# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ANALISIS DE ALGUNAS CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE UN BIOPOLIMERO PRODUCIDO POR *Klebsiella pneumoniae* EN UN PROCESO DE FERMENTACION SIMPLE."

POR

CARLOS EMILIO OROZCO MAGDALENO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INGENIERIA CERAMICA

MONTERREY, N. L., MEXICO DE 1999

TM
Z5521
FCQ
1999
07

1020126079

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

### DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES

" ANÁLISIS DE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE UN BIOPOLÍMERO PRODUCIDO POR *Klebsiella pneumoniae* EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN SIMPLE."

POR
CARLOS EMILIO OROZCO MAGDALENO

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Ingeniería Cerámica

FEBRERO DE 1999

FONDO
TESIS

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
### *DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES*

LA TESIS PRESENTADA POR EL Sr. CARLOS EMILIO OROZCO MAGDALENO, TITULADA :

" ANÁLISIS DE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE UN BIOPOLÍMERO PRODUCIDO POR *Klebsiella pneumoniae* EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN SIMPLE "

HA SIDO ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INGENIERIA CERÁMICA

MC. SERGIO FERNANDEZ DELGADILLO
ASESOR Y SINODAL

Dr. JAVIER MACOSSAY TORRES
CO-ASESOR Y SINODAL

Dr. ERNESTO URETA BARRON
REVISOR Y SINODAL

Dr. ARMANDO GARCÍA LUNA
REVISOR Y SINODAL

MC. MARTHA A. SUÁREZ HERRERA
COORDINADORA DE LA ESCUELA
DE GRADUADOS EN CIENCIAS

# CONTENIDO


| | página |
|---|---|
| ÍNDICE DE ESQUEMAS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| ABREVIATURAS | v |
| CAPITULO 1 | |
| 1.1 Introducción | 1 |
| 1.2 Objetivos | 16 |
| CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS. | |
| 2.1 Descripción de equipos y reactivos | 17 |
| 2.1.1 Reactivos | 17 |
| 2.1.2 Equipos | 19 |
| 2.2 Obtención del microorganismo | 20 |
| 2.3 Diseño del medio de cultivo empleado | 20 |
| 2.4 Función de los micronutrientes | 22 |
| 2.5 Composición del medio empleado | 22 |
| 2.6 Composición de los micronutrientes | 23 |
| 2.7 Escalamiento | 23 |
| 2.8 Proceso de fermentación | 25 |
| 2.9 Curva de crecimiento | 27 |
| 2.10 Determinación de azúcares reductores (3,5 DNS) | 29 |
| 2.10.1 Preparación de los reactivos | 30 |
| 2.10.2 Preparación de la curva de calibración | 30 |
| 2.10.3 Preparación de las muestras | 31 |
| 2.11 Determinación del pH | 31 |
| 2.12 Obtención del exopolisacárido | 32 |
| 2.13 Técnicas instrumentales de caracterización | 34 |
| 2.13.1 Análisis del EPS por FT-IR | 34 |
| 2.13.2 Análisis del EPS por RMN | 36 |
| 2.13.3 Análisis térmico de EPS | 40 |
| 2.13.3.1 Análisis térmogravimetrico (TGA) | 41 |
| 2.13.3.2 Análisis térmico diferencial (DTA) | 42 |
| 2.13.4 Espectroscopia de absorción atómica | 44 |
| 2.13.5 Cromatografía | 45 |
| 2.13.6 Propiedades reológicas del EPS | 49 |

CAPITULO 3 RESULTADOS.
3.1 Identificación del microorganismo 51
3.2 Curva de calibración 52
3.3 Parámetros de la fermentación 53
3.4 Resultados de obtención de exopolisacárido 57
3.5 Resultados de FT-IR 59
3.6 Análisis térmico de exopolisacárido 62
3.7 Análisis del agente polimerizante por absorción atómica 65
3.8 Análisis del exopolisacárido por RMN 66
3.9 Análisis de la viscosidad del exopolisacárido 69
3.10 Cromatografía 70

CONCLUSIONES 72

APENDICE
Figuras del microorganismo 73
Figuras de la fermentación 74
Figuras del proceso de separación del exopolisacárido 75
Figuras del biopolímero en película 76
Figuras del biopolímero húmedo y seco 77

REFERENCIAS 78

ÍNDICE DE ESQUEMAS


| | | pagina |
|---|---|---|
| 1.1 | Amilosa | 2 |
| 1.2 | Amilopectina | 3 |
| 1.3 | Celulosa | 4 |
| 1.4 | Quitina | 5 |
| 1.5 | Poliéster | 8 |
| 1.6 | Xantano | 12 |
| 1.7 | Gelano | 13 |


ÍNDICE DE FIGURAS


| | | |
|---|---|---|
| 2.1 | Diagrama de flujo de la fermentación batch para la obtención de exopolisacárido | 24 |
| 2.2 | Curva de crecimiento típica de un proceso fermentativo de los microorganismos | 29 |
| 2.3 | Diagrama de flujo de la obtención del exopolisacárido | 33 |
| 2.4 | Termograma típico de una reacción de descomposición | 42 |
| 2.5 | Curva típica de un análisis térmico diferencial | 43 |
| 2.6 | Diagrama de flujo para la identificación de azúcares reductores | 48 |
| 3.1 | Curva de calibración de azúcares reductores | 53 |
| 3.2 | Curva de crecimiento y determinación de azúcares reductores | 55 |
| 3.3 | Curva de crecimiento y determinación del pH | 56 |
| 3.4 | Evolución de la producción del exopolisacárido | 57 |
| 3.5 | pH y concentración de EPS en función del tiempo | 59 |
| 3.6 | Espectro de FT-IR del exopolisacárido | 60 |
| 3.7 | Espectro de FT-IR del exopolisacárido hidrolizado con NaOH al 3 % | 61 |
| 3.8 | Espectros del EPS hidrolizado y sin hidrolizar | 62 |
| 3.9 | Análisis térmico del exopolisacárido a las 3 hrs | 64 |
| 3.10 | Análisis térmico del exopolisacárido a las 15 hrs | 64 |
| 3.11 | Análisis térmico del exopolisacárido a las 24 hrs | 64 |
| 3.12 | Espectro de RMN $^{1}H$ del blanco | 67 |
| 3.13 | Espectro de RMN $^{1}H$ de la muestra | 68 |
| 3.14 | Viscosidad del exopolisacárido en función de la velocidad de rotación del viscosimetro | 69 |
| 3.15 | Resultados de la cromatografía en papel | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS


2.1 Parámetros al inicio de la fermentación 26
2.2 Estándares para azúcares reductores mediante el método ácido 3,5-DNS 30
2.3 Tiempos de toma de muestras 32
2.4 Núcleos adecuados para el estudio de RMN 38
2.5 Solubilidad del exopolisacárido en diferentes solventes 39
3.1 Pruebas bioquímicas 51
3.2 Resultados de los estándares de azúcares reductores 52
3.3 Cambios físicos ocurridos durante la fermentación 56
3.4 Resultados de los pesos obtenidos del exopolisacárido a diferentes tiempos 57
3.5 Comparación de resultados de obtención de exopolisacárido 58
con otros microorganismos 61
3.6 Comparación de temperaturas de descomposición de exopolisacáridos 65
3.7 Concentración de iones metálicos divalentes 65
3.8 Comparación de los elementos encontrados en % en peso con la goma de xantano 66
3.9 Resultados de las viscosidades obtenidas con diferentes velocidades de rotación con 3 diferentes rotores 70
3.10 Comparación de los $R_f$ de la muestra y estándares de azúcares 71

# ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| $^{o}C$ | Grados centígrados |
| EPS | Exopolisacárido |
| TGA | Análisis termogravimetrico |
| DTA | Análisis termodiferencial |
| R.P.M. | Revoluciones por minuto |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| FT-IR | Transformada de Fourier-Infrarrojo |
| PHA | Polihidroxialkanoatos |
| PHB | Polihidroxobutiratos |
| CMC | Carboximetilcelulosa |
| D.O | Densidad óptica |
| pH | Potencial de hidrogeno |
| $\lambda$ | Longitud de onda |
| nm | Nanometros |
| Um | Micromoles |
| Ug | Microgramos |
| $\alpha$ | Infinito |
| g/l | Gramos sobre litro |
| ml | Mililitro |
| Lt | Litro |

# CAPITULO 1

# INTRODUCCIÓN

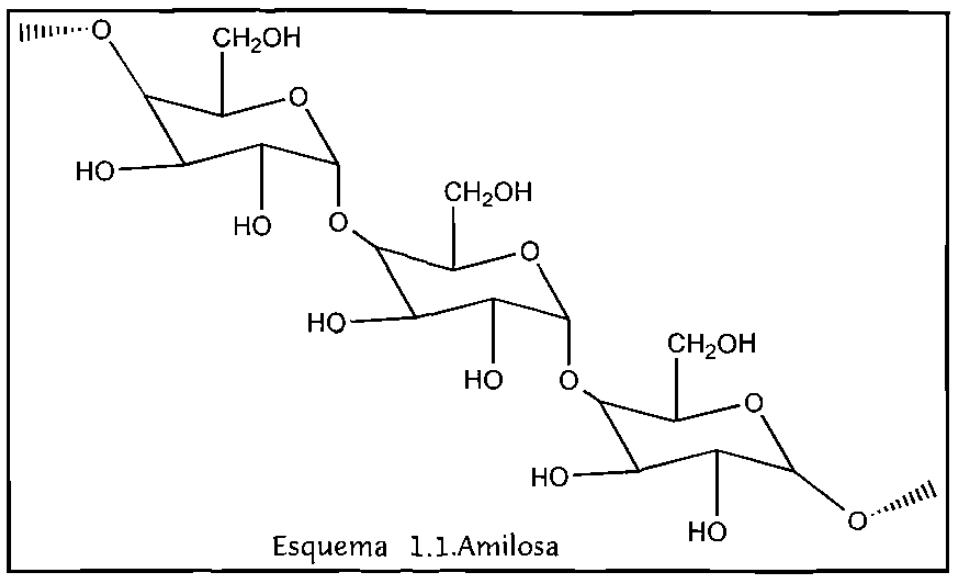
# 1 INTRODUCCIÓN.

Los biopolímeros son macromoléculas naturales cuyas propiedades físicas y químicas dependen de sus propiedades estructurales y de sus funciones metabólicas. Entre las macromoléculas que se incluyen en esta clase se encuentran los polinucleótidos, las proteínas, los polipéptidos y los polisacáridos. Estos biopolímeros se derivan de fuentes biológicas naturales en los cuales desarrollan funciones especiales tales como: El transporte de la información genética que conlleva el proceso de replicación y síntesis de proteínas, el cual es efectuado por los polinucleótidos; Los polipéptidos y proteínas, que son moléculas que catalizan todas las reacciones químicas de origen biológico como por ejemplo ; las realizadas durante el transporte de oxígeno, el movimiento muscular, la respuesta nerviosa, el almacenamiento de nutrientes, la regulación hormonal, y también participan en la conformación estructural, etc. Los polisacáridos son macromoléculas de origen natural que se pueden encontrar tanto en plantas, caparazones de crustáceos y microorganismos, teniendo funciones como la de almacenar información en su molécula, servir como soporte estructural confiriéndoles resistencia mecánica y servir como reservorío etc., por lo que son la categoría más grande de la familia de los biopolímeros. Más de 100 azúcares y derivados de los azúcares son viables como monómeros para la síntesis de polisacáridos.

