

# FACTORES PARA EL ESCALADO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR FERMENTACIÓN ESTÁTICA

Luis Alfonso Caicedo<sup>1\*</sup>, F. P. De França<sup>2</sup>, L. Lopez<sup>3</sup>

Recibido: 31/08/01 Aceptado: 14/12/01

**Palabras clave:** celulosa bacterial, *acetobacter*, fermentación estática

**Keywords:** bacterial cellulose, *acetobacter*, static fermentation.

## RESUMEN

En la producción de celulosa bacteriana por el método estático, el factor de rendimiento  $Y_p/s$  es afectado por la concentración de glucosa inicial y el tiempo de fermentación. Bajas concentraciones dan valores altos de  $Y_p/s$  al inicio de la fermentación, mientras que altas concentraciones requieren tiempos largos para lograr valores comparables. El área superficial aumenta la producción de celulosa, pero existe una relación (área interfacial/volumen de medio) límite a partir de la cual la celulosa producida por unidad de área comienza a descender. Existe una relación lineal entre el espesor relativo de película, definido como (altura de película húmeda/altura de líquido), y el área por unidad de volumen de medio. El espesor relativo límite (altura de película = altura de líquido) se encontraría para una relación área- volumen teórica

ca de  $1,1 \text{ cm}^{-1}$ , pero en la práctica se determinó que este valor es de  $0,8 \text{ cm}^{-1}$  para no afectar el rendimiento de celulosa.

## ABSTRACT

In the production of bacterial cellulose through a static method, the yield factor  $Y_p/s$  is affected by the concentration of the initial glucose and the fermentation time. Low concentrations give  $Y_p/s$  high values at the beginning of the fermentation, where high concentrations require long times to achieve comparative values. The surface area increases the cellulose production; however, there is a value of interfacial area to liquid volume relationship that gives the greater values of cellulose per unit area. There is a linear relationship between the film relative height defined as (wet film height/liquid height) and the interfacial area per medium unit volume. For the film relative height limit (wet film height = liquid height) corresponds the theoretical value  $1.1 \text{ cm}^{-1}$ , but the practical limit determined was ca.  $0.8 \text{ cm}^{-1}$ .

1\* Universidad Nacional de Colombia. Telefax 57(1)3165334 E-mail:lcaicedo@ing.unal.edu.co

2 Universidad Federal de Río de Janeiro, Escuela de Química.

3 Universidad Federal de Río de Janeiro, Instituto de Macromoléculas.

## INTRODUCCIÓN

La celulosa es conocida por ser el principal componente de las plantas. Sin embargo, en los últimos años la celulosa de origen bacteriano (BC) ha adquirido gran importancia por sus propiedades, que en algunos casos son superiores a las de la celulosa de origen vegetal (1, 2). Dentro de sus aplicaciones se encuentran las de adsorbente, espesante, sustituto de piel, soporte de células e, inclusive, materia prima para la obtención de papel de alta calidad (1, 3, 4). Diferentes bacterias, como *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sarcina*, producen celulosa (5); sin embargo, las bacterias del género *Acetobacter*, en especial la *A. Xylinum*, son las más empleadas (5, 6, 7, 8). Dentro de las técnicas propuestas para su obtención están el método estático y el agitado. El primero es el más empleado a nivel de laboratorio, y el segundo es el más estudiado en los últimos años por producir una mayor transferencia de oxígeno que favorece la producción de celulosa; sin embargo, presenta el inconveniente de inducir en la célula la pérdida de la capacidad productora de celulosa (6, 9, 10).

