UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DEL USO DEL NEJAYOTE PARA LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANO POR *Xanthomonas campestris* Y SU ESCALAMIENTO A NIVEL SEMI-PILOTO.

Por

Jesús Oziel Zúñiga Sánchez

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL USO DEL NEJAYOTE PARA LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANO POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* Y SU ESCALAMIENTO A NIVEL SEMI-PILOTO

COMITÉ DE TESIS

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas
Vocal

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Vocal

Dra. María Julissa Ek-Ramos
Vocal

M.C. Alonso A. Orozco Flores
Director externo

EVALUACIÓN DEL USO DEL NEJAYOTE PARA LA PRODUCCIÓN DE GOMA XANTANO POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* Y SU ESCALAMIENTO A NIVEL SEMI-PILOTO

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

M.C. Alonso A. Orozco Flores
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia que me apoyó a lo largo de estos dos años y durante toda mi vida, que me dieron ánimos en los momentos más difíciles, también a Dios por ser guía en nuestro núcleo familiar.

A mis asesores de Tesis por enseñarme durante tanto tiempo, en especial a la Dra. Patricia Tamez Guerra y al Dr. Alonso Alberto Orozco Flores por abrirme las puertas en el laboratorio y haberme apoyado de gran manera durante mi formación tanto a nivel licenciatura así como estos dos años que duro el posgrado. También agradezco a los demás miembros de mi comité por su asesoría, Dr. Ricardo A. Gómez Flores, Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas, Dra. Zinnia Judith Molina Garza y Dra. María Julissa Ek-Ramos, de igual manera al Dr. César Iván Romo Sáenz y a la Dra. Norma Zamora quienes también me brindaron su apoyo y asesoría.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Formulación de Biológicos y Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas de la Facultad de Ciencia Biológicas, UANL, por siempre brindarme apoyo y también por pasar momentos divertidos haciendo más ameno trabajar en el laboratorio, así como su ayuda en los experimentos, que sin duda este proyecto no podría haber salido adelante sin ellos.

A los trabajadores de la UFB y UIAD: Nora, Queta, Adán, Doña Rosy, Angello, Andrea y Rosa

A los estudiantes que estuvieron en el laboratorio durante este tiempo: Laiju, Ileana, Yera, Brenda, Vivi, Bri, Aymeé, David, Viry, Maribel, Dianelys, Dani, Sofi, Mimí, etc.

A mis compañeros de Maestría en Microbiología: Ricardo, Gabriel, Jesica, Katia, Eder y Lucero.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado en este proyecto con la beca CVU-893659.

DEDICATORIAS

Para mi familia

Mi comité de tesis

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

ÍNDICE

CONTENIDO……pg

ÍNDICE.....I
ÍNDICE DE TABLAS.....III
ÍNDICE DE FIGURAS.....IV
NOMENCLATURA.....V
RESUMEN.....VI
1. INTRODUCCIÓN.....1
2. ANTECEDENTES.....3
2.1 Goma xantano.....3
2.2 Demanda comercial de goma xantano.....3
2.3 Producción de goma xantano.....4
2.3.1 Producción industrial de goma xantano.....4
2.3.2 Fuentes de carbono alternativas para la producción del xantano.....5
2.4 Nejayote.....7
2.4.1 Propiedades químicas del nejayote.....8
2.4.2 Aplicaciones del nejayote.....8
3. JUSTIFICACIÓN.....10
4. HIPÓTESIS.....11
5. OBJETIVO GENERAL.....12
5.2 Objetivos específicos.....12
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....13
6.1 Mantenimiento de *Xanthomonas campestris* y preparación del inóculo.....13
6.2 Preparación de sustratos.....13
6.3 Producción de la goma xantano.....14
6.3.1 Recuperación de goma xantano.....14
6.3.2 Rendimiento del xantano producido a partir de nejayote industrial.....15
6.3.2.1 Análisis fisicoquímico del xantano producido a partir de nejayote industrial..15
6.3.3 Rendimiento del xantano producido a partir de nejayote semi-industrial.....16

6.4 Actividad celular del cultivo de *X. campestris* 16
6.5 Análisis fisicoquímico del xantano producido a partir de nejayote semi-industrial ... 17
6.5.1 Contenido de piruvato y acetilo covalentemente unido al polisacárido 17
6.5 Escalamiento de la producción de goma xantano a nivel semi-piloto 18
6.5.1 Contenido de piruvato y acetilo covalentemente unido al polisacárido 19
6.6 Análisis estadísticos 19
7. RESULTADOS 21
7.1 Producción de goma xantano y actividad celular de *X. campestris* usando nejayote industrial 21
7.2 Cualidades físico-químicos del xantano obtenido a partir de nejayote industrial 22
7.3 Producción de xantano y actividad celular de *X. campestris* en nejayote semi-industrial 22
7.3.1 Rendimiento de goma xantano producido en nejayote 22
7.3.2 Actividad celular de *X. campestris* usando nejayote semi-industrial 25
7.4 Análisis de la goma xantano obtenida durante la fermentación usando nejayote 27
7. 5 Producción de xantano y actividad celular en los cultivos 27
7.5.1 Producción de goma xantano a partir del nejayote 27
7.5.2 Actividad celular de *X. campestris* cultivada en medios a base de nejayote 30
7. 6 Contenido de grupos piruvato y acetil covalentemente unidos al polisacárido 32
7.7 Producción de xantano y actividad celular de *X. campestris* en nejayote semi-industrial a nivel semi-piloto 35
7.8 Contenido de grupos piruvato y acetil covalentemente unidos al polisacárido 35
8. DISCUSIÓN 37
9. CONCLUSIONES 45
10. PERSPECTIVAS 46
11. LITERATURA CONSULTADA 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis conforme a la Norma NRF-300-PEMEX-2012 de la goma xantano producida por *X. campestris* a partir de nejayote industrial 22