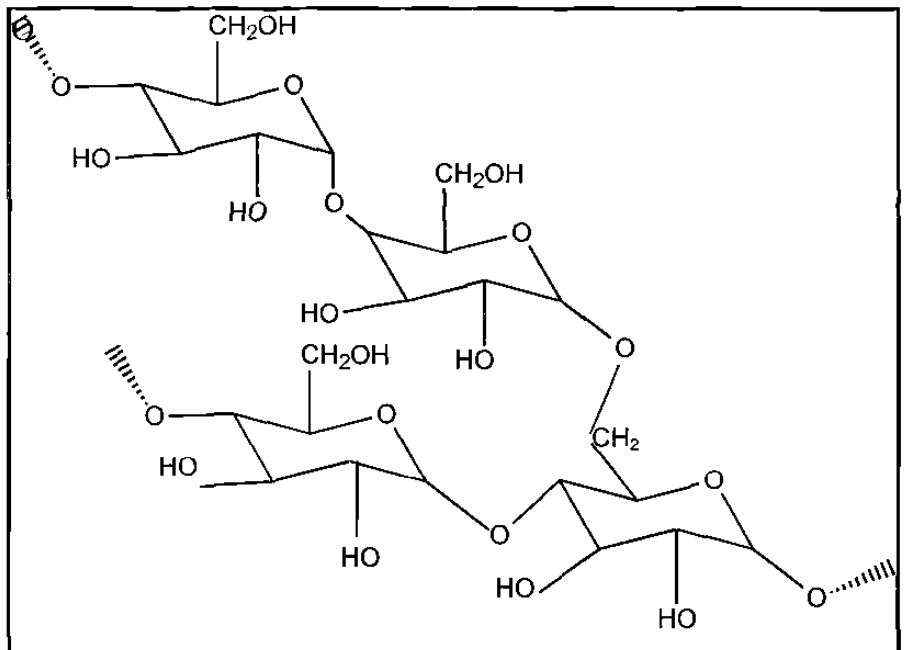
El término polisacárido es aplicable a los polímeros que pueden o no contener estructuras que se repiten periódicamente en el cual el grupo dominante, pero no necesariamente exclusivo, está unido por enlaces tipo glucosídicos, que son formados mediante una condensación entre el grupo hidroxilo del carbono anomérico de un monosacárido o un residuo de monosacárido y un segundo compuesto que puede ser o no otro monosacárido con la consecuente eliminación de agua.[30, 32]

$$n\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow (C_6H_{10}O_5)_n + (n-1)\ H_2O$$

Los enlaces covalentes que unen a las unidades monoméricas pueden presentarse en diferentes posiciones del anillo glucosídico formándose cadenas lineares como las amilosas (esquema. 1.1), y ramificadas como las amilopectinas (esquema 1.2)[30,32] encontrándose ambos tipos en el almidón.



Esquema 1.1.Amilosa

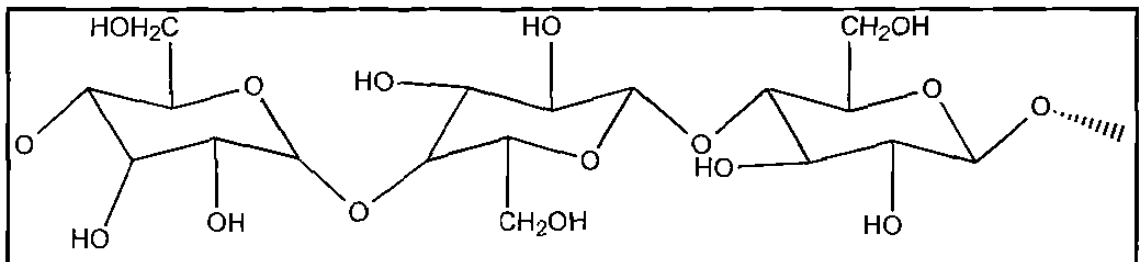



Esquema 1.2.Amilopectina

Existen varios tipos de polisacáridos, entre los cuales encontramos a los homopolímeros que están formados por subunidades de la misma estructura monomérica, así como los están formados de diferentes subunidades estructurales monoméricas llamadas heteropolímeros.[3]

Entre los homopolímeros encontramos al almidón que contiene unidades de α-glucosa, y la celulosa que contiene unidades de β-glucosa (esquema 1.3), ambas estructuras están hechas de isómeros de glucosa que difieren solamente en la posición de el enlace en el C-1 .[30, 32, 21,28]

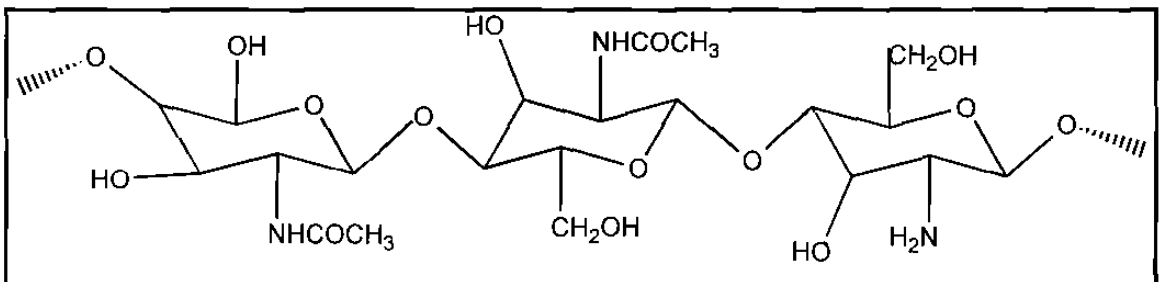
Entre los heteropolisacáridos podemos mencionar las galactomanosas (compuesto de galactosa y manosa), arabinoxilanos (compuesto de arabinosa y xilanosa), peptidoglucanos, etc.




Esquema 1.3. Celulosa

El desarrollo de los materiales basados en la ciencia y la tecnología ha resultado en grandes logros en beneficio de la humanidad, teniendo como consecuencia diversas y nuevas alternativas en el campo de los materiales. Una de estas nuevas alternativas se desarrolla en el campo de la ciencia de los polímeros naturales, esto se debe a que en las ultimas seis décadas del siglo XX, los materiales poliméricos industriales han sido basados en polímeros sintéticos de origen petroquímico.[8] Sin embargo, a partir de los años setentas la preocupación por el medio ambiente y su progresivo deterioro da paso a la búsqueda de nuevas alternativas, principalmente en la ciencia y tecnología de los polímeros de origen natural, en la cual se desea que contenga la misma capacidad de resistencia y facilidad de elaboración que los polímeros sintéticos pero con una tendencia a la biocompatibilidad con el medio ambiente. Ante este reto surge la industria química de los materiales, en especial aquellos que se derivan de procesos biológicos naturales como por ejemplo los de las plantas, animales y microbiológicos, obteniéndose la formación de biopolímeros .

Entre los polímeros naturales de mayor importancia industrial encontramos a la celulosa (esquema 1.3), el cual es el componente más abundante de las fibras de las maderas y de las plantas, encontrándose casi pura en las fibras de algodón siendo constituído este biopolímero por unidades monoméricas de β-D-(+)-glucopiranosa (1→4). [30, 32, 28]
Los derivados de la celulosa son ampliamente utilizados comercialmente, por ejemplo, el acetato de celulosa es ampliamente utilizado en la industria del plástico, fibra, papel, etc. El glucógeno es un polisacárido de origen animal que ejemplifica a los carbohidratos que se almacenan para su posterior liberación cuando el metabolismo lo exige.[28,32] La quitina (esquema 1.4) es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y esta formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β(1→4) glucosídicos, presentándose principalmente como constituyente de los caparazones de crustáceos, insectos, hongos y algunas levaduras.[28, 32]



Esquema 1. 4 Quitina

Desde el inicio del presente siglo ya se mencionaba en la literatura la formación de materiales poliméricos a partir de microorganismos, encontrados muchas de las veces como resultado de experimentos y en los cuales, al final se evaluaban las propiedades fisicoquímicas de los biopolímeros.[8] Estos polisacáridos de origen microbiano se pueden encontrar: como inclusiones intracelulares que actúan como material de reserva o reguladores, como por ejemplo; el glucógeno, el polihidroxibutirato (PHB), y otros materiales relacionados (polihidroxialkanoatos), los cuales mantienen a los sustratos en una forma inaccesible a las enzimas metabólicas y ejercen muy poca presión osmótica, en ellos se puede encontrar que la secuencia de monómeros se representa por un grupo repetitivo de subunidades ; y como polisacáridos extracelulares, que podemos encontrar como material mucilaginoso extracelular en forma de cápsulas o limos en donde las subunidades pueden ser desde disacáridos hasta hexasacáridos. Esta formación de material mucilaginoso extracelular por parte de los microorganismos, generó un amplio interés ya que reflejan su respuesta inmediata a cambios en su medio ambiente, y se refleja en la acumulación de exopolisacáridos que le permiten una fuerte adhesión a superficies sólidas así, como también genera cambios en los flujos de soluciones acuosas cuando este lo contiene.[17,9]Estos polisacáridos microbianos son sintetizados mediante reacciones multienzimáticas dentro de la célula. Aunque no han sido totalmente elucidadas las rutas biosintéticas , el proceso en general es el siguiente; las unidades oligosacáridas se sintetizan a partir de precursores, azúcares activados

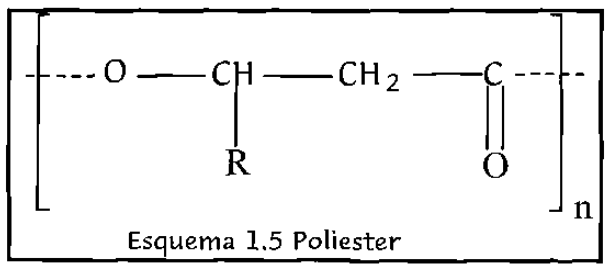
en la forma de azúcar-nucleótidos-fosfatados, los cuales se unen secuencialmente a un lípido isoprenoide conocido también como lípido portador de antígeno (LPA) en donde se sintetizan las unidades monoméricas que son transferidas a otro lípido isoprenoide para iniciar la polimerización. El lípido también sirve como transportador del polímero formado a través de la membrana celular de donde es liberado. En este procedimiento existen varias posibilidades de control biosintético; la forma de incorporación del sustrato, y la disponibilidad de precursores como la UDP-glucosa o el lípido isoprenoide. Existe otra síntesis de polisacáridos, la cual consiste de procesos de acoplamiento de unidades repetitivas utilizando un lípido intermediario. Este mecanismo parece ser utilizado en la síntesis de polímeros extracelulares. Todavía no se tiene completamente establecido el mecanismo de terminación de la polimerización, y en algunos casos el polisacárido contiene substituyentes ácidos o cetálicos que dan ciertas características reológicas especiales al polisacárido en solución. El mecanismo exacto de excreción también no es conocido totalmente y puede constituir otro nivel de control de la biosíntesis de polisacáridos.[26, 6,33]

Entre los polisacáridos de origen microbiano podemos encontrar una gran variedad de biopolímeros, los cuáles podemos clasificar en :

a)-. Inclusiones intracelulares

b)-. Polisacáridos extracelulares.

Entre los polisacáridos intracelulares se encuentran algunos que tienen interés industrial como los polihidroxialkanoatos (PHA), polihidroxibutiratos (PHB), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) etc., los cuales tienen la característica común de ser poliésteres (esquema 1.5) [3,8.33]



Esquema 1.5 Poliester

Estos poliésteres se encuentran como reservorío intracelular en una gran variedad de bacterias, entre las cuales podemos citar a *Alcaligenes eutrophus, Azotobacter methylotrophs,*[34] *etc.*

Los primeros poliésteres fueron observados primeramente por Lemoigne en 1925[3,35] en donde los trabajos en esta área en la década de los 60´s y 70´s a través de varios laboratorios, llevó al entendimiento de su síntesis, rutas metabólicas y regulación metabólica de PHB y PHA.

Estos poliésteres han sido producidos desde 1982[19] como poliésteres biodegradables que han venido a ser utilizados como substituyentes de los plásticos derivados del petróleo, exhibiendo un amplio rango de propiedades termomécanicas.[19,3,34,35]

Existen reportes acerca de que bacterias, algas, hongos y levaduras suelen producir polisacáridos extracelulares con diferentes estructuras químicas y propiedades físicas.[26,6] Estos exopolisacáridos producidos por microorganismos presentan un carácter hidrofílico predominante, esto es debido a que su estructura esta compuesta por grupos -OH, $-NH_2$,-COOH, -O-, -SH, etc. Como consecuencia, su uso industrial esta más extendido en su capacidad para modificar las propiedades reológicas de sistemas acuosos[6,8,26], adicionalmente estos microorganismos son capaces de sobrevivir en condiciones extremas adversas, ya que su presencia ha sido encontrada en altas concentraciones de sales, aguas alcalinas y ácidas en donde ellos proliferan.[17]

todavía no es completamente clara la síntesis, pero es aceptado que la síntesis de exopolisacárido juega un rol importante en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos en un amplio rango de condiciones.[6,26,5] en donde las funciones que presentan la formación de exopolisacáridos por los microorganismos son las siguientes; autoprotección contra la desecación, protección contra depredadores, barrera para la difusión envolviendo o uniendo los iones metálicos, adhesión a superficies sólidas. [5,17]

Algunas de las características intrínsecas de los polisacáridos microbianos son : [20,5]

1-. Alta viscosidad a bajas concentraciones.