Con miras a aumentar la productividad, se han aislado especies más estables a la agitación (11) y se ha propuesto efectuar una remoción periódica de la celulosa producida en cultivos estáticos (6), y nuevas formas de reactor y de suministro de oxígeno (12). De otro lado, la celulosa obtenida por el método estático, además de presentar algunas propiedades diferentes respecto a la obtenida por el método agitado (1), se produce en

forma de película, la cual se emplea como sustituto de piel (3). La producción por el método estático se ha realizado especialmente en erlenmeyers y frascos rouxe (1, 6), y los estudios han estado encaminados a estudiar variables como temperatura, pH, y tipo y concentración de sustrato (13, 14). A pesar de lo anterior, pocos trabajos han sido presentados con miras a estudiar las variables que afectan su escalado. El presente trabajo intenta estudiar el efecto de la relación área/volumen y de la concentración del sustrato sobre la producción de BC en un cultivo estático.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Microorganismo

Se usó un cultivo mixto de bacterias *Acetobacter*, aislado de una cultura del hongo del té. La cepa se conservó en un medio compuesto por infusión de té (*Camellia sinensis*), preparado calentando a ebullición por 15 minutos 12 g de té seco en 300 mL de agua destilada; 1% p/v de extracto de levadura y 10 g/L de glucosa. Este medio se esterilizó a 120°C por 20 minutos, se inoculó con el cultivo mixto, se dejó en la estufa por 4 días a 30°C y se almacenó a 4°C. El inóculo se preparó de igual forma, sustituyendo la infusión de té por agua.

### Medio de producción

El medio empleado para la etapa inicial contenía extracto de levadura al 1% p/v y glucosa en concentraciones de 10, 20, 50 y 200 g/L; fue esterilizado a 120°C

por 20 minutos e inoculado con 10 mL de cultivo mixto.

### Condiciones de experimentación

Fueron empleados para el estudio inicial frascos cónicos de 500 mL, con 150 mL de medio. En la segunda parte, para el estudio del efecto de la relación área/volumen, se emplearon frascos cilíndricos de 7,6; 8,9; 10. y 12,9 cm de diámetro interno, y 150 mL de medio que contenían 20 g/L de glucosa y 1% p/v de extracto de levadura. La esterilización y el volumen de inóculo fueron los mismos que en los ensayos anteriores. La temperatura fue de 30°C.

### Análisis

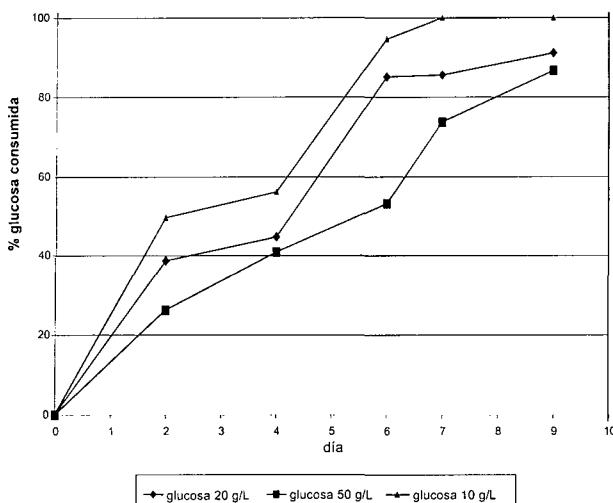
Los azúcares fueron analizados por HPLC con una columna Sugar Pack, agua des-ionizada como fase móvil y re-

fractómetro como detector. La celulosa fue retirada mediante filtración en los días 2,4,5,6,7 y 9 de acuerdo con el ensayo, lavada con agua destilada y colocada en 150 mL de solución de NaOH al 0,1% p/v, en ebullición, por 5 minutos. Después, fue lavada con agua destilada, colocada sobre láminas prepesadas de vidrio y secada en la estufa a 30°C hasta obtener peso constante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la glucosa

Para estudiar el efecto de la concentración inicial de glucosa, se escogieron las concentraciones iniciales de 10, 20, 50 y 200 g/L. Los resultados se presentan en la figura 1. Se observa que la velocidad de consumo de glucosa aumenta con la concentración inicial de sustrato; sin embargo, la velocidad específica, defi-



**Figura 1.** Consumo de glucosa en función del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

nida como velocidad de consumo por unidad de masa de sustrato inicial, es menor a medida que aumenta éste, lo cual puede indicar un efecto inhibitorio de la glucosa. De otro lado, con 10 g/L se logra una conversión total a los siete días, mientras que para 20 y 50 g/L, a los nueve días sólo se alcanza cerca del 90%, y para 200 g/L la conversión no sobrepasa el 50%. Esto indica, desde el punto de vista del escalado, que altas concentraciones de sustrato favorecen el consumo pero alargan el tiempo de proceso aumentando las posibilidades de contaminación.

