preocupación porque terminara, por todo su cariño y porque no me jale las orejas.

A PAOLA Y ROSSY

Por que son parte de mí.

A MIS SUEGROS

Por su amistad y ayuda incondicional.

A VERO

por ser mi mejor amiga.

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco al Dr. Enrique Galindo por permitirme continuar en su grupo para realizar esta meta, por todas sus enseñanzas y el apoyo que me ha brindado durante todos estos años.

Gracias al M. en B. Luis Torres por su asesoría, ayuda incondicional y por todos estos años de amistad.

Gracias a la Ing. Verónica Albiter por su participación en la realización de esta tesis, ayuda incondicional y por su amistad.

A mis sinodales los Dres. Edmundo Brito, Enrique Galindo, Federico García J., Octavio T. Ramírez y Rafael Vazquez les agradezco sinceramente su ayuda en la revisión de este trabajo.

Agradezco al Dr. Edmundo Brito por su ayuda en las determinaciones de viscosidad en el reómetro Haake (Facultad de Química).

Agradezco al M. en C. Raul R. Robles por su ayuda en la liofilización de las muestras (CEPROBI/IPN).

Agradezco al M. en B. Leopoldo Güterca por su ayuda en la parte de cromatografía en gel.

Gracias al grupo de investigación E.G. y al personal de la planta piloto del Instituto de Biotecnología.

A la P.Q.I. Celia Flores le agradezco el apoyo técnico que me brindo y su amistad.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis,  
**GRACIAS.**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M., en Cuernavaca, Morelos.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Enrique Galindo Fentanes (Tutor principal, IBT/UNAM)

M. en B. Luis Gilberto Torres Bustillos (Co-tutor, IBT/UNAM)

Dr. Agustín López Munguía-Canales (Co-tutor, IBT/UNAM)

Dr. Federico García Jiménez (Co-tutor, Instituto de Química/UNAM)

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del CONACyT a través de una beca de Maestría (No. Reg. 61100) y con una beca de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología.

## INDICE GENERAL

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCION</b>	3
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1. Origen de la goma xantana	5
2.2. Estructura de la goma xantana	6
2.2.1. Unidad repetitiva básica	6
2.2.2. Aspectos conformacionales de la goma xantana en solución	6
2.3. Características de la goma xantana	11
2.3.1. Propiedades reológicas de las soluciones de goma xantana	11
2.3.2. Bases moleculares para las propiedades de las soluciones de xantana	13
2.4. Fermentación para la producción de goma xantana	15
2.5. Influencia del uso de diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i> y de las condiciones de fermentación sobre la producción de goma xantana	15
2.6. Caracterización de diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i>	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	27
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b>	
4.1. Equipo	28
4.1.1. Fermentador	28
4.1.2. Cepas	28
4.1.3. Medios de cultivo	30
4.2. Métodos analíticos	31
4.2.1. Determinación de biomasa	31
4.2.1.1. Curva de peso seco	31
4.2.2. Determinación de glucosa	33
4.2.3. Determinación de la concentración de polímero	33
4.2.4. Determinación de radicales acetilo	33
4.2.5. Determinación de radicales pirúvico	35
4.2.6. Determinación de nitrógeno total (Micro-Kjeldahl)	37
4.2.7. Determinación de nitrógeno proteico (Lowry)	40
4.2.8. Determinación de humedad	41

	Pág.	
4.3.	Determinaciones reológicas	42
4.3.1.	Reología en el viscosímetro Brookfield LVT	42
4.3.1.1.	Índices reológicos y viscosidad aparente	42
4.3.2.	Reología en el reómetro Haake CV20N	44
4.4.	Metodologías experimentales	45
4.4.1.	Purificación de las cepas	45
4.4.1.1.	Preservación de las cepas en nitrógeno líquido	46
4.4.2.	Fermentaciones	47
4.4.2.1.	Inóculos	47
4.4.2.2.	Condiciones de fermentación	47
4.4.2.3.	Control de oxígeno disuelto durante las fermentaciones	48
4.4.3.	Determinación de la pureza relativa del producto	48
4.4.4.	Determinación de la distribución de pesos moleculares	48
4.4.5.	Determinación del contenido de goma xantana (como carbohidratos totales, método del ácido sulfúrico-resorcinol)	49
4.4.6.	Estimación del peso molecular promedio	50
4.4.7.	Purificación de los productos finales	50
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
5.1.	Fermentaciones con control de oxígeno disuelto	54
5.2.	Calidad de los productos finales de la fermentación	62
5.3.	Purificación de los productos	64
5.4.	Características físico-químicas de los productos	66
5.4.1.	Acetilos, pirúvico y nitrógeno	66
5.4.2.	Estimación del peso molecular promedio y distribución de pesos moleculares	71
5.5.	Reología	75
5.5.1.	Reología de soluciones diluidas: efecto de la concentración y tipo de sal	75
5.5.2.	Reología de soluciones concentradas	85
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
6.1	Conclusiones	100
6.2.	Recomendaciones	102
	<b>NOMENCLATURA</b>	<b>103</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>104</b>

## RESUMEN

La mayoría de los trabajos relacionados con la producción de goma xantana se han llevado a cabo con la cepa de colección *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459. Por consiguiente, la caracterización de cepas que potencialmente sean mejores productoras o que presenten características explotables constituye un aspecto importante para la producción de goma xantana.

El objetivo general del presente trabajo consistió en caracterizar más detalladamente las fermentaciones a escala laboratorio y el polímero producido por varias cepas de *Xanthomonas*, para su posible utilización en la producción de goma xantana.

Se trabajó con tres cepas nativas de *Xanthomonas* (denominadas 10, 11 y 16). La cepa control fue una variante de la cepa de colección *X. campestris* NRRL-B 1459 (denominada E2). Los cultivos se llevaron a cabo en fermentadores cuyo volumen de trabajo fue 1.5 litros y se realizaron bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto, velocidad de agitación, pH y temperatura. Los productos obtenidos fueron caracterizados mediante la determinación de la distribución de pesos moleculares, contenido de acetilo, pirúvico, nitrógeno total y proteico. Posteriormente, estos productos fueron sometidos a un proceso de purificación (precipitación, centrifugación, diafiltración, cromatografía de intercambio iónico y liofilización). Durante este proceso se obtuvieron 2 clases de productos (semi-purificados y purificados), los cuales fueron empleados en las determinaciones reológicas de las soluciones de 1 y 10 g/L de xantana y en la cuantificación del peso molecular promedio.

Las cinéticas de biomasa, producto y sustrato, así como el cambio en la viscosidad durante las fermentaciones de las cepas 10, 11 y 16 fueron similares a las reportadas previamente para la cepa E2. La cepa 16 mostró un menor crecimiento de la bacteria sin repercutir en la producción de goma. Esto puede representar una ventaja técnica en el proceso, dado que permite tener un producto más puro. Aunque las concentraciones finales de xantana fueron similares en todos los casos ( $\pm 1.0$  g/L con respecto a la cepa E2), las cepas 10, 11 y 16 mostraron una viscosidad aparente final mayor que la que presentó la cepa control.

Los productos de las cepas de estudio presentaron diferentes contenidos de radicales acetilo y pirúvico. Los productos de las cepas 10 y 11 mostraron bajo contenido de pirúvico, debido a que un bajo contenido de pirúvico causa una menor adsorción sobre el suelo estas cepas presentan potencial para aplicarse en la recuperación del petróleo. El producto de la cepa 16 presentó un alto



contenido de nitrógeno, en relación al que mostró el producto de la cepa control, lo cual sugiere que alguna proteína puede estar asociada con el polímero.

El peso molecular promedio de los productos de las cepas de estudio estuvieron en el rango de  $10 \times 10^6$  -  $13 \times 10^6$  kg/kgmol. Los cromatogramas de la distribución de pesos moleculares de los productos de las cepas de estudio presentaron la tendencia modal previamente reportada para xantana.

Los reogramas de las soluciones de 1 g/L de xantana (y 0.1 M de NaCl como electrolito) mostraron que dichas soluciones presentaron viscosidades (Pa.s,  $0.3 \text{ s}^{-1}$  < velocidad de deformación <  $40 \text{ s}^{-1}$ ) en el siguiente orden: 11 > 16 > 10 > E2. Se obtuvieron diferentes tendencias al comparar las viscosidades de las soluciones de 1 g/L de los cuatro productos cuando no se adicionó sal; con una fuerza iónica más alta (NaCl, 1.0 M) o cuando se adicionó una sal diferente (buffer de fosfatos, 0.1 M). Asimismo, se observaron diferentes tendencias al comparar las viscosidades de las soluciones de 10 g/L cuando se adicionó (1 % de KCl) o no sal, antes y después de ser sometidas a tratamiento térmico.

Se caracterizaron una serie de cepas de *Xanthomonas*, las cuales presentaron potencial para mejorar aspectos particulares del proceso de producción o para producir xantana adecuada para aplicaciones específicas.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

La goma xantana es el primer heteropolisacárido bacteriano usado ampliamente en las industrias de alimentos, farmacéutica y del petróleo. El éxito de la goma xantana se debe a sus propiedades únicas como hidrocoloide. Se caracteriza por su alta viscosidad, alto grado de pseudoplasticidad, excelente estabilidad al pH y temperatura, así como alta afinidad a una variedad de sales. Además, en unión con otras gomas forma geles o produce un incremento sinérgico en la viscosidad.

La unidad repetitiva de la goma xantana está integrada por un pentasacárido ramificado (glucosa-glucosa-manosa-ácido glucurónico-manosa). En las manosas interna y externa de la ramificación o cadena lateral se localizan los radicales acetilo y pirúvico respectivamente. La proporción de estos radicales influye en las características de la goma (v.g. viscosidad) y son una función de la cepa y de las condiciones de cultivo (v.g. velocidad de agitación, concentración de oxígeno disuelto). Así, en la producción de goma xantana, la cepa de cultivo, la concentración de goma y la recuperación del producto son aspectos críticos del proceso.

La caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas campestris*, representa un punto de gran importancia, dado que pueden encontrarse cepas que presenten mayor producción de goma xantana con respecto a la que se obtiene actualmente con una cepa de colección. Consecuentemente, se mejoraría el proceso de producción de este heteropolisacárido bacteriano.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos relacionados con la producción de goma xantana han sido reportados con cepas provenientes de colecciones de cultivos, principalmente *Xanthomonas campestris* NRRL-B 1459 y sus derivados.

Los reportes sobre la caracterización de cepas nativas que podrían ser utilizadas en aplicaciones prácticas son muy escasos y limitados en cuanto al tipo de estudios realizados (v.g. viscosidad y/o contenido de acetilos, pirúvico, nitrógeno total). Por otra parte, las comparaciones entre cepas de *Xanthomonas* no se han realizado bajo las mismas condiciones de fermentación (v.g. concentración de oxígeno disuelto). Además, el producto obtenido de las fermentaciones es frecuentemente comparado sin tener en cuenta la pureza del polímero.

Debido a la poca investigación realizada en este campo, surge la idea de llevar a cabo la caracterización de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* enfocada en los aspectos de fermentación (en condiciones controladas de oxígeno disuelto), físico-químico (contenido de acetilo, pirúvico, nitrógeno total, nitrógeno proteico, peso molecular promedio y distribución de pesos moleculares) y reológico (determinaciones de la viscosidad de soluciones de diferentes concentraciones de goma xantana). Los resultados de esta caracterización permitirán tener un panorama general de las relaciones existentes entre estas áreas.

## CAPITULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1. ORIGEN DE LA GOMA XANTANA

La Northern Regional Research Laboratories (N.R.R.L.) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos llevó a cabo -durante los años 50's- un extensivo programa de selección de cultivos con la finalidad de encontrar microorganismos, que pudieran sintetizar gomas solubles en agua de interés comercial. Este estudio se basó principalmente en dos puntos. Primero, se consideró que había en los Estados Unidos un mercado potencial para nuevas gomas solubles en agua. Las cuales, podrían suplementar o reemplazar a algunas ya existentes derivadas de plantas, tales como la goma arábiga, la de algarrobo y el almidón, entre otras. Debido a que el abastecimiento y la calidad de la mayoría de estas gomas está sujeto a diferentes factores, como son las variaciones estacionales y las condiciones climáticas adversas; se pensó que la producción de gomas por fermentación podría ser más confiable. Segundo, debido a una sobreproducción de almidón de maíz se contaba con el abastecimiento de una fuente de carbón, la cual podía ser fácilmente convertida a D-glucosa para ser usada en la fermentación para la producción de gomas microbianas (Kennedy y Bradshaw, 1984).

De todos los microorganismos probados, la bacteria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 fue la que produjo el polímero con las más interesantes propiedades en solución. Estas propiedades radican en una alta viscosidad a bajas concentraciones de goma xantana, alta pseudoplasticidad y una atípica insensibilidad a un amplio rango de concentraciones de sal, pH y temperatura (Kennedy y Bradshaw, 1984).

Aunque no se sabe el origen exacto de la cepa de *X. campestris* NRRL B-1459, esta fue subsecuentemente depositada en la American Type Culture Collection como ATCC 13951. Por otra parte, se sabe que bacterias de este género pueden ser aisladas de plantas de col (*Brassica oleracea*). Además, se tiene evidencia de que la composición química de la xantana producida por fermentación es idéntica al polímero sintetizado sobre los tejidos de col bajo condiciones naturales (Coitrell y Kang, 1978). Una característica común de las especies de *Xanthomonas* es que son patógenas para sus plantas hospederas. Algunos ejemplos de estas son: la col (*X. campestris*), la caña de azúcar (*X. albilineans* y *X. vasculotruncum*), la fresa (*X. fragariae*) y el nogal (*X. juglandis*) (Kennedy y Bradshaw, 1984).

Finalmente, después de años de estudios que comprobaron la inocuidad de la goma xantana, en 1969 ésta goma fue aprobada como un aditivo de alimentos por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos.

## **2.2. ESTRUCTURA DE LA GOMA XANTANA**

### **2.2.1. UNIDAD REPETITIVA BASICA**

La estructura primaria aceptada para la goma xantana se presenta en la figura 2.1. Este biopolímero tiene una unidad repetitiva de cinco azúcares en donde la cadena principal contiene dos unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. La cadena lateral se encuentra unida a una glucosa de manera alternada en la posición 3. Esta consiste de una  $\beta$ -D-manosa terminal unida mediante un enlace glicosídico a la posición 4 del  $\beta$ -D-ácido glucurónico, el cual está unido por medio de un enlace glicosídico a la posición 2 de una unidad de  $\alpha$ -D-manosa. Un grupo acetilo se encuentra unido a la manosa no-terminal en la posición 6, mientras que el ácido pirúvico se encuentra (en forma de cetil) unido a las posiciones 4 y 6 de la manosa terminal. Ambos radicales se encuentran unidos a la molécula de xantana en cantidades no-estequiométricas (Holzwarth, 1976; Cottrell y Kang, 1978).

La cadena principal de la goma xantana -la cual consiste en una cadena celulósica- es completamente insoluble en agua debido a la formación paralela de moléculas en arreglo cristalino a través de puentes de hidrógeno. Sin embargo, la adición de la cadena lateral de trisacáridos cargados al esqueleto de la celulosa, como es el caso de la goma xantana, permite que las moléculas se solubilizan en agua fría o caliente (Hwang y Kokini, 1991).

### **2.2.2. ASPECTOS CONFORMACIONALES DE LA GOMA XANTANA EN SOLUCION**

Polisacáridos como la goma xantana (los cuales presentan interesantes propiedades en solución) tienden a formar, en medio acuoso, estructuras ordenadas (secundarias, terciarias o cuaternarias). Estudios de difracción de fibras con rayos X sugirieron que la molécula de goma xantana adopta una conformación helicoidal (de mano derecha) con una simetría de 5 pliegues y un paso de 4.7 nm. (figura 2.2). Estos datos sugieren que la cadena lateral está unida covalentemente a la cadena principal del polímero y estabiliza la estructura de la hélice. La goma xantana es difícil de cristalizar,

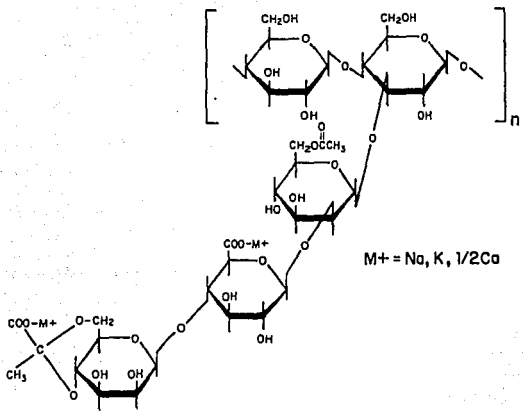


Figura 2.1 Estructura primaria de la goma xantana (Hwang y Kokini, 1991).

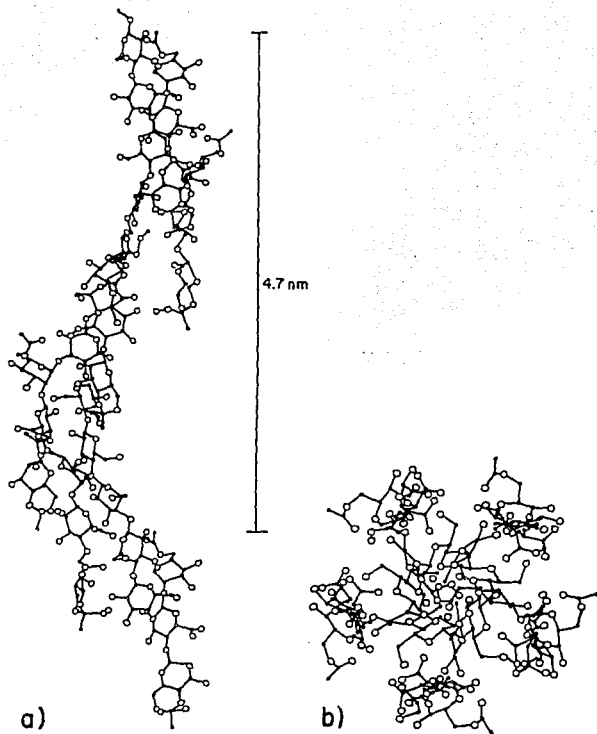


Figura 2.2 El empaquetamiento de la hélice de goma xantana visto: a) perpendicularmente y b) desde la parte de abajo del eje (Moorhouse *et al.*, 1977).

lo cual resulta en fotografías de rayos X de pobre resolución que hacen imposible discriminar entre estructuras de hélice sencilla o multicadenas. Por consiguiente, aún existe polémica sobre el hecho de que si la molécula de xantana se presenta en solución como una hélice sencilla, una hélice doble o como un dímero resultado de la asociación de cadenas de hélice sencilla. Sin embargo, al parecer, los modelos de doble cadena comienzan a ser más aceptados (Morris *et al.*, 1983; Shatwell y Sutherland, 1990; Morris, 1993).

Existe evidencia (Morris, 1977; Shatwell y Sutherland, 1990) que indica que, con el calentamiento, la molécula de goma xantana experimenta un cambio conformacional reversible de la estructura ordenada a la desordenada (transición orden-desorden) (figura 2.3). En la conformación ordenada, las cadenas laterales están alineadas con la cadena principal para dar una estructura rígida estabilizada por enlaces covalentes intramoleculares. Por otra parte, Milas y Rinaudo (1984) encontraron que existen 2 conformaciones diferentes (forma ordenada y desordenada) de la molécula en solución, dependiendo de las condiciones experimentales.

Milas *et al.* (1990) mencionan que existen 2 conformaciones ordenadas en solución: una nativa (I) y otra renaturalizada (II). El esquema de las conformaciones de la goma xantana es el siguiente:

NATIVA (I)            →    DESNATURALIZADA    →    RENATURALIZADA (II)  
(ORDENADA)                            (DESORDENADA)                            (ORDENADA)

Las conformaciones I y II presentan la misma masa molecular, pero presentan diferencias en el volumen hidrodinámico (volumen que ocupa la molécula en el espacio) y en las propiedades reológicas. La conformación II muestra, en relación a la conformación I, una viscosidad más elevada. Las temperaturas de transición conformacional para las transiciones nativa-desnaturalizada y renaturalizada-desnaturalizada son idénticas.

Se ha reportado (Kennedy y Bradshaw, 1984; Shatwell y Sutherland, 1990) que un incremento en la fuerza iónica causa un incremento en la temperatura media de transición. En condiciones de baja fuerza iónica, la repulsión entre los grupos carboxilatos tiende a desestabilizar la estructura. Sin embargo, si se adiciona sal, los cationes tienden a estabilizar la conformación ordenada y así evitar su ruptura por calor. Cuando se adiciona un electrolito a una concentración arriba de un valor crítico (aproximadamente 0.02 N NaCl) se observa un incremento en el volumen hidrodinámico del polisacárido. Este incremento se debe a repulsiones electrostáticas intermoleculares ocasionadas por el exceso de sal, lo cual permite la asociación de cadenas de xantana.



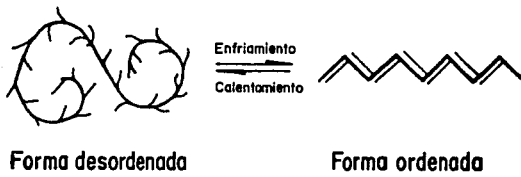


Figura 2.3 Estructura conformacional de la goma xantana (Dea *et al.*, 1977).

El grado de sustitución de acetilos y pirúvicos en la molécula de xantana afecta la estabilidad de la hélice. La conformación ordenada llega a ser más estable en función de un incremento en los radicales aceto, o bien a una disminución en cuanto a pirúvico se refiere. La desestabilización ocasionada por el pirúvico está relacionada con un incremento en la repulsión entre las cadenas laterales. Por otro lado, el efecto estabilizante relacionado con el contenido de grupos aceto no está claro aún. Sin embargo, existen 2 hipótesis. Una indica que este efecto está asociado a interacciones apolares entre los grupos metil cetilos y otra propone que estos sustituyentes puedan actuar como aceptores de puentes de hidrógeno y consecuentemente estabilizan la molécula (Sharwell y Sutherland, 1990).

### 2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA GOMA XANTANA

#### 2.3.1. PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS SOLUCIONES DE GOMA XANTANA

La importancia de la goma xantana se basa fundamentalmente en las propiedades reológicas que presenta en solución. La propiedad más importante de la xantana es su capacidad viscosificante. En la figura 2.4 se muestra un reograma (viscosidad *versus* velocidad de deformación) que ejemplifica la pseudoplasticidad de las soluciones de xantana. Es decir, que la viscosidad decrece al aumentar la velocidad de deformación. Además, se muestra la relación entre viscosidad y concentración de goma.

Además de las características mencionadas anteriormente, la viscosidad que presentan las soluciones de xantana es excepcionalmente estable a la temperatura (4-93 °C), pH (1-13) y fuerza iónica (Margaritis y Pace, 1985 ; Galindo, 1990).