2-. Propiedades gelantes.

3-. Compatibilidad con altas concentraciones de sales.

4-. Alta solubilidad en agua y conducta anticongelante.

5-. Polielectrolito y potencial de intercambio iónico.

6-. Capacidad floculante, dispersante y versatilidad de adhesión.

7-. Biodegradabilidad.

En general, podemos decir que las propiedades de los exopolisacáridos dependen principalmente de la rigidez de la estructura molecular que pueda adoptar el biopolímero.[2,610] Adicionalmente podemos mencionar que se encuentran microorganismos que producen dos tipos de gomas extracelulares; las que forman una capa alrededor del microorganismo o capsulares, y aquellas que se solubilizan en el medio de cultivo incrementando, sustancialmente, la viscosidad del caldo de fermentación.[26,2]

Definida de manera convencional una goma es un material polimérico que puede disolverse o dispersarse en agua para formar soluciones, suspensiones de alta viscosidad o geles.

Las gomas las podemos clasificar en tres grupos :

Gomas naturales : Provenientes de exudados de arboles (arábiga, tragacanto, etc.), extractos de semillas (guar, algarrobo), algas marinas (agar, alginatos, carragenina), proteínas animales (gelatina, caseína), proteínas vegetales (soya), y gomas microbianas (dextrana, xantana).[26]

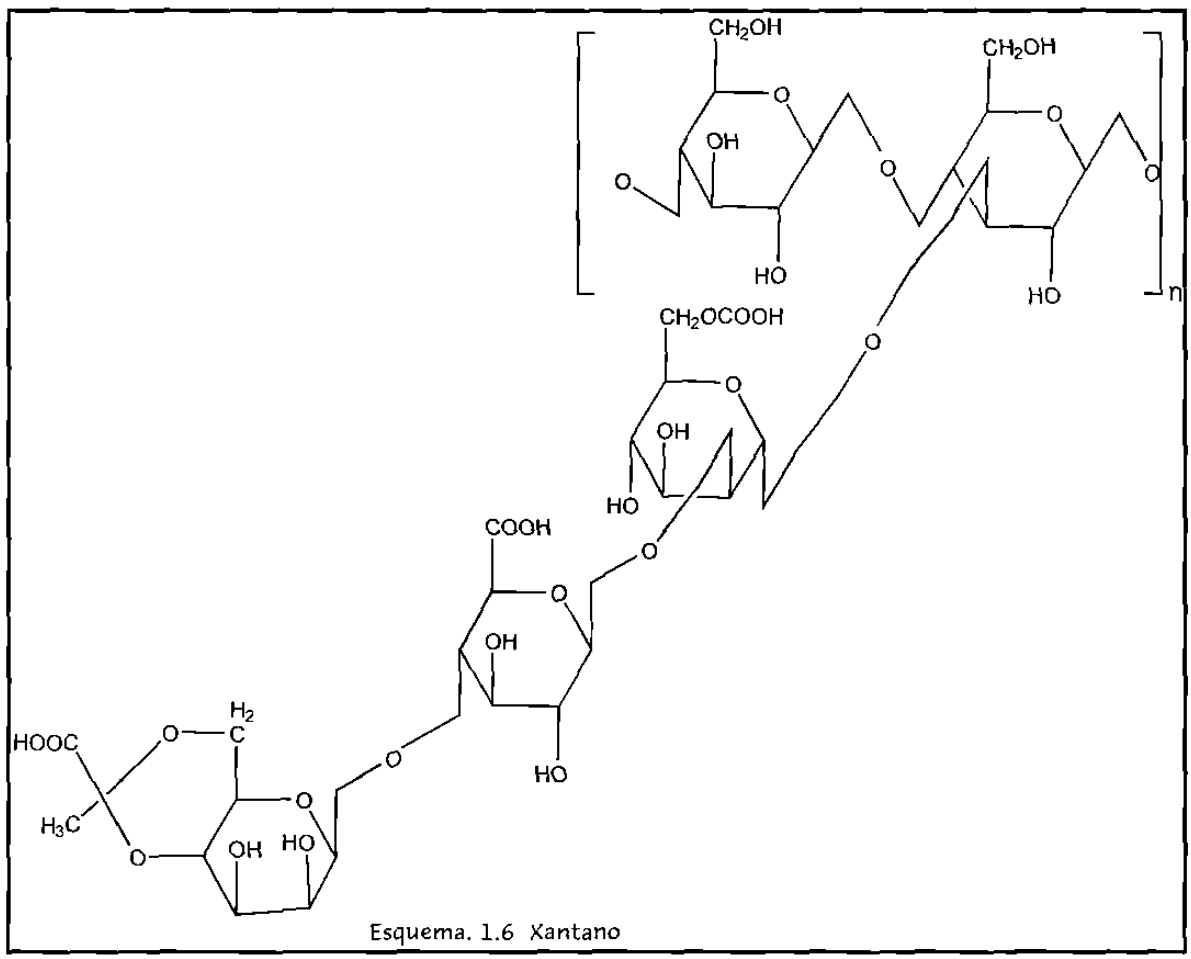
Gomas modificadas o semisintéticas : Derivados de las celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa), almidones (acetatos de almidón, dextrinas).

Gomas sintéticas : Derivados petroquímicos tales como , sales del ácido poliacrílico, polietilenglicol, polivinilpirrolidina.

Su uso industrialmente se debe principalmente a su capacidad de alterar las propiedades de flujo de sistemas acuosos, ya sea como viscosificante, gelificante ó agentes de suspensión.[20,26,30] También se ha encontrado que algunos microorganismos (bacterias de silicato), productores de exopolisacáridos (principalmente heteropolisacáridos), mejoran las propiedades de las arcillas debido a que el exopolisacárido unido a la arcilla actúa como resina durante el quemado[18].

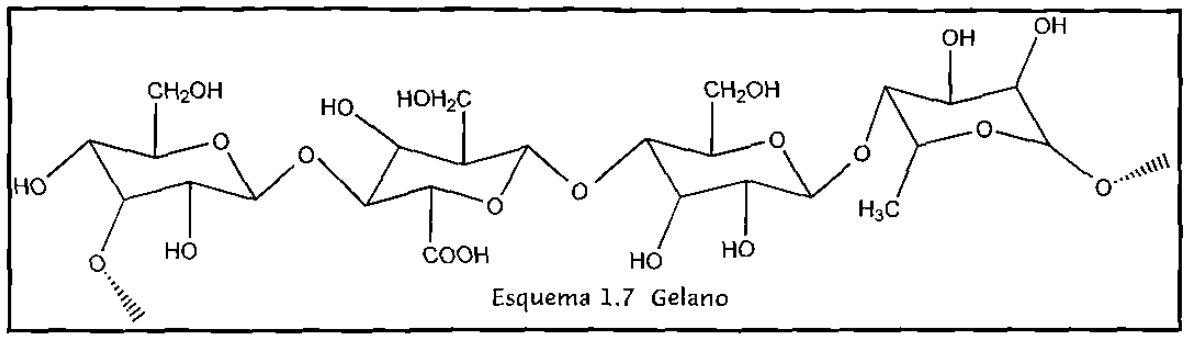
El primer exopolisacárido producido comercialmente fue la goma de xantano, la cual es obtenida de *Xanthomonas campestri* siendo un polímero ramificado con unidades monoméricas de glucosa, manosa y ácido glucurónico[2,9,26] (esquema 1.6).

Este es quizás el polisacárido que ha sido sujeto a mayor cantidad de estudios relacionados con sus propiedades físicas y estructura química, siendo producido a escala industrial y utilizada como aditivo espesante y gelificante en los alimentos, en cerámica para suspender los componentes de los barnices, en la industria textil para evitar que se corran los colorantes, y en la industria farmacéutica y cosmética como agente estabilizante de medicamentos y texturizador de cosméticos.[20, 21,26]




Esquema. 1.6 Xantano

Entre otros exopolisacáridos producidos por microorganismos podemos mencionar a la goma de gelano[16] (esquema 1.8) producido por *Pseudomona elodea,* [2,6] el cual es un exopolisacárido iónico de gran interés industrial debido a las propiedades reológicas que presenta en soluciones acuosas. El pululan es un polisacárido producido a partir del almidón por una levadura llamada *Aureobasidium pullulans,* mientras que el microorganismo *Alcaligenes faecalis varmyxogenes* produce una goma llamada curdlano .[2,6]



Esquema 1.7 Gelano

Todos los polisacáridos producidos por microorganismo tienen también otras aplicaciones futuristas en el área medica tales como ser utilizados para la formación de injertos vasculares.[3,6] Otro rol importante que juegan los biopolímeros es el de actuar como depresante ya que separa selectivamente minerales de otros minerales. Hay numerosos reportes sobre la aplicación de carboximetilcelulosa ( CMC ) como depresante para talco y otros minerales de magnesia presentes como impurezas en varios minerales de sulfito.[11]

El presente trabajo tiene como objetivo la obtención de exopolisacáridos a partir de fuentes microbianas, debido a que se ha observado que los exopolisacáridos dentro de sus características intrínsecas tienen gran adhesividad a sustratos sólidos, gracias a que contiene grupos hidrofílicos que forman parte de su estructura, resultando por lo tanto atractiva y concebible su utilización en ciertos materiales sólidos con la finalidad de mejorar ciertas propiedades o de protegerlos contra condiciones naturales adversas. Adicionalmente su estructura esta compuesta de grupos glucosídicos principalmente, permitiéndole a los exopolisacáridos modificar las propiedades reológicas de ciertas soluciones acuosas ya sea por gelación o por cambios en su flujo característico, adicionalmente, el de saber cuanto calcio y magnesio se llega a incorporar en la red del biopolímero ya que algunos reportes de investigadores dan por hecho que la gelación de algunos biopolímeros se debe a la atracción electrostática que se genera entre los grupos funcionales carboxilatos sobre el polisacárido y los iones divalentes resultando en un efecto de puenteos y entrecruzamientos entre las cadenas de polímeros, impartiendo mayor estabilidad a la película y mayor resistencia al corte; estas características permiten la utilización en diferentes áreas, como, por ejemplo, el de ser un agente que mejora el control en el recubrimientos de aceites, y en la industria petrolera para mejorar la extracción de aceites, en los fluidos de perforación tiene el objetivo de reducir la viscosidad a altas velocidades de corte necesarias para lubricar la barrena durante la perforación.[20, 21, 26]

Todo esto constituye un buen ejemplo de como una sustancia de origen biológico puede ser producida y manipulada para su utilización industrial.[12] El fin de utilizar y producir biopolímeros de origen microbiano radica en la ventaja de que su producción no depende de condiciones climáticas ni de recolección, y si en la factibilidad de utilizar varias materias primas para su producción. Además de contar con mayor uniformidad en sus propiedades, pureza y características intrínsecas, puesto que su biosíntesis es en general muy especifica. Todo esto aunado a que los biopolímeros de origen animal y vegetal son fuentes agotables y su recuperación tardaría mas tiempo en comparación de los producidos y obtenidos por los microorganismos, los cuales son fuentes renovables, sin embargo, hasta este momento la mayor desventaja que tiene la producción de biopolímeros mediante microorganismos es el alto costo de obtención.

Nuestro principal interés en este trabajo es estudiar las características de un polímero encontrado en la industria de alimentos como contaminante de los equipos usados en la producción o envasado de alimentos, que es producido durante la formación de un biofilm por el crecimiento de microorganismos contaminantes, que presenta problemas de disolución o destrucción por parte de las sustancias químicas que regularmente son utilizadas como detergentes o desinfectantes en este tipo de industria.

## 1.1 OBJETIVOS.

1-. Obtener exopolisacárido mediante una fermentación simple.

2-. Seguir algunos parámetros físicos y químicos de la formación del exopolisacárido.

3-. Estudiar el exopolisacárido mediante diferentes técnicas de caracterización.