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Actividad celular y producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando nejayote industrial. 21
Fig. 2. Producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, utilizando volúmenes de 100 mL, de nejayote semi-industrial 23
Fig. 3. Producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, utilizando volúmenes de 1 L, de nejayote semi-industrial 24
Fig. 4. Actividad celular del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando volúmenes de 100 mL, de nejayote semi-industrial 25
Fig. 5. Actividad celular del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando volúmenes de 1 L, de nejayote semi-industrial 26
Fig. 6. Goma xantano producida a partir de medio a base nejayote industrial y semi-industrial con diferentes suplementos..... 27
Fig. 7. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote industrial usando volúmenes de 100 mL 28
Fig. 8. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 100 mL 29
Fig. 9. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 1 L. 30
Fig. 10. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote industrial. 31
Fig. 11. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 100 mL..... 31
Fig. 12. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 1 L..... 32
Fig. 13. Contenido de piruvato en las muestras de goma obtenidas a partir de ambos ensayos (100 mL y 1 L) usando nejayote semi-industrial. 33
Fig. 14. Contenido de acetil en las muestras de goma obtenidas a partir de ambos ensayos (100 mL y 1 L) usando nejayote semi-industrial..... 34
Fig.15. Actividad celular y producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación a nivel semi-piloto, usando nejayote semi-industrial. 35
Fig. 16. Contenido de piruvato y acetil en las muestras de goma obtenidas a partir del ensayo en biorreactor usando nejayote semi-industrial..... 36

NOMENCLATURA

α	**Alfa**
bioH_2	**Bio-hidrógeno**
cP	**Centipouls**
ºC	**Grados Celsius**
DBO	**Demanda bioquimica de oxígeno**
DMSO	**Dimetil-sulfóxido**
D.O.	**Densidad óptica**
DQO	**Demanda quimica de oxígeno**
g	**Gramos**
g/L	**Gramos por litro**
h	**Hora**
HSD	**Diferencia honestamente significativa**
L	**Litro**
LPM	**Litros por minuto**
M	**Molar**
m^3	**Metro cúbico**
mg/L	**Miligramos por litro**
min	**Minuto**
mL	**Mililitro**
MTT	**Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol**
nm	**Nanómetros**
pH	**Potencial de hidrógeno**
pK	**Concentración iónica**
p	**Significancia**
ppm	**Partes por millón**
rpm	**Revoluciones por minuto**
ton	**Tonelada**
UI	**Unidades internacionales**
µL	**Microlitros**
%	**Porcentaje**
<	**Menor que**
≤	**Menor o igual que**

RESUMEN

El xantano es un polisacárido producido por cepas del género *Xanthomonas* ampliamente usado en la industria, para reducir el costo de su producción se plantea el empleo de fuentes alternativas de carbono. Tal es el caso del nejayote, residuo del proceso de nixtamalización. Se trabajó con nejayote industrial, semi-industrial (con distintos suplementos), y medio YGC como control. Para todas las cinéticas de crecimiento y producción de goma se inició con $1x10^8$ células/mL de *Xanthomonas campestris*. A las 24 h de incubación, la producción usando nejayote industrial fue similar a la del control con valores no mayores a 4 g/L hasta el final del ensayo, sin embargo, la producción en el medio YGC continúo aumentando hasta las 96 h (9.3 g/L). Para los ensayos de actividad celular, los valores de mayor absorbancia fueron de 3.884 y 2.713 para el control y el tratamiento de nejayote industrial respectivamente a las 24 h. Sin embargo, en los ensayos utilizando un mayor volumen del residuo como medio de cultivo, aquel tratamiento que mostró mejores resultados en cuanto a producción del biopolímero fue el nejayote suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10.8 g/L) con un valor de absorbancia menor al del control (3.621 y 1.816 respectivamente) al final del cultivo. Una vez llevado el escalamiento de la producción de xantano a nivel de biorreactor de 14 L, utilizando este último tratamiento se logró obtener rendimientos cercanos a los 6 g/L con una actividad celular de 1.902 esto al final del cultivo, además se evaluaron las características fisicoquímicas del xantano obtenido a partir de los tratamientos (contenido de grupos piruvato y acetil), en dónde los resultados obtenidos a partir del ensayo llevado a cabo a nivel semi-piloto (0.107 y 0.130), son similares en comparación con lo obtenido a partir de una muestra comercial del biopolímero (0.148 y 0.127) (D.O. 540 nm). Se informa sobre la adaptación de *X. campestris* en ambientes con alto contenido de materia orgánica como lo es un medio a base de nejayote, mientras se mantiene su capacidad para producir xantano, en donde el sustrato utilizado ofrece una alternativa barata y prometedora para la producción del biopolímero, ayudando a reducir el costo del producto final.