En diversos trabajos (Margaritis y Zajic, 1978; Margaritis y Pace, 1985) se ha reportado el uso del modelo de Ostwald de Waele, mejor conocido como la "ley de la potencia", para representar el comportamiento reológico de diversos polisacáridos en suspensión como es el caso de la goma xantana. La ecuación fundamental de este modelo es la siguiente:

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

donde:

- $\tau$  Esfuerzo de corte
- $\dot{\gamma}$  Velocidad de deformación
- K Índice de consistencia
- n Índice de flujo

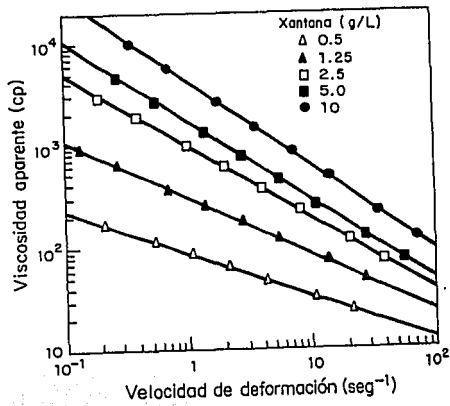


Figura 2.4 Reograma mostrando el efecto de la velocidad de deformación sobre la viscosidad aparente de soluciones de goma xantana de varias concentraciones (Galindo, 1990).

La ley de la potencia ha demostrado ser una ecuación útil y adecuada para representar el comportamiento reológico no-Newtoniano del tipo pseudoplástico que exhiben las soluciones poliméricas en función de la velocidad de deformación. Mientras más grande sea el valor de  $K$ , más viscoso es el fluido. A medida que el valor de  $n$  decrece, el fluido es más pseudoplástico ó reofluidizante.

### 2.3.2. BASES MOLECULARES DE LAS PROPIEDADES DE LAS SOLUCIONES DE XANTANA

Generalmente, los polielectrolitos (como la goma xantana) en condiciones de baja fuerza iónica, adoptan una conformación altamente expandida. En este caso, al adicionar sal, la conformación se colapsa a un enrollamiento más compacto, debido a la distribución de cargas. Dado que la reología de la solución polimérica es críticamente dependiente de la forma molecular, estas variaciones en las dimensiones del enrollamiento se reflejan normalmente en grandes cambios en la viscosidad de la solución (Morris, 1977).

Las propiedades que presenta la goma xantana en solución pueden explicarse mediante interacciones inter e intramoleculares, las cuales surgen de las estructuras secundaria y terciaria. La capacidad de la xantana para formar soluciones de alta viscosidad, aún a bajas concentraciones de este biopolímero, es el resultado de su estructura ramificada, de la rigidez de la estructura ordenada, de las interacciones intermoleculares y del alto peso molecular ( $> 2 \times 10^6$ ) (Kennedy y Bradshaw, 1984; Morris *et al.*, 1983). Se ha reportado un amplio rango de valores para el peso molecular promedio de la goma xantana. Este varía desde  $2 \times 10^6$  a  $50 \times 10^6$  (Kennedy y Bradshaw, 1984; Herbst *et al.*, 1988; 1992).

Lambert *et al.* (1982) reportaron el primer cromatograma de permeación en gel de goma xantana empleando ya sea un detector refractométrico ó uno de dispersión de luz. Estos autores mencionan que, cuando la concentración iónica del eluyente es igual o mayor a 0.05 M, el proceso de exclusión en cromatografía de permeación en gel es controlado por el volumen hidrodinámico. En el caso de la goma xantana (cuya molécula es como una barra rígida al adicionarle sal), existen problemas para interpretar los cromatogramas. Para evitar esto, deben emplearse concentraciones bajas de goma (v.g. 1 g/L o menos). Además, es necesario adoptar la más baja velocidad de flujo disponible para así prevenir la orientación y/o deformación del polímero.

Existen reportes (Morris, 1977) que indican que la conformación de la goma xantana es totalmente dependiente de la ausencia o presencia de sal. Cuando se someten a calentamiento, las soluciones de goma xantana en condiciones de baja fuerza iónica (tal es el caso cuando este biopolímero es disuelto en agua destilada) muestran un incremento en la viscosidad de la solución. Este comportamiento es indicativo del desdoblamiento de una configuración ordenada, tal como una hélice, a un enrollamiento aleatorio con el subsecuente incremento en el volumen hidrodinámico efectivo y, por consiguiente, en la viscosidad. La estabilización de la estructura ordenada probablemente se deba a la reducción de las repulsiones electrostáticas entre los grupos cargados cercanos.

Morris (1977) sugiere que en la conformación ordenada, las cadenas laterales están alineadas con la cadena principal para dar una estructura rígida estabilizada por enlaces no-covalentes intramoleculares.

Cuando se adiciona sal a soluciones de goma xantana, el cambio resultante en viscosidad diferirá de acuerdo a la concentración de este polisacrido (Cadmus et al., 1976). A concentraciones de xantana menores de 0.2 %, la adición de sal causa un ligero decremento en la viscosidad de la solución (Kennedy y Bradshaw, 1984). Las soluciones de xantana también son resistentes a la degradación por calor. Estas pueden permanecer a temperatura elevada por largos períodos de tiempo sin ningún cambio en la viscosidad de las mismas (Kennedy y Bradshaw, 1984).

A los niveles de sal empleados en la mayoría de las aplicaciones industriales, la estructura ordenada es estable arriba de 100° C. De allí la relativa insensibilidad de la viscosidad de las soluciones de goma xantana a la temperatura o bien a mayores incrementos en la fuerza iónica. El agrupamiento de moléculas rígidas en solución, forma una tenue red intermolecular, de la cual surgen otras propiedades interesantes tales como la capacidad de suspender partículas, estabilización de emulsiones y la tixotropía (Morris, 1977).

Sandford *et al.* (1977) reportaron que la viscosidad de la solución de xantana fue mayor a medida que se incrementaba el contenido de radicales pirúvicos. Sin embargo, las muestras de este biopolímero con bajo contenido de pirúvico (2.5-3.0 %) fueron derivados de una cepa variante de *X. campestris*, de modo que las diferencias observadas podrían deberse a cambios en otras características como podrían ser el peso molecular o los grupos acetilos (Kennedy y Bradshaw, 1984). En contraste, se ha reportado (Kennedy y Bradshaw, 1984) que el contenido de radicales pirúvico en la xantana no afecta directamente la viscosidad de las soluciones de esta goma. Para apoyar esto, se prepararon químicamente soluciones de xantana libre de piruvato, las cuales mostraron viscosidades significativamente más altas que las presentaron las soluciones de xantana

libre de piruvato obtenidas de una cepa mutante de *X. campestris*. Esto indicó que ocurrió algún cambio en las características de la xantana, lo cual influye en la viscosidad de la solución.

Por otra parte, Hwang y Kokini (1991) mencionan que, en soluciones concentradas (aproximadamente 1 % w/v), la viscosidad de la goma xantana con alto contenido de pirúvico se incrementó significativamente con la adición de sal. En el caso de goma xantana con bajo contenido de pirúvico, no ocurrió lo mismo. Sin embargo, estos autores no mencionan las condiciones experimentales (v.g. concentración y tipo de sal, tratamiento térmico).

#### 2.4. FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE GOMA XANTANA

La fermentación para la producción de goma xantana, al igual que la de otros polisacáridos microbianos, se lleva a cabo en cultivos por lote. Se emplean tanques agitados mecánicamente con suministro de aire estéril, control de temperatura y de pH. Una de las principales características de la fermentación es el cambio que se presenta en las propiedades reológicas del caldo durante el cultivo.

El comportamiento reológico al inicio de la fermentación es Newtoniano (la viscosidad es independiente de la velocidad de deformación). A medida que procede la fermentación, la reología del caldo es del tipo no-Newtoniano (se torna más viscoso y pseudoplástico). Además, presenta un comportamiento viscoelástico a altas concentraciones de goma xantana (Torres *et al.*, 1994).

La importancia de las propiedades reológicas del caldo de fermentación radica en que los cambios ocurridos durante el cultivo afectan parámetros tales como la transferencia de masa, el mezclado y el consumo de energía en el tanque, que consecuentemente, repercuten en el escalamiento del proceso (Margaritis y Zajic, 1978).

#### 2.5. INFLUENCIA DEL USO DE DIFERENTES CEPAS DE *Xanthomonas* Y DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE GOMA XANTANA

Herbst *et al.* (1988) reportaron la relación entre las condiciones de cultivo y la calidad de la xantana. La tensión de oxígeno durante la fermentación fue mantenida arriba de 20 %. La

distribución de pesos moleculares fue determinada por cromatografía en gel durante el transcurso de la misma, encontrándose que el volumen de elución del pico máximo no cambia significativamente con el tiempo de fermentación (figura 2.5). Sin embargo, el peso molecular promedio varía en función de la fase de crecimiento y consecuentemente, en función del tiempo de fermentación (figura 2.6).

Peters *et al.* (1989) reportaron como la producción y el peso molecular promedio de la xantana están influenciados por la velocidad de agitación. Estos autores encontraron que evitando la limitación de oxígeno, mediante altas velocidades de agitación o por el uso de altas presiones parciales de oxígeno en el gas, se tenían los mismos resultados en la productividad específica de goma. En relación al peso molecular promedio, Peters *et al.* (1989), reportaron que a mayor velocidad de agitación, mayor peso molecular promedio. Además, cuando introdujeron al fermentador aire enriquecido con oxígeno a bajas velocidades de agitación, obtuvieron aproximadamente el mismo peso molecular que cuando emplearon altas velocidades de agitación. Estos autores afirman que el efecto de la velocidad de agitación sobre la calidad de la xantana es más bien función de la disponibilidad de oxígeno en el sistema que de la hidrodinámica en el bioreactor.

Por otra parte, Herbst *et al.* (1989) estudiaron la influencia del suministro de oxígeno sobre la calidad de la xantana. Encontraron que la ausencia de zonas estancadas y la adecuada transferencia de oxígeno en el fermentador son los factores más importantes para lograr una alta productividad así como goma xantana de alto peso molecular.

Flores *et al.* (1994) estudiaron el efecto de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *X. campestris* sobre la producción y calidad de la goma xantana. Estos autores reportaron que el contenido de ácido pirúvico se incrementó a medida que la fermentación transcurrió. El contenido de piruvato fue muy similar cuando la concentración de oxígeno fue mayor al 40 % (figura 2.7). Estos valores fueron más altos si se comparan con los obtenidos con una concentración de oxígeno disuelto de 10 %. La concentración de oxígeno disuelto influye determinantemente en el comportamiento reológico del caldo de fermentación (figura 2.8) y, consecuentemente, en la calidad de la goma. Flores *et al.* (1994) encontraron pesos moleculares promedio de  $10 \times 10^6$  kg/kgmol cuando la concentración de oxígeno disuelto fue mayor a 40 %.

A través del uso de diferentes pathovares de *X. campestris*, así como de mutantes se pueden obtener diferentes tipos de xantanas. En el caso de cepas mutantes de *X.c.*, el polisacárido puede presentar diferencias en su estructura, principalmente en la cadena lateral (tetra o trisacáridos) (Hassler y Doherty, 1990).

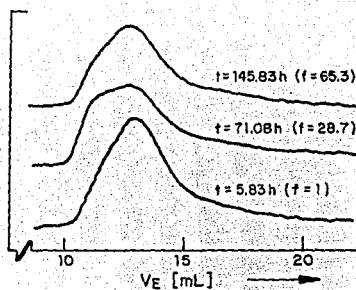


Figura 2.5 Cromatogramas correspondientes a diferentes tiempos de fermentación ( $f$ =factor de dilución), (Herbst *et al.*, 1988).

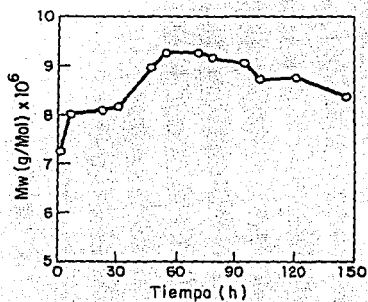


Figura 2.6 Peso molecular promedio a través del tiempo de fermentación (Herbst *et al.*, 1988).



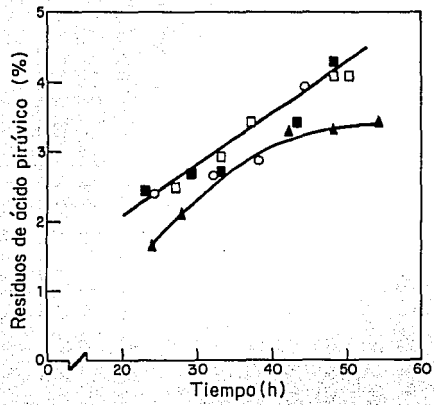


Figura 2.7 Residuos de ácido pirúvico en la goma xantana como una función del tiempo de fermentación. DOT (%): ( $\blacktriangle$ ) 10, ( $\square$ ) 40, ( $\blacksquare$ ) 80, ( $\circ$ ) 100 (Flores *et al.*, 1994).

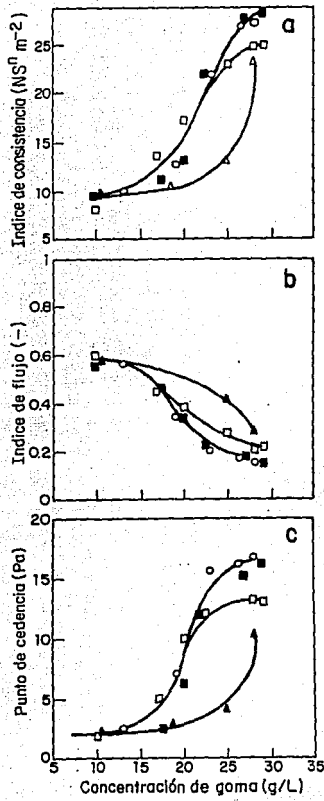


Figura 2.8 Caracterización reológica del medio de cultivo a través de la fermentación. DOT (%): (▲) 10, (◻) 40, (■) 80, (○) 100 (Flores *et al.*, 1994).

De manera concluyente, se establece que el uso de diferentes cepas de *Xanthomonas* así como condiciones de fermentación (v.g. velocidad de agitación, nivel de oxígeno disuelto, medio de cultivo) dan como resultado variaciones en la composición del polímero. Estas variaciones tienden a estar principalmente relacionadas con el contenido de radicales acetilo y pirúvico y, desde luego, con el peso molecular promedio.

Actualmente, existe una diversidad de xantanas las cuales presentan una amplia variación en los grados de acetilación y piruvilación. Lo mismo se puede encontrar goma xantana con un alto contenido de piruvato o bien con la total ausencia de este radical. Sin embargo, la mayoría de las xantanas disponibles comercialmente se encuentran totalmente acetiladas y sólo presentan aproximadamente un 30 % de piruvilación (Sutherland y Tait, 1992).

La aplicación de la goma xantana en ciertos casos depende del contenido de pirúvico. Por ejemplo, en la recuperación del petróleo, un alto contenido de pirúvico causa una mayor adsorción sobre el suelo y por consiguiente ocasiona problemas en las operaciones de inyección (Kleinitz *et al.*, 1989; Schumpe y Deckwer, 1990; Peters *et al.*, 1993).

## 2.6. CARACTERIZACION DE DIFERENTES CEPAS DE *Xanthomonas*

Los reportes relacionados con el aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Xanthomonas* que presenten características interesantes de aplicación son muy limitadas. Scamparini y Rosato (1987) reportaron el aislamiento de 21 cepas nativas de *Xanthomonas*, de las cuales seleccionaron 4 cepas (p.v. *manihotis*). El estudio reportado por estos autores (con las cuatro cepas seleccionadas) se basó principalmente en determinaciones de la viscosidad del caldo de fermentación y de soluciones de 0.2 % de goma xantana, las cuales fueron comparadas con una solución de una xantana comercial ("Keltrol") a la misma concentración de goma (Tablas 2.1A. y 2.1B.). La viscosidad aparente fue determinada con un viscosímetro Brookfield. Los resultados de Scamparini y Rosato (1987) muestran que únicamente una cepa presentó mejores propiedades reológicas que la solución de Keltrol, especialmente a bajas velocidades de deformación. A este respecto, recientemente Sánchez *et al.* (1992) demostraron que las soluciones de goma xantana comercial no permiten simular (a la misma concentración de goma y fuerza iónica) exactamente las propiedades reológicas de los caldos de fermentación.

**Tabla 2.1A. VISCOSIDAD (cps) DE LOS CALDOS DE FERMENTACION DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.**

RPM	CE PA			
	280	287	289	320
0.3	23,000	10,500	6,750	7,250
0.6	15,500	7,750	5,750	5,375
1.5	8,700	4,800	3,800	3,650
3.0	5,450	3,325	2,700	2,500
6.0	3,350	2,187	1,837	1,725
12.0	2,000	1,381	1,193	1,128
30.0	1,000	737	642	607
60.0	+	456	403	357

(Scamparini y Rosato, 1987)

**Tabla 2.1B. VISCOSIDAD (cps) DE LAS SOLUCIONES\* DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS.**

RPM	CEPA				Kontrol
	280	287	289	280	
0.3	1,100	150	300	00	550
0.6	825	125	225	25	450
1.5	500	130	160	30	310
3.0	325	85	110	45	220
6.0	205	62	82	35	147
12.0	126	41	50	22	101
30.0	66	24	28	15	52
60.0	40	16	19	10	37

\* Concentración: 0.2 % de goma xantana.

Scamparini y Rosato (1987)

En 1989, Galindo *et al.* reportaron la caracterización reológica de caldos de fermentación de tres cepas de *Xanthomonas campestris* (NRRL B-1459, subcepa NRRL B-1459 y una cepa aislada de col, SCF-4). También presentaron datos reológicos de soluciones reconstituidas a partir de los polímeros crudos precipitados. Las cepas fueron cultivadas en un fermentador de 25 litros. Los resultados se muestran en la tabla 2.2. Estos autores encontraron diferencias en los parámetros de la ley de la potencia (K y n) entre la cepa SCF-4 y las cepas NRRL B-1459, NRRL B-1459-4L. Postulan que esto podría ser visto como una evidencia indirecta de diferencias genéticas entre las cepas.

**Tabla 2.2. CARACTERISTICAS DE LAS FERMENTACIONES DE 3 CEPAS DE *Xanthomonas campestris*.**

	CEPA		
	1459	1459-4L	SCF-4
Tiempo de fermentación (h)	48.0	48.0	73.0
Velocidad específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.19	0.32	0.05
Concentración final (g/L)	18.0	12.9	8.6
Viscosidad* final (cps)	6,100	4,500	1,600
Azúcar residual (g/L)	0.0	2.7	1.4

\* Viscosímetro Brookfield, aguja 4, 30 rpm.

Galindo *et al.* (1989)

Aunado a lo anterior, Galindo *et al.* (1989) encontraron que el tratamiento térmico al cual son sometidos los caldos de fermentación, origina cambios en las propiedades reológicas de los productos (tabla 2.3). El efecto que produce este tratamiento en las soluciones de los polímeros es diferente dependiendo del origen de la xantana. Esto probablemente indica que los polímeros presenten diferencias conformacionales.

**Tabla 2.3. DATOS REOLOGICOS DE LAS SOLUCIONES DE LOS POLIMEROS OBTENIDOS DE LAS TRES CEPAS DE *Xanthomonas*.**

PARAMETROS DE LA LEY DE LA POTENCIA TRATAMIENTO TERMICO	n (--)		K (Pa.s <sup>n</sup> )	
	NO	SI	NO	SI
SOLUCION DEL POLIMERO DE LA CEPA:				
1459	0.35	0.14	2.0	11.1
1459-4L	0.23	0.15	5.9	9.8
SCF-4	0.29	0.19	3.2	8.2

\* Concentración: 10 g/L

Galindo *et al.* (1989)

Posteriormente, Torrestiana *et al.* (1990) llevaron a cabo el aislamiento de 7 cepas de *Xanthomonas*. La caracterización se realizó en términos de la morfología, resistencia a antibióticos, producción de goma, viscosidad y contenido de pirúvico. La cepa control fue la cepa de colección *X. campestris* NRRL B-1459. Torrestiana y colaboradores (1990) encontraron que sólo una cepa presentó una viscosidad aparente (a 30 rpm en un viscosímetro Brookfield) muy cercana a la que presentó la cepa de colección. Por otra parte, aunque el contenido de ácido pirúvico ha sido sugerido por otros autores (Sandford *et al.*, 1977) como un índice de la calidad de la goma xantana, los resultados de Torrestiana *et al.* (1990) presentaron una muy baja correlación entre el contenido de ácido pirúvico y la viscosidad. Además, estos autores encontraron que la sensibilidad a la penicilina G podría ser un buen índice para la selección de cepas productoras de goma xantana de alta calidad.

Ramírez (1993) llevó cabo un aislamiento, selección y caracterización de cepas de *Xanthomonas campestris*. En este estudio se aislaron 14 cepas nativas, las cuales fueron caracterizadas a nivel de matraces en cuanto a viscosidad aparente (figura 2.9). En base a este parámetro fueron seleccionadas las cepas denominadas como 10, 11, 12, 15 y 16 para ser evaluadas a nivel de fermentador de 2 litros. Ramírez (1993) reporta que los cultivos de las cepas en cuestión presentaron diferencias cinéticas (tabla 2.4) y reológicas (tabla 2.5) en relación al cultivo de la cepa control. Los productos de estas cepas presentaron diferentes contenidos de acetilo, pirúvico y de nitrógeno total (tabla 2.6).

**Tabla 2.4. RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES DE CINCO CEPAS DE *Xanthomonas* EN UN FERMENTADOR\* DE UN LITRO.**

CEPA	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	XANTANA (kg.m <sup>-3</sup> )	$\mu_n$ **(mPa.s)
10	0.57	18.9	4,500
11	0.16	17.1	5,800
12	0.20	13.9	1,200
16	0.12	13.2	3,800
E2	0.11	16.1	4,300

\* Peptona como fuente de nitrógeno y después de que la concentración de glucosa estuvo abajo de 1 kg.m<sup>-3</sup>.

\*\* Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.

Ramírez (1993)

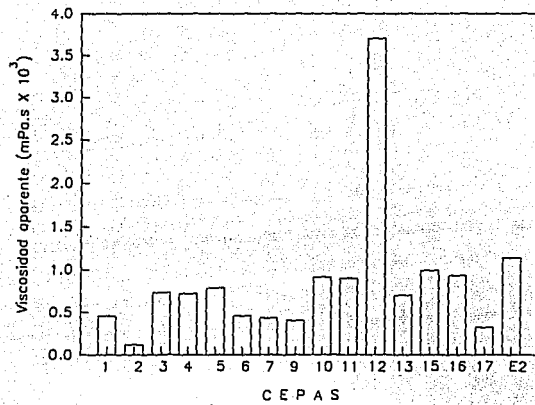


Figura 2.9 Viscosidad aparente final de los caldos de fermentación producidos por las cepas nativas (Ramírez, 1993).

**Tabla 2.5. INDICES REOLOGICOS DE LA LEY DE LA POTENCIA DE LAS SOLUCIONES DE LOS PRODUCTOS DE CINCO CEPAS DE *Xanthomonas*.**

SOLUCION DE 10 g/L DE LA CEPA:	K (Pa.s <sup>n</sup> )	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

(Ramírez, 1993)

**Tabla 2.6. ANALISIS QUIMICO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DE CINCO CEPAS DE *Xanthomonas*.**

PRODUCTO DE LA CEPA:	PIRUVICO (%)	ACETILO (%)	NITROGENO KJELDAHAL (%)
10	0.75	5.0	1.8
11	0.21	5.7	1.9
12	0.03	4.0	2.9
16	4.20	4.1	1.0
E2	2.14	5.0	0.5

(Ramírez, 1993)

Posteriormente, se demostró que los resultados de la cepa 12 obtenidos por Ramírez (1993) no fueron reproducibles (datos no publicados) concluyéndose que probablemente esta cepa presentó inestabilidad genética.