4-. Estudiar sus propiedades reológicas del exopolisacárido

# CAPITULO 2

# MATERIALES Y METODOS

# 2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

## 2.1 DESCRIPCIÓN DE EQUIPOS Y REACTIVOS.

### 2.1.1 REACTIVOS.

| FORMULA | NOMBRE | MARCA | PUREZA(%) |
|---|---|---|---|
| $HOCH_2CH(CHOH)O$ | Dextrosa anhidra. | Baker Analyzed | |
| $Na_2MoO_4 .2H_2O$ | Molibdato de sodio dihidratado | Mallinckrodt Chemical | 99-102 |
| $CaCl_2 .2H_2O$ | Cloruro de calcio dihidratado | PQM | 97.3 |
| $FeSO_4 .7H_2O$ | Sulfato de fierro heptahidratado | CTR | 99 |
| $MnSO_4 .H_2O$ | Sulfato de manganeso hidratado | PQM | 98-100 |
| $CaSO_4 .2H_2O$ | Sulfato de calcio dihidratado | Mallinckrodt Chemical | 99.2 |
| $ZnSO_4 .7H_2O$ | Sulfato de zinc heptahidratado | PQM | 99 |
| $MgSO_4 .7H_2O$ | Sulfato de magnesio heptahidratado | Baker Analyzed | 100 |
| $KNaC_4H_4O_6 .4 H_2O$ | Tartrato de sodio y potasio heptahidratado | J.T. Baker | 100 |
| NaOH | Hidróxido de sodio | Baker Analyzed | 97.1 |
| $C_7H_4N_2O_7$ | Ácido 3,5 DNS | Sigma | |

| FORMULA | NOMBRE | MARCA | PUREZA (%) |
|---|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | Fosfato ácido de dipotasio | P.Q.M | 98.6 |
| $CH_3CH_2OH$ | Etanol | C.T.R | 99.5 |
| $CaCl_2$ | Cloruro de calcio | Baker Analyzed | 99 |
| $NH_4OH$ | Hidróxido de amonio | Baker Analyzed | 28.9 |
| $CH_3CN$ | Acetonitrilo | Aldrich | 99.9 |
| $(CH_3)_2SO$ | Dimetilsulfoxido | P.Q.M | 99.8 |
| $C_3H_7NO$ | NN-dimetilformamida | Merck | 99 |
| $C_2H_8O$ | Tetrahidrofurano | Aldrich | 99.1 |
| | Medio MRVP | Bioxon | |
| | Extracto de levadura | Bioxon | |
| | Caldo nutritivo | Bioxon | |
| | Agar citrato de simmons | Difco | |
| | Agar para Pseudomonas | Difco | |
| | Agar doble azúcar russell | Difco | |

2.1.2 EQUIPOS.

| NOMBRE | MARCA |
|---|---|
| pH-metro | Beckman 50pH meter |
| Centrífuga | Baxter Medifuge 3632 |
| Agitador | Lab-line Instruments 3518 |
| Microscopio | Leitz |
| Espectrofotómetro UV-VIS | Perkin-Elmer Lambda 12 |
| Balanza analítica | Sartorius basic BA 160p |
| Espectrófotometro de A.A. | Varían SpectrAA |
| Viscosímetro | Brookfield THA |
| Microferm®Fermentor | New Brunswick |
| Espectrofotómetro de RMN | Bruker amx serie 400 |
| Analizador térmico TGA/DTA | TA Instruments 2100 |
| Espectrofotómetro FT-IR. | Perkin-Elmer Paragon 1000 c |
| Espectrofotómetro UV/VIS | Coleman junior II 6/20 |

## 2.2 OBTENCIÓN DEL MICROORGANISMO.

El cultivo se obtuvo a raíz de un problema industrial, en el cual se observaba la producción de una alta viscosidad, desarrollada a partir del crecimiento de microorganismos sobre una fuente carbonada residual y en períodos cortos de tiempo ; esta viscosidad sugiere una alta acumulación de exopolisacáridos, los cuales son producidos y excretados por los microorganismos como mecanismo de supervivencia y destoxificación, ya que éste es expuesto a diferentes concentraciones de ácidos y bases para disolverlo durante los procesos de saneamiento, lo cual no es logrado totalmente, por este motivo se generó el interés de producirlo a nivel laboratorio para evaluar sus propiedades reológicas y posible aplicación en materiales cerámicos. Los microorganismos se aislaron y se identificaron como un bacilo gram negativo del genero *Klebsiella pneumoniae.*

## 2.3 DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO EMPLEADO.

El diseño del medio de cultivo líquido se llevo a cabo buscando la acumulación de exopolisacárido y no de crecimiento celular, lográndose este objetivo mediante una relación de fuente carbonada mayor que la fuente nitrogenada, debido a que es bien conocido que muchos microorganismos aerobios y anaerobios acumulan exopolisacárido bajo condiciones de limitación de nutrientes y con una adecuada fuente de carbono.[2,6,10]

Este efecto se debe a una seria limitación de material nutritivo que afecta los procesos fisiológicos y bioquímicos normales del microorganismo, el cual se ve obligado a secretar exopolisacárido como medio de supervivencia a fluctuaciones de temperatura, desecación, protección contra compuestos tóxicos, depredación y resistencia a ataques químicos y físicos.[2,6] Asimismo, otro efecto que se observa por la limitación de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo es que la enzima depolimerasa esta ausente, esto debido a que las vías biosintéticas de aminoácidos se ven afectadas con la consecuente supresión de la actividad de la enzima depolimerasa, la cual, si estuviera presente, rompería los enlaces de polisacáridos evitando la formación y acumulación de exopolisacárido.[3,5,6] El medio de cultivo contiene otros nutrientes como fosfatos, los cuáles son una fuente de energía por lo que tiene un marcado efecto en el crecimiento celular. La producción de exopolisacáridos se da a bajas concentraciones de fosfatos, ya que, un alto contenido originaría que la producción de exopolisacárido decreciera considerablemente[10] ; también se tiene reportado que medios con bajas concentraciones o deficiencias de fosfatos poseen la particularidad de originar soluciones ligeramente ácidas (pH 5.6-4.5), en algunas fermentaciones, pero en general la acidificación de las soluciones originaria una disminución de la viscosidad.[12] Adicionalmente, se ha observado que el contenido de $Mgso_4.7H_2O$ tiene un marcado incremento en la producción de exopolisacárido en concentraciones que van de 0.1-0.3 g/l de acuerdo con lo reportado en bibliografía. [10]

## 2.4 FUNCIÓN DE LOS MICRONUTRIENTES.

Se ha observado que la función de los micronutrientes sobre el crecimiento bacterial y la formación de exopolisacárido tiene un efecto marcado. Altas concentraciones de las sales inorgánicas incrementan el crecimiento celular disminuyendo simultáneamente la formación de exopolisacárido[10] ; por otro lado, se ha observado que la adición de sales inorgánicas divalentes tienen un efecto marcado en la gelación de los biopolímeros, ya que la atracción electrostática que se genera por la interacción entre los grupos funcionales y los cationes divalentes da como resultado un efecto de puenteo entre las cadenas poliméricas generando entrecruzamientos, dando ambos efectos: que la película biopolimérica se estabilice haciéndola más resistente al corte; y a los ataques químicos y físicos.[26] Por esta razón se genero el interés de conocer cuanto calcio y magnesio se integra a la red polimérica.

## 2.5 COMPOSICIÓN DEL MEDIO EMPLEADO.[12]

| REACTIVOS | PESO (g/L) |
|---|---|
| Glucosa | 25 g |
| Extracto de levadura | 3 g |
| Fosfato ácido de dipotasio | 2 g |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 0.1 g |
| Solución trazas (micronutrientes) | 3.5 ml |
| Agua desionizada | 1000 ml |

## 2.6 COMPOSICIÓN DE LOS MICRONUTRIENTES.[12]

| REACTIVOS | PESO (g/L) |
|---|---|
| Sulfato de zinc heptahidratado | 0.718 g |
| Cloruro de calcio dihidratado | 0.368 g |
| Molibdato de sodio dihidratado | 0.554 g |
| Sulfato ferroso heptahidratado | 0.696 g |
| Sulfato de manganeso hidratado | 0.422 g |
| Sulfato de calcio dihidratado | 0.494 g |

## 2.7 ESCALAMIENTO.

En términos comunes, podemos decir que el escalamiento es una técnica y metodología compleja empleada para transferir la producción a gran escala en la cual varios parámetros físicos, y biológicos se ven afectados a partir de un proceso de fermentación desarrollado en pequeño dentro del sistema como por ejemplo ; transferencia de masa y calor, características de mezclado, requerimientos de la potencia de agitación, respuesta del microorganismo etc., por lo que hace que el escalamiento sea altamente interdisciplinario requiriendo la combinación y el uso integrado de conceptos y metodologías de ingeniería química y fisiología celular los cuales son críticos al realizar un escalamiento , de esta manera el estudio de las fermentaciones dará más respuestas sobre la fisiología y bioquímica celular.[21,22,23,26]

El escalamiento que se llevo a cabo en este trabajo de investigación se ilustra en la figura 2.1, mientras que los parámetros que se controlaron al inicio de la fermentación se ilustra en la tabla 2.1

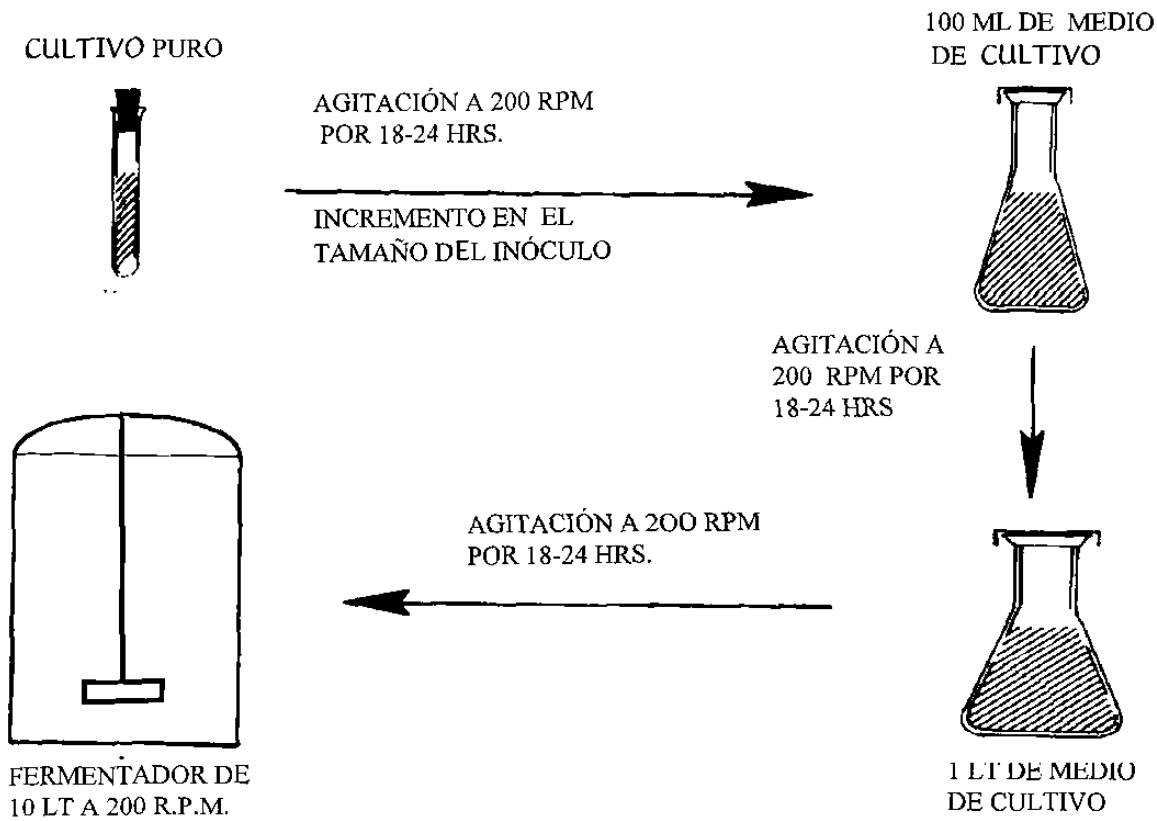



Fig 2.1 Diagrama de flujo de la fermentación batch para la producción de exopolisacárido.