1. INTRODUCCIÓN

La goma xantano (o xantano) es un biopolímero extracelular secretado por especies del género *Xanthomonas* (Casas *et al*., 2000). Actualmente, es uno de los polisacáridos microbianos comercializados de mayor importancia a nivel industrial, producto de la fermentación por *Xanthomonas campestris* (Velu y Velayutham, 2014). Este biopolímero fue descubierto en los años 50 por los Laboratorios Regionales de Investigación del Norte (NRRL; por sus siglas en ingles) de los Departamentos de Agricultura de Estados Unidos (Velu *et al.*, 2016).

Este exopolisacárido tiene una excelente solubilidad y estabilidad bajo condiciones tanto ácidas como alcalinas. Su estructura ramificada le confiere propiedades espesantes, con un comportamiento pseudoplástico estable en un amplio rango de pH, pK (concentración iónica) y temperatura, lo que la hace mejor que otras gomas naturales como la goma de algarrobo o goma guar (Casas *et al*., 2000).

Debido a sus propiedades reológicas, esta es utilizada en el sector industrial en diferentes áreas, tal como artículos de aseo, recuperación de aceites, cosméticos, pinturas basadas en agua. Por otro lado, también es empleada en la industria alimenticia como agente de suspensión y estabilizante (Velu *et al*., 2016). Se ha utilizado en una amplia variedad de alimentos por varias razones importantes, que incluyen la estabilización de la emulsión, la estabilidad de la temperatura, y su compatibilidad con los ingredientes alimentarios (García-Ochoa *et al*., 2000).

La producción anual alrededor del mundo de este biopolímero es de 30,000 toneladas (Velu *et al*., 2016). Además, dadas sus propiedades, es el polisacárido microbiano aprobado por la FDA de mayor uso alrededor del mundo en diferentes sectores de la industria, es por ello por lo que se ha estimado que tendrá una demanda global de hasta 987.7 millones USD para el 2020 (Barua *et al*., 2016).

Dadas las necesidades en la producción de este exopolisacárido, los investigadores se centran en estrategias de reducción de costos, como la identificación de sustratos alternativos de bajo precio para lograr el máximo de obtención de goma xantano, sin embargo, el proceso de fermentación juega un rol importante en el mantenimiento de las

propiedades de la goma, es por ello que la composición de los medios y parámetros del proceso son esenciales para mejorar la producción del polisacárido (Felicia *et al.*, 2017).

Desde un punto de vista económico y ambiental, es deseable el empleo de sustratos alternativos a partir de complejos con alta materia orgánica como residuos sólidos municipales, de agua residual, de producción agrícola o industrial (García-Depraect *et al.*, 2017). Dado el contenido de compuestos orgánicos e inorgánicos estos residuos pueden llegar a representar problemas de contaminación ambiental, tal es el caso del proceso de nixtamalización del maíz el cual genera un residuo conocido como nejayote que contiene una gran cantidad de residuos orgánicos que no pueden ser reincorporados al suelo de manera natural (Valderrama-Bravo *et al*., 2012; Meraz *et al.*, 2016).

Durante la nixtamalización, una alta concentración de materiales sólidos que consisten en materia seca de maíz se pierde durante el proceso. Estas pérdidas de producción pueden ser económicamente significativas para un fabricante debido a la pérdida de masa, procesamiento de desechos y costos de eliminación, así como la contaminación ambiental y posibles sanciones legales (Rosentrater, 2006).

Por lo anterior, y debido a la gran capacidad metabólica de *X. campestris*, el nejayote representa un medio de cultivo potencial para emplearse en la producción de este biopolímero, como una alternativa en la reducción de costos de producción del xantano, mediante la optimización de este tipo de bio-procesos que no solo permitan la obtención de esta clase de biopolímeros, si no que pueda llegar a permitir que las modificaciones metabólicas realizadas por este microorganismo en este tipo de residuos permitan la reincorporación de los mismos al suelo o empleo en otros procesos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Goma xantano

La goma xantano es el biopolímero de mayor importancia en diferentes ramas de la industria producido principalmente por la bacteria *X. campestris*, siendo considerado el de mayor producción a nivel mundial debido su amplio rango de aplicaciones siendo el único aprobado para uso en alimentos. Este polímero proporciona un aumento o disminución de viscosidad en soluciones acuosas, además de ser un excelente estabilizador en una gran variedad de suspensiones, emulsiones y espumas manteniéndose estable en amplios rangos de temperatura, pH y concentración de sales (Velu *et al*., 2016).

2.2 Demanda comercial de goma xantano

De acuerdo a De Monaco-Lopes *et al.* (2015) la capitalización de mercado de la goma xantano es de aproximadamente 270 millones de dólares, y las proyecciones de esta superan los 400 millones de dólares. Para abastecer a los diversos sectores de consumo, cada año se producen 86,000 toneladas de goma xantano a un costo aproximado de 400 millones de dólares al año (Kalogiannis *et al*., 2003; De Monaco-Lopes *et al*., 2015). Además, se ha reportado que el 60% de la goma xantano que es elaborada, se consume en industrias no alimenticias (Niknezhad *et al*., 2015).