Al analizar la producción de celulosa en la figura 2, se concluye que, en las fases iniciales, la velocidad de formación se ve inhibida por la alta concentración de sustrato inicial, pero al final la velocidad se incrementa, lo cual indica que en las primeras etapas del proceso hay un gran consumo de sustrato que se

transforma en compuestos intermedios que posteriormente se aprovechan para la producción de celulosa. Esta formación de intermediarios se hace más rápida a altas concentraciones. Lo anterior se corrobora analizando la figura 3, en la que muestra el factor de rendimiento celulosa:sustrato (Y<sub>p/s</sub>) en función del tiempo para las diferentes concentraciones. Para 10 g/L, el valor de Y<sub>p/s</sub> permanece casi constante durante los 9 días, aunque se nota un ligero incremento en el último día, posiblemente por el empleo de un intermediario por parte de las células; para 20 g/L, el valor es bajo al inicio, lo que indica una ligera inhibición de la reacción de formación de celulosa, pero luego se estabiliza y se mantiene en intervalos que oscilan entre 0,3 y 0,35 g/g. Para 50 y 200 g/L de glucosa, la etapa inicial se caracteriza por una alta transformación de glucosa y baja conversión a celulosa, y los Y<sub>p/s</sub> son menores de 0,05 g/g, pero a

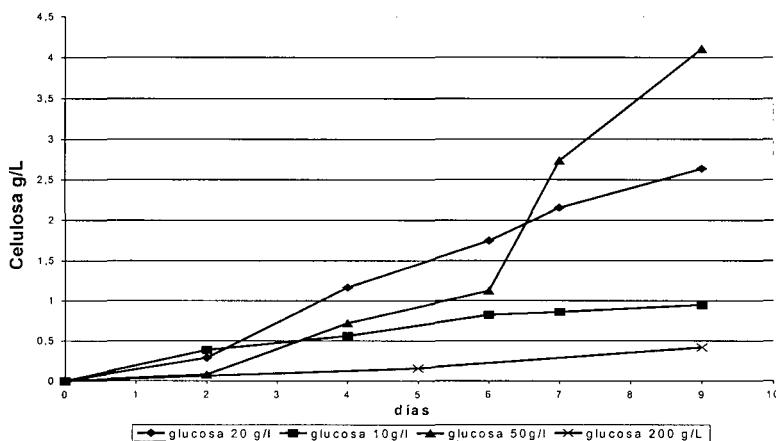
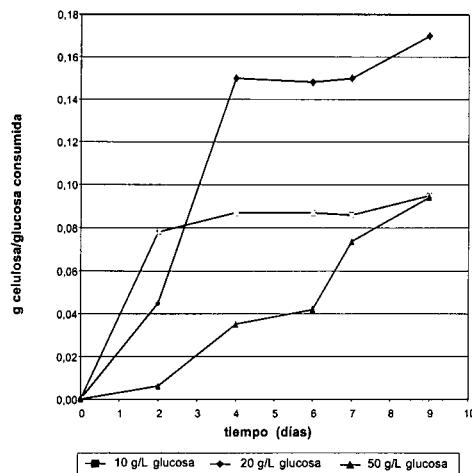


Figura 2. Producción de celulosa en función del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

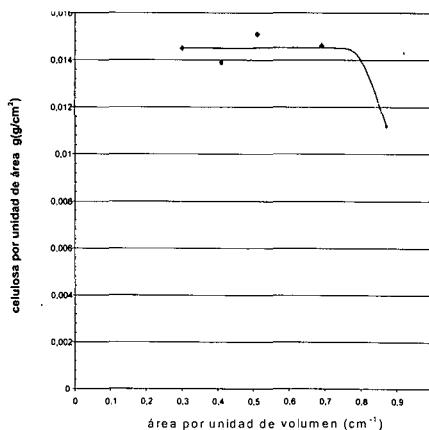


**Figura 3.** Variación del factor estequiométrico celulosa:glucosa (Yp/S) con el tiempo para diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