## 2.8 PROCESO DE FERMENTACIÓN.

La fermentación para la producción de exopolisacáridos envuelve un estricto balance del proceso metabólico para la generación de ATP en la cual los compuestos orgánicos sirven como donadores de electrones (oxidándose) y como aceptores de electrones (reduciéndose) ; los compuestos que desarrollan estas dos funciones son por lo regular dos compuestos diferentes que provienen de un solo substrato fermentable (como un azúcar). Por lo que hace a los carbohidratos los principales substratos de las fermentaciones, así como también pueden ser ácidos orgánicos, aminoácidos, etc. [21,22] El equipo de fermentación tipo batch que se utilizo para llevar a cabo la producción de exopolisacárido se realizó en un recipiente de vidrio equipado con suministro de aire estéril, agitación mecánica, medición de pH y con una capacidad de volumen total de 14 lts. Estudios realizados por investigadores afirman que su característica más importante, es el cambio sustancial en el comportamiento reológico del caldo durante el cultivo, cambio muy importante ya que afecta parámetros críticos de la fermentación.[26,12] El proceso fermentativo llevado a cabo se realizó con un volumen de 10 lts de medio de cultivo, seguido de esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos ; seguido por una fase de enfriamiento lento (12-24 hrs). La inoculación fue realizada a partir de un cultivo puro y joven, el cual proviene de un proceso de escalamientos sucesivos con la misma composición del medio de cultivo como se señala en la figura 2.1

En donde al final el inóculo es añadido en el medio de cultivo final con todas las precauciones de asepsia para evitar posibles contaminaciones. Posteriormente, se procedió a establecer las condiciones de la fermentación, las cuales se presentan en la tabla 2.1 Durante el tiempo de fermentación se siguieron parámetros como crecimiento celular, concentración de azúcares reductores, pH y obtención de exopolisacáridos. [21, 22,23] La obtención de los resultados de los parámetros abajo mencionados se obtuvieron tomando muestras de 200 ml del fermentador en condiciones de asepsia total mediante la introducción de aire estéril al fermentador (el aire pasa a través de un filtro relleno con algodón y fibra de vidrio previamente esterilizado), realizando una presión mayor de entrada de aire al interior del fermentador para poder obtener la muestra, recogiéndolas en matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml en un tiempo menor de 1 minuto.

Tabla 2.1 parámetros al inicio de la fermentación.

| PARAMETROS | CONDICIÓN |
|---|---|
| Volumen del medio | 10 lts |
| Agitación | 200 r.p.m. |
| Temperatura | Constante |
| Aireación | No |

En la fase exponencial ( A ), también conocida como crecimiento continuo, las células están en una reproducción o fisión máxima constante en donde se sintetiza nuevo material celular a velocidad máxima, y en donde el número de células se incrementa en relación linear con el tiempo. En esta fase, el conteo de células viables equivale al conteo total de células jóvenes debido a que relativamente se encuentran pocas células muertas. La fase de desaceleración ( B ) se caracteriza debido a que el número de células vivas generadas por escisión ya no es linear debido a que el microorganismo empieza a encontrar dificultades como lo son escasez de nutrientes, acumulación de sustancias tóxicas para el microorganismo y cambios de pH, simultáneamente, la transferencia de energía empieza a decrecer por lo que el rango sostenido de multiplicación empieza a decaer. En la fase estacionaria ( C ), se observa una línea horizontal en la cual se puede decir que el número de células vivas y muertas están balanceadas, debido al agotamiento de nutrientes y mayor aparición de sustancias tóxicas para el microorganismo. La fase de muerte ( D ) se presenta como una línea exponencial a la inversa de lo que sucede durante la fase logarítmica de desarrollo en donde gran variedad de condiciones contribuyen a la muerte de las células, siendo una de las más importantes el agotamiento de las sustancias nutritivas esenciales, y la acumulación de productos inhibidores. En este periodo las bacterias mueren a diferentes tiempos de la misma manera que lo hacen al desarrollarse.[21, 23]

## 2.9 CURVA DE CRECIMIENTO.

Si se inocula un medio líquido con células microbianas jóvenes tomadas de una cepa, y se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo midiendo su crecimiento celular mediante técnicas espectrofotométricas (turbidez) y se traza una gráfica a los diferentes tiempos, se obtiene una curva de crecimiento. Los método utilizados para medir un crecimiento celular en un medio líquido se pueden realizar por métodos directos e indirectos. El método directo es aquel que puede estimar el número de células en un volumen definido. Mientras que el método indirecto (turbidimétrico), utilizado en la realización de este trabajo, mide la turbidez generada en el medio de cultivo por la acumulación ó crecimiento celular. Este método se utilizó por ser rápido y simple, aunque esta sujeto a errores debido a la variación en tamaño y forma de la célula . En este trabajo se midió la turbidez que se genera en el medio de cultivo por el crecimiento celular y se midió como porcentaje de transmitancia en un espectrofotómetro UV/VIS Coleman Junior II modelo 6/20 a $\lambda$=540 nm calibrando a 0 y 100 % de transmitancia utilizando medio de cultivo estéril como blanco. Una gráfica de una curva de crecimiento se presenta en la figura 2.2 La curva de crecimiento no presenta fase "lag" ó logarítmica de desarrollo debido a que procede de un escalamiento en el cual las células ya se adaptaron al medio de cultivo, y por lo tanto hay acumulación de enzimas y metabolitos secundarios que permiten una fase sostenida de crecimiento.

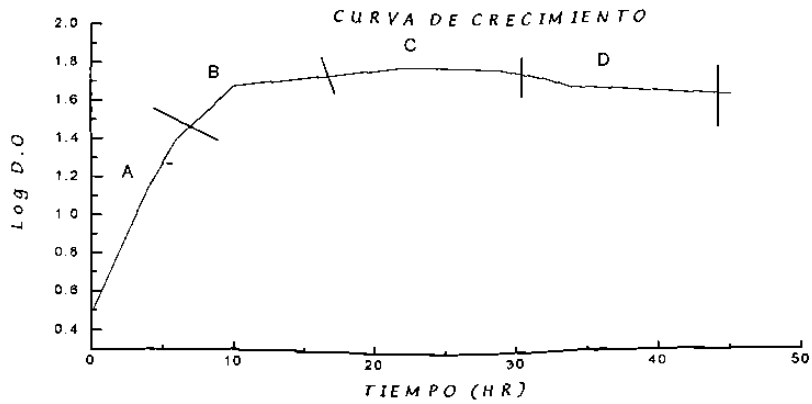



Fig. 2.2 Curva de crecimiento típica de un proceso fermentativo de los microorganismos.

## 2.10 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (METODÓ ACIDÓ 3,5-DINITROSALICÍLICO ).

Este método analítico empleado es de suma utilidad en el proceso fermentativo ya que nos da la concentración de azúcar que se esta consumiendo (azúcar reductor) ; esto es, conociendo la concentración inicial de azúcar que hay en el medio de cultivo y conforme sigue la fermentación se toman muestras a determinados tiempos y se realiza una gráfica de absorbancia contra tiempo, monitoreando el consumo de azúcar por el microorganismo. La metodología empleada es la siguiente :

1-. Las muestras líquidas se centrifugan a 3000 rpm/15 min. para separar el paquete celular del sobrenadante.

2-. Del sobrenadante obtenido se toma 1 ml para determinar azúcares reductores.

2.10.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

SOLUCIÓN A-. Diluir por calentamiento 150g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada.

SOLUCIÓN B-. Preparar una solución de NaOH 2N, agregar posteriormente 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y diluir mediante calor constante.

Mezclar las soluciones A y B y aforar a 500 ml con agua destilada.

2.10.2 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

A-. De una solución patrón de dextrosa anhidra 0.01 M (180mg/100 ml de agua destilada), preparar los siguientes estándares :

Tabla.2.2 Estándares para azúcares reductores mediante el método ácido 3,5-DNS.

| GLUCOSA (ml) | AGUA (ml) | CONC (µm/ml) | CONC. (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 1 | 180 |
| 2 | 8 | 2 | 360 |
| 3 | 7 | 3 | 540 |
| 4 | 6 | 4 | 720 |
| 5 | 5 | 5 | 900 |
| 6 | 4 | 6 | 1080 |
| 7 | 3 | 7 | 1260 |
| 8 | 2 | 8 | 1440 |
| 9 | 1 | 9 | 1620 |
| 0 | 1 | BCO | 0 |

B-. Tomar 1 ml de cada concentración y pasar a un tubo de 13x100 y añadir 1 ml del reactivo 3,5-DNS calentar los tubos a ebullición en baño de temperatura por 5 minutos e inmediatamente pasar a baño de agua helada, añadir 2 ml de agua destilada y agitar.

C-. Leer en espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer a $\lambda$= 540 nm.

D-. Graficar absorbancia contra concentración.

2.10.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

I-. De los sobrenadantes se tomó 1 ml de cada muestra y se aforo a 50 ml con agua desionizada.

II-. Posteriormente se prosiguió la metodología igual que los estándares.

III-. Interpolar y obtener las concentraciones ya sea en µm/ml o µg /ml.

2.11 DETERMINACIÓN DEL pH.

Las mediciones de pH se llevaron a cabo con un pH-metro Beckman con electrodo de calomel ajustando el pHmetro a pH 4 y 7 con soluciones standares. A las muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo se les determinó el pH inmediatamente desde el inicio de la fermentación hasta el final de la misma ; así como también al medio de cultivo sin inocular. Cabe señalar que la producción de exopolisacárido en el medio de cultivo no estuvo bajo control de pH, pero, reportes de algunos investigadores indican que existe mayor producción cuando se controla el pH.[12] Los datos obtenidos a los diferentes intervalos de tiempo se graficaron a los diferentes tiempos de las de las muestras obtenidas.

## 2.12 OBTENCIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO.

Durante el seguimiento de la fermentación se tomaron 3 volúmenes grandes de muestras de medio de cultivo a diferentes tiempos como se indica en la tabla 2.3 Así como también volúmenes pequeños (100 ml), esto se realizo para observar si había un aumento en la acumulación de exopolisacárido.

Tabla 2.3 Tiempos de toma de muestras(vol.)

| TIEMPO (HR) | VOLUMEN MEDIO (Lt) |
|---|---|
| 3 | 2 |
| 15 | 2 |
| 24 | 1 |

Estas muestras se obtuvieron introduciendo aire (el cual pasa por un filtro relleno con fibra de vidrio y algodón estéril) al tanque fermentador y recogiendo las muestras en un matraz de 5 litros de capacidad. Posteriormente, se colocó en un recipiente etanol frío al 99.5 % en una relación de tres veces mayor que el volumen del medio de cultivo, seguido de la transferencia de el medio de cultivo en el etanol, observándose en poco tiempo precipitación (flotación) del biopolímero en forma de nata de color blanco. Inmediatamente se procedió a obtener el biopolímero ayudándose de pinzas, e inmediatamente se puso a secar a vacío por 24 hrs, a temperatura ambiente. El material obtenido se reflujo con etanol al 99.5 % por 72 hrs.

Este paso se diseño para purificar el biopolímero ya que en bibliografía el paso de purificación del biopolímero es mediante diálisis con un cierto tamaño de poro y de cierto peso molecular pero no contamos con esta técnica y procedimos a utilizar la arriba mencionada.

La fermentación se llevo a cabo utilizando un fermentador Microferm®Fermentor modelo New Brunwick en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas en el Departamento de Microbiología.