Además, en la industria de la agricultura, se ha utilizado para mejorar la capacidad de flujo en formulaciones de fungicidas, herbicidas e insecticidas mediante la suspensión uniforme del componente sólido. En la industria del petróleo, la goma xantano se utiliza en la perforación del mismo, fracturación, limpieza de tuberías entre otros, esto debido a que la goma cuenta con una excelente compatibilidad con la sal y resistencia a la degradación térmica, siendo útil también como un aditivo en fluidos de perforación (De Monaco-Lopes *et al.*, 2015).

Las propiedades toxicológicas y de seguridad del xantano para aplicaciones en industria alimentaria y farmacéutica han sido ampliamente investigadas, esta no es tóxica,

no es sensibilizante y no causa irritación en la piel o en los ojos (García-Ochoa *et al.*, 2000). Sobre esta base, el xantano ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, para su uso como un aditivo alimenticio sin limitaciones en cuanto a concentración (Kennedy y Bradshaw, 1984; Gomashe *et al.*, 2013). En 1980, la Comunidad Económica Europea agregó la goma xantano a la lista de emulsificantes/estabilizadores de comida, bajo el artículo E-415 (García-Ochoa *et al*., 2000).

2.3 Producción de goma xantano

El xantano se produce por fermentación aeróbica a una temperatura de 27-30 °C, estimulado por la presencia de ácidos orgánicos. En el proceso comercial, el microorganismo puede convertir aproximadamente el 70% del sustrato (principalmente sacarosa, glucosa y ácido cítrico) a goma. La producción está muy influenciada por el microorganismo utilizado, en donde las cepas individuales determinan la composición del polisacárido (De Monaco-Lopes *et al.* 2015). Varios estudios señalan que la producción de goma es posible usando diferentes cepas de *Xanthomonas*. Usando la cepa 1078 de *X. campestris* pv. *campestris*, Rottava *et al.* (2009) lograron obtener un rendimiento de goma de 9.67 g/L, mientras que usando la cepa de *X. arborícola* pv. *pruni* 106, Borges *et al.* (2009) lograron obtener 19.5 g/L de goma, rendimiento que se vio fuertemente influenciado por el pH y el flujo de aire durante el proceso.

2.3.1 Producción industrial de goma xantano

Estudios han reportado que el costo del proceso de producción está influenciado por, la capacidad de la cepa microbiana utilizada, el costo del sustrato, las operaciones de la unidad involucradas en la recuperación del producto y los parámetros fisicoquímicos (Felicia *et al*., 2017). Comercialmente, el xantano se produce mediante un proceso de fermentación por lotes, seguido de un tratamiento térmico, eliminación de células, recuperación con alcohol, secado y molienda de la goma (De Monaco-Lopes *et al.*, 2015).

La producción comercial del xantano utiliza glucosa como sustrato, y generalmente se realiza por lotes ("Bacth production") en lugar de la producción continua, debido a que se ha demostrado que el primer proceso funciona con éxito (Velu y Velayutham, 2014). Diferentes fases de crecimiento así como alteraciones en el medio de cultivo, como el uso de diferentes sustratos y la limitación de nutrientes, no influyen en la estructura primaria del exopolisacárido, pero pueden afectar el grado de decoración, la masa molecular y el rendimiento del xantano (Becker *et al*., 1998). En cuanto al sustrato utilizado para la producción comercial del exopolisacárido, Becker *et al.* (1998) hacen énfasis en que *X. campestris*, por su gran diversidad metabólica, puede usar un amplio rango de fuentes de nitrógeno y carbono, en donde la goma es usualmente producida por fermentación de las cepas con glucosa, sucrosa, almidón, ácidos o hidrolizados enzimáticos de almidón como las mayores fuentes de carbono en cultivos en lote y como fuentes de nitrógeno, hidrolizados de caseína y de levadura son frecuentemente utilizados. Sin embargo, Panyu *et al.* (2016) resaltaron que debido al alto costo de la glucosa y sacarosa (US$ 400-600/ton), la goma producida posee un alto precio (US$ 4,000-5,000/ton), por lo tanto, es de gran importancia encontrar sustratos alternativos de bajo costo para la producción de este polisacárido.

2.3.2 Fuentes de carbono alternativas para la producción del xantano

De acuerdo a diferentes estudios, las fuentes de carbono más comunes para la producción de xantano a partir de cepas de *X. campestris* son la glucosa y la sacarosa, tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio, sin embargo, en las últimas décadas se han estudiado el uso de residuos agroindustriales como fuente de carbono como una alternativa para el cultivo de diferentes cepas de la bacteria, como lo mencionan De Monaco-Lopes *et al.* (2015). De acuerdo a Felicia *et al.* (2017), varios sustratos de bajo costo, como el suero lácteo o la pulpa de tapioca, se han utilizado para la producción efectiva del xantano a través de un proceso de fermentación con rendimientos de hasta 16.4 y 7.1 g/L de goma respectivamente, así como el uso de polvo de semillas de jaca como un sustrato barato para la producción de este biopolímero (51.62 g/L). En otro trabajo, se demostró a nivel de laboratorio que el bagazo de yuca hidrolizado por vía ácida y complementado con fuentes