La principal limitante del trabajo realizado por Ramírez (1993) es que las fermentaciones no se llevaron a cabo con control de oxígeno disuelto. Como se mencionó en párrafos anteriores, este parámetro constituye otra variable dentro del proceso, dado que influye en las características de la goma xantana (Flores *et al.*, 1994). Ahora se sabe que es difícil comparar los productos de estas cepas, ya que se desconoce la historia del nivel de oxígeno durante el transcurso de estas fermentaciones.



Además, la caracterización química-reológica realizada por Ramírez (1993) se basó en determinaciones del contenido de acetilo, pirúvico y nitrógeno total y en soluciones de 10 g/L de goma xantana y 1 % de KCl respectivamente. De acuerdo a esto, resulta interesante integrar la caracterización de soluciones diluidas (v.g. 1 g/L de goma xantana) y la caracterización física (v.g. peso molecular promedio y distribución de pesos moleculares) con la finalidad de poder eventualmente establecer alguna correlación entre las diferentes propiedades.

Cabe resaltar que los trabajos realizados por Scamparini y Rosato (1987) y los de Torrestiana *et al.* (1990) se realizaron en matraces agitados. Dadas las limitantes que se presentan al trabajar con matraces y al escaso trabajo realizado en relación a la caracterización de cepas de *Xanthomonas*, resulta de interés caracterizar -en fermentadores- diferentes cepas nativas de *Xanthomonas campestris* que pudieran presentar propiedades explotables para la producción de goma xantana.

## CAPITULO 3

### OBJETIVOS

#### GENERAL

Caracterizar bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto, la fermentación y el polímero producido en estas condiciones por varias cepas de *Xanthomonas* que pudieran mostrar características aprovechables para la producción de goma xantana. Dadas las características naturales de los productos, tratar de establecer posibles correlaciones entre los aspectos físico-químicos y reológicos.

#### ESPECIFICOS

- A) Caracterizar cinética y reológicamente la fermentación bajo condiciones controladas de oxígeno disuelto de las cepas 10, 11 y 16 en un fermentador de 2 litros, usando como control una variante de la cepa *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, denominada E2.
- B) Caracterizar físico-químicamente los polímeros obtenidos y reológicamente las soluciones de ellos.

## CAPITULO 4

### MATERIALES Y METODOS

#### 4.1. EQUIPO

##### 4.1.1. FERMENTADOR

En la figura 4.1 se muestra el diagrama del fermentador de 2 litros. Entre los componentes y características de este equipo se encuentran: una flecha de acero inoxidable de 0.009 m de diámetro, motor eléctrico de 1 Hp, un sello que permite un cierre hermético y un tanque de vidrio (diámetro = 0.11 m, altura = 0.22 m, espesor del vidrio = 0.005 m).

Los controles con los que cuenta este fermentador son:

**Temperatura.** Mediante un termomix (Colora ET5) sumergido en la tina del fermentador.

**Agitación.** Mediante un reóstato adicionado al motor, calibrado con tacómetro óptico (Uveeder-Root 6611).

**Aireación.** Mediante un rotámetro (Cole-Parmer, 3217-45)

**pH.** Mediante un controlador de pH (Cole-Parmer, 5662-00), electrodo de pH (Ingold), bomba peristáltica para la adición de ácido o base (Masterflex 7014-20).

**Espuma.** Control manual mediante inyección de silicón

##### 4.1.2. CEPAS

Se trabajó con tres cepas nativas de *Xanthomonas* (10, 11 y 16). Estas cepas provienen de un trabajo (Ramírez, 1993) de aislamiento y selección de cepas silvestres de *Xanthomonas campestris* (Tabla 4.1) Aún cuando se desconoce el pathovar de las cepas 10 y 11, Ramírez (1993) reportó que en base a sus características morfológicas estas cepas pueden considerarse como pertenecientes al género *Xanthomonas*. Asimismo, reportó que los cultivos de las cepas 10, 11 y 16 presentaron los valores de viscosidad más altos y que además sus productos presentaron diferentes contenidos de radicales acetilo y pirúvico. La cepa control fue una variante de la cepa de colección *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, denominada E2 (Galindo *et al.*, 1992).

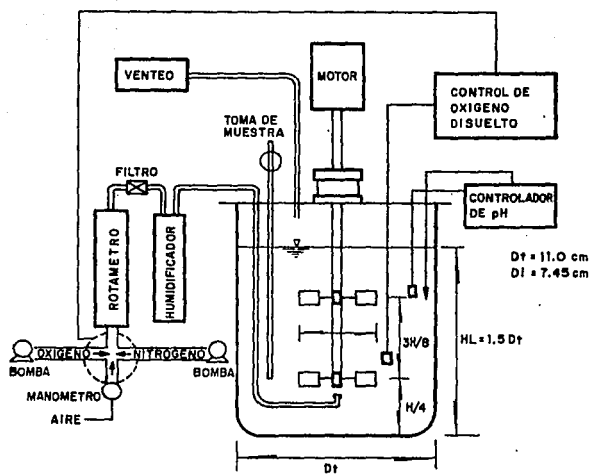


Figura 4.1 Diagrama del fermentador y sus componentes.

Tabla 4.1. CEPAS DE TRABAJO

CEPA	PATHOVAR
10	no definido
11	no definido
16	<i>manihotis</i>
E2	<i>campestris</i>

#### 4.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

##### MEDIO YM (CRECIMIENTO) (Haynes *et al.*, 1955)

COMPONENTE	g/L	
Glucosa	10	(J.T. Baker)
Peptona	5	(Difco)
Extracto de malta	3	(Bioxon)
Extracto de levadura	3	(Bioxon)
Agar (si se requiere)	20	

##### MEDIO DE PRODUCCION (Flores, 1989)

COMPONENTE	g/L	
Glucosa	24	
Peptona	0.8	
Fosfato de amonio monobásico	0.6978	(J.T. Baker)
Fosfato de potasio monobásico	3.068	(J.T. Baker)
Acido cítrico	1.3	(J.T. Baker)
Sulfato de magnesio	0.23	(J.T. Baker)
Cloruro férrico	0.0014	(J.T. Baker)
Carbonato de calcio	0.0024	(J.T. Baker)
Acido bórico	0.0048	(J.T. Baker)
Oxido de zinc	0.0072	(J.T. Baker)
pH (con NaOH concentrado)	7	(J.T. Baker)

El ajuste de pH y la esterilización del medio deben llevarse a cabo sin la glucosa. Esta última se disuelve y esteriliza por separado (121 °C, 20 minutos), para ser posteriormente adicionada al fermentador en condiciones estériles.

## 4.2. METODOS ANALITICOS

### 4.2.1. DETERMINACION DE BIOMASA

La masa celular se determinó mediante su densidad óptica (D.O.) en el espectrofotómetro (Beckman 35) a 565 nm.

Las muestras de las fermentaciones se procesaron de la siguiente manera:

1. Pesar un gramo de caldo de fermentación en un matraz de 50 mL (aforado), aforar con agua destilada (IBT/UNAM) y homogenizar (Vortex, Lab-line Instrument).
2. Leer la D.O. total de la solución a 565 nm.
3. Centrifugar (Beckman J2-21) la solución a 14,000 rpm durante 20 minutos. Separar cuidadosamente el sobrenadante y leer la absorbancia de éste a 565 nm.
4. La diferencia entre la D.O. total (paso 2) y la del sobrenadante (paso 3) corresponde a la D.O. celular.

Para determinar la concentración celular, se extrapoló el valor de D.O. en la curva de peso seco (sección 4.2.1.1.).

#### 4.2.1.1. CURVA DE PESO SECO

Las muestras de las fermentaciones de la cepa E2 se procesaron de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2.1. Posteriormente:

- Las células centrifugadas se resuspenden en 20 mL de agua destilada.
- Se filtran a través de membranas Millipore de tamaño de poro de 0.45 µm (previamente puestas a peso constante).
- Se dejan secar en la estufa a 40 °C hasta que estén a peso constante.
- La diferencia entre el peso final y el peso inicial de la membrana representa el peso de las células.
- Con los datos obtenidos se construyó una gráfica de D.O. en función de la concentración de células en peso seco (figura 4.2).

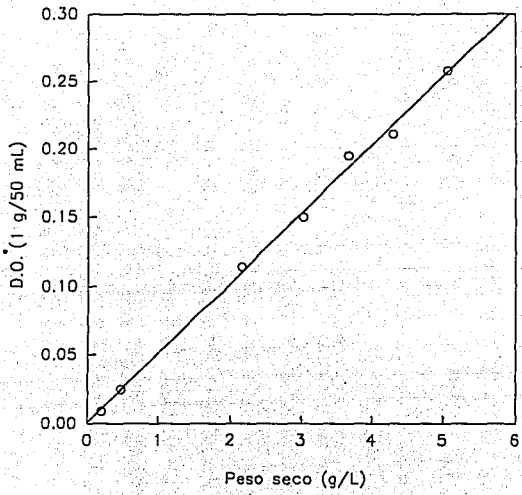


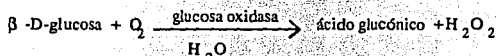
Figura 4.2 D.O. versus la concentración de células en peso seco.  
\* a 565 nm.

#### 4.2.2. DETERMINACION DE GLUCOSA

La concentración de glucosa en el caldo de fermentación se determinó mediante el analizador de glucosa Beckman 2.

El analizador utiliza un electrodo de oxígeno, un reactivo y un sistema electrónico que mide la velocidad de cambio en el consumo de oxígeno cuando una muestra es inyectada en una solución de un reactivo conteniendo enzimas.

Cuando la muestra es inyectada en la solución del reactivo, la  $\beta$ -D-glucosa de la muestra se combina con el oxígeno disuelto de la solución de acuerdo a la siguiente reacción:



En la reacción el oxígeno es consumido a la misma velocidad que la glucosa reacciona para formar el ácido glucónico. La máxima velocidad observada, después de un intervalo requerido para que el reactivo se mezcle y el sistema responda, es una medida directa de la concentración de glucosa originalmente presente en la muestra al tiempo de la inyección. El analizador mide esta velocidad máxima y permite una lectura digital que corresponde a la concentración de glucosa en mg/dL.

#### 4.2.3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE POLIMERO

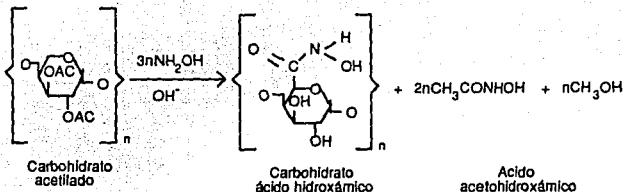
Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

1. Se pesan 5 g de caldo de fermentación, se le adiciona 1 mL de cloruro de potasio (J.T. Baker) concentrado (35 % P/V) y 10 mL de alcohol isopropílico (Droguería Cosmopolita, S.A.; relación 2:1 V/P alcohol-muestra).
2. El alcohol se decanta y el precipitado se lava dos veces con alcohol isopropílico.
3. La goma precipitada se seca en estufa (Felisa 2914) a 50 °C hasta peso constante.

#### 4.2.4. DETERMINACION DE RADICALES ACETILO

Esta técnica se basa en la determinación colorimétrica del ácido acetohidroxámico (McComb y McCready, 1957) que se forma por la siguiente reacción:





El grupo \u00e9ster del carbohidrato con la hidroxilamina alcalina a bajas temperaturas, produce \u00e1cido hidrox\u00e1mico. El carbohidrato \u00e1cido hidrox\u00e1mico forma con los iones f\u00e9rricos un complejo insoluble. Cuando el \u00e1cido acetohidrox\u00e1mico se produce por los grupos acetilos secundarios, se forma un complejo rosa soluble que se detecta colorim\u00e9tricamente. Esta t\u00e9cnica es aplicable en general a pol\u00edmeros acetilados.

#### REACTIVOS

1. Soluci\u00f3n de hidr\u00f3xido de sodio. 9.4 g en 100 mL de agua destilada.
2. Soluci\u00f3n de clorhidrato de hidroxilamina (Reactivos monterrey, S.A.). 3.75 g en 100 mL de agua destilada.
3. Soluci\u00f3n de \u00e1cido percl\u00f3rico (J.T. Baker) al 70 %. (V/V).
4. Soluci\u00f3n stock de perclorato f\u00e9rrico (J.T. Baker). 1.93 g de cloruro f\u00e9rrico en 5 mL de \u00e1cido clorh\u00eddrico concentrado, agregar 5 mL de \u00e1cido percl\u00f3rico al 70 %. Calentar y evaporar la soluci\u00f3n casi a sequedad. Finalmente, llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada (la soluci\u00f3n es estable por un mes en refrigeraci\u00f3n).
5. Soluci\u00f3n de perclorato f\u00e9rrico. 8.3 mL de \u00e1cido perclorico al 70 % en 60 mL de la soluci\u00f3n stock. Enfriar con hielo y llevarla a 500 mL con metanol absoluto (soluci\u00f3n estable por una semana a temperatura ambiente).
6. Soluci\u00f3n \u00e1cida de metanol (J.T. Baker). Enfriar en hielo 35.2 mL de \u00e1cido percl\u00f3rico y llevar a 500 mL con metanol absoluto frio.
7. Soluci\u00f3n est\u00e1ndar de pentaacetato de glucosa (Sigma, G-5125). Disolver 0.6235 g de \u03b2-D-(+) penta-acetato de glucosa por calentamiento lento en 30 mL de alcohol et\u00edlico. Llevarlo a 50 mL con agua destilada. Tomar al\u00edcuotas de 5, 10, 15, 20 mL de esa soluci\u00f3n y llevarlos a 50 mL con agua destilada. 5 mL de estas soluciones representan 5, 10, 15 y 20 \u00b5g de acetilo por mL. Preparar un blanco usando 5 mL de agua en lugar de la soluci\u00f3n est\u00e1ndar.

## CURVA ESTANDAR

1. Para la elaboración de esta curva tomar 5 mL de la muestra, disolver en 25 mL de la solución de hidroxilamina y se agrega gota a gota 25 mL de la solución de NaOH.
2. De la solución anterior se toman 2 mL y se adicionan 5 mL de agua destilada y 5 mL de la solución ácida de metanol. Se lleva a un volumen de 25 mL con solución de perclorato férrico. Se lee a 520 nm contra el blanco.  
NOTA: El perclorato férrico se adiciona lentamente y con agitación por lo que se emplea una bureta que regule el goteo.

## DETERMINACION DE RADICALES ACETILO EN LA MUESTRA

1. Se pesa 0.130 g de cada muestra, disolver en 25 mL de la solución de hidroxilamina y se agrega gota a gota 25 mL de la solución de NaOH.
2. Se procede como en el paso 2 para la preparación de la curva estándar.
3. Se prepara un blanco con 5 mL de agua destilada y se prosigue como en el caso de las muestras.

Los resultados de acetilos se expresan en %:

$$\% \text{ de acetilo} = \frac{130 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} \left( \frac{2 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) = 0.208$$

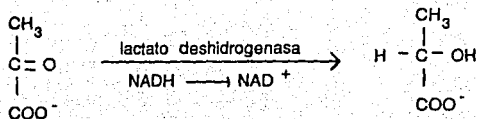
La curva estándar se da en X mg/mL de acetilos

$$\% \text{ de acetilos} = \frac{X}{0.208} (100)$$

\* En el caso de la curva estándar, el volumen entre el cual se divide es de 55 mL.

## 4.2.5. DETERMINACION DE RADICALES PIRUVICOS

El ácido pirúvico se determina enzimáticamente (Hadjivassiliou y Rieder, 1968; Dukworth y Yaphe, 1970), mediante el decremento de la absorbancia a 340 nm por el NAD<sup>+</sup> formado cuando se reduce una mol de piruvato a lactato, en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa.



### REACTIVOS

1. Solución de 1 M de carbonato de sodio (J.T. Baker). Disolver 10.59 g en 100 mL de agua destilada.
2. Solución de 1 N de ácido clorhídrico (J.T. Baker). Disolver 8.35 mL en 100 mL de agua destilada.
3. Solución de 1 N de trietanolamina (Merck). Disolver 6.66 mL en 50 mL de agua destilada.
4. Solución de bicarbonato de sodio (J.T. Baker), 0.1 % (P/V)
5. NADH (Sigma N-6879). 10 mg por mL de bicarbonato de sodio 0.1 %.
6. Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo con 25,000 U., suspensión cristalina en 2.1 M (3.2 M) de sulfato de amonio (Sigma L 2500).

### DETERMINACION DE ACIDO PIRUVICO EN LA MUESTRA

1. Pesar 0.005 g de xantana en polvo, los cuales se colocan en tubos de ensayo y se agregan 2 mL de solución de ácido clorhídrico. Se mezclan hasta su completa disolución.
2. Se prepara un blanco con 2 mL de ácido clorhídrico únicamente y se prosigue de la misma manera como para las muestras. El blanco lleva todos los reactivos excepto el NADH.
3. Se tapan los tubos herméticamente y se calientan en baño María en ebullición durante 3 horas, posteriormente se dejan enfriar y se agitan.
4. La solución se neutraliza con 1.2 mL de la solución de carbonato de sodio. Se lleva a un volumen de 10 mL con agua destilada. Se asegura que el pH sea neutro con una tira de papel indicador de pH.

5. Tomar 2 mL de la mezcla en un tubo de ensaye. Adicionar 1 mL de la solución de trietanolamina. Posteriormente, agregar 50 µL de la solución de NADH. Agitar y medir la absorbancia a 340 nm en contra del blanco.
6. Adicionar a cada muestra 4 µL de la enzima lactato deshidrogenasa y se deja actuar la enzima por 90 minutos. Una vez que ha transcurrido este tiempo, se vuelve a leer contra el blanco.
7. Restar la absorbancia final obtenida de la absorbancia inicial para determinar que cantidad de NADH se consume.

El porcentaje de ácido pirúvico se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ ácido pirúvico} = \frac{(\text{NADH consumido}) (88) (3.054) (5) (100)}{(5000) (6.22)}$$

Donde:

88	es el peso molecular del ácido pirúvico.
3.054	volumen total de la muestra.
5	factor de dilución.
6.22	coeficiente de extinción.
5000	muestra en µg.

#### 4.2.6. DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL (MICRO-KJELDAHAL)

El método de Kjeldahal ha sido adaptado a la escala de microanálisis (micro-Kjeldahal) y semi-microanálisis (semi-micro-Kjeldahal) (Montes, 1966; Devore y Muñoz, 1978). La reacción esencial es la mineralización sulfúrica del nitrógeno total al estado del sulfato de amonio, por la oxidación de la materia con el ácido sulfúrico. Al hacer reaccionar esta sal con la base fuerte se desprende amoníaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de una solución valorada de ácido en presencia de indicadores.

Mediante titulación con un ácido valorado, se calcula la cantidad de amoníaco desprendido y por consiguiente, el porcentaje de nitrógeno de la muestra.

#### REACTIVOS

1. Hidróxido de sodio 1:1 (P/V).
2. Acido bórico al 4 % (P/V).

3. Solución indicadora. Mezclar 2 partes de una solución alcohólica de rojo de metilo (Merck) al 0.2 % (P/V) con 1 parte de una solución alcohólica de azul de metileno (Merck) al 0.2 % (P/V).
4. Sulfato de potasio (J.T. Baker).
5. Acido sulfúrico concentrado (J.T. Baker).
6. Negro de selenio (Merck).
7. Solución de ácido clorhídrico al 0.01 N (solución valorada).
8. Papel cebolla.

#### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1. Pesar 0.1 g de la muestra en el papel cebolla. Pesar 1.0 g de sulfato de potasio y 0.04 g de negro de selenio. Se envuelve bien de manera que no se salga ni la muestra ni los reactivos. Se introduce en un matraz Kjeldahl, se agregan 3 mL de ácido sulfúrico concentrado.
2. Realizar un blanco únicamente con todos los reactivos mencionados en el paso 1.  
NOTA: El peso del papel debe ser el mismo para todas las muestras.
3. Los matraces se colocan en posición inclinada mediante soportes y pinzas, en una mantilla de calentamiento hemisférica para matraz, la cual se debe de encontrar en una campana de extracción.
4. Se calienta hasta total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que el contenido del matraz este completamente claro. Se deja enfriar.
5. Para destilar las muestras, es necesario lavar el aparato con agua destilada. El procedimiento de lavado se describe a continuación:
  - a) El aparato de destilación se ilustra en la figura 4.3.
  - b) Se agrega aproximadamente la mitad de agua a la bola del matraz. Calentar con una mantilla hemisférica hasta observar las primeras burbujas de ebullición. En este momento, agregar agua por la parte superior del aparato (llave de paso 1).  
NOTA: debe asegurarse que la llave de paso 2 esté cerrada.
  - c) Colocar a la salida del refrigerante un matraz colector.
  - d) Destilar aproximadamente 30 mL de agua destilada. El agua que queda en el bulbo se desecha abriendo la llave de paso 2. El aparato está listo para usarse.

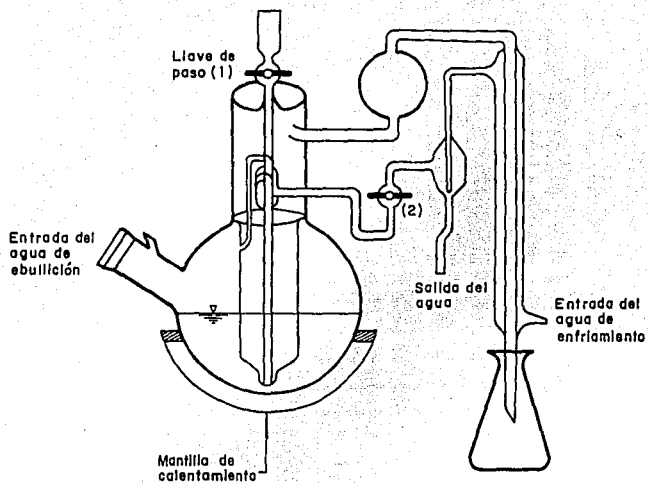


Figura 4.3 Aparato de micro-Kjeldahal.

6. Destilación de las muestras:

- a) La muestra digerida se pasa al destilador en la misma manera en que se agrega el agua para el lavado (tomando las mismas precauciones). El matraz se enjuaga con 5 mL de agua destilada y se introduce al destilador.
- b) Se agrega lentamente gota a gota 20 mL de la solución de hidróxido de sodio, debido a que la reacción es muy violenta.  
NOTA: Tener cuidado al adicionar el hidróxido para que no se sifonee hacia la solución de ácido bórico.
- c) Al final del refrigerante se coloca un matraz con 15 mL de la solución de ácido bórico y 5 gotas de la solución indicadora.
- d) Destilar 20 mL y retirar el matraz.
- e) Lavar el destilador para ser utilizado nuevamente.
- f) La solución destilada se titula con la solución de ácido clorhídrico valorada hasta el vire a rosa-violeta.

El porcentaje de nitrógeno se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{mL HCl problema} - \text{mL HCl blanco}) (\text{NHCl}) (0.014) (100)}{\text{peso muestra}}$$

Donde:

mL HCl problema = mililitros de HCl gastados en el problema.

mL HCl blanco = mililitros de HCl gastados en el blanco.