Después de cumplir el tiempo de reflujo se procedió a secar a vacío por 24 hrs como se muestra en el diagrama de flujo figura 2.2

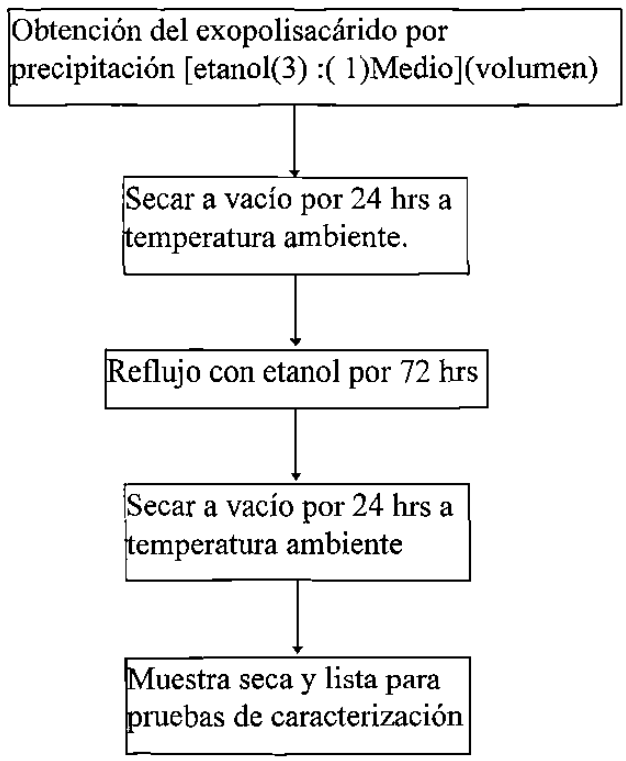



Fig. 2.3 Diagrama de flujo de la obtención del exopolisacárido.

## 2.13 TECNICAS INSTRUMENTALES DE CARACTERIZACIÓN.

La caracterización estructural de los polímeros usualmente requiere de una combinación de diferentes técnicas y métodos analíticos tales como TGA, DTA, RMN de $H^1$ Y $C^{13}$, COSY, HPLC, GC, Difracción de Rayos-X en polvos, TMA, viscosidad intrínseca, propiedades reológicas, análisis elemental, microscopía electrónica, absorción atómica, etc.. Estos métodos pueden proporcionar información más detallada sobre la estructura y conformación de los polímeros de gran valor para la investigación.[20]

### 2.13.1 ANÁLISIS DEL EXOPOLISACÁRIDO POR FT-IR.

La radiación de infrarrojo se refiere a una región del espectro electromagnético entre el visible y la región de microondas. El espectro de IR permite a los químicos obtener información estructural de los grupos funcionales que lo componen.

La teoría de la radiación de infrarrojo nos dice que frecuencias entre 10000-400 $cm^{-1}$ es absorbida y convertida por una molécula orgánica en energía de vibración molecular en donde esta absorción es cuantizada ; lo cual genera un espectro de bandas, por lo que la frecuencia o longitud de onda de absorción dependerá de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces y de la geometría del átomo .

La posición de las bandas en el espectro de IR es presentada como numero de onda (v) cuyas unidades es el recíproco del centímetro ($cm^{-1}$), siendo esta unidad proporcional a la energía de vibración. La intensidad de las bandas puede se expresada como transmitancia (T) o absorbancia (A) en donde la transmitancia es la fracción de la energía radiante incidente que transmite o emite la muestra, a menudo se expresa como %T y, la absorbancia es el logaritmo de base 10 de el recíproco de la transmitancia

$$A=\log_{10}(1/T).$$

Dependiendo de la región del espectro en que estemos trabajando, es factible caracterizar una sustancia tomando los siguientes parámetros:

- En la región del infrarrojo cercano (12500 hasta los 4000$cm^{-1}$) se encuentran diferentes bandas de absorción resultantes de sobretonos armónicos de bandas fundamentales y combinadas que se relacionan con átomos de hidrogeno.
- En la región del infrarrojo medio de 4000-1300 $cm^{-1}$ existen dos tipos principales de bandas, la primera corresponde a interacciones diátomicas, esto se refiere a que las bandas de absorción se ven afectadas debido a otras influencias estructurales.
- La segunda región es conocida como la región de huellas dactilares se encuentra en la región de 1300-650 $cm^{-1}$ , en esta zona es factible identificar enlace tipo S=O, C=C, C=O, C=N, etc..
- La región del infrarrojo lejano (667-10 $cm^{-1}$) es adecuada para el estudio de compuestos inorgánicos y organometálicos cuyos átomos sean pesados y con enlaces débiles.[24]

En el presente trabajo se utilizó la espectroscopia de infrarrojo utilizando un Paragon FT-IR 1000 PC de Perkin Elmer para seguir cualitativamente la formación del biopolímero y realizar comparaciones con standares de una base de datos de polímeros. Este método analítico se utilizó para obtener los posibles grupos funcionales con los que cuenta la estructura y compararlos con otros exopolisacárido ya reportadas en literatura. Se realizaron pastillas de KBr con el material seco de exopolisacárido colocando ambas sustancias en un mortero de ágata y procediendo a moler y uniformizar, posteriormente se colocó el polvo en un dado para hacer las pastillas y se le aplico presión (1700 psi) y vacío dejándolo por 7-10 min. La pastilla se colocó en un portamuestra y se procedió a correr la muestra.

### 2.13.2 ANÁLISIS DEL EXOPOLISACÁRIDO POR RMN.

La resonancia magnética nuclear es básicamente otra forma de espectrofotometría de absorción similar a IR o UV. Una muestra bajo condiciones apropiadas en un campo magnético puede absorber radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia gobernada por las características de la muestra en donde las propiedades fundamentales de un átomo son : la masa, la carga, y el giro del electrón. Siendo esta última representada con el símbolo I, el cual puede tener valores de 0,1/2, 1,3/2, en donde el valor real de I depende del núcleo en particular.

Una característica de los núcleos es que poseen carga positiva, esta carga da vueltas sobre el eje nuclear generando un campo magnético. Los núcleos que tienen un giro de $I \neq 0$ poseerán un momento dipolar magnético ($\mu$), cuando estos núcleos se colocan entre los polos de un magneto externo, la energía de interacción está dada por :

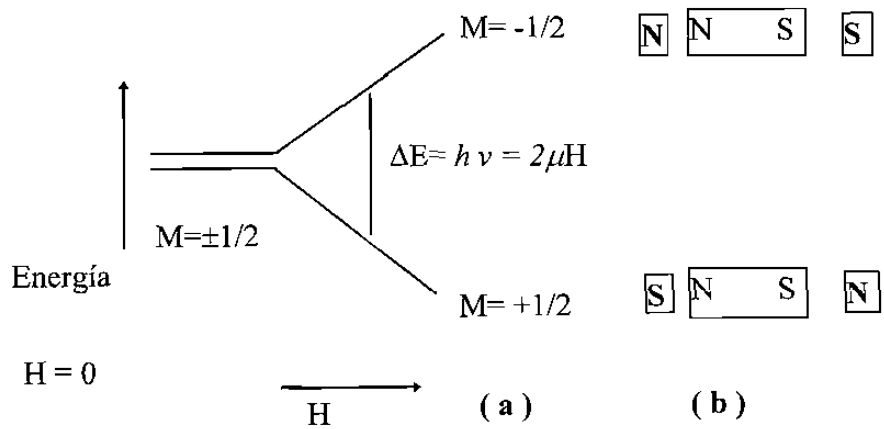
$$E = -\mu H \cos \theta$$

Donde H es el campo magnético externo y $\theta$ el ángulo entre los vectores $\mu$ y H. El signo menos indica que la interacción es de atracción. El ángulo $\theta$ puede tener cualquier valor, por lo tanto E varía continuamente. La mecánica cuántica limita a $\mu$ en el campo magnético a ciertas orientaciones permitidas que se caracterizan por el número cuántico del giro nuclear $M = \pm ½$ por lo tanto la energía está dada por :

$$E = -\mu/I\ HM$$

En ausencia del campo magnético, esto es $H = 0$, estas dos orientaciones son equivalentes en energía.

En la siguiente representación se ve la separación de los niveles (a) y su análogo básico (b).



Ahora bien, si el núcleo se irradia con la frecuencia adecuada tal que puede inducirse la transición del nivel inferior al superior, se obtiene el fenómeno que se conoce con el nombre de resonancia magnética nuclear (RMN).[24] En la tabla 2.4 se da una lista de algunos núcleos en los que es aplicable la técnica de RMN.

Tabla 2.4 Núcleos adecuados para estudio de RMN.

| ISÓTOPO | GIRO NUCLEAR (I) | ABUNDANCIA NATURAL (%) |
|---|---|---|
| $^{1}H$ | ½ | 99.985 |
| $^{13}C$ | ½ | $1.5x10^{-2}$ |
| $^{14}N$ | ½ | 99.63 |
| $^{15}N$ | ½ | 0.37 |
| $^{17}O$ | 5/2 | $3.7x10^{-2}$ |
| $^{19}F$ | ½ | 100 |
| $^{31}P$ | ½ | 100 |

En este trabajo el exopolisacárido se probó con distintos solventes polares y no polares tanto orgánicos como inorgánicos para ver la mejor solubilidad posible, así como también con diferentes ácidos y bases a diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 2.5

Tabla 2.5 Solubilidad del exopolisacárido en diferentes solventes.

| SOLVENTE (1 ml) | RELACIÓN (%) | PESO DEL EPS (mg) | SOLUBILIDAD |
|---|---|---|---|
| Agua | 10 0 | 5 | Parcialmente I |
| DMS | 100 | 5 | Parcialmente I |
| DMF | 100 | 5 | Negativo |
| DMS ($\Delta^0$) | 100 | 5 | Parcialmente I |
| DMS/AGUA ($\Delta^0$) | 50:50 | 5 | Parcialmente I |
| AGUA ($\Delta^0$) | 100 | 5 | Parcialmente I |
| AAG | 100 | 5 | Negativo |
| AFG | 100 | 5 | Negativo |
| AAG/AFG ($\Delta^0$) | 50 :50 | 5 | Negativo |
| Hexano | 100 | 5 | Negativo |
| THF | 100 | 5 | Negativo |
| Metanol | 100 | 5 | Negativo |
| Cloroformo | 100 | 5 | Negativo |
| Acetonitrilo | 100 | 5 | Negativo |
| $NH_4OH$ ($\Delta^0$) | 100 | 5 | Parcialmente II |
| NaOH 3% ($\Delta^0$) | 100 | 5 | Parcialmente III |

($\Delta^0$) = Calentamiento en baño maría a $95^0$c/20 min.
DMS = Dimetil sulfoxido
DMF = Dimetil formamida
AAG = Acido acético glacial
AFG = Acido fórmico glacial
THF = Tetrahidrofurano

Parcialmente I = Hinchado
Parcialmente II = Hinchado y algo disuelto
Parcialmente III = Hinchado y más disuelto

Después de encontrar el solvente en el cual se obtenía una mejor disolución parcial (NaOH al 3% con agua deuterada), se procedió a enviar una muestra en una concentración de 6 ppm (6 mg/ml) al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina para resonancia de $^1H$ y de $^{13}C$ en un espectrófotometro de RMN de 400 MHz marca Bruker amx serie avance dpx 400 con sonda multinuclear.

### 2.13.3 ANÁLISIS TÉRMICO DEL EXOPOLISACÁRIDO.

El análisis térmico permite medir algunas propiedades fisicoquímicas de ciertos materiales cuando estos se programan a una medición continua en función de la temperatura en una atmósfera determinada , esto es cuando la muestra esta sujeta a cambios de temperatura controlado, el programa puede envolver calentamientos o enfriamientos en un rango fijo de cambios de temperaturas o a temperaturas constantes.

El conocimiento de las propiedades térmicas de los polímeros es siempre importante y crítico de conocer para determinar las transiciones térmicas que pueden ocurrir cuando estos son expuestos a cambios de temperatura, esta herramienta proveen información tal como temperaturas de descomposición, temperaturas de fundición, temperaturas de transición vítrea, etc. [25, 15] estos efectos variarán de acuerdo a la naturaleza del polímero como por ejemplo la celulosa la cual su temperatura de descomposición empieza abajo de los 100°C, mientras que las poliamidas son estables arriba de los 400°C.[25]

Entre las principales técnicas termoanáliticas podemos mencionar :

a-. Análisis termogravimétrico (TGA)

b-. Análisis térmico diferencial (DTA)

2.13.3.1 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA).