de nitrógeno podría ser un sustrato adecuado para la producción de xantano utilizando *X. campestris*, obteniendo como resultado un rendimiento promedio de 14 g/L (De Monaco Lopes *et al*., 2015). Panyu *et al.* (2016) reportaron la producción del biopolímero por fermentación usando desperdicios de cocina como único sustrato, los residuos de cocina se pre-trataron primero por un método de hidrólisis simple; la máxima producción de goma, conversión de reducción de azucares y rangos de utilización alcanzaron 11.7 g/L, 67.1% y 94.8%, respectivamente; Las cinéticas de la fermentación en lote mostraron que la estabilidad térmica de la goma obtenida fue similar a una muestra comercial.

Zakeri *et al.* (2015), probaron tres concentraciones diferentes de melaza de caña de azúcar (30, 60 y 90 g/L), como único sustrato de fuente de carbono, en donde los modelos no estructurados pudieron describir este proceso de fermentación con éxito. En otro estudio, la fermentación de xantano por aislamientos locales de *X. campestris* NRRL-B-1449 a partir de melazas de caña de azúcar usando diferentes fuentes de nitrógeno fueron estudiadas a nivel de lote continuo. La producción de la goma fue estimada en un intervalo de 24 h, en donde los resultados mostraron que el rendimiento máximo fue obtenido después de 120 h de incubación (3.6 g/L); Además, el rango óptimo de agitación fue de 500 rpm (Gomashe *et al*., 2013).

La producción de goma xantano por *X. campestris* ATCC 1395 usando melaza de remolacha como fuente de carbono fue estudiado por Kalogiannis *et al.* (2003), en donde la adición de K_2HPO_4 al medio tuvo un efecto significativo en la producción de la goma y la biomasa. Se observó una producción máxima de 53 g/L después de 24 h con 175 g/L de melaza, 4 g/L de K_2HPO_4 y a pH neutro inicial, en donde se concluyó que la melaza de remolacha parece ser un sustrato industrial adecuado para las fermentaciones de este polisacárido.

Niknezhad *et al.* (2015) usando suero de queso (caracterizado por un alto contenido orgánico y poseer un severo riesgo para el ambiente), como fuente de carbono para la producción de xantano con *X. campestris* PTCC1473 y *X. pelargonii* PTCC1474, obtuvieron después de 48 h de fermentación el rendimiento más alto (16.4 g/L) a partir de 65.2 g/L de suero para *X. campestris*.

2.4 Nejayote

La nixtamalización es un proceso de tres pasos en donde primero, los granos de maíz se cocinan en una solución saturada de hidróxido de calcio. A continuación, los granos cocidos se almacenan durante 1–15 h para finalmente, lavarlos para eliminar el exceso de calcio y materia orgánica para obtener el nixtamal (Valderrama-Bravo *et al.*, 2012).

A escalas mayores (nivel industrial) después de la molienda húmeda al hidratar el maíz para la extracción de almidones se procede a la cocción del maíz con un tratamiento alcalino (0.6 a 1.2 % de hidróxido de calcio con respecto al peso del maíz), durante un periodo de 50-70 min a temperaturas entre 90-95°C, y un reposo por 12-14 h. Posteriormente se realiza un drenado y lavado para remover el exceso de calcio y materia seca perdida. El nixtamal obtenido está listo para la molienda húmeda, dando una masa que puede ser utilizada así o deshidratada para producir harina de maíz nixtamalizado, que se puede hidratar para elaborar tortillas y un amplia gama de botanas (Olguín-Arteaga *et al.*, 2015).

Durante la nixtamalización, se generan grandes volúmenes de nejayote; solo en México, la generación anual de este subproducto alcanza los 14.800 millones de litros (Garcia-Depraect *et al*., 2017). Se ha estimado que una planta procesadora de maíz, productora de nixtamal, con capacidad de 600 toneladas por día, llega a generar entre 1,500 y 2,000 m^3 de nejayote diarios. Este efluente se considera contaminante debido a su pH alto (12 a 14) (Salmerón-Alcocer *et al*., 2003), y su elevada carga de materia orgánica (2,540 mg/L) (Valderrama-Bravo *et al*., 2012).

Algunas veces, el nejayote industrial se vierte en cuerpos de agua (ríos o lagos), en suelos o en el alcantarillado público, y pocas veces se le aplica algún tratamiento previo, resultando en un grave problema por la contaminación que resulta si se libera en aguas residuales, esto debido a los altos valores de demanda química y bioquímica de oxigeno que presenta, así como el contenido de una alta carga de sólidos de maíz (Salmerón-Alcocer *et al*., 2003).

2.4.1 Propiedades químicas del nejayote

De acuerdo a Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2010, el nejayote contiene un alto grado de solidos de maíz, en donde cerca del 50% de estos sólidos están suspendidos y contienen aproximadamente 64, 20 y 1,4% de polisacáridos sin almidón, almidón y proteína, respectivamente. El 50% restante consiste en proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en fenoles y carotenoides.