tiempos mayores hay aprovechamiento de los intermediarios para formar una gran cantidad de celulosa. Para bajas concentraciones, la formación de intermediarios es poca, y prácticamente la glucosa se transforma en celulosa directamente, pero con bajos rendimientos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dudman (14) para *A. aceto-genum*, donde concentraciones altas requieren tiempos largos para una mayor producción de celulosa y, por ende, para 50 y 200 g/L, los valores de Yp/s para tiempos cortos son menores en relación con los de baja concentración. Las oscilaciones que se presentan en los valores de Yp/s durante la fermentación pueden deberse al acople de las dos reacciones involucradas. Como se puede ver, en 10 y 20 g/L existe un valor límite de Yp/s que depende de la concentración inicial, lo cual hace pensar que existe un valor económica y técnicamente más eficiente.

#### Efecto de la relación área/volumen sobre la producción de celulosa

Con el fin de estudiar el efecto de la geometría del fermentador sobre la producción de celulosa, se estudiaron para un mismo volumen de medio cuatro áreas interfaciales gas-líquido, empleando frascos de diferente diámetro. El efecto del área se aprecia en la figura 4, a partir de la cual se puede concluir que, a medida que se amplía el área, se incrementa la cantidad de celulosa producida, lo cual evidencia un efecto de la transferencia de oxígeno sobre el proceso. Sin embargo, se ve una tendencia a alcanzar un valor máximo. Con el fin de verificar la influencia del área interfacial sobre la formación de producto, se determinó la celulosa producida por unidad de área en función del área por unidad de volumen de medio (figura 4); se observó que permanece constante en un valor medio de 0,014 g/cm<sup>2</sup>, hasta una relación cer-



**Figura 4.** Producción de celulosa por unidad de área para diferentes relaciones área/volumen de líquido.

cana a  $0,80\text{ cm}^{-1}$ , a partir de la cual cae a valores de  $0,011\text{ g/cm}^2$ , aproximadamente, lo que indica que existe una altura mínima de líquido que permite obtener la máxima producción de celulosa. Para alturas superiores de líquido, existirá un volumen no aprovechado, posiblemente limitado por la transferencia de masa, y para inferiores, se reduciría la producción de celulosa por ocupar todo el volumen líquido disponible. Lo anterior se corroboró graficando el espesor relativo de la película húmeda, definido como la relación entre el espesor de la película húmeda y la altura del líquido, contra la relación área/volumen del líquido, como se muestra en la figura 5. Se aprecia que existe una relación lineal entre las dos variables. Para un valor límite de espesor relativo de película húmeda de 1, donde la altura de la película es igual a la altura del líquido, el área por unidad de volumen es  $1,1\text{ cm}^{-1}$ , pero el límite práctico obtenido de la figura 5 que no afecta el rendimiento de celulosa por unidad de área es de  $0,8\text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente.

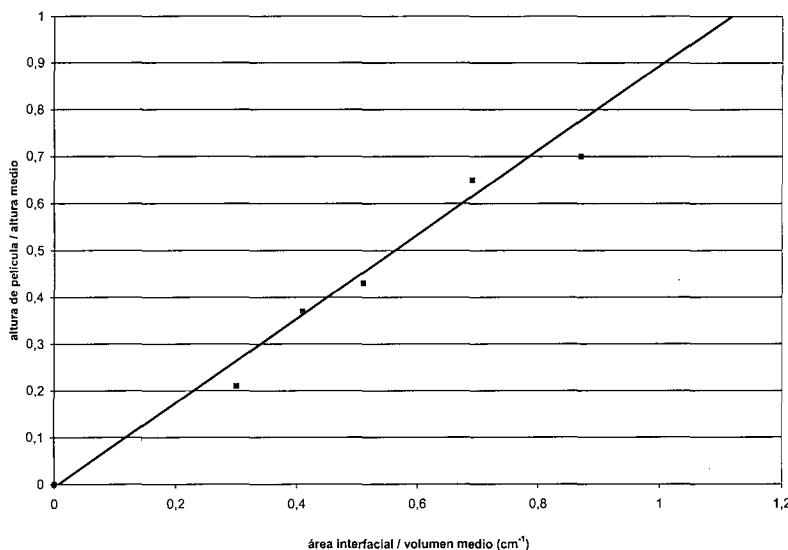
## CONCLUSIONES

La producción de celulosa por el método estático depende de la concentración inicial de glucosa y del tiempo de fermentación. Bajas concentraciones dan en corto tiempo valores altos de  $Y_p/s$ , mientras que altas concentraciones requieren tiempos de fermentación demasiado largos para lograr  $Y_p/s$  comparables e inclusive mayores.