NHCl = normalidad del ácido clorhídrico.

#### 4.2.7. DETERMINACION DE NITROGENO PROTEICO (LOWRY)

Para la determinación de nitrógeno proteico se emplea un método colorimétrico sensible (Lowry *et al.*, 1951). Este método usa material seco o en solución. Requiere 2 mg de proteína como mínimo.

El color producido resulta de la reacción de la proteína con el cobre alcalino del reactivo (reacción de Biuret) más la reducción de la sal de fosfomolibdato fosfotungstato (reactivo de Folin-Ciocalteu) por residuos de tirosina y triptofano de la proteína.

#### REACTIVOS

1. Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.  
Disolver 4 g en 1000 mL de agua destilada.
2. Sulfato de cobre (J.T. Baker) al 1.0 % (P/V).
3. Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker) al 1 % (P/V).
4. Carbonato de sodio al 2% (P/V).  
Disolver 2 g de carbonato de sodio en 100 mL hidróxido de sodio 0.1 N.

5. Solución E.  
Mezclar 1 volumen de la solución 2 más 1 volumen de la solución 3.
6. Solución F.  
Mezclar 50 volúmenes de la solución 4 más un volumen de la solución E.
7. Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252).  
Solución 1:1 (V/V) con agua destilada un momento antes de iniciar la técnica.  
NOTA: Esta solución debe mantenerse en frasco ambar a temperatura ambiente.

#### CURVA ESTANDAR DE ALBUMINA

1. Pesar 10 g de albúmina sérica bovina (Sigma A-7906). Llevarla a 10 mL con agua destilada.
2. Tomar alícuotas de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la solución de albúmina y llevarlos a 10 mL con agua destilada. 1 mL de esta solución representa 50, 100, 150 y 200 µg de proteína de albúmina.
3. Tomar 1 mL de la solución anterior, agregar 5 mL de la solución F. Mezclar los tubos y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Preparar un blanco con 1 mL de agua destilada en lugar de la solución de albúmina.
5. Agregar a cada tubo 0.5 mL del reactivo de Folin, agitar inmediatamente y dejar reposar 30 minutos.
6. Leer a 590 nm contra el blanco.

Elaborar la curva estándar graficando densidad óptica (D.O.) *versus* concentración de proteína (µg/mL de albúmina).

#### DETERMINACION DE NITROGENO PROTEICO EN MUESTRAS DE GOMA

1. Pesar 0.05 g de muestra y disolver en 50 mL de agua destilada.
2. Tomar 1 mL de esta solución y proceder como en el caso de la curva estándar. Los resultados de nitrógeno proteico se expresan en %.

#### 4.2.8. DETERMINACION DE HUMEDAD

Este parámetro se determinó mediante una balanza para determinación de humedad.

El procedimiento es el siguiente:



1. Pesar 0.2 g de goma sobre plato de aluminio previamente tarado.
2. Seleccionar la temperatura máxima.
3. Seleccionar tiempo de secado.
4. Iniciar el proceso de secado y tomar lecturas cada minuto hasta tener peso constante (% de sólidos).

$$\% \text{ humedad} = 100 \% \text{ de sólidos inicial} - \% \text{ de sólidos final}$$

### 4.3. DETERMINACIONES REOLOGICAS

#### 4.3.1. REOLOGIA EN EL VISCOSIMETRO BROOKFIELD LVT

A cada una de las muestras de las fermentaciones (por disponibilidad del equipo) se les determinó la viscosidad aparente en el viscosímetro Brookfield de agujas LVT en todas las velocidades disponibles (0.3, 0.6, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 30.0 y 60.0 rpm) a una temperatura constante de 25 °C. El procedimiento es el siguiente:

1. Colocar 5 mL de muestra en una probeta.
2. Colocar en el viscosímetro la aguja 4.
3. Al estar el indicador de lectura en cero, presionar el embrague y sumergir la aguja dentro de la muestra. Cerciorarse que el nivel superior de esta, coincida con la marca de inmersión de la aguja.
4. Seleccionar la velocidad a la cual se desea hacer la medición. Prender el viscosímetro sosteniendo el embrague.
5. Soltar el embrague. Después de estabilizarse el indicador de lectura, nuevamente presionar el embrague.
6. Cuando el indicador de lectura pase por la mirilla del viscosímetro, apagar este y tomar la lectura indicada (sin soltar el embrague), la cual está dada en % de torque.

#### 4.3.1.1. INDICES REOLOGICOS Y VISCOSIDAD APARENTE

En base al modelo de la ley de la potencia y teniendo en cuenta que el viscosímetro Brookfield de agujas LVT fue diseñado para fluidos Newtonianos, se emplearon las siguientes ecuaciones para calcular los parámetros  $n$  (índice de flujo) y  $K$  (índice de consistencia) de fluidos no-Newtonianos:

$$\tau = K (\dot{\gamma})^n \quad (4.1)$$

En el caso de flujo entre cilindros concéntricos, se sabe que  $\tau$  es una función del radio y de la longitud de la aguja con que se hacen las determinaciones (Charles, 1978). Por lo tanto:

$$\tau = \frac{M \times (\text{lectura}/100)}{2 \pi R_b^2 L_b \times 10^7} \quad (4.2)$$

Donde:

- $\tau$  esfuerzo de corte (Pa).
- M torque aplicado por el instrumento (637.7 dinas.cm).
- $R_b$  radio de la aguja (0.001588 m).
- $L_b$  longitud efectiva de la aguja (0.03396 m).
- $10^7$  factor de conversión de dinas/cm<sup>2</sup> a Pa.

Se ha demostrado (Charles, 1978) que para el caso exclusivo de fluidos que obedecen la ley de la potencia, en un flujo entre dos cilindros uno de los cuales está girando en un medio de radio "infinito" (situación a la que se asemeja el Brookfield cuando se utiliza sin el protector), la velocidad de deformación está dada por:

$$\text{Velocidad de deformación (s}^{-1}\text{)} \quad \dot{\gamma} = \frac{2 \omega}{n} \quad (4.3)$$

donde:

$\omega$  es la velocidad angular,  $2\pi N$  (s<sup>-1</sup>)

Por consiguiente, el esfuerzo de corte para este tipo de fluidos, puede ser calculado sustituyendo la ecuación (4.1) en la ecuación (4.3), quedando entonces:

$$\tau = K (2 \omega/n)^n \quad (4.4)$$

reordenando:

$$\tau = K (2/n)^n \omega^n \quad (4.4a)$$

De acuerdo con lo anterior, la ecuación (4.4a) se puede linealizar. A partir de la regresión lineal se calculan los valores de  $n$  y  $K$ .

$$\log \tau = \log [K (2/n)] + n \log \omega \quad (4.5)$$

Si se construye un gráfico logarífmico de  $\tau$  versus  $\omega$ , la pendiente corresponde a  $n$ . Conociendo  $n$  y el valor de la ordenada al origen, es posible conocer el valor de  $K$ :

$$K = \frac{10^b}{(2/n)^n} \quad (4.6)$$

Una vez encontrados los valores de  $n$  y  $K$ , estos se utilizan en el cálculo de la curva de flujo ( $\tau$  versus  $\dot{\gamma}$ ), utilizando las ecuaciones antes descritas.

Finalmente, la viscosidad aparente del fluido es determinada como la relación:

$$\mu_a = \tau / \dot{\gamma} \quad (4.7)$$

#### 4.3.2. REOLOGIA EN EL REOMETRO HAAKE CV20N

Con la finalidad de tener mediciones de viscosidad más precisas, todas las soluciones que se prepararon con los productos finales de las fermentaciones se procesaron en el reómetro Haake CV20N a 25 °C.

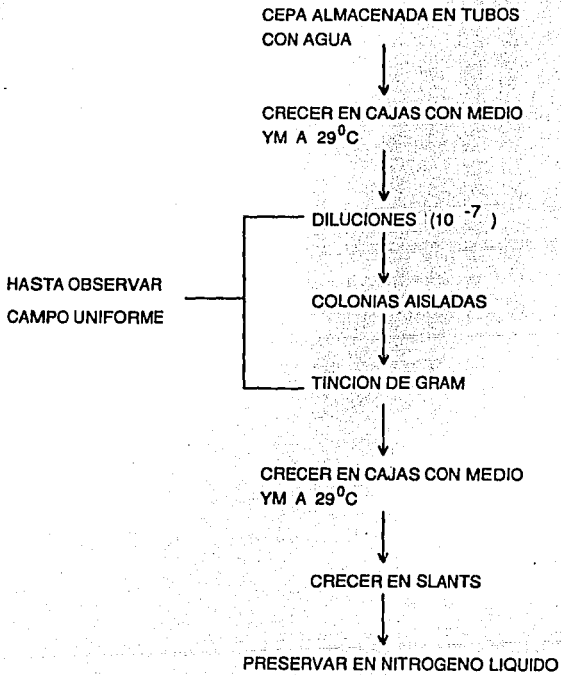
El procedimiento es el siguiente:

1. Prender el Rotovisco RV20 y Rheocontroller RC20.
2. Seleccionar el sensor y colocarlo sin apretar demasiado el tornillo.
3. Ajustar a cero con el botón <0>.
3. Colocar el volumen de muestra adecuado al sensor en el dispositivo correspondiente.
4. Bajar el sensor.
5. Checar que el sensor este en cero. En caso contrario subir y bajar el sensor cuantas veces sea necesario hasta que se relaje y de lectura de cero (o muy cercana a cero).
6. El botón de  $\tau$  debe estar en 1.0.
7. Se prende el CV20N.
8. Los rangos de % de lectura son 2: 1-10 y 1-100.
9. El botón <D, T,  $\tau$ > determina el porcentaje de lectura para cada caso dependiendo de la posición del indicador.
10. Una vez determinadas las lecturas se apaga el CV20.
11. Se sube el sensor. Se quita y limpia tanto el sensor como el recipiente de la muestra.
12. Se apaga el Rotovisco RV20 y el Rheocontroller RC20.

#### 4.4. METODOLOGIAS EXPERIMENTALES

##### 4.4.1. PURIFICACION DE LAS CEPAS

Para llevar a cabo la purificación de cada cepa se planteo la siguiente estrategia:



#### 4.4.1.1. PRESERVACION DE LAS CEPAS EN NITROGENO LIQUIDO

##### PREPARACION DE LA CEPA

1. El microorganismo es sembrado en tubos inclinados (slants) y cultivado durante 48 horas a 29 °C. De un tubo inclinado aproximadamente se obtienen 30 muestras para ser transferidas a viales de polipropileno.

##### PREPARACION Y ADICION DEL AGENTE CRIOPROTECTOR (DIMETIL SULFOXIDO) AL TUBO INCLINADO

1. Diluir el dimetil sulfóxido al 10% V/V. Esterilizar a 114 °C durante 10 minutos en frasco ámbar.
2. Agregar a cada tubo inclinado 20 mL del agente crioprotector.
3. Agitar vigorosamente el slant en un "vortex". Evitar que se mueva el tapón del tubo para que no se contamine.
4. Dejar reposar el tubo inclinado más la solución crioprotectora (suspensión celular) durante 15 minutos en baño de hielo.

##### TRANSFERENCIA DE LA SUSPENSION CELULAR A VIALES DE POLIPROPILENO

1. Esterilizar tubos Eppendorf de 1.5 y 0.5 mL abientos.
2. Transferir la suspensión celular a los tubos Eppendorf de 1.5 mL. Utilizar pipetas estériles y evitar desprender el agar del tubo inclinado.
3. De estos tubos transferir una alícuota de 0.3 mL de la suspensión celular a tubos Eppendorf de 0.5 mL. Utilizar jeringas estériles de 1.0 mL. Cerrar inmediatamente el tubo.

##### SELLADO DE TUBOS

1. La parte superior del tubo se acerca al fuego, en el momento que empieza a fundirse se aleja y se presiona con pinzas.
2. Cubrir la parte superior del tubo con parafilm.

##### CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

Es necesario realizar un congelamiento lento para minimizar al máximo el daño a las células en esta etapa. Debido a esto, el congelamiento se realiza de la siguiente manera:

1. Almacenar los tubos a 4 °C (refrigerador) durante 10 minutos.
2. Almacenar los tubos a -20 °C (congelador) durante 10 minutos.
3. Almacenar los tubos a -70 °C (Revco) durante 10 minutos.
4. Finalmente se almacenan en el tanque con nitrógeno líquido.

#### 4.4.2. FERMENTACIONES

##### 4.4.2.1. INOCULOS

Las cepas (10, 11, 16 y E2) se encuentran almacenadas en nitrógeno líquido en tubos Eppendorf (0.3 mL). En cada caso se inoculó aproximadamente 0.15 mL en matraces de 250 mL con 50 mL de medio YM.

Por seguridad, para cada fermentación, se prepararon 4 matraces los cuales fueron incubados a 29 °C durante 48 horas a 200 rpm. Terminado este tiempo de incubación, de cada matraz se tomó una muestra en condiciones estériles, para ser teñida con los reactivos de Gram y ser observada al microscopio.

Los inóculos fueron seleccionados tomando como criterio que las tinciones presentaran un cultivo uniforme de bacilos gram-negativos característicos de *Xanthomonas*.

##### 4.4.2.2. CONDICIONES DE FERMENTACION

Una vez seleccionado el inóculo, este se transfirió al fermentador (figura 4.1) en condiciones estériles, el cual contenía el medio de producción previamente esterilizado. El volumen de trabajo del fermentador fue de 1.5 litros.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Agitación	200 rpm	(las primeras 18 horas)
	600 rpm	(de las 18 a las 24 horas)
	700 rpm	(de las 24 horas en adelante)
Aireación	1.0 vvm	
Presión	1.0 kg/cm	
Oxígeno disuelto	70 ± 10 %	
pH	7.0	(controlado con NH OH al 50%)
Temperatura	29 °C	

El seguimiento de las fermentaciones se llevó a cabo tomando muestras cada 6 ó 12 horas.

El criterio para aumentar la velocidad de agitación durante la fermentación fue que siempre se observara movimiento del fluido en la pared del tanque. De esta manera, fue posible mejorar la determinación del oxígeno disuelto.

Como criterio para suspender las fermentaciones se consideró el agotamiento de la glucosa en el medio de cultivo.

#### 4.4.2.3. CONTROL DE OXIGENO DISUELTO DURANTE LAS FERMENTACIONES

El control de oxígeno disuelto durante las fermentaciones se llevó a cabo mediante un sistema *on-off* (figura 4.1). Este sistema consta de un controlador de oxígeno disuelto (Cole Parmer) al cual está conectado un electrodo de oxígeno polarográfico (Cole Parmer). En este controlador se seleccionan los valores mínimo y máximo en los cuales va a variar el nivel de oxígeno disuelto. Además, a este controlador se encuentran conectadas en paralelo dos bombas peristálticas de velocidad fija (60 rpm, Cole Parmer).

Las bombas peristálticas trabajan intermitentemente permitiendo el paso del oxígeno y del nitrógeno. Las líneas que pasan por las bombas están unidas mediante una conexión de cruz a la entrada del aire, la cual está regulada por un manómetro a 1 kg/cm<sup>2</sup>. En esta área se lleva a cabo la mezcla aire-nitrógeno o aire-oxígeno que permite mantener el oxígeno disuelto al nivel establecido previamente.

#### 4.4.3. DETERMINACION DE LA PUREZA RELATIVA DEL PRODUCTO

Con cada cepa se realizaron fermentaciones por duplicado. Para cada cepa la goma xantana fue precipitada en presencia de 2 % (peso/peso polímero) de cloruro de potasio como electrolito. Posteriormente, las fibras se secaron, molieron y homogenizaron. Con este polvo se preparó una solución al 0.1 %, con la finalidad de determinar la cantidad de goma específica por gramo de caldo deshidratado. Esta solución se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante correspondiente fue precipitado con alcohol isopropílico y cloruro de potasio (2 % peso/peso polímero).

Los resultados del párrafo anterior se corroboraron mediante la determinación de la concentración de goma xantana mediante el método del ácido sulfúrico-resorcinol (sección 4.4.5.)

#### 4.4.4. DETERMINACION DE LA DISTRIBUCION DE PESOS MOLECULARES

##### MATERIAL

1. Columna de vidrio de 150 x 1.50 cm
2. Gel Sepharose CL 2B (Pharmacia)
3. Buffer NaCl 0.5 M
4. Goma xantana (Rhodigel)

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparar una solución (con el buffer) un poco más concentrada de 1000 ppm (menor de 1500 ppm). Esta solución se filtra a través de una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .
2. Checar la concentración de goma de la solución mediante la técnica de ácido sulfúrico-resorcinol (Sección 4.4.5.).
3. Ajustar la concentración de la solución a 1000 ppm (1 g/L).
4. Tomar 3 mL de la solución de goma xantana (1000 ppm) e introducir deslizándola por las paredes de la columna de cromatografía en gel (no por las paredes del embudo), evitando mover la capa superior de gel.
5. El goteo de la columna debe estar ajustado entre 3-4 mL/h.
6. Colectar las fracciones que se obtengan al eluir el buffer de NaCl 0.5 M en una proporción equivalente a un volumen del embudo.
7. Determinar la absorbancia de cada una de las muestras siguiendo
8. Al terminar, lavar la columna con la fase móvil por lo menos una vez el volumen del embudo.

#### 4.4.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE GOMA XANTANA (COMO CARBOHIDRATOS TOTALES, METODO DEL ACIDO SULFURICO-RESORCINOL) (Graham, 1971; Kennedy *et al.*, 1982)

#### REACTIVOS

1. Acido sulfúrico concentrado.
2. Solución de Resorcinol. 4 % (P/V), esta debe de prepararse cada vez que va a ser utilizada.

#### CURVA ESTANDAR

1. Preparar soluciones de goma xantana comercial ("Rhodigel") que tengan concentraciones entre 5 y 250 ppm.
2. Tomar 1.0 mL de cada solución, agregar 1.0 mL de la solución de resorcinol y mezclar.
3. Agregar rápidamente 6 mL de ácido sulfúrico concentrado.
4. Colocar la solución en baño de hielo.
5. Sacar del baño y dejar reposar 10-25 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer la absorbancia a 494 nm contra el blanco.

#### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Este se realiza de la misma manera que la curva estándar a partir del paso 2.



#### 4.4.6. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR PROMEDIO

Herbst *et al.* (1992) determinaron el peso molecular promedio mediante el método de dispersión de luz de laser (Low Angle Laser Light Scattering) de diferentes tipos de xantanas (v.g. caldos de fermentación, producto comercial, productos sonicados) obtenidos bajo diferentes condiciones de fermentación y los cuales presentan diferentes contenidos de acetilo y pirúvico. Este peso molecular fue correlacionado con la viscosidad aparente (velocidad de deformación =  $7.5 \text{ s}^{-1}$ ) de soluciones de 1 g/L de xantana. Herbst *et al.* (1992) ajustaron los datos obtenidos a una curva, que se presenta en la gráfica de  $\mu_a$  versus  $M_w$  (figura 4.4). Estos autores mencionan que la dispersión que presentan estos datos probablemente sea debida al efecto de alguna característica no identificada. Sin embargo, la tendencia general en todos los casos es muy similar.

#### REACTIVOS

1. Buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH = 7.0.
2. Goma xantana.

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparar una solución de 1 g/L de goma xantana con el buffer de fosfatos.
2. Eliminar las burbujas de aire.
3. Determinar la viscosidad en todo el rango de velocidades de deformación disponibles en el reómetro Haake CV20N.
4. Calcular la viscosidad a  $7.5 \text{ s}^{-1}$ .
5. Interpolarse el valor de viscosidad en la gráfica reportada por Herbst *et al.* (1992) (figura 4.4) y determinar el rango del peso molecular promedio de la muestra.

#### 4.4.7. PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS FINALES

Los pasos que se siguieron para la purificación de los productos se plantearon tomando como base los reportes de Kennedy y Sutherland (1987) y Shatwell y Sutherland (1990). Estos pasos permiten eliminar células, intercambiar sales y disminuir el contenido de las mismas. Por consiguiente, se obtiene una disminución en el contenido de nitrógeno. La estrategia de purificación se describe mediante el siguiente diagrama:

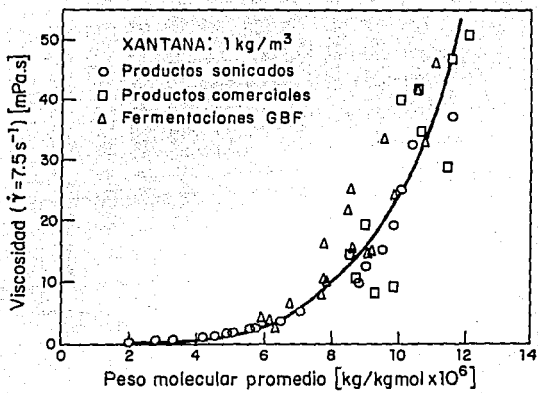
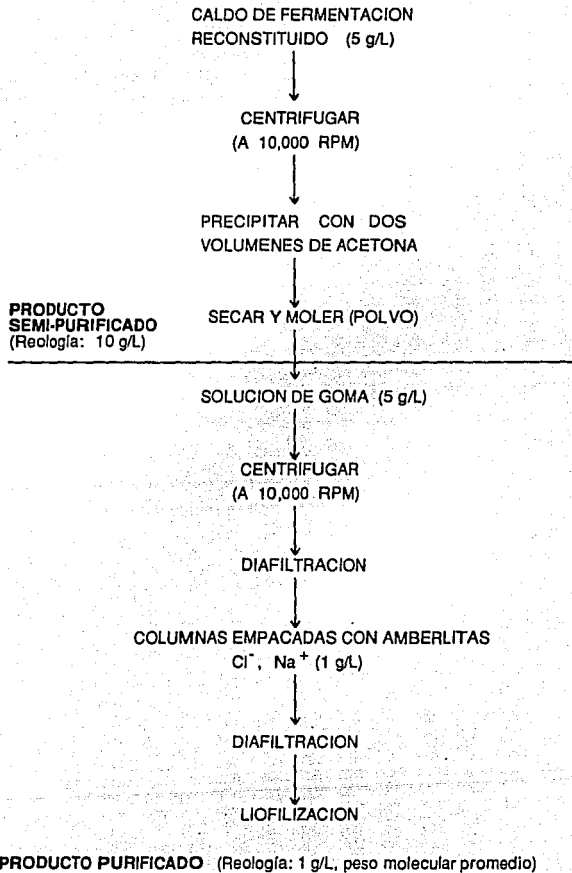


Figura 4.4 Viscosidad versus peso molecular promedio (Herbst *et al.*, 1992).



Inicialmente, se preparó una solución de 5 g/L (5 litros) a partir del caldo de fermentación deshidratado. Esta solución fue centrifugada (centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-10) a 10,000 rpm durante 3 horas. Una vez realizado este paso, se procedió a precipitar la goma xantana con tres volúmenes de acetona. Las fibras obtenidas fueron secadas y molidas. A este polvo, se le denominó producto semi-purificado y se utilizó en la preparación de las soluciones de 10 g/L, las cuales fueron empleadas en las determinaciones reológicas de las soluciones concentradas.