Otros estudios revelaron que el nejayote contiene polisacáridos de arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa y ácido D-glucurónico y aproximadamente 23% de fibra cruda (cuya fracción de fibra dietética puede estimular el crecimiento de probióticos). Por lo tanto, los efluentes agroindustriales tales como las aguas residuales procedentes del procesamiento de cereales pueden ser una fuente abundante de compuestos prebióticos (Figueroa-González *et al*., 2011). Además las proporciones de Demanda biológica de oxígeno/Demanda química de oxígeno DBO/DQO del nejayote (0.6) sugieren que la materia orgánica del sustrato puede ser biodegradada, esto de acuerdo a lo que mencionan (Garcia-Depraect *et al*., 2017).

2.4.2 Aplicaciones del nejayote

Existe evidencia de que el tratamiento adecuado de este subproducto no sólo disminuye la contaminación, también es fuente de compuestos de valor agregado alto con potencial para aplicaciones tecnológicas. Ciertas propiedades biológicas (actividad antioxidante) del nejayote se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos, tales como arabinoxilanos y polifenoles (Díaz-Montes *et al*., 2016).

Por su contenido nutrimental (polisacáridos, fibra cruda, almidón, proteínas, vitaminas y fitoquímicos), y la gran cantidad de residuos de nejayote que se generan, se ha sugerido emplearlo para la producción de biogás, el cultivo de probióticos, y parcial o totalmente para la formulación de medios de cultivo para otros microorganismos (Figueroa-González *et al*., 2011; García-Depraect *et al*., 2017).

Figueroa-González *et al.* (2011) refieren que los precios relativamente altos para cultivar microorganismos de importancia industrial, son debido a que los medios de cultivo

para su producción deben complementarse con aminoácidos y vitaminas, mencionando además que la reducción de los costos a escala industrial puede comenzar con el uso de algunos efluentes residuales agroindustriales como medios de cultivo.

La intención de usar el nejayote se reporta desde hace tiempo, Domínguez-Espinosa y Pacho-Carrillo (2003) produjeron enzimas con actividad amilolítica al incubar *Aspergillus awamori* en el extracto de la nixtamalización; tales enzimas ayudaron a degradar el efluente. La fermentación inició con pH de 4.5 y se prolongó durante 100 h, propiciando la actividad amilolítica de 16 UI, lo que se traduce en la reducción de 42% de los sólidos solubles y hasta 21% de la DQO. Salmerón-Alcocer *et al*. (2003) trataron biológicamente el nejayote con microorganismos aislados de suelo contaminado por el mismo efluente. Ellos implementaron un sistema de biorreactores en cascada triple y emplearon el residuo como medio de cultivo para *Acinetobacter* spp., *Paenibacillus amylolyticus* y *Pseudomonas putida*. Los resultados demostraron una disminución en la DQO de 28,000 a 3,612 ppm después del tratamiento. En otro trabajo, Garcia-Depraect *et al.* (2017) evaluaron la producción de bio-hidrógeno (bioH_2) en un reactor discontinuo a partir de la co-digestión de nejayote, evaluando los efectos de diferentes proporciones de ambos residuos, observando que la estructura microbiana del inóculo permitió la adaptabilidad para alimentarse de los sustratos, indicando una alta robustez en esta clase de residuos que podrían considerarse como sustratos con potencial para la producción de bioH_2 debido a su alta resistencia, sin costo y con abundante disponibilidad.

Los usos que se le han dado al nejayote están encaminados a la recuperación de componentes de valor agregado alto (González *et al*., 2003), recuperación de arabinoxilanos (Niño-Medina *et al*., 2009; Paz-Samaniego *et al*., 2015), como fuente de enriquecimiento para alimentos funcionales (Acosta-Estrada *et al*., 2014), o como medio de cultivo para crecimiento de bacterias (Blanco-Gámez *et al*., 2008). Con base en esto y a la aplicación de diferentes metodologías para tratar el nejayote, se resalta el uso de este efluente residual y su aprovechamiento para una contribución al medio ambiente a través de diferentes procesos como la obtención de productos de valor agregado, en este caso la producción de la goma xantano.

3. JUSTIFICACIÓN

La goma xantano, al ser un biopolímero ampliamente usado en diferentes ramas de la industria alimenticia, energética y farmacéutica, representa un compuesto de suma importancia económica.

Dados los elevados costos de producción por la materia prima para su elaboración, y los altos requerimientos por la industria, la optimización en la obtención de la goma representa un factor importante. Por tal motivo el uso de otras fuentes de carbono y dada la versatilidad metabólica de *X. campestris*, el nejayote representa una alternativa viable dadas sus propiedades para ser considerado como materia prima en la producción de este biopolímero, así como en la reducción de la recalcitrancia del efluente como subproducto de la fermentación de este.

4. HIPÓTESIS

La goma xantano producida a partir del nejayote a nivel semi-piloto por *X. campestris* cumple con las características fisicoquímicas para su empleo a nivel industrial

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la factibilidad y optimización de la producción y escalamiento de goma xantano a partir de nejayote a nivel semi-piloto.