El análisis termogravimétrico es una técnica que mide los cambios de peso de una substancia en función de la temperatura o tiempo en un determinado rango, en donde su equilibrio termodinámico se ve afectado resultando una serie de cambios (físicos y/o químicos) en la que se ve involucrada la liberación o absorción de energía en forma de calor, estos datos son representados de manera gráfica como el de la figura 2.4, en donde el peso se gráfica en el eje de las $Y$ y la temperatura en el eje de las $X$. La metodología que se sigue es la siguiente : muestra en pequeñas cantidades (mg) es calentada en un rango constante (1-20°c/min) teniendo un peso constante hasta empezar a descomponerse a una temperatura $T_1$ llegando hasta una temperatura constante de descomposición $T_2$ , una segunda constante es observada la cual corresponde a el peso del residuo $W_2$ , la diferencia entre $W_1$ y $W_2$ ($\Delta W$) son datos fundamentales de la muestra y pueden ser utilizados para cálculos cuantitativos de cualquier proceso fisicoquímico involucrado, en el que haya una disminución o cambio de masa. Las variables que se pueden presentar durante la corrida de una muestra son : rangos de calentamiento, naturaleza del sólido, atmósfera del horno. [25, 15]

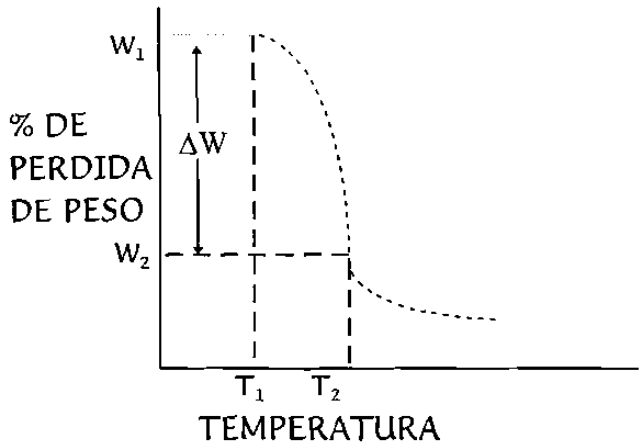



Fig. 2.4 Termograma típico de una reacción de descomposición.

2.13.3.2 ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (DTA).

El análisis térmico diferencial es una técnica en la cual los cambios de calor dentro de un material son monitoreados y comparados con la de un material inerte de referencia en el rango de trabajo, de tal manera que podremos tener una relación de las diferencias de temperatura (la de la muestra con respecto a la referencia) en función de la rampa de temperatura que a la que se realice el análisis esto nos dan resultados en forma de gráficas que nos permiten detectar, por medio de picos, las temperaturas a las cuales se dan transformaciones fisicoquímicas de la muestra, dependiendo de la forma y orientación del pico se puede determinar si el evento observado es endotérmico (absorción de energía) o exotérmico (liberación de energía).

Las aplicaciones del DTA nos permite evaluar mediciones físicas (cambios de fase cristalina, fusiones, diagrama de fases, cambios de estado líquido y líquidos cristalinos, capacidades caloríficas y transiciones vítreas), y químicas (descomposiciones, deshidrataciones y formación vítrea de los materiales).[25]

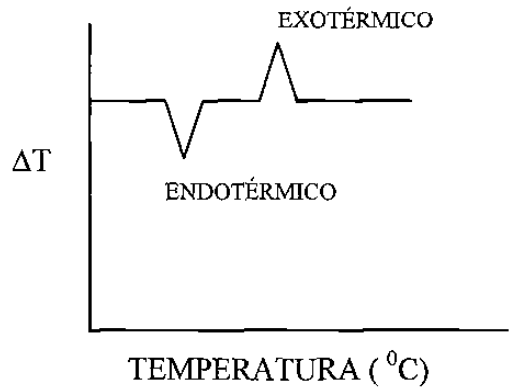



Fig. 2.5 Curva típica de DTA

A las 3 muestras de exopolisacárido obtenidas por precipitación con etanol y purificadas por reflujo con etanol al 99.5 % durante la fermentación, se les realizaron pruebas de análisis térmico de DTA y TGA corriéndose en una rampa de calentamiento de 5°C/min. que va desde temperatura ambiente hasta 400°C en una atmósfera de aire con un flujo de 100 ml/min utilizando un termoanalizador DTA/TGA TA Instruments 2100, las muestras se colocaron en un crisol de platino con un promedio de peso por cada muestra de 10 mg corriéndose paralelamente un standard de referencia de alumina ($Al_2O_3$) en atmósfera de aire.

### 2.13.4 ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

La absorción atómica es una técnica que envuelve la absorción de luz por átomos libres, siendo este principio la base para la determinación de metales.

Los átomos consisten en un núcleo central, compuesto de protones y neutrones el cual esta rodeado de orbitales en los cuales se localizan los electrones, los átomos son capaces de absorber luz o calor excitando a los electrones de valencia (electrones ubicados en las últimos orbitales del átomo) transfiriéndolos a niveles de mayor energía en donde la longitud de onda absorbida es proporcional al espacio entre los niveles energéticos .Como cada elemento tiene un cierto arreglo de longitudes de onda de absorción tendrá un patrón definido para cada elemento.

La determinación de calcio y magnesio en el EPS es la de ver el porcentaje de estos elementos que se incorporan a la red del biopolímero ya que reportes de otros investigadores[2] dan por hecho la incorporación de ambos elementos ayudando a la red polímerica a ser más resistente al corte debido a puenteos y entrecruzamientos que se generan internamente.

2.13.5 CROMATOGRAFÍA.

Los método cromatográficos son procesos de migración diferencial en el cual se caracteriza por el paso uniforme de una mezcla fluida (gas o líquida) a través de otra sustancia relativamente inmovilizada (líquida o sólida ). la cual por diferencias de polaridad migran los componentes de una mezcla.[29] La característica que distingue un proceso cromatográfico es la interacción entre la fase móvil y la fase estacionaria, esta interacción se basa en una combinación de factores como solubilidad, intercambio iónico, adsorción y filtración . El método cromatográfico empleado es la cromatografía en papel, el cual es un procedimiento simple y se basa en la partición de los componentes de una mezcla entre dos fases líquidas debido a diferencias de solubilidades de los componentes de cada fase. La función principal del papel es de servir de soporte inmóvil para el agua absorbida en este soporte, que a su vez sirve como fase estacionaria. La fase móvil es una mezcla líquida homogénea, que consiste en un solvente orgánico saturado de agua . EL procedimiento utilizado es el siguiente.

un volumen de la muestra se aplica en una región determinada cerca del extremo del papel cromatográfico, el punto de aplicación, llamado origen, es secado. Mientras tanto el solvente (fase móvil), se coloca en una cámara cerrada dejándolo un tiempo para que el interior de la cámara se sature con los vapores del solvente.

Después del equilibrio se pone en contacto el extremo del papel con el solvente y este comenzará a subir o bajar dependiendo de la técnica (ascendente o descendente) por capilaridad. Cuando el solvente de desarrollo alcanza el origen, la muestra se disolverá diferencialmente en las dos fases habiendo una distribución de la muestra entre la fase estacionaria acuosa (polar), aportada por el papel y la fase móvil, principalmente orgánica (nopolar) en donde la distribución esta gobernada por las diferencias de solubilidades de cada soluto en las fases. Después de que los solutos de la muestra se encuentran distribuidos a diferentes distancias del origen, esta se relaciona con el recorrido total del solvente de desarrollo de la siguiente manera :

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

El $R_f$ es característico de cada compuesto orgánico ó inorgánico dependiendo del solvente y la fase estacionaria. Después de que el solvente ha migrado la fase estacionaria se retira y se seca. La fase final es detectar la ubicación de cada compuesto ya sea por luz ultravioleta o tratando el papel con un reactivo químico que interactua con los compuestos ya resueltos para producir un producto coloreado.[28,29.,30] La cromatografía en papel para carbohidratos se puede considerar como un proceso de partición, aunque la adsorción puede estar presente en algunos casos.

La movilidad de los azúcares depende de la forma del anillo y de la configuración de los grupos hidroxilos[29], también cabe señalar que el tipo de enlace tiene gran influencia en la migración ya que se conoce que las uniones disacáridos (1→4) migran más rápido que las uniones (1→6)[29].

La identificación de los polisacáridos por cromatografía es complicada por lo que se tienen que hidrolizar para separar los monómeros ó los oligosacáridos presentes ; la hidrólisis llevada a cabo se realizó con ácido clorhídrico 3 N por 6 hr/95° C en baño María seguido de una neutralización con carbonato ácido de sodio.

El sistema desarrollador utilizado es acetato de etilo- agua- ácido acético glacial- Metanol (65 :10 :7.5 :20) . El sistema revelador es ftalato ácido de potasio- anilina- nbutanol (1.5 g : 1 ml : 100 ml).

A continuación se presenta el diagrama de flujo de la técnica de cromatografía de papel ( figura. 2.6 ).

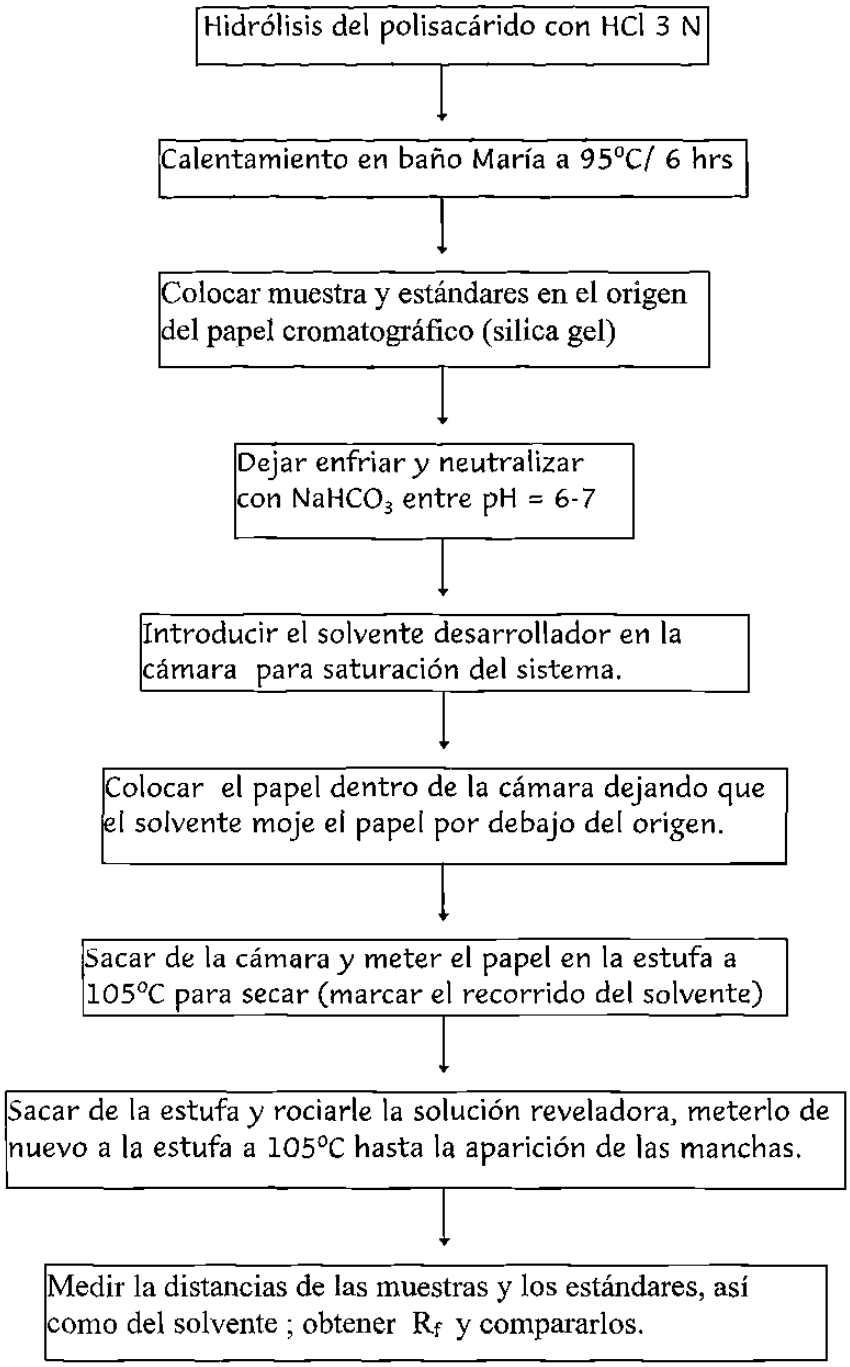



Fig. 2.6 Diagrama de flujo para la identificación de azúcares por cromatografía.