Posteriormente, con el producto semi-purificado se preparó una solución de 5 g/L de xantana (2 litros). Esta solución fue centrifugada a 10,000 rpm durante 3 horas. Al terminar este paso, la solución se diluyó con agua destilada a una concentración de 1 g/L de xantana. Esta solución diluida fue diafiltrada (Amicon DC-10L, cartucho de fibra hueca HSP100-43) manteniendo un volumen constante de siete litros, se utilizó agua miliQ durante este paso. La diafiltración se terminó una vez que la conductividad del agua procedente de la diafiltración, fue igual a la que presentaba el agua miliQ (0.5  $\mu$ Mhos). En este momento, la solución se concentró al volumen inicial (5 litros).

El siguiente paso fue introducir la solución de 1 g/L de xantana, primero, a través de una columna (2.5 x 50 cm) empacada con un intercambiador aniónico (Amberlita de  $\text{Cl}^-$ , Sigma IRA-410). Esta columna estaba conectada en serie a una columna empacada con un intercambiador catiónico (Amberlita de  $\text{Na}^+$ , Sigma IR-120 plus). En ambas columnas el flujo de alimentación fue de 45 mL/h. Acto seguido, la solución de 1 g/L se diafiltró bajo las mismas condiciones que en la primera diafiltración. Finalmente, esta solución se liofilizó (Liofilizadora de charolas Usifroid, SMH.15CF, CEPROBI-IPN). El producto obtenido se denominó producto purificado y fue empleado en la preparación de las soluciones de 1 g/L, las cuales se utilizaron en las determinaciones de los parámetros reológicos de las soluciones diluidas y del peso molecular promedio.

## CAPITULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 5.1. FERMENTACIONES CON CONTROL DE OXIGENO DISUELTO

Las fermentaciones de las cepas 10, 11, 16 y control (E2) se llevaron a cabo bajo condiciones constantes de temperatura, pH, velocidad de agitación y nivel de oxígeno disuelto como se especifica la sección 4.4.2.2. En la figura 5.1 se presenta un perfil de oxígeno disuelto típico durante el transcurso de la fermentación (cepa control). Estos datos muestran que el sistema de control *on-off* permitió mantener de manera satisfactoria el nivel de oxígeno disuelto dentro del rango de  $70 \pm 10 \%$ . Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado, los resultados que se presentan son el promedio obtenido para cada cepa.

En las figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 se presenta el promedio de los resultados para cada cepa. En estas graficas, las barras indican el valor máximo y mínimo que se obtuvo con los duplicados. En algunos casos estas desviaciones son de la misma magnitud que el símbolo. Los resultados demuestran que las fermentaciones con control del nivel de oxígeno disuelto en el intervalo de  $70 \pm 10 \%$  para cada cepa fueron muy similares.

En la figura 5.2 se presenta la cinética de la fermentación de la cepa E2. La cinética de crecimiento (D.O.) presentó las fases propias del crecimiento microbiano. Durante las primeras 6 horas, manifestó una fase de adaptación (fase lag). Una vez terminada esta fase, las bacterias entraron a una fase de crecimiento logarítmico o exponencial. Sin embargo, no se observaron las fases estacionaria y de lisis reportada por Flores (1989) y Ramírez (1993) bajo diferentes condiciones de fermentación. En la fase logarítmica de esta fermentación, la velocidad específica de crecimiento promedio fue  $0.123 \text{ h}^{-1}$ , lo cual representa un tiempo de duplicación de 5.63 horas.

La producción de goma (figura 5.2) se encuentra parcialmente asociada al crecimiento ( $\alpha=0.107 \text{ g xantana/g biomasa}$ ,  $\beta=0.027 \text{ g xantana/g biomasa-h}$ ) y lo único que detiene la fermentación es el agotamiento de sustrato. La viscosidad se incrementó de manera exponencial a partir de las 24 horas de haber iniciado la fermentación, debido al incremento en la

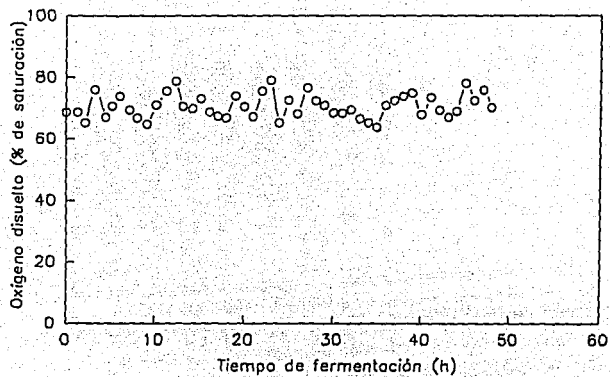


Figura 5.1. Perfil típico de oxígeno disuelto durante los cultivos de *Xanthomonas* (cepo control) a un nivel de  $70 \pm 10 \%$ .

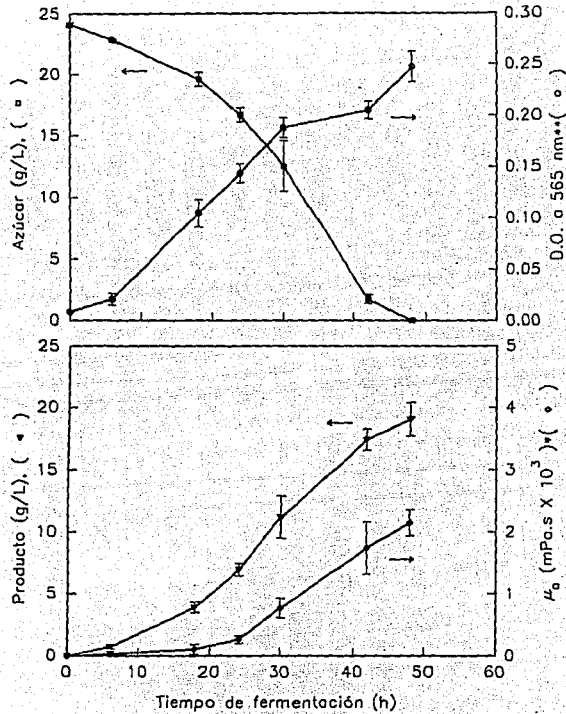


Figura 5.2. Cinética de fermentación de la cepa control.

\* Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.

\*\* Dilución 1:50.

concentración de goma. La viscosidad aparente final promedio del caldo de fermentación fue de 2,150 centipoises y la concentración de goma promedio fue de 19.1 g/L. Las cinéticas de crecimiento, formación de producto y generación de viscosidad concuerdan con el comportamiento reportado por Flores (1989).

En la figura 5.3 se presenta la cinética de fermentación de la cepa 10. El crecimiento de la bacteria no presentó fase lag. Asimismo, no se observaron las fases estacionaria y de lisis reportadas por Ramírez (1993) bajo diferentes condiciones de fermentación para esta misma cepa. Durante la fase exponencial se presentó una velocidad específica de crecimiento promedio de  $0.10 \text{ h}^{-1}$ , lo cual implica un tiempo de duplicación de 7.2 horas.

Las cinéticas de producción de goma y viscosidad de la cepa 10 presentaron la misma tendencia que la encontrada con la cepa E2. Con esta cepa se obtuvo, en promedio, una concentración de goma y viscosidad aparente final de 19.4 g/L y 3,240 centipoises, respectivamente.

En la figura 5.4 se muestra la cinética de fermentación de la cepa 11. Esta cepa, al igual que la cepa 10, no presentó la fase lag. Además, no se presentaron las fases estacionaria y de lisis reportadas por Ramírez (1993) para esta misma cepa bajo diferentes condiciones de fermentación. La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial promedio fue  $0.11 \text{ h}^{-1}$ . Presentando un tiempo de duplicación de 6.2 horas. El perfil del consumo de azúcar fue similar al que presentó la cepa E2. Sin embargo, en este caso, la producción de goma estuvo parcialmente asociada al crecimiento ( $\alpha = 3.25 \text{ g xantana/g biomasa}$ ,  $\beta = 0.103 \text{ g xantana/g biomasa-h}$ ). La concentración final de goma promedio fue de 20.4 g/L. La viscosidad aparente final promedio fue de 4,400 centipoises.

En la figura 5.5 se presenta la cinética de crecimiento de la cepa 16. Esta cepa tuvo una fase lag de 6 horas. Además, presentó fase estacionaria a diferencia de los reportado por Ramírez (1993) para fermentaciones con esta misma cepa bajo diferentes condiciones de cultivo. Durante la fase exponencial, la velocidad específica de crecimiento promedio fue de  $0.145 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 4.78 horas). En el caso de la cepa 16 (figura 5.5) la formación de producto, al igual que en el caso de la cepa 11, estuvo parcialmente asociada al crecimiento de la bacteria ( $\alpha = 11.60 \text{ g xantana/g biomasa}$ ,  $\beta = 0.232 \text{ g xantana/g biomasa-h}$ ).



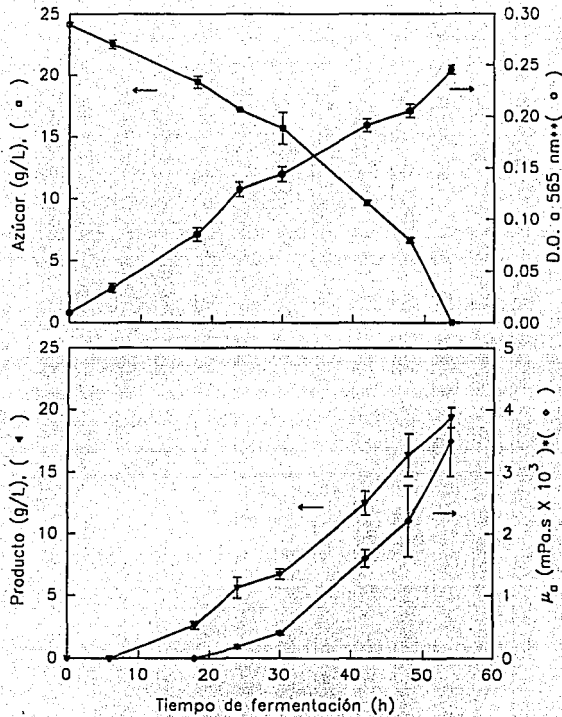


Figura 5.3. Cinética de fermentación de la cepa 10.  
 \* Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.  
 \*\* Dilución 1:50.

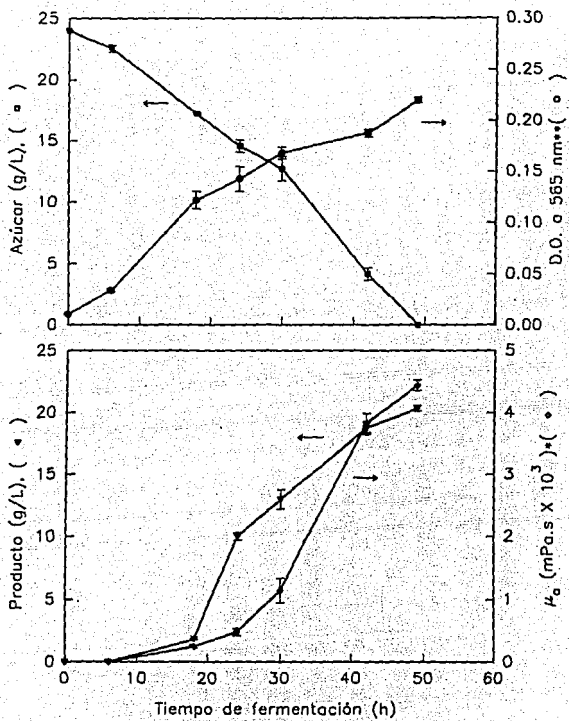


Figura 5.4. Cinética de fermentación de la cepa 11.

- ◻ Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.
- ◊ Dilución: 1:50.

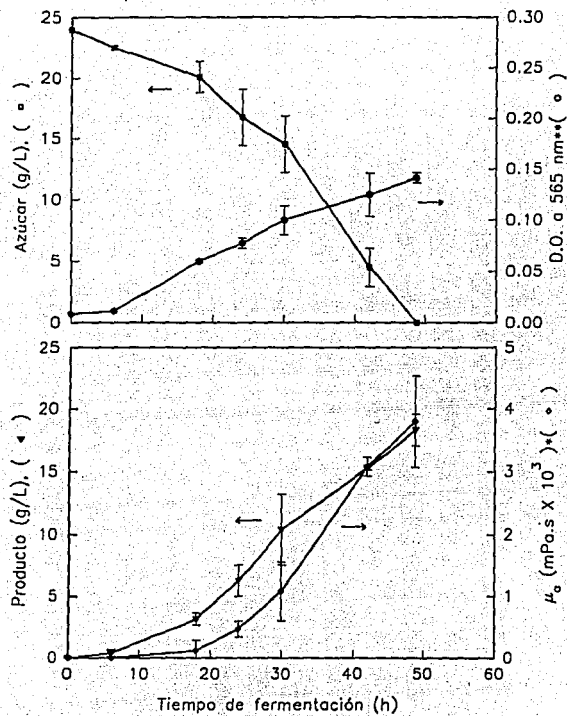


Figura 5.5. Cinética de fermentación de la cepa 16 .  
 • Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.  
 •• Dilución 1:50.

Resumendo, en la tabla 5.1 se presentan los resultados promedios finales de las fermentaciones con cada cepa. Aún cuando las cepas 16 y E2 presentaron fase de adaptación (lag), sus tiempos de fermentación no se incrementaron (tabla 5.1) en relación a la cepa 11 que no mostró fase lag. La cepa 10 fue la que presentó un mayor tiempo de fermentación (54 horas), es decir que la fermentación tardó en finalizar aproximadamente 6 horas más que las otras cepas, lo cual no es significativo. Esta diferencia en tiempo puede deberse a que esta cepa presentó -en promedio -la menor velocidad específica de crecimiento de las cuatro cepas.

**Tabla 5.1. RESULTADOS PROMEDIOS FINALES DE LOS LOTES DE FERMENTACION CON CONTROL DE OXIGENO DISUELTO AL 70 ± 10 %.**

	CEPA 10	11	16	E2
Tiempo de fermentación* (h)	54.0	49.0	48.8	48.0
Velocidad específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.10	0.11	0.14	0.12
Tiempo de duplicación (h)	7.2	6.2	4.8	5.6
Azúcar residual (g/L)	d.l.d.	d.l.d.	d.l.d.	d.l.d.
Concentración celular final (g peso seco/L)	4.80	4.31	2.78	4.84
Concentración final de goma (g/L)	19.4	20.4	18.3	19.1
Viscosidad final** (mPa.s)	3,240	4,440	3,800	2,150
Rendimiento sobre azúcar consumida (%):				
Y <sub>x</sub> /s	18.4	16.3	9.9	18.6
Y <sub>p</sub> /s	80.6	84.8	76.3	79.4
Productividad (g/L-h)	0.36	0.43	0.37	0.39

\* Azúcar inicial 24.0 g/L, concentración celular inicial 0.176 ± 0.20 g/L.

\*\* Viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4, 30 rpm.

d.l.d. debajo del límite de detección, 0.001 g/L.

De las cepas experimentadas (tabla 5.1), la cepa 16 mostró una menor concentración celular sin menoscabo de la producción de goma. La velocidad específica de crecimiento fue mayor para la cepa 16 y la cepa 10 presentó la menor velocidad específica de crecimiento.

En la figura 5.6 se regraficaron los datos promedio de viscosidad aparente (30 rpm) de los caldos de fermentación en función de la concentración de goma xantana (figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5). Los cultivos de las cepas 10, 11, 16 y E2, a la misma concentración de goma, presentaron diferentes valores de viscosidad. Las cepas de estudio presentaron mayor viscosidad aparente final que la cepa control. En relación a este parámetro, la cepa 11 presentó la mayor viscosidad aparente final (4,400 centipoises) de las cuatro cepas. La cepa control (E2) mostró una viscosidad aparente de 2150 centipoises (tabla 5.1).

De las cuatro cepas, la cepa 11 (tabla 5.1) presentó el mayor rendimiento de producto sobre azúcar consumida (84.8 %), así como la mayor productividad (0.43 g/L-h).

## 5.2. CALIDAD DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LA FERMENTACION

Los caldos de cada una de las fermentaciones (por duplicado) de las cuatro cepas fueron precipitados. Las fibras fueron secadas, molidas y el polvo tamizado a través de una malla 100 para que el lote de cada cepa fuera homogéneo. A partir del polvo obtenido se determinó la pureza del producto (tabla 5.2) mediante el método descrito por Sánchez *et al.* (1992) (sección 4.4.3) y corroborado con la determinación de la concentración relativa de goma, en base a una curva de calibración de un producto comercial ("Rhodigel") mediante la determinación de carbohidratos totales (método del ácido sulfúrico-resorcinol, sección 4.4.5).

Tabla 5.2. PUREZA RELATIVA\* DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LAS FERMENTACIONES CON CONTROL DE OXIGENO DISUELTO (70 ± 10 %).

PRODUCTO DE LA CEPA	g goma xantana relativa/g polvo
10	0.74
11	0.82
16	0.74
E2	0.76

\* Referida al producto comercial "Rhodigel", como carbohidratos totales.

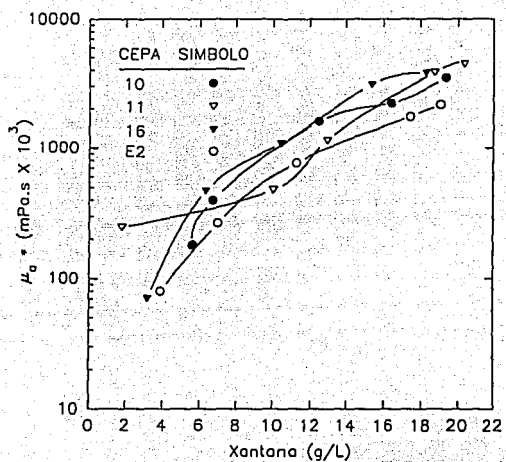


Figura 5.6 Viscosidad aparente de los caldos de fermentación en función de la concentración de goma xantana. \* a 30 rpm, viscosímetro Brookfield, aguja 4.

Los resultados entre estos dos métodos difieren en la tercera cifra después del punto decimal ( $\pm 0.002$ , datos no presentados). La diferencia entre ambos métodos fue despreciable, de modo que aún cuando el método descrito por Sánchez *et al.* (1992) está relacionado con los sólidos precipitables, este refleja claramente el contenido de goma en el producto (pureza relativa del producto). Probablemente, esto esté relacionado con el hecho de que en ambos métodos se eliminan células, ya sea por centrifugación (método de sólidos precipitables) o por filtración (método del ácido sulfúrico-resorcinol).

De acuerdo con los datos de la tabla 5.2, el producto de la cepa 11 presentó el mayor contenido de goma xantana por gramo de caldo deshidratado, es decir, una pureza relativa más alta. Las cepas 10, 16 y E2 presentaron una pureza relativa muy similar entre ellas.

### 5.3. PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS

La goma xantana producida por las cuatro cepas fue sometida (por separado) a un proceso de purificación (sección 4.4.7.) con la finalidad de obtener un producto que presentara una mayor pureza relativa y características adecuadas (v.g. cantidad mínima del mismo tipo de sal) para ser utilizado en las determinaciones reológicas y del peso molecular promedio. Durante este proceso se obtuvieron dos tipos de productos, uno se denominó "semi-purificado" y el otro "purificado", productos a los cuales también se determinó su pureza relativa.

En la tabla 5.3 se muestran los resultados de la pureza relativa de los productos "semi-purificados". Los resultados reflejan que estos productos presentaron un contenido de goma relativo muy similar ( $0.895 \pm 0.015$ ) por gramo de polvo. Estos productos incrementaron su pureza relativa en un rango de 7-23% con respecto a su pureza relativa inicial. Esto se debe a que en la primera centrifugación y precipitación se eliminó la mayor proporción de células.

Tabla 5.3. PUREZA RELATIVA\* DE LOS PRODUCTOS SEMI-PURIFICADOS.

<u>PRODUCTO DE LA CEPA</u>	<u>g goma xantana relativa/g polvo</u>
10	0.89
11	0.88
16	0.91
E2	0.88

\* Referida al producto comercial "Rhodigel", como carbohidratos totales.

En la tabla 5.4 se presenta la proporción de goma xantana relativa en los productos "purificados". Al igual que en los productos semi-purificados, los productos denominados purificados presentaron una proporción de goma xantana relativa similar ( $0.935 \pm 0.015$ ) por gramo de producto liofilizado. El porcentaje restante (6.5-8%) puede ser atribuido a cenizas y nitrógeno total. Los productos purificados incrementan su pureza relativa en un 3 a 6% con respecto a los productos semi-purificados. Esto es el resultado de que en la segunda centrifugación y pasos subsiguientes (v.g. diafiltración, intercambio iónico) se excluyó una menor proporción de células, se disminuyó la cantidad de sal y se uniformizó el tipo de sal presente.

**Tabla 5.4. PUREZA RELATIVA\* DE LOS PRODUCTOS PURIFICADOS.**

PRODUCTO DE LA CEPA	g goma xantana relativa/g polvo
10	0.92
11	0.93
16	0.95
E2	0.93

\* Referida al producto comercial "Rhodigel", como carbohidratos totales.

Los resultados de las tablas 5.3 y 5.4 muestran que la estrategia planteada (sección 4.4.7.) permitió purificar de manera satisfactoria el producto de cada cepa, logrando finalmente purezas del 92-95 % (tabla 5.4) .

Como se mencionó anteriormente, los productos semi-purificados presentaron proporciones similares de goma, lo cual permitió comparar de manera más estricta los productos provenientes de las cepas de estudio con el producto de la cepa control. Esto mismo ocurrió en el caso de los productos purificados.

El producto semi-purificado se empleó en las determinaciones de la reología de soluciones concentradas (10 g/L) y el producto purificado se utilizó en las determinaciones reológicas de soluciones diluidas (1.0 g/L) y en la determinación del peso molecular promedio.



En la tabla 3.5 se muestran los resultados de nitrógeno Kjeldahal y Lowry, antes y después del proceso de purificación. Con el proceso de purificación, el contenido de nitrógeno total y nitrógeno proteico disminuyó, respecto al contenido que se determinó antes de la purificación, entre un 37-55 % y 37-65 % respectivamente, dependiendo de la cepa. Los datos sugieren que posiblemente la biomasa u otros compuestos nitrogenados (v.g. enzimas, proteínas) no fueron eliminados por completo. El producto de la cepa 16 presentó el menor porcentaje (37 %) de decremento en el contenido de nitrógeno después del proceso de purificación. La disminución en el contenido de nitrógeno se debe a que durante el proceso de purificación, al cual estuvieron sujetos los productos, se eliminaron principalmente células y sales.

Adicionalmente, se determinó el contenido de pirúvico antes y después del proceso de purificación. Los resultados (datos no presentados) de los cuatro productos mostraron que el proceso de purificación no disminuyó el contenido de pirúvico, el cual permaneció igual.

**Tabla 5.5. CONTENIDO DE NITROGENO EN LOS PRODUCTOS ANTES Y DESPUES DE SER SOMETIDOS AL PROCESO DE PURIFICACION.**

PRODUCTO DE LA CEPA	LOWRY (%)*		KJELDAHAL (%)*	
	ANTES	DESPUES	ANTES	DESPUES
10	0.83	0.42	1.09	0.43
11	1.02	0.56	1.36	0.75
16	3.04	1.91	3.21	2.01
E2	1.01	0.45	1.43	0.50

\* Por ciento en peso.