5.2 Objetivos específicos

i. Optimizar la producción de goma xantano a partir de nejayote a nivel laboratorio.

ii. Evaluar las características fisicoquímicas de la goma xantano producida a nivel laboratorio.

iii. Escalar la producción de goma xantano a nivel semi-piloto.

iv. Determinar las características fisicoquímicas de la goma xantano producida a nivel semi-piloto.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se especifique lo contrario, los medios de cultivo y reactivos empleados se adquirieron en Sigma-Aldrich Química de México, S.A. de C.V., Toluca de Lerdo, México.

6.1 Mantenimiento de *Xanthomonas campestris* y preparación del inóculo

Para este proyecto se usó la cepa ATCC-29497 de *X. campestris* adquirida y conservada bajo las especificaciones de la *American Type Culture Collection* (ATCC), la cual se cultivó en placas con agar YGC, medio recomendado por la ATCC para el crecimiento del microorganismo, el cual consiste en 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de sacarosa, 20 g/L de carbonato de calcio y 15 g/L de agar bacteriológico ajustado a un pH de 7.0. Las placas se incubaron por 48 h a 27°C. Para la preparación del inóculo, para los tratamientos experimentales, una asada de las células de la bacteria se transfirió de las placas con medio sólido a un matraz conteniendo 100 mL de medio de cultivo líquido YGC manejando las cantidades de reactivo antes mencionadas. El matraz se incubó a 27°C a 120 rpm por 48 h.

6.2 Preparación de sustratos

La muestra de nejayote se obtuvo de la empresa Gruma, S.A. (Guadalupe, N.L., México), además se trabajó con una muestra semi-industrial del sustrato, el cual fue obtenido de un molino ubicado en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey, N.L., México.

Después de los respectivos análisis (medición del pH inicial de los residuos al momento de su obtención), ambas muestras se homogenizaron y sometieron a un proceso de filtración utilizando una malla Mont INOX NO. 80 (CTR, Monterrey, N.L., México), para la separación de sólidos y material insoluble de mayor tamaño. Posteriormente se prepararon matraces con 90 mL del residuo filtrado y se ajustó el pH a 7.0. En el caso de la

muestra de residuo semi-industrial se evaluaron distintos aditivos (tratamientos) para mejorar la producción; nejayote con 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de carbonato de calcio, y 1 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, como lo reporta García-Ochoa *et al.* (1992), además se trabajó con combinaciones de estos mismos reactivos para determinar el rendimiento de producción de la goma obtenida en cada una, todo esto utilizando el nejayote como base para el medio de cultivo. Los medios fueron esterilizados por una hora, esto último con el objetivo de eliminar microorganismos presentes en la muestra al momento de su llegada.

Después de acondicionar los tratamientos de nejayote, estos fueron utilizados como medio de fermentación para la producción de la goma, inoculando con 10% v/v a una concentración final de $1x10^8$ células/mL de *X. campestris* como preinoculo, los cuales fueron incubados a una temperatura de 27°C a 120 rpm por 5 días.

Para comparar el rendimiento del polisacárido obtenido a base de nejayote (control negativo), se manejó como control la goma producida utilizando como sustrato el medio YGC. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Además, se llevó a cabo la producción de xantano a partir de aquellos tratamientos de nejayote semi-industrial (mencionados con anterioridad) que mostraron producción del polisacárido, utilizando volúmenes de 950 mL de medio de residuo filtrado y a pH 7.0, completando a volúmenes de 1 L, manejando la misma concentración de inoculo, así como las condiciones de incubación pero aumentando la velocidad de agitación a 150 rpm y comparando el rendimiento de goma obtenida con la del control positivo (medio YGC), realizando la producción por triplicado para servir como repeticiones para los análisis estadísticos.

6.3 Producción de la goma xantano

6.3.1 Recuperación de goma xantano

La goma xantano se recuperó a partir de las muestras siguiendo el protocolo de García-Ochoa *et al.,* (2000). Para lograrlo, mediante un tratamiento con calor para eliminar las bacterias presentes, se colocaron las muestras en tubos para un manejo más sencillo y se

sometieron a ebullición por 20-30 min aproximadamente. Después se pusieron bajo condiciones de centrifugación a 10,000 rpm por 5 min a 4°C con el objetivo de separar el sobrenadante donde se re-suspendió la goma. Con el objetivo de separar el biopolímero, el sobrenadante se colocó en viales nuevos y se agregó un volumen de isopropanol, usando tres veces el volumen de este en relación al del sobrenadante, para permitir la separación del polisacárido. Para determinar el peso seco de la goma, esta se separó mecánicamente usando una espátula y se colocó en una balanza de infrarrojos (AND AD-4715, Tokio, Japón), para calcular el peso seco de la goma manejando condiciones de 121ºC.

6.3.2 Rendimiento del xantano producido a partir de nejayote industrial

Para cada uno de los tratamientos, los ensayos de producción de goma se llevaron a cabo en un intervalo de 5 días; en el caso del tratamiento con el residuo industrial, se tomaron cantidades establecidas de la muestra cada 8 h durante el tiempo de fermentación y posteriormente se realizó la separación del biopolímero siguiendo el protocolo previamente descrito, obteniendo mediante el secado con la balanza de espectro infrarrojo, la producción en g/L del polisacárido a los diferentes tiempos de cultivo, y así obtener las respectivas graficas de producción a lo largo del ensayo en donde se trabajó solamente con el control negativo de la muestra, es decir el residuo de nejayote sin ningún aditivo comparándolo con los resultados de rendimiento obtenidos a partir del medio YGC.