La producción de celulosa está controlada por la transferencia de oxígeno, lo cual se facilita aumentando el área superficial del fermentador. Sin embargo, existe un valor límite de altura del líquido que garantiza la mayor producción de celulosa por unidad de área.

## AGRADECIMIENTOS

A la División Nacional de Investigación (DINAIN) y a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial de este proyecto.



**Figura 5.** Variación del espesor relativo de la película húmeda respecto a la relación área: volumen de líquido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ougiya, H.; Hioki, N.; Watanabe, K.; Morinaga, Y.; Yoshinaga, F.; Samejima, M. (1998). Relationship between the Physical Properties and Surface Area of Cellulose Derived from Adsorbates of Various Molecular Sizes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** 1880-84.
- Yamanaka, S.; Watanabe, K.; Kitamura, N.; Iguchi, M.; Mitsuhashi, S.; Nishi, Y.; Uryu, M. (1989). The Structure and Mechanical Properties of Sheet Prepared from Bacterial Cellulose. *J. of Mater. Scien.* **24** 3141-45.
- Fontana, J.S.; Franco, V.C.; de Souza, S.J.; Lyra, I. N.; de Souza, A.M. (1991). Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* ("Tea Fungus") Biofilm used in Skin Therapy. *Appl. Bioch. Biotechnol.* **28/29** 341- 351.
- Okiyama, A.; Motoki, M.; Yamanaka, S. (1993). *Food Hydrocolloids* **6** 493-501.
- Ross, P.; Mayer R.; Benziman, M. (1991). Cellulose Biosynthesis and Function in Bacterial. *Microbiology Reviews*. **55** 35-58.
- Dudman, W.F. (1960). Cellulose Production by Acetobacter Strains in Submerged Cultured. *J. Gen. Microbiol.* **22** 25-39.
- Lee, F.L.; Lu, S.F.; Chen, H.K. (1999). A Thermotolerant and High

- Acetic Acid Producing Bacterium *Acetobacter* Species I-14-L. *J. Appl. Microbiol.* **86** 55-62.
8. Naritomi, T.; Kouda, T.; Yano, H.; Yoshinaga, F. (1998). Effect of Lactate on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. *J. Ferment. Bioeng.* **85** 89-95, 598-603.
9. Schramm, M.; Hestrin, S. (1954). Factors Affecting Production of Cellulose at the Air Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum*. *J. gen. Microbiol.* **11** 123-29.
10. Yang, Y.K.; Park, S.H.; Hwang, J.W.; Pyun, Y.R.; Kim, Y.S. (1998). Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under Agitated condition. *J. Ferment. Bioeng.* **85** 312-17.
11. Toyokasi, H.; Kojima, Y.; Tsuchida, T.; Hoshino, K.; Yamada, Y.; Yoshinaga, F. (1995). The Characterization of an Acetic Acid Bacterium Useful for Producing Bacterial Cellulose in Agitation Cultures: The Proposal of *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans* subs. nov. *J. gen. Appl. Microbiol.* **41** 307-14.
12. Kouda, T.; Naritomi, T.; Yano, H.; Yoshinaga, F. (1998). Inhibitory Effect of Carbon Dioxide on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* in Agitated Culture. *J. Ferment. Bioeng.* **85** 312-17.
13. Oikawa, T.; Ohtori, T.; Ameyama, M. (1995). Production of Cellulose of D- Mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci. Biotech. Bichem.* **59** 331-32.
14. Dudman, F. (1959). Cellulose Production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. gen. Microbiol.* **21** 312-26.