2.13.6 PROPIEDADES REOLÓGICAS DEL EXOPOLISACÁRIDO.

La determinación de las propiedades reológicas de los polímeros es un aspecto importante en su caracterización química, ya que nos da una amplia información de su peso molecular y el tipo de flujo que presenta el cual nos ayuda a entender mejor sus propiedades.

Una forma de definir la viscosidad sería como la medida de la fricción interna de un fluido causado por la atracción molecular, la cual genera esta resistencia a fluir [31] . La técnica empleada para determinar la viscosidad en soluciones es un método simple y rápido capaz de darnos una amplia información acerca de la conducta que presentan los polímeros bajo presencia de fuerzas externas, en donde su viscosidad variará con el rango de deformación presentando diferentes tipos de flujo, como por ejemplo: Newtoniano (donde la viscosidad es independiente del rango de corte) y no-newtonianos el cual posee una amplia gama de comportamientos en el que mencionaremos a los pseudoplasticos (donde la viscosidad decrece con el incremento del rango de corte), dilatante (donde la viscosidad aumenta con el rango de corte).[30, 31] Entre los ejemplos de fluidos newtonianos mencionaremos al agua y los aceites de motores y, de no-newtonianos podemos mencionar de acuerdo al grupo que corresponde como; los pseudoplasticos en la cual encontramos a las pinturas, las emulsiones y dispersiones, mientras que el de comportamiento dilatante es presentado por fluidos con sólidos defloculados como pastas cerámicas, gomas en agua, etc.

En este trabajo se utilizo un viscosímetro Brookfield modelo HAT ; la solución se realizó colocando un gramo de exopolisacárido en 300 ml de NaOH 3 % y se calentó a baño María por 3 hr/90 °C, se dejó reposar por 12 hrs y se filtró la solución ajustándolo a 300 ml con NaOH al 3 %.

# CAPITULO 3

# RESULTADOS

1020126079

# 3 RESULTADOS.

## 3.1 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.

La muestra proporcionada fue sembrada en agar nutritivo para posteriormente realizar pruebas bioquímicas ; inmediatamente después se realizó una fermentación al cual se le tomo muestras de la misma y se sembró en EMB (agar eosina azul de metileno) realizándole pruebas bioquímicas , dándonos los siguientes resultados (tabla 3.1).

Tabla 3.1 pruebas bioquímicas

| PRUEBAS | RESULTADOS |
|---|---|
| Indol | - |
| Rojo de metilo | - |
| Vogues-Proskauer | + |
| Citrato de simmons | + |
| Sucrosa | + |
| Glucosa | + |
| Inositol | + |
| $H_2S$ (gas) | - |
| Oxidasa | - |
| Arabinosa | + |
| Arginina | + |

Con los resultados de las pruebas bioquímicas y observaciones microscópicas se realizo la identificación del microorganismo productor de exopolisacárido (EPS) siendo un bacilo Gram negativo del género *Klebsiella pneumoniae* el cual por antecedentes se sabe que es capaz de secretar exopolisacárido al medio y con estructura variada dependiendo de la fuente de carbono y los flujos de energía [6,2]

10-0126079

## 3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN.

Los resultados obtenidos de la curva de calibración para azúcares reductores se presentan en la figura 3.1, así como también se presenta la tabla 3.2 en la cual se localizan las concentraciones de los estándares empleados para la curva. La curva de calibración presenta una regresión lineal de 0.999, lo cual nos determina que el método es confiable para poder utilizarla y determinar la concentración de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo en el cual durante el transcurso de la transformación nos da el azúcar residual presente y de esta manera se obtiene información concerniente a la formación del exopolisacárido a partir de los azúcares presentes.

Tabla 3.2 Resultados de los estándares de azúcares reductores.

| CONCENTRACIÓN (µg/ml) | ABSORBANCIA |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 180 | 0.3233 |
| 360 | 0.58 |
| 540 | 0.8811 |
| 720 | 1.2149 |
| 900 | 1.5457 |
| 1080 | 1.8802 |
| 1260 | 2.1907 |
| 1440 | 2.4601 |

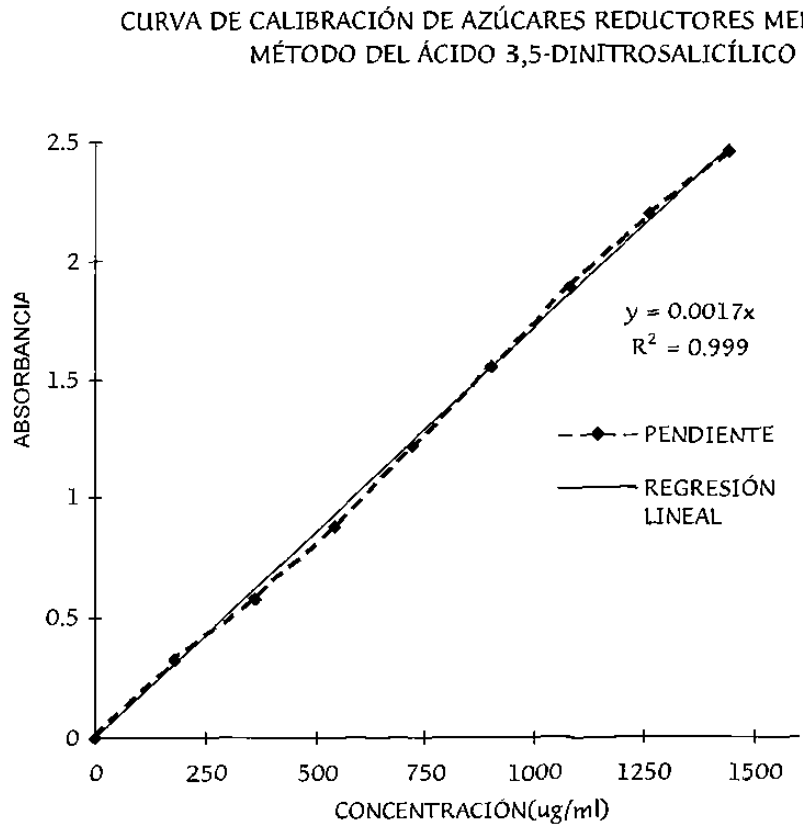



Fig. 3.1 Curva de calibración de azúcares reductores

## 3.3 PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN.

Los resultados de los parámetros seguidos durante la fermentación fueron reproducibles y se representan en las figuras 3.2 y 3.3. En la figura 3.2 se reporta el crecimiento del microorganismo expresado como logaritmo de la densidad óptica contra el tiempo, así como también la concentración de azúcares reductores (µg/ml) contra el tiempo. Se puede apreciar que a medida que los microorganismos se van desarrollando en función del tiempo, la tendencia de la concentración de azúcares reductores es a la inversa (disminuyendo), debido a que los microorganismos están utilizando la fuente de azúcares para sintetizar exopolisacárido el cual es excretado, y esta excreción se aprecia visualmente en el medio ya que va cambiando la características intrínsecas del caldo de la siguiente manera :

la solubilización del exopolisacárido define el comportamiento reológico del medio de cultivo líquido, ya que durante la fase inicial de la fermentación (0-1 hr) el fluido es prácticamente Newtoniano esto es ,la viscosidad es independiente de la rapidez de deformación pero, conforme avanza la fermentación (2-26 hrs) se incrementa la viscosidad del medio gradualmente y se convierte en un fluido dilatante ó espesante. En esta etapa es en donde se alcanza la mayor producción del exopolisacárido y la mayor estabilidad de la red polimérica ya que en la fase final de la fermentación (26→46 hrs) la viscosidad decrece (tipo pseudoplasticos). Además, con los datos obtenidos de la curva de crecimiento (figura 3.2 y .3.3), podemos precisar que la fase exponencial máxima de los microorganismos se encuentra entre las 12 y 15 hrs, posteriores al inicio de la fermentación y es en esta fase en donde se aprecia la mayor producción de exopolisacárido y por consiguiente un aumento de la viscosidad (ver tabla 3.4 y figura 3.4) ; la fase estacionaria empieza a las 18 hrs, entre las 18 y 26 hrs se pudo apreciar que la viscosidad del medio se mantiene y se puede establecer que en este tiempo es en donde se alcanza la mayor estabilidad de la red polimérica del exopolisacárido esto corroborándose con los resultados de termogravimetría obtenidas a las 24 horas en la cual se aprecia que la temperatura máxima de descomposición se alcanza a una temperatura de 306.8°C (ver figura 3.10) también, a que al obtener el exopolisacárido mediante pinzas se apreciaba una consistencia mayor que las muestras tomadas a tiempos posteriores y anteriores a las 24 horas.
A partir de las 26 horas y manteniéndose hasta las 46 horas la viscosidad del medio empieza a decaer en donde empieza un declive o muerte de los microorganismos y en donde también se aprecia que la consistencia del exopolisacárido disminuye considerablemente. Con los datos anteriores podemos decir que la característica principal de la fermentación consiste en que el producto principal que es el exopolisacárido (EPS), es el responsable directo de los cambio ocurridos en las propiedades reológicas del medio y que es necesario analizarle para poder encontrar con más detalle los cambios de los parámetros ocurridos en la fermentación durante la solubilización del exopolisacárido en el medio.

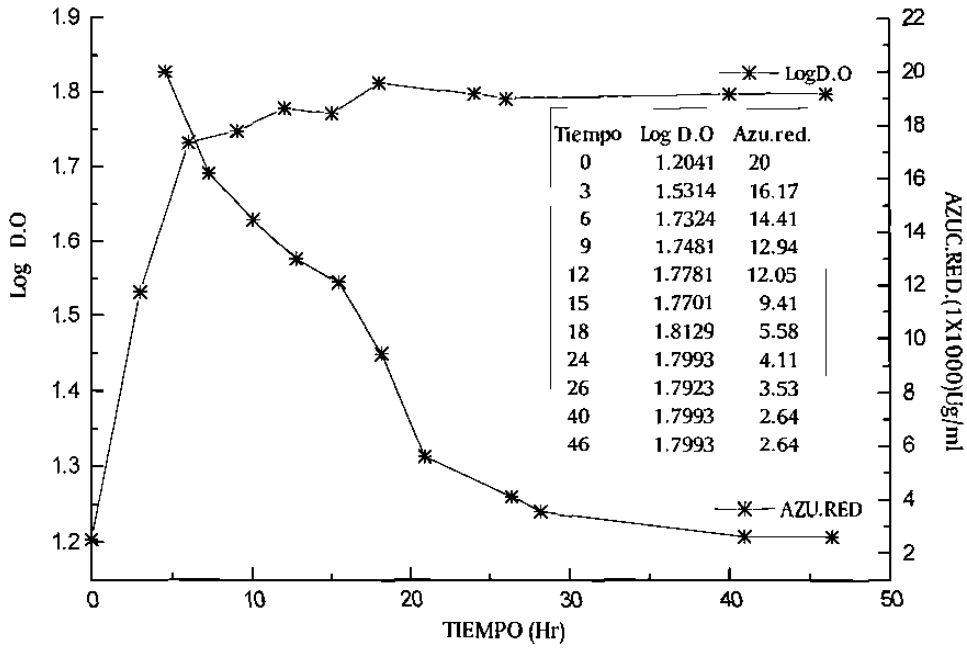



Fig. 3.2 Curva de crecimiento y determinación de azúcares reductores durante la fermentación y formación del exopolisacárido por *Klebsiella pneumoniae.*

En la figura 3.3 se reporta el crecimiento de los microorganismos como logaritmo de la densidad óptica contra tiempo y el potencial de hidrógeno contra el tiempo, se observa que a medida que el crecimiento de los microorganismos avanza, el pH va disminuyendo debido a que los microorganismos al utilizar los carbohidratos del medio de cultivo aparte de formar exopolisacárido, también llegan a formar ácidos orgánicos por lo consiguiente, el pH del medio disminuye conforme avanza la fermentación (figura 3.4) aunque esta disminución de pH, no llego a afectar la viscosidad del medio durante el tiempo que transcurre de las 2-26 hrs más, no podemos precisar su efecto posteriormente de las 26-46 hrs. Estudios realizados sugieren que manteniendo un pH óptimo del medio se puede obtener una mayor producción de exopolisacárido y una mayor estabilidad de la red esto debido a que se sabe que manteniendo un pH predominantemente entre 5.2-5.8 y, este confiere identidad iónica específica a las moléculas y que es importante para su estructura final y sus funciones.[17,12]