#### 5.4. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LOS PRODUCTOS

##### 5.4.1. ACETILO, PIRUVICO Y NITROGENO

Los caldos de cada una de las fermentaciones de las cuatro cepas fueron precipitados. Las fibras fueron secadas (conteniendo una humedad del 5 %) y molidas. A partir del polvo obtenido se realizaron determinaciones del contenido de acetilo, pirúvico, nitrógeno total

(Kjeldahal) y proteico (Lowry). En la tabla 5.6. se presentan los resultados analíticos de estos parámetros para los productos de las cepas 10, 11, 16 y E2. El producto de la cepa 10 presentó el menor contenido de pirúvico (0.24 %), mientras que el producto de la cepa 16 mostró el mayor contenido de pirúvico (6.82 %) entre los cuatro productos analizados.

Las gomas provenientes de las cepas de estudio presentaron diferentes contenidos de radicales acetilo y pirúvico (tabla 5.6). El contenido de ambos radicales quedó comprendido dentro de los intervalos reportados para otras cepas (Shatwell y Sutherland, 1990). Además, se encontró que existe la tendencia de que a mayor contenido de pirúvico, menor porcentaje de radicales acetilo y viceversa (figura 5.7).

**Tabla 5.6. RESULTADOS ANALÍTICOS (% EN PESO) DE LOS PRODUCTOS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Xanthomonas*.**

CEPA	PIRUVICO (%)		ACETILO (%)		NITROGENO	NITROGENO	
	* **	* **	* **	* **	LOWRY (%)	KJELDA HAL (%)	
10	0.24	0.75	10.0	5.0	0.83	1.09	1.8
11	0.50	0.21	8.1	5.7	1.02	1.36	1.9
16	6.82	4.20	4.6	4.1	3.04	3.21	1.0
E2	2.56	2.14	7.3	5.0	1.01	1.43	0.5

\* Antes de ser sometidos al proceso de purificación

\*\* Ramírez, 1993

Los productos de las cepas 10, 11 y E2 (tabla 5.6) presentaron valores muy similares de nitrógeno total, del cual la mayor proporción corresponde a nitrógeno proteico. El producto de la cepa 16 presentó el doble del contenido de nitrógeno total en relación a la cepa control. La mayor proporción de este parámetro está representado por nitrógeno proteico, lo cual sugiere la posible asociación de un polipeptido (de cadena corta) o una proteína en el polímero producido por esta cepa.

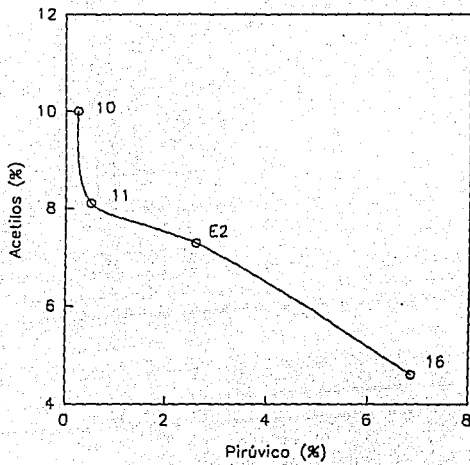


Figura 5.7. Relación entre el contenido pirúvico y el de acetilo de los productos de los diferentes cepos de *Xanthomonas*.

En la tabla 5.6 se comparan también los resultados analíticos obtenidos en las fermentaciones con control de oxígeno disuelto con los reportados por Ramírez (1993) en fermentaciones sin control de este parámetro. El contenido de pirúvico del producto de la cepa E2 en fermentaciones con control de oxígeno disuelto fue similar al reportado por Ramírez (1993) (2.14% y 2.56%, respectivamente). Tomando esto como base, el contenido de pirúvico se normalizó en base al contenido de este radical que presentó en cada caso el producto de la cepa E2. (tabla 5.7).

En la tabla 5.7 se muestra que al efectuarse las fermentaciones con control de oxígeno disuelto al  $70 \pm 10$  %, los productos de las cepas 10, 11 y 16 presentaron diferente proporción de pirúvico normalizado con respecto a la proporción que presentaron los datos de pirúvico reportados por Ramírez (1993). Al parecer, los productos de las cepas 10, 11 y 16 fueron más susceptibles que el producto de la cepa E2 a presentar variaciones en el contenido de este radical al controlar el nivel de oxígeno disuelto durante las fermentaciones. Los datos de Ramírez (1993) no involucran la pureza del producto. Teniendo esto en cuenta, en algunos casos, la diferencia será mayor que en otros. Por otra parte, Flores *et al.* (1994) reportaron que el contenido de pirúvico varía con la concentración de oxígeno disuelto que se mantenga a lo largo de la fermentación. Sin embargo, no reportaron datos que comparen los resultados obtenidos con y sin control de oxígeno disuelto durante la fermentación.

**Tabla 5.7. CONTENIDO DE PIRUVICO NORMALIZADO DE LOS PRODUCTOS DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Xanthomonas*.**

CEPA	PIRUVICO NORMALIZADO	
	*	**
10	0.093	0.293
11	0.195	0.082
16	2.664	1.640
E2	1.0	0.992

\* Antes de ser sometidos al proceso de purificación.

\*\* Ramírez, 1993.

Por otra parte, el contenido de acetilo y nitrógeno Kjeldahl también presentaron diferencias (tabla 5.6). De estos parámetros, sobresale la gran diferencia en nitrógeno total comparado con el reporte de Ramírez (1993) que presentó el producto de la cepa 16, del cual la mayor proporción corresponde a nitrógeno proteico. Al parecer, el nivel de oxígeno disuelto mantenido durante la fermentación favoreció la producción de determinada proteína de la cual no se tiene mayor información.

En la recuperación del petróleo, la adición de polímeros, como la goma xantana, a los fluidos que se inyectan reduce la movilidad del agua y mejora la eficiencia de desplazamiento del petróleo. A este respecto, se ha reportado que soluciones de xantana con un bajo contenido de pirúvico (menor del 4 %) presentan una menor adsorción (medida como calor de adsorción) sobre el suelo y consecuentemente origina buena inyección (Kleinitz *et al.*, 1989; Schumpe y Deckwer, 1990; Peters *et al.*, 1993). De acuerdo con el contenido de pirúvico que presentan los cuatro productos (tabla 5.6), los correspondientes a las cepas 10 y 11 podrían ser empleados en la recuperación de este recurso natural.

Como se mencionó anteriormente, el grado de sustitución de acetilos y pirúvicos en la molécula repercute en la estabilidad de la hélice (Shatwell y Sutherland, 1990). De manera que, la conformación ordenada de la molécula de xantana llega a ser más estable al incrementarse el contenido de acetilo. En la tabla 5.8 se muestran las relaciones acetilo/pirúvico para cada uno de los productos. Debido a la alta proporción de radicales acetilo (con respecto a radicales pirúvico) que presenta el producto de la cepa 10, se puede inferir que posiblemente de los cuatro productos, la estructura conformacional de este producto sea la más estable a factores tales como temperatura y concentración de sal.

**Tabla 5.8. RELACION ACETILO/PIRUVICO DE LOS PRODUCTOS**

<u>CEPA</u>	<u>ACETILO/PIRUVICO</u>
10	41.7
11	16.3
16	0.7
E2	2.8

#### 5.4.2. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR PROMEDIO Y DISTRIBUCION DE PESOS MOLECULARES

El peso molecular promedio fue determinado mediante una técnica viscosimétrica utilizando la curva de calibración reportada por Herbst *et al.* (1992), (sección 4.4.6.). Los productos empleados fueron sometidos a un proceso de purificación (sección 4.4.7.).

La tabla 5.9 muestra una aproximación a los pesos moleculares promedio de los productos obtenidos a partir de las cepas de estudio. Debido a la dispersión que muestran los datos de la curva de calibración de Herbst *et al.* (1992), se presenta el intervalo en el cual probablemente se encuentre el peso molecular promedio para cada producto. En el caso de los productos de las cepas E2, 11 y 16, debido a que la curva de calibración reportada por Herbst *et al.* (1992) incluye valores de viscosidad de hasta 55 mPa.s y que las soluciones de estos productos presentaron viscosidades mayores a 55 mPa.s (40 % más), se extrapoló la curva para determinar el intervalo.

El peso molecular promedio reportado por Flores *et al.* (1994) para el producto de la cepa E2, obtenido en fermentaciones con control de oxígeno disuelto al 80 %, quedó comprendido dentro del intervalo de peso molecular promedio encontrado para este producto.

**Tabla 5.9. PESO MOLECULAR PROMEDIO DE LOS PRODUCTOS**

CEPA	$\mu_a$ (mPa.s)*	Mw ( $\times 10^6$ kg/kgmol)
10	29.6	9.5-10.5
E2	57.9	11.4-12.2
16	72.4	12-13
11	77.0	12-13

La distribución de pesos moleculares se determinó mediante cromatografía de permeación en gel (secciones 4.4.4 y 4.4.5.), para lo cual se empleó el caldo de fermentación deshidratado y reconstituido en buffer de NaCl correspondiente a cada cepa. Las soluciones fueron filtradas a través de una membrana Millipore para remover microgeles y debris celular.

Los cromatogramas de los productos de las cepas de estudio y de la cepa E2 se presentan en la figura 5.8. Los perfiles de elución presentaron la tendencia modal reportada para xantana por Herbst *et al.* (1988) y por Flores *et al.* (1994).

A partir de los datos de absorbancia (figura 5.8), se realizó un análisis de comparación entre las variancias de los cuatro productos. Las variancias de los productos de las cepas E2 y 16 con respecto a la variancia del producto de la cepa 11 presentaron diferencias estadísticas no significativas con un límite de confianza del 95 % ( $F_{cal} = 1.13$  y  $1.26$ , respectivamente). Asimismo, la variancia del producto de la cepa 16 en relación a la que presentó el producto de la cepa E2 mostró diferencia no significativa estadísticamente, con un límite de confianza del 95 % ( $F_{cal} = 1.12$ ). Además, las variancias de los productos de las cepas 11, 16 y E2 presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a la variancia del producto de la cepa 10, con un límite de confianza del 95 % ( $F_{cal} = 2.24, 2.89, 2.58$  respectivamente).

A partir de los datos de la figura 5.8 se calculó el área bajo la curva para 3 rangos arbitrarios de volúmenes de elución: 0-58 mL, 58-109 mL y de 109-155 mL, los cuales representan pesos moleculares altos, medios y bajos, respectivamente. Con estos datos se calculó la frecuencia (%) para cada fracción de polímero, la cual se graficó en función del rango del volumen de elución (figura 5.9). Se observa que:

- 1) El producto de la cepa 16 presentó la mayor frecuencia de pesos moleculares altos (14.9 %).
- 2) El producto de la cepa 11 presentó la mayor frecuencia de pesos moleculares medios (90.0 %).
- 3) El producto de la cepa 10 presentó la mayor frecuencia de pesos moleculares bajos (23.2 %).

En la tabla 5.10 se presenta un resumen de los parámetros físico-químicos de la goma xantana producida por las diferentes cepas que se estudiaron en este trabajo. Los parámetros físico-químicos no presentaron una relación evidente con la concentración y viscosidad aparente final (promedio) del caldo de fermentación. A diferencia de lo reportado por Sandford *et al.* (1977), no se encontró relación entre la viscosidad aparente final del caldo de fermentación y el contenido de pirúvico. Esto probablemente se deba a que en el trabajo realizado por Sandford *et al.* (1977) no se tomó en cuenta la pureza del producto. Por otra parte, Kennedy y Bradshaw (1984) reportaron que el contenido de pirúvico no afecta directamente la viscosidad de las soluciones de goma xantana.

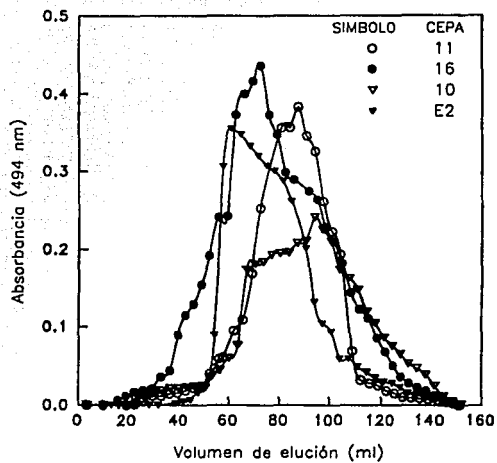


Figura 5.8. Cromatogramas de los productos provenientes de las cepas de estudio (Cromatografía en gel).



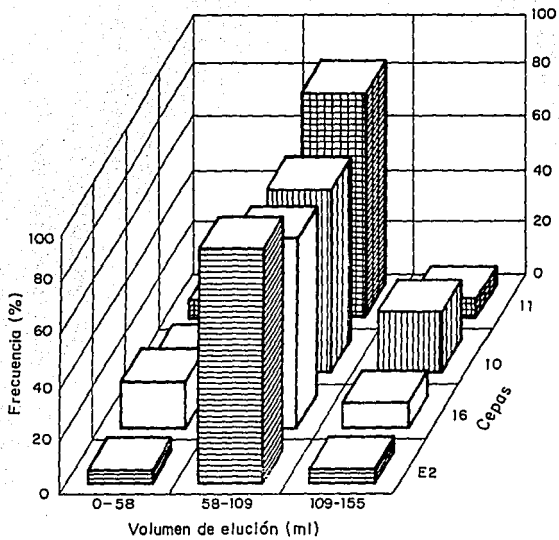


Figura 5.9 Frecuencia versus volumen de elución, a partir de los cromatogramas (figura 5.8) de los productos de las cepas de estudio.

**Tabla 5.10. PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DE LOS PRODUCTOS**

CEPA	$\mu_a$ *(mPa.s)	PIRUVICO (%)	ACETILO (%)	Mw ( $\times 10^6$ kg/kgmol)
10	3,240	0.24	10.0	9.5-10.5
E2	2,150	2.56	7.3	11.4-12.2
16	3,800	6.82	4.6	12-13
11	4,440	0.50	8.1	12-13

\* De los caldos finales de fermentación, determinada a 30 rpm en el viscosímetro Brookfield LVT, aguja 4.

Kleinitz *et al.* (1989) reportaron que a mayor contenido de pirúvico, mayor peso molecular y que esta es la razón por la cual la goma xantana con alto contenido de pirúvico muestra un mayor valor de viscosidad. Los datos encontrados en este trabajo (tabla 5.10) no presentaron la tendencia encontrada por estos autores. Esto quizá se deba a que en el presente trabajo se tomó en cuenta la pureza del producto en las determinaciones físico-químicas. A este respecto, Kleinitz *et al.* (1989) no mencionan el haber considerado este parámetro.

## 5.5. REOLOGIA

### 5.5.1. REOLOGIA DE SOLUCIONES DILUIDAS: EFECTO DE LA CONCENTRACION Y TIPO DE SAL

Con la finalidad de caracterizar más a fondo las soluciones, se planteó utilizar soluciones diluidas de goma xantana (1 g/L) en las determinaciones reológicas. En la preparación de estas soluciones se emplearon los productos purificados.

En la figura 5.10 se muestra el reograma de viscosidad en función de la velocidad de deformación de los diferentes productos a una concentración 1.0 g/L y sin adición de sal. Se observa que a bajas velocidades de deformación ( $< 20 \text{ s}^{-1}$ ) la solución del producto de la cepa 16 presentó mayor viscosidad, seguido de las soluciones de los productos de las cepas 11 y E2. Finalmente, la solución del producto de la cepa 10 presentó la menor viscosidad. A velocidades de deformación mayores a  $20 \text{ s}^{-1}$ , se observó que las soluciones de los productos de las cepas 11 y 16 presentaron la misma viscosidad. En este rango de velocidades, la solución del producto de la cepa E2 (cepa control) mostró la menor viscosidad de los cuatro productos estudiados.

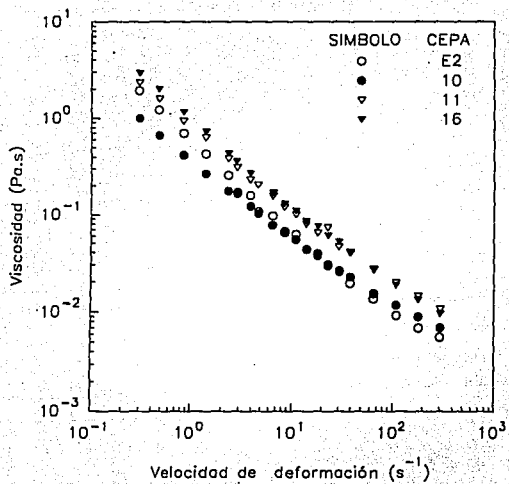


Figura 5.10. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de goma xantana (purificada, sin sal).

Los cuatro productos presentaron viscosidades aparentes (velocidad de deformación=10  $s^{-1}$ ) más altas (entre 40 a 100 %) que las que reportaron Morris *et al.* (1983); Tako y Nakamura (1984) y Kennedy y Bradshaw (1984), a la misma concentración de goma. Sin embargo, estos autores omiten si tomaron en cuenta la pureza de los productos.

Debido a la escasa información (Cadmus *et al.*, 1976) que se tiene en relación al efecto de la concentración de sal sobre la viscosidad de soluciones diluidas (v.g. 1  $g/L$ ) de goma xantana, se planteó estudiar este efecto agregando inicialmente 0.1 M de NaCl. Posteriormente, se agregó sal (en cristales) para incrementar la concentración de 0.1 a 1.0 M de NaCl en cada solución.

En la figura 5.11 se presenta el reograma de los diferentes productos. La concentración de goma utilizada fue de 1.0  $g/L$  y 0.1 M de NaCl. En todo el rango de velocidades de deformación (30-300  $s^{-1}$ ) estudiado, la solución del producto de la cepa 11 presentó la viscosidad más alta seguido en orden descendente de las soluciones de los productos de las cepas 16, 10 y E2.

En la figura 5.12 se muestra el reograma de las soluciones de los productos a una concentración de goma de 1.0  $g/L$  y 1.0 M de NaCl. Bajo estas condiciones, las soluciones de los productos de las cepas 10 y 11 presentaron viscosidades muy similares, siendo estas más altas con respecto a la viscosidad de la solución del producto de la cepa E2. En cuanto a viscosidad se refiere, en orden descendente se encuentra la solución del producto de la cepa 16 y finalmente la solución del producto de la cepa E2. Datos como los de los reogramas de soluciones de 1.0  $g/L$  de goma xantana con sal (0.1 M y 1.0 M de NaCl; figuras 5.11 y 5.12, respectivamente) no tienen antecedentes en la literatura.

En la figura 5.13 (datos regraficados de las figuras 5.10, 5.11 y 5.12) se presentan los reogramas de las soluciones de 1  $g/L$  de goma correspondientes a los productos de las cuatro cepas de *Xanthomonas* con el fin de comparar más claramente el efecto de la sal. En las figuras 5.13 a, b, c y d fue evidente que al agregar NaCl a una concentración de 0.1 M, la viscosidad de las soluciones disminuyó. Las soluciones de los productos de las cepas E2 y 10 (figuras 5.13 a y b, respectivamente) presentaron mayor disminución en el valor de viscosidad en todo el rango de velocidades de deformación estudiado.

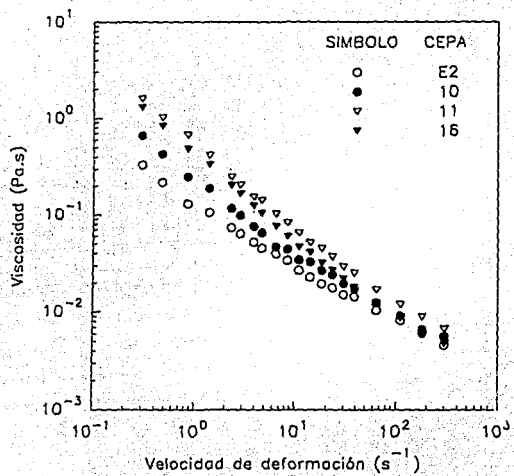


Figura 5.11. Reograma de viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de gomo xantana (purificada) y 0.1 M de NaCl.

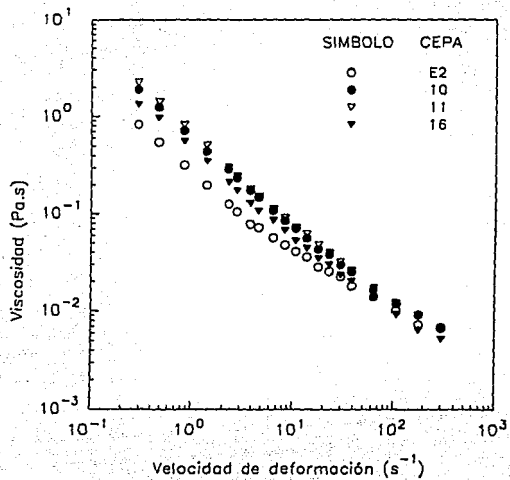


Figura 5.12. Reograma de viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de goma xantano (purificada) y 1.0 M de NaCl.

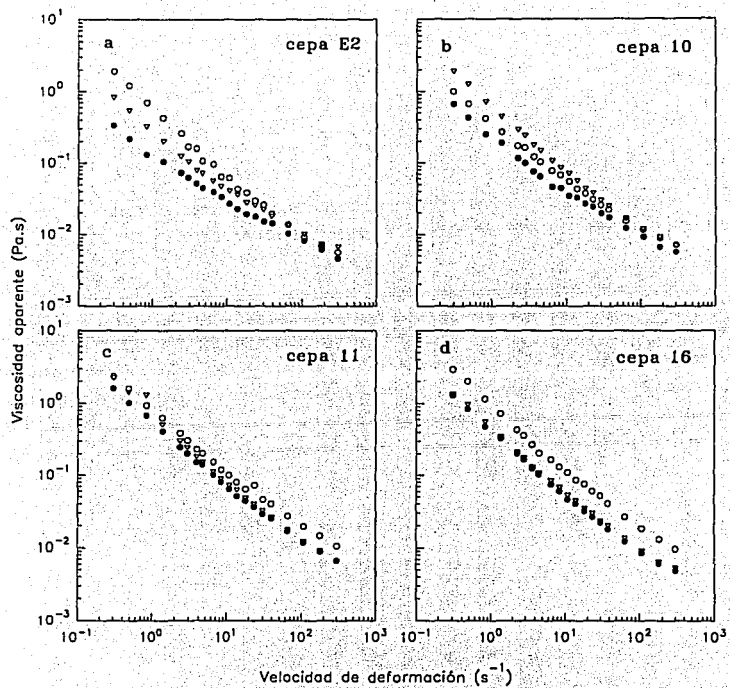


Figura 5.13. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de goma xantana (purificada). Símbolos: (  $\circ$  ) sin sal, (  $\bullet$  ) 0.1 M de NaCl y (  $\nabla$  ) 1.0 M de NaCl.

La disminución en la viscosidad (como resultado de la adición de sal), concuerda con el reporte de Kennedy y Bradshaw (1984), quienes mencionan que a bajas concentraciones de goma (menores a 0.2 %) la adición de sal ocasiona un decremento en la viscosidad. En relación a este aspecto, Kennedy y Bradshaw (1984) indicaron que la disminución en este parámetro está asociada con el hecho de que a bajas fuerzas iónicas (caso semejante cuando no se ha agregado sal a la solución) la conformación presente está altamente expandida, la cual al agregar la sal adopta un enroscamiento aleatorio más compacto debido a la selección de cargas.

En las figuras 5.13 a y b se muestra que en el caso de las soluciones de los productos de las cepas E2 y 10, al incrementar aún más la concentración de sal (de 0.1 a 1.0 M de NaCl) se incrementó la viscosidad. A este respecto, Kennedy y Bradshaw (1984) mencionan que cuando se adiciona sal a una concentración arriba de un valor crítico, se observa un incremento en el volumen hidrodinámico. Este incremento está relacionado con el hecho de que las repulsiones electrostáticas intermoleculares ocasionadas por el exceso de sal, permiten la asociación de cadenas de xantana. El incremento de la viscosidad fue notable en la solución del producto de la cepa 10, la cual alcanzó valores de viscosidad superiores a los determinados en el caso en donde no se agregó sal. La solución del producto de la cepa 11 (figura 5.13c) mostró un incremento en la viscosidad a velocidades de deformación menores a  $30 \text{ s}^{-1}$  y 1.0 M de NaCl respecto a la viscosidad que presentó la solución a 0.1 M de NaCl, mientras que la viscosidad de la solución del producto de la cepa 16 (figura 5.13d) fue la misma al incrementarse la concentración de sal (NaCl). Al parecer, las soluciones de 1 g/L de los productos de las cuatro cepas de estudio presentan diferente valor crítico en la concentración de sal.

Se ha reportado (Shatwell y Sutherland, 1990) que la relación acetilo/pirúvico proporciona información de la estabilidad de la estructura conformacional de la hélice de xantana. Además, un cambio conformacional se traduce en un cambio en la viscosidad. Sin embargo, el incremento en la viscosidad aparente a  $10.8 \text{ s}^{-1}$  (tabla 5.11), al incrementar la concentración de sal de 0.1 a 1.0 M de NaCl, parece estar más bien asociado al intervalo en el cual se encuentra el peso molecular promedio que a la relación acetilo/pirúvico. Estos resultados indican que a menor peso molecular promedio, mayor es el incremento en la viscosidad. De acuerdo con esto, se plantea que a concentraciones de 1 g/L de goma y al incrementar la concentración de sal (de 0.1 M a 1.0 M de NaCl), la goma xantana con menor peso molecular promedio experimenta un cambio conformacional que se traduce en un mayor volumen hidrodinámico (mayor incremento en la viscosidad). Pese a esto, en ningún momento se puede descartar que la relación acetilo/pirúvico no tenga influencia en la viscosidad.



**Tabla 5.11. INCREMENTO EN LA VISCOSIDAD APARENTE DE LAS SOLUCIONES DE GOMA XANTANA.**

SOLUCION DEL PRODUCTO DE LA CEPA	$\mu_a$ 1.0 M*/ $\mu_a$ 0.1 M	Mw (x 10 <sup>6</sup> kg/kgmol)	ACETILOPIRUVICO (adimensional)
10	2.05	9.5-11.5	41.7
E2	1.51	11.4-12.2	2.8
16	1.14	12-13	0.7
11	1.12	12-13	16.3

\* Incremento en la viscosidad aparente (10.8 s<sup>-1</sup>), al incrementar la concentración de sal de 0.1 a 1.0 M de NaCl en las soluciones de 1 g/L de goma xantana.

Para la determinación del peso molecular promedio fue necesario determinar los reogramas de las soluciones de los diferentes productos debido a que en el reómetro Haake CV20N no es posible determinar directamente la viscosidad aparente a 7.5 s<sup>-1</sup>. La concentración de goma fue de 1 g/L en buffer de fosfatos 0.1 M (pH = 7.0). Estas determinaciones permitieron además conocer los valores de viscosidad para cada cepa en estas condiciones (figura 5.14) y estudiar el efecto del tipo de sal (figura 5.15) sobre la viscosidad de las soluciones.

Los reogramas de la figura 5.14 muestran que las soluciones de los productos de las cepas 11 y 16 presentaron la mayor viscosidad entre las soluciones de los cuatro productos experimentados. Las soluciones de los productos de las cepas E2 y 10 presentaron (en orden descendente) menor viscosidad.

En las figuras 5.15 a, b, c y d se muestran los reogramas de las soluciones de los diferentes productos. La concentración de goma fue de 1 g/L y 0.1 M de sal (NaCl o buffer de fosfatos de potasio). Las viscosidades de las soluciones de los cuatro productos estuvieron en el mismo rango. Sin embargo, las soluciones de los productos de las cepas 10, 11 y 16 presentaron una menor viscosidad en presencia de 0.1 M de NaCl comparada con la que presentó la solución del producto de la cepa E2. Además, las soluciones de los tres productos de las cepas de estudio presentaron viscosidades mayores con 0.1 M de buffer de fosfatos comparadas con las que presentó la solución del producto de la cepa E2. Los reogramas de las figuras 3.15 a, b, c y d muestran que la viscosidad se vio afectada por la combinación producto-tipo de sal. A este respecto, Hwang y Kokini (1991) reportaron que el efecto de los grupos acetilo y pirúvico

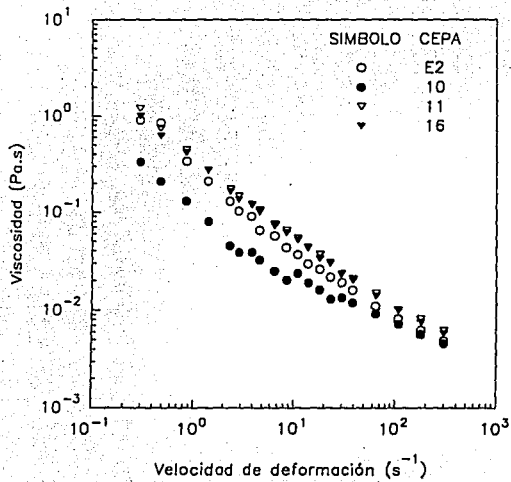


Figura 5.14: Reograma de la viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de goma xantana (purificada) en buffer de fosfatos de potasio (pH = 7.0).

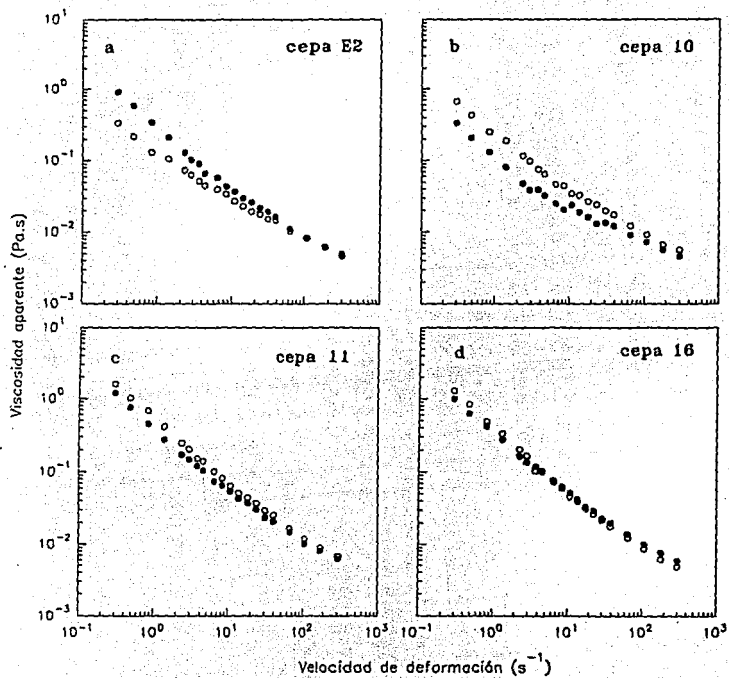


Figura 5.15. Reograma de viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 1 g/L de goma antana (purificada). Símbolos: (○) 0.1 M de buffer de fosfatos de potasio y (●) 0.1 M de NaCl.

sobre la viscosidad de la solución puede estar influenciado por la concentración de goma y la presencia de sal.

De manera preliminar, se trató de correlacionar los parámetros reológicos ( $\mu$ a, K y n) de las soluciones de 1 g/L de xantana con los diferentes parámetros físico-químicos (pureza, contenido de acetilo, pirúvico, nitrógeno total, nitrógeno proteico y la relación acetilo/pirúvico) con la finalidad de encontrar alguna posible relación a nivel molecular. Los resultados de este análisis demostraron que la relación entre los parámetros reológicos y físico-químicos no fue del todo clara. Posiblemente, a nivel molecular (soluciones diluidas de 1 g/L de xantana), la relación entre estos parámetros sea más compleja, es decir, que los parámetros reológicos no sean función de un solo parámetro físico-químico sino de varios de ellos en conjunto. Sin embargo, de acuerdo con el reporte de Herbst *et al.* (1992), es evidente que existe una relación directa entre la viscosidad aparente y el peso molecular promedio.

### 5.5.2. REOLOGIA DE SOLUCIONES CONCENTRADAS

Con el objetivo de caracterizar más detalladamente las soluciones de los diferentes productos, se decidió llevar a cabo determinaciones de viscosidad de soluciones concentradas (10 g/L) de goma xantana. En la preparación de estas soluciones se emplearon los productos denominados semi-purificados dado que a estos productos ya se les había eliminado la mayor proporción de células y a que los productos comerciales no son sometidos a un proceso de purificación tan específico como el empleado en el presente trabajo para obtener los productos purificados.

En las figuras 5.16 a y b se muestran los reogramas de las soluciones de los productos de las cuatro cepas de *Xanthomonas*, sin y con sal (respectivamente) y antes de ser sometidas al tratamiento térmico (A.T.T.). Las soluciones de los productos de las cepas 10 y 11 presentaron mayores viscosidades en todo el rango de velocidades de deformación ( $0.3\text{-}300\text{ s}^{-1}$ ) comparadas con las que presentó la cepa E2. La solución del producto de la cepa 16 mostró viscosidades superiores a las que presentó la cepa control a velocidades de deformación menores a  $30\text{ s}^{-1}$ .

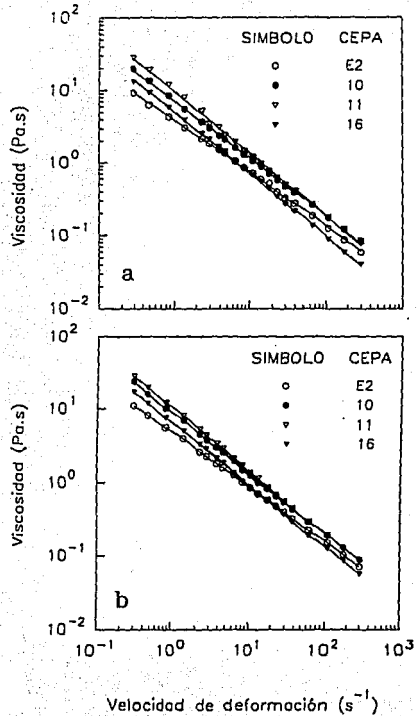


Figura 5.16. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada), antes del tratamiento térmico. a) sin sal y b) con 1 % de KCl (0.13 M).

En las figuras 5.17 a, b, c y d se regraficaron los datos de las figuras 5.15 a y b con el fin de analizar el efecto de la presencia de sal. Para las soluciones de los cuatro productos se observó que a concentraciones de 10 g/L de xantana, la adición de altas concentraciones de sal (v.g. 1 % de KCl) ocasiona un incremento en la viscosidad poco significativo (menor a 100 mPa.s) en todo el rango de velocidades de deformación estudiado. Cadmus *et al.* (1976) reportaron que la adición de sal a soluciones de goma xantana ocasiona cambios en la viscosidad que diferirán en relación a la concentración de xantana. Morris (1977) ha reportado que variaciones en las dimensiones del enrollamiento de la molécula de xantana, se reflejan normalmente en grandes cambios en la viscosidad de la solución. Probablemente, a esta concentración de goma, la adición de sal no contribuya a un cambio conformacional en la molécula de xantana.

Las soluciones (de 10 g/L) de los productos de las cepas de estudio fueron sometidos a un tratamiento térmico (110 °C, 15 minutos; D.T.T.) con la finalidad de inactivar a la bacteria y de mejorar las características reológicas de la goma xantana en solución (Galindo, 1985). En la figuras 5.18 a y b se muestran los reogramas de las soluciones de 10 g/L de las cuatro cepas. Después del tratamiento térmico sin adición de sal (figura 5.18 a), la solución del producto de la cepa 10 presentó una viscosidad muy similar a la que presentó la solución de la cepa control. Las soluciones de los productos de las cepas 11 y 16 también mostraron viscosidades muy similares entre sí, pero menores a la que se determinó para la solución de la cepa E2.

En la figura 5.18 b se presentan los reogramas de las soluciones concentradas después del tratamiento térmico con 1 % de KCl. Las soluciones de los productos de las cepas 10 y 11 mostraron viscosidades mayores a la que presentó la cepa E2. La solución del producto de la cepa 16 mostró viscosidades cercanas, pero inferiores a la que presentó la solución de la cepa control.

En las figuras 5.19 a, b, c y d se regraficaron los datos de las figuras 3.18 a y b con el fin de mostrar de mejor manera el efecto de la sal en las soluciones que fueron sometidas al tratamiento térmico. Los resultados muestran que la viscosidad se incrementó al adicionar la sal. Estos resultados concuerdan con el reporte de Tako y Nakamura (1984) quienes mencionan que, para concentraciones mayores a 0.4 g/L de goma xantana, la adición de sal produce un incremento en la viscosidad. Además, este incremento también concuerda con el reporte de Galindo *et al.* (1989), quienes reportaron que el tratamiento térmico origina cambios en las propiedades reológicas de los productos. Sin embargo, el cambio relativo fue diferente en cada

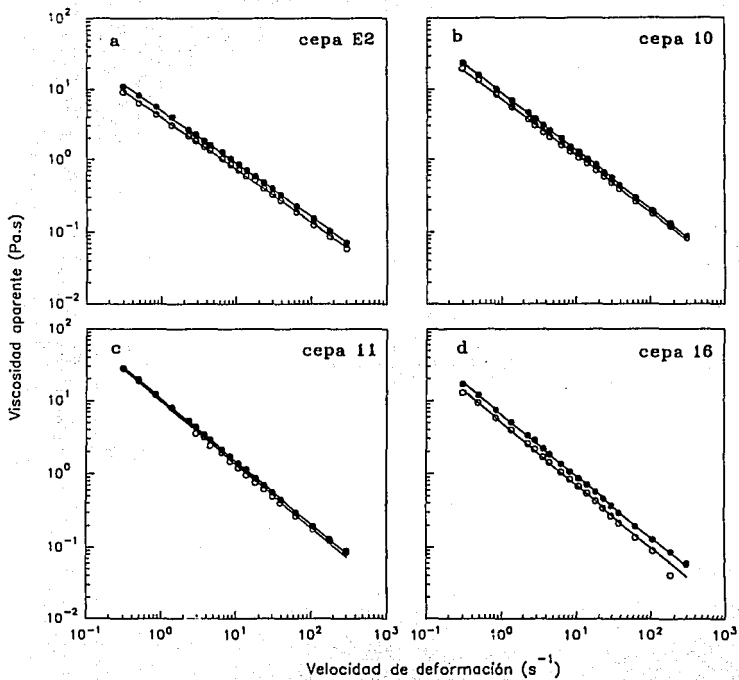


Figura 5.17. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma (semi-purificada), antes del tratamiento térmico. Símbolos: (  $\circ$  ) sin sal y (  $\bullet$  ) con 1 % de KCl (0.13 M).

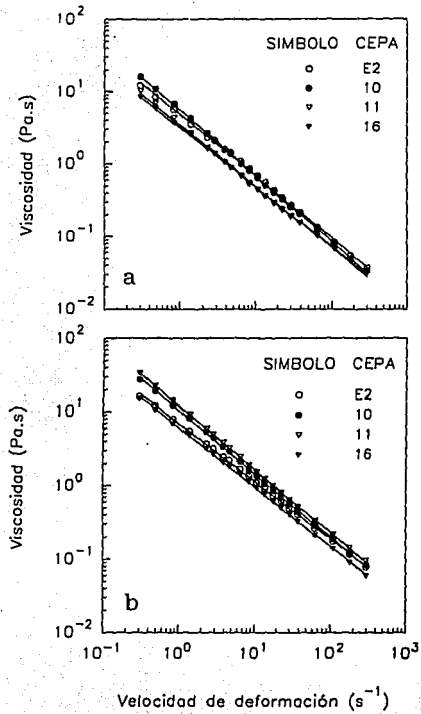


Figura 5.18. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada), después del tratamiento térmico. a) sin sal y b) con 1 % de KCl (0.13 M).



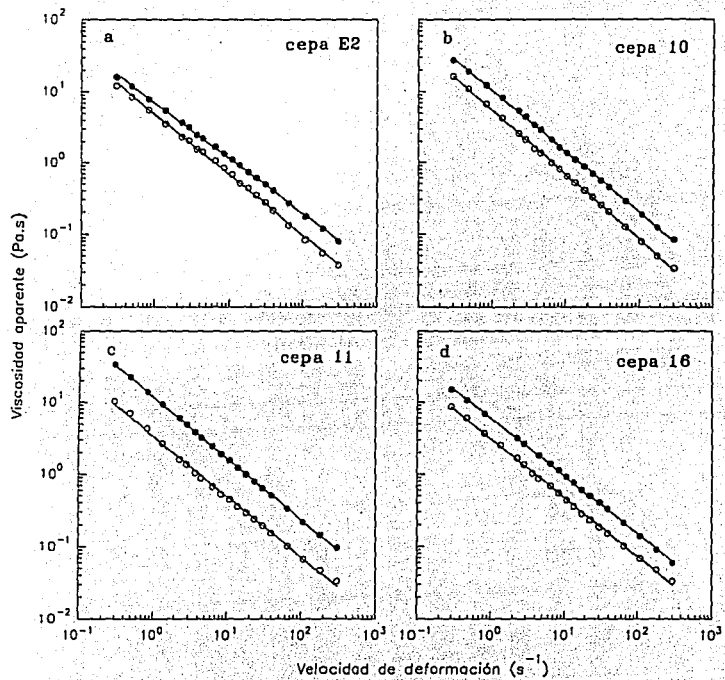


Figura 5.19. Reograma de viscosidad *versus* velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada), después del tratamiento térmico. Símbolos: (○) sin sal y (●) con 1 % de KCl (0.13 M).

polímero. Estos autores proponen que esto probablemente se deba a diferencias estructurales entre las xantanas que presentan diferentes orígenes. Por otra parte, se ha reportado (Morris, 1977; Sharwell y Sutherland, 1990) que la molécula de xantana presenta una estructura rígida. Probablemente la adición de sal y la alta temperatura (110 °C) ocasionen que la molécula sea más flexible, originándose un cambio conformacional (conformación más expandida) que produzca el incremento en la viscosidad.

En las figura 5.20 a, b, c y d se presentan los mismos datos de las figuras 5.16a y 5.18a con el fin de mostrar el efecto del tratamiento térmico sobre la viscosidad de las soluciones (sin adición de sal). El tratamiento térmico ocasionó un decremento en la viscosidad de las soluciones. Posiblemente la temperatura aplicada y la poca cantidad de sal presente en las soluciones de como resultado flexibilidad en la molécula y compactamiento de la misma.

En las figura 5.21 a, b, c y d (datos regraficados de las figura 5.16 b y 5.17 b) se presentan los reogramas de las soluciones concentradas de los productos de las cuatro cepas. Después de someter las soluciones (conteniendo 1 % de KCl), al tratamiento térmico la viscosidad de las soluciones de los productos de las cepas 10, 11 y 16 no experimentó cambios. La solución de la cepa control mostró un incremento poco significativo (menor a 100 mPa.s) en la viscosidad. En estas condiciones, posiblemente la alta concentración de sal (1 % de KCl) en las soluciones, ocasionó que la estructura conformacional de la hélice permaneciera estable al ser sometida a altas temperaturas.

Para las soluciones de 10 g/L de xantana también se trató de correlacionar, de manera preliminar, los parámetros reológicos (viscosidad aparente, y los índices n y K de la ley de la potencia) en función de los diferentes parámetros físico-químicos (contenido de acetilo, pirúvico, relación acetilo/pirúvico y pureza) con la finalidad de encontrar alguna relación que nos indique que factores y como influyen estos a nivel intermolecular en el comportamiento reológico de las soluciones de xantana. Los resultados de las figuras 5.22, 5.23, 5.24 y 5.25 presentan tendencias relativas debido a que únicamente se tienen cuatro datos.

En la figura 5.22, se presentan los datos de n y K (soluciones de 10 g/L de xantana, sin sal y después del tratamiento térmico) en función del contenido de acetilo en los productos. El índice de consistencia (K) se incrementó a medida que aumentó el porcentaje de acetilo en los productos. A medida que aumenta el porcentaje de acetilo, las soluciones de los productos son más pseudoplásticas (disminución en el índice de flujo).

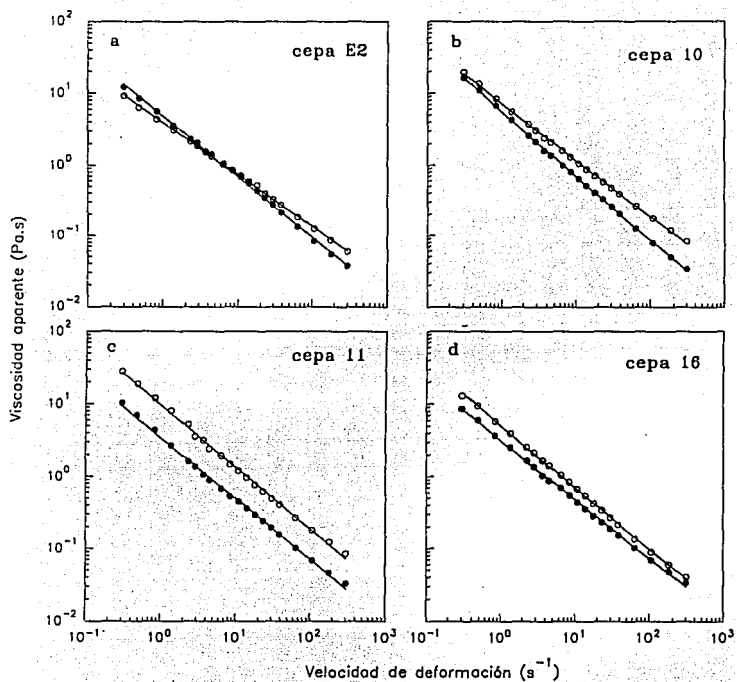


Figura 5.20. Reograma de viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada), sin sal. Símbolos: ( o ) antes del tratamiento térmico y ( • ) después del tratamiento térmico.

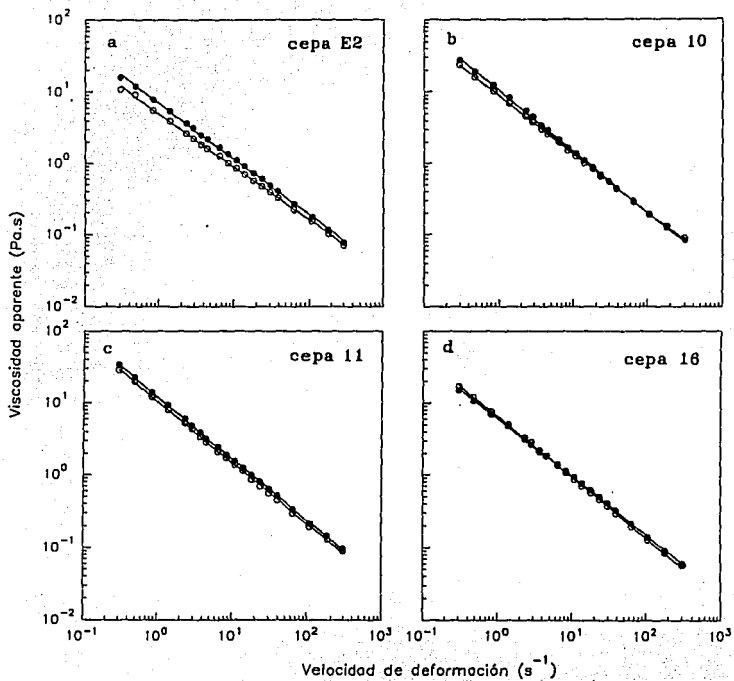


Figura 5.21. Reograma de viscosidad versus velocidad de deformación de soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada), con 1% de KCl. Símbolos: (  $\circ$  ) antes del tratamiento térmico y (  $\bullet$  ) después del tratamiento térmico.

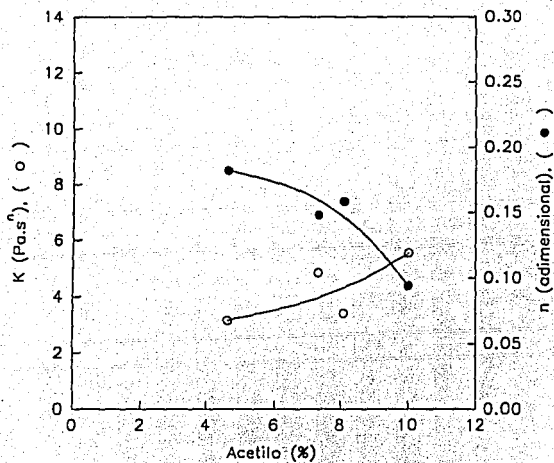


Figura 5.22 Parámetros reológicos de las soluciones de 10 g/L de goma xantano (semi-purificada) en función del contenido de radicales acetilo en los productos. Sin sal, después del tratamiento térmico.

En la figura 5.23 a, se muestran los datos de  $n$  y  $K$  de las soluciones de 10 g/L de xantana (sin sal y antes del tratamiento térmico) en función del contenido de pirúvico. El índice de consistencia ( $K$ ) disminuyó al aumentar el contenido de radicales pirúvico en los productos. En el caso de las soluciones concentradas (10 g/L de xantana) con 1 % de KCl y después del tratamiento térmico (figura 5.23 b), el índice de consistencia disminuyó al aumentar el porcentaje de pirúvico. Al parecer, para pirúvico mayor al 3 % este índice permanece prácticamente constante. El índice de consistencia aumenta, al aumentar el contenido de pirúvico en los productos.

En la figura 5.24 a, se presentan los datos de índice de consistencia ( $K$ ) de las soluciones de 10 g/L de xantana (sin sal y antes de tratamiento térmico) en función de la relación acetilo/pirúvico. El índice de consistencia se incrementa, al incrementarse la relación acetilo/pirúvico, hasta un valor aproximado de acetilo/pirúvico=16. A partir de este punto, el índice de consistencia disminuye (en menos 1.0 Pa.s). Al adicionar la sal (1 % de KCl) a las soluciones (antes de tratamiento térmico, figura 5.24 b), el índice de consistencia presentó tendencias similares a las de la figura 5.24 a.

En la figura 5.25 a, se presentan los datos de  $n$  y  $K$  de las soluciones de 10 g/L de xantana (sin sal y después del tratamiento térmico) en función de la relación acetilo/pirúvico. El índice de flujo ( $n$ ), el cual representa la pseudoplasticidad de las soluciones, disminuye al aumentar la relación acetilo/pirúvico en los productos. Con la adición de la sal (1 % de KCl) a las soluciones y después del tratamiento térmico (figura 5.25 b) el índice de flujo disminuye, mientras que el índice de consistencia aumenta (hasta un valor aproximado de acetilo/pirúvico=16). A partir de la relación acetilo/pirúvico igual a 16,  $K$  disminuyó (en menos de 1.0 Pa.s), mientras que el índice de flujo aumentó (en menos de 0.05).

Aún cuando en las figuras 5.22, 5.23, 5.24 y 5.25 solo se presentaron las tendencias preliminares, a nivel intermolecular (soluciones de 10 g/L de xantana), fue evidente que los parámetros reológicos  $n$  y  $K$  dependieron de parámetros químicos tales como el contenido de acetilo, pirúvico y la relación acetilo/pirúvico.

De los estudios de reología se tiene que las soluciones de goma xantana provenientes de las cepas 10, 11, 16 y control presentaron valores de viscosidad que dependieron de las condiciones empleadas en su preparación (v.g. concentración de goma, contenido de sal, tipo de sal, tratamiento térmico). Además, en soluciones de 10 g/L de goma xantana con 1 % de KCl y después del tratamiento térmico (situación semejante en la que se comparan los productos comerciales), sobresalen las soluciones de los productos de las cepas 10 y 11 en relación a la

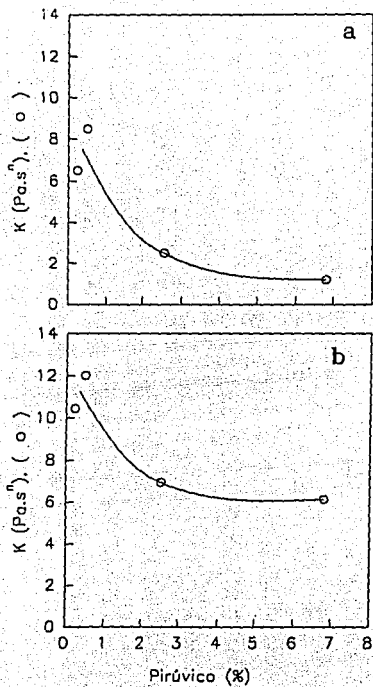


Figura 5.23. Parámetros reológicos de las soluciones de 10 g/L. de goma xantana (semi-purificada) en función del contenido de radicales pirúvico en los productos. a) sin sal, antes del tratamiento térmico y b) con 1 % de KCl (0.13 M), después del tratamiento térmico.

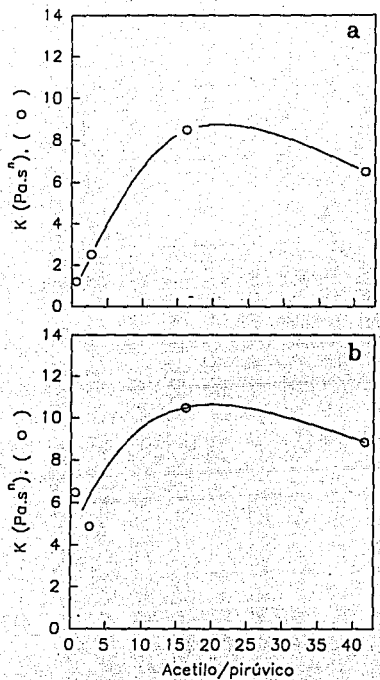


Figura 5.24. Parámetros reológicos de las soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada, antes del tratamiento térmico) en función de la relación acetil/piruvico en los productos. a) sin sal y b) con 1 % de KCl (0.13 M).



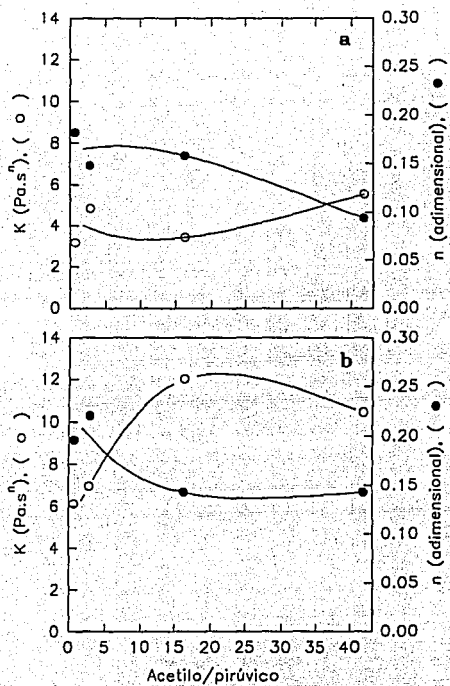


Figura 5.25. Parámetros reológicos de las soluciones de 10 g/L de goma xantana (semi-purificada, después del tratamiento térmico) en función de la relación acetil/piruvico en los productos. a) sin sal y b) con 1 % de KCl (0.13 M).

viscosidad que presentó la solución del producto de la cepa control (en todo el rango de velocidades de deformación estudiado). Bajo estas condiciones, la viscosidad de la solución del producto de la cepa 16 fue similar a la que mostró la solución de la cepa control.

Finalmente, de la caracterización físico-química de las xantanas provenientes de las cepas 10, 11 y 16, así como de la caracterización reológica de sus soluciones, se concluye que estas cepas y sus productos presentan características propias explotables para la producción de goma xantana. Esta xantana puede ser utilizada en la recuperación del petróleo, en la industria alimentaria y en otras áreas como en la producción de productos químicos agrícolas, pinturas y cerámica o en cualquier otro proceso, en donde se requieran determinadas características químicas y/o reológicas.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1. CONCLUSIONES

Se implementaron una serie de técnicas que permitieron caracterizar en forma más rigurosa y detallada tres cepas de *Xanthomonas*. De la caracterización físico-química y reológica se concluye que las cepas de estudio y sus productos presentaron características peculiares, las cuales son potenciales para mejorar aspectos particulares del proceso de producción o para producir xantana idónea para aplicaciones específicas.

Al comparar las viscosidades de las soluciones de los productos, estos presentaron diferente orden secuencial dependiendo de la concentración de goma, concentración y tipo de sal, tratamiento térmico, según fue el caso.

Las características físico-químicas no presentaron una relación evidente con el promedio de la concentración y de la viscosidad aparente final de los caldos de fermentación. Posiblemente esto se deba a que las purezas relativas de estos productos eran diferentes entre ellas.

Para las soluciones diluidas, las cuales pueden proporcionar información en relación a la molécula, de manera preliminar se encontró que la relación entre los parámetros reológicos y los diferentes parámetros físico-químicos fue poco evidente. Al parecer, la relación entre estos parámetros es más complicada de lo que se pensaba, probablemente un análisis estadístico multifactorial pueda dar mayor información.

En las soluciones concentradas, las cuales pueden proporcionar información a nivel intermolecular, se encontró que los parámetros químicos podrían estar determinando los parámetros reológicos (como son el contenido de pirúvico, de acetilo y de la relación acetilo/pirúvico).

Si se compara con la cepa control (E2) y/o su producto:

- Los caldos de fermentación de las cepas 10, 11 y 16 presentaron viscosidades finales superiores.
- La cepa 11 presentó el mayor rendimiento de producto sobre azúcar consumida así como la productividad más alta.
- La cepa 16 produjo menos biomasa durante el cultivo, pero el producto con más alto contenido de nitrógeno. Esto último sugiere la posible asociación de un polipéptido (de cadena corta) o de una proteína con este polímero.
- Las cepas 10 y 11 produjeron polímeros con bajo contenido de pirúvico. De acuerdo con los reportes de la literatura los productos de estas cepas pueden ser empleados en aplicaciones tales como la recuperación del petróleo. Los productos de las cepas 10 y 11 presentaron el más bajo y el más alto peso molecular promedio, respectivamente.
- Las soluciones de 1 g/L de los polímeros provenientes de las cepas 11 y 16 exhibieron viscosidades considerablemente más altas.
- En una situación semejante en la que se comparan los productos comerciales, las soluciones de 10 g/L (con 1 % de KCl y después del tratamiento térmico) de los polímeros provenientes de las cepas 10 y 11 mostraron viscosidades más altas.

El proceso de purificación permitió obtener gomas con purezas relativas del 92-95 % de xantana. Durante este proceso se logró eliminar, respecto al contenido inicial, entre el 37 y el 55 % del nitrógeno total y entre el 37 y el 65 % del nitrógeno proteico.

Al agregar 0.1 M de NaCl a las soluciones de 1 g/L de xantana, se observó un decremento en la viscosidad de las soluciones. Este efecto ha sido reportado previamente en la literatura.

Al parecer, las soluciones de 1 g/L de los productos de las cuatro cepas de estudio presentan diferentes concentraciones críticas de sal, a partir de la cual se observa un incremento en la viscosidad.

## 6.2. RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se caracterizaron tres cepas que resultaron ser potenciales para emplearse en la producción de goma xantana. Además, estas cepas y sus productos pueden ser caracterizados en base a otros parámetros o bien ser utilizadas en la realización de estudios de carácter básico, en relación a aspectos genéticos y de biosíntesis.

Para futura caracterización de cepas o bien como una continuación de este trabajo se proponen los siguientes aspectos:

- Se sabe que las soluciones de goma xantana son estables en un amplio rango de pH y temperatura. Sin embargo, es conveniente determinar la estabilidad de cada producto en diferentes condiciones de pH y temperatura.
- Probablemente la composición de los azúcares sea diferente en cada polímero. Razón por la cual sería de interés determinar la relación entre los azúcares componentes de las gomas obtenidas.
- Integrar a la caracterización reológica otro tipo de determinaciones como la viscosidad intrínseca y la viscoelasticidad (para diferentes concentraciones de goma y sal) de los productos.
- En la parte de producción, se sugiere escalar los procesos de fermentación con estas cepas con la finalidad de determinar si los niveles de concentración de xantana que se obtengan son adecuados en relación a los que se obtienen actualmente con la cepa control.
- Con la finalidad de tratar de establecer correlaciones entre los parámetros físico-químicos y reológicos una alternativa podría ser obtener productos con diferente peso molecular promedio (mediante el manejo de diferentes niveles de oxígeno disuelto, en las fermentaciones) y variar el contenido de acetilo y de pirúvico (mediante tratamiento químico), con la salvedad de que al variar el contenido de estos radicales no cambie el peso molecular promedio y/o la distribución de pesos moleculares.

## NOMENCLATURA

<b>K</b>	Indice de consistencia	(Pa.s)
<b>L<sub>h</sub></b>	Longitud efectiva de la aguja del viscosímetro	(m)
<b>M</b>	Torque aplicado por el viscosímetro Brookfield LVT	(dinas.cm)
<b>n</b>	Indice de flujo	(adimensional)
<b>R</b>	Radio de la aguja del viscosímetro	(m)
<b>Y<sub>x/s</sub></b>	Rendimiento de biomasa sobre azúcar consumido: (g de biomasa/g de azúcar consumido) X 100	(%)
<b>Y<sub>n/s</sub></b>	Rendimiento de producto sobre azúcar consumido: (g de producto/g de azúcar consumido) X 100	(%)

### Letras griegas

<b>γ</b>	Velocidad de deformación	(s <sup>-1</sup> )
<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento	(h <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>a</sub></b>	Viscosidad aparente	(Pa.s)
<b>ω</b>	Velocidad angular	(s <sup>-1</sup> )
<b>τ</b>	Esfuerzo de corte	(Pa)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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". *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 942-948.
- Cottrell, I. W. and Kang K. S. (1978). "Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications". Chapter 10. *Developments in Industrial Microbiology*, 19, 117-131.
- Charles, M. (1978). "Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures". *Advances in Biochemical Engineering*, 8, 1-62.
- Davidson, I.W. (1978). "Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture". *FEMS Microbiology Letters*, 3, 347-349.
- Dea, I. C. M., Morris, E. R., Rees, D.A. and Welsh, E.J. (1977). "Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems". *Carbohydrate Research*, 57, 249-272.
- Devore, G. y Muñoz, M.E. (1978). "Química Orgánica". *Publicaciones Culturales, S.A.*, 110-113.
- Duckworth, M. and Yaphe, W. (1970). "Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides". *Chemistry and Industry*, 6, 747-748.

Flores, F. (1989). "Estrategias para incrementar la concentración de producto (goma xantana) en la fermentación de *Xanthomonas campestris*". Tesis de licenciatura, Escuela de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Flores, F., Torres, L.G. and Galindo, E. (1994). "Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. *Journal of Biotechnology*, **34**, 165-173.

Galindo, E. (1985). "Polisacáridos microbianos". En: **Prospectiva de la Biotecnología en México**. Quintero R. (Compilador), Ed. Fundación Barros Sierra-CONACyT, 65-92.

Galindo, E., Torrestiana, B. and Garcia-Rejón, A. (1989). "Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions". *Bioprocess Engineering*, **4**, 113-118.

Galindo, E. (1990). "La goma xantana: estado del arte en tecnología y mercado". Informe elaborado para GEPLACEA.

Galindo, E., Salcedo, G., Flores, C. and Ramírez, M.E. (1992). "Improved shake flask test for the screening of xanthan producing microorganisms". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **9**, 122-124.

Graham, H. D. (1971). "Microdetermination of Keltrol (xanthan gum)". *Journal of Dairy Science*, **54**, 1162-1628.

Hadjivassiliou, A. A. and Rieder, S. V. (1968). "The enzymatic assay of pyruvic and lactic acid. A definitive procedure". *Clinica Chimica Acta*, **19**, 357-361.



Hannote, M., Flores, F., Torres, L. and Galindo, E. (1991). "Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer". *Chemical Engineering Journal*, 45, B49-B56.

Hassler, A. R. and Doherty, H. D. (1990). "Genetic engineering of polysaccharide structure: Production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*". *Biotechnology Progress*, 6 (2), 182-187.

Herbst, H., Peters, H.U., Suh, I.S., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1988). "Monitoring xanthan quality during fermentation by size exclusion chromatography". *Biotechnology Techniques*, 2 (2), 101-104.

Herbst, H., Peters, H.U., Suh, I.S., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1989). "Comparison of various fermenter types used for production of xanthan". *DECHEMA Biotechnology Conferences 3*, part A, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 495-498.

Herbst, H., Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1992). "Xanthan production in stirred tank fermenters: oxygen transfer and scale-up". *Chemical Engineering and Technology*, 15, 425-434.

Holzwarth, G. (1976). "Conformation of the extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris*". *Biochemistry*, 15 (19), 4333-4339.

Hwang, J. and Kokini, J.L. (1991). "Structure and rheological function of side branches of carbohydrate polymers". *Journal of Texture Studies*, 22, 123-167.

Kennedy, A.F.D. and Sutherland, I.W. (1987). "Analysis of bacterial exopolysaccharides". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 12-19.

Kennedy, J.F., Jones, P. and Barker, S.A. (1982). "Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* culture". *Enzyme and Microbial Technology*, **4**, 39-43.

Kennedy, J.F. and Bradshaw, I.J. (1984). "Production, properties and applications of xanthan". *Progress in Industrial Microbiology*, **19**, 319-371.

Kleinitz, W., Littmann, W. and Herbst, H. (1989). "Screening of xanthan-biopolymer for a high salinity oil reservoir". *Proceedings of the Fifth European Symposium on Improved Oil Recovery*. Budapest, Germany.

Lambert, F., Milas, M. and Rinaudo, M. (1982). "Gel permeation chromatography of the xanthan gum using a light scattering detector". *Polymer Bulletin*, **7**, 185-189.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *Journal of Biological and Chemistry*, **193**, 265-275.

Margaritis, A and Zajic, J.E. (1978). "Mixing, mass transfer and scale up of polysaccharides fermentations". *Biotechnology and Bioengineering*, **20**, 939-1001.

Margaritis, A. and Pace, G.W. (1985). "Microbial polysaccharides". En: *Comprehensive Biotechnology*, Moo-Young (Ed) Vol. III, Pergamon press, New York, E.U.A., 1005-1041.

McComb, E. A. and McCready, R. M. (1957). "Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction". *Analytical Chemistry*, **29**, 819-821.

Milas, M. and Rinaudo, M. (1984). "On the existence of two different secondary structures for the xanthan in aqueous solutions". *Polymer Bulletin*, **12**, 507-514.

Milas, M., Rinaudo, M., Knipper, M. and Schuppiser, J.L. (1990). "Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions". *Macromolecules* **23**, 2506-2511.

Montes, A.L. (1966). "Bromatología". Vol. I, Ed. Universitaria de Buenos Aires, Argentina, 58-60.

Moorhouse, R., Walkinshaw, M.D. and Arnott S. (1977). "Xanthan gum-molecular conformation and interactions". In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Sandford, P. A. and Laskin, A. (Eds.), ACS Symp. Ser. Vol 45, American Chemical Society, Washington, D. C., 90-102.

Morris, E.R. (1977). "Molecular origin of xanthan solution properties". In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Sandford, P. A. and Laskin, A. (Eds.), ACS Symp. Ser. Vol 45. American Chemical Society, Washington, D. C., 81-89.

Morris, V.J., Franklin, D. and Tanson, K. (1983). "Rheology and microstructure of dispersions and solutions of the microbial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* (xanthan gum)". *Carbohydrate Research*, **121**, 13-30.

Morris, V.J. (1993). "Fermentation-derived polysaccharides for use in foods". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **58** (2), 199-201.

Peters, H.-U., Herbst, H., Hesselink, P., Lünsdorf, H., Schumpe, A. and Deckwer, W.-D. (1989). "The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*". *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 1393-1397.

Peters, H.-U., Suh, I.-S., Schumpe, A. and Deckwer, W. D. (1993). "The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation". *Biotechnology Letters*, **15** (6), 565-566.

Ramírez, M. E. (1993). "Aislamiento, selección y caracterización de cepas de *Xanthomonas campestris*". Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sánchez, A., Martínez, A., Torres, L. and Galindo, E. (1992). "Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths. *Process Biochemistry*, 27, 351-365.

Sandford, P. A., Pittsley, J. E., Knutson, C. A., Watson, P. R., Cadmus, M. C., and Jeanes, A. (1977). "Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content". In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Sandford, P. A. and Laskin, A. (Eds.), ACS Symp. Ser. Vol 45. American Chemical Society, Washington, D. C., 192-209.

Scampani, A.R.P. and Rosato Y.B. (1987). "Production of xanthan gum by different isolates of *Xanthomonas campestris*". *Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, I*. Nijssel, D. M., Van der Meer, R. R. and Luyben, K. Ch. A. M (Eds.) Elsevier Science, Amsterdam, 301-304.

Schumpe, A. and Deckwer, W.D. (1990). "Biochemical engineering for polysaccharide (xanthan gum) production". *CHISA'90*, Prague, August. Paper (29), 26-31.

Shatwell, K.P. and Sutherland, I.W. (1990). "The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan". *Carbohydrate Research*, 206, 87-103.

Sutherland, I.W. and Tait, M.I. (1992). "Biopolymers". In: *Encyclopedia of Microbiology, I*, 339-349.

Tako, M. and Nakamura, S. (1984). "Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media". *Agriculture and Biological Chemistry*, 48 (12), 2987-2993.

Tako, M. and Nakamura, S. (1989). "Evidence for intramolecular associations in xanthan molecules in aqueous media". *Agriculture and Biological Chemistry*, 53 (7), 1941-1946.

Torrestiana, B., Fucikovsky, L. and Galindo, E. (1990). "Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates". *Letters in Applied Microbiology*, 10, 81-83.