6.3.2.1 Análisis fisicoquímico del xantano producido a partir de nejayote industrial

Una vez obtenida la goma a partir del nejayote industrial, esta fue molida empleando una licuadora Ninja Blender (Modelo BL770A 30), posteriormente 100 g fueron enviados al laboratorio del Instituto Mexicano del Petróleo, Dirección de Servicios de Ingeniería, Gerencia de Servicios Químicos (CDMX, México), para el análisis de sus características fisicoquímicas y finalmente los resultados fueron comparados con base a los parámetros establecidos por la norma NRF-300-PEMEX-2012.

6.3.3 Rendimiento del xantano producido a partir de nejayote semi-industrial

En el caso del residuo semi-industrial de nejayote, se evaluaron los tratamientos (distintos nutrientes como aditivos y combinaciones de los mismos), como una estrategia para mejorar la producción de xantano, los cuales se mencionan a continuación:

- Medio de cultivo YGC (Recomendado)
- Nejayote
- Nejayote + extracto de levadura (10 g/L)
- Nejayote + carbonato de calcio (20 g/L)
- Nejayote + sulfato de magnesio heptahidratado (1g/L)
- Nejayote + extracto de levadura + carbonato de calcio
- Nejayote + extracto de levadura + sulfato de magnesio heptahidratado
- Nejayote + carbonato de calcio + sulfato de magnesio heptahidratado
- Nejayote + extracto de levadura + carbonato de calcio + sulfato de magnesio heptahidratado

Como se mencionó anteriormente, los ensayos de producción se realizaron en volúmenes de 100 mL, para después escalar a 1 L, se llevaron a cabo en un intervalo de 5 días, tomando muestra cada 24 h durante el tiempo de fermentación, para medir el rendimiento de producción a lo largo del ensayo, en donde se compararon los resultados de cada uno de los tratamientos establecidos y se concluyó cuál de estos presentó mejores resultados.

6.4 Actividad celular del cultivo de *X. campestris*

La actividad celular de la bacteria fue evaluada mediante ensayo de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para los ensayos realizados utilizando el nejayote industrial, se tomaron cantidades establecidas de la muestra cada 8 h durante el tiempo de fermentación y posteriormente se realizó el ensayo de la actividad celular, en el cual a partir del inicio de la fermentación (tiempo 0) se colocaron 125 µL del cultivo de la bacteria en placas de 96 pocillos (utilizando un pocillo por muestra) para luego añadir 15 µL del reactivo MTT por pozo, una vez realizado esto, la placa se llevó a incubación a

condiciones de 27°C por 20 min aproximadamente. Una vez pasado el tiempo de incubación, a cada uno de los pocillos con muestra se les adicionó un total de 20 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) con el objetivo de disolver las muestras en un solvente orgánico y llevar a cabo la medición de la absorbancia de cada uno de los pocillos a una longitud de onda de 570 nm. Todo esto se llevó a cabo comparando los tratamientos de control negativo (nejayote) así como de control positivo (medio YGC) y por triplicado y así obtener una curva de la actividad celular del microorganismo desde el inicio hasta el final del tiempo de fermentación.

Los experimentos realizados con la muestra de nejayote semi-industrial siguieron el protocolo mencionado con anterioridad, a diferencia que el muestreo se realizó cada 24 h a lo largo del tiempo de cultivo y se obtuvieron los resultados de los tratamientos suplementados con los aditivos ya antes mencionados.

6.5 Análisis fisicoquímico del xantano producido a partir de nejayote semi-industrial

Una vez obtenida la goma a partir de los tratamientos de nejayote semi-industrial, esta fue molida empleando una licuadora Ninja Blender (Modelo BL770A 30), para así determinar el contenido de grupos piruvato y acetilo covalentemente unido al polisacárido, estos como indicadores de sus características reológicas como lo son la viscosidad y el peso molecular respectivamente (López *et al*., 2004) (De Monaco-Lopes *et al.*, 2015).

6.5.1 Contenido de piruvato y acetilo covalentemente unido al polisacárido

El contenido de grupos piruvato unidos al polisacárido fue determinado por un método colorimétrico, después de la hidrolisis de las muestras de xantano (0.5%) en HCl 0.1 M a 100 °C por 4 h (Cheng *et al.*, 2012), esto con el propósito de que las muestras se disolvieran por completo, se tomaron 2.5 mL de suspensión de goma y fueron colocados en viales con 10% p/v de Na_2HPO_4 0.5 M y se incubaron a 37°C por 1 h, seguido a esto, a cada vial se le añadieron 2 mL de ácido tricloroacético al 10%, se mezclaron las muestras y centrifugaron a 2500 rpm por 10 min, se tomó después 1 mL de sobrenadante y en un vial nuevo se agregaron 0.5 mL de 2,4 dinitrofenilhidrazina (pesando 0.4g del reactivo,

colocando 2 mL de ácido sulfúrico concentrado con precaución y 3 mL de agua destilada hasta disolución y finalmente agregando a la solución 12 ml de etanol, agitando cuidadosamente hasta homogenizarlo), finalmente se agregaron a los viales 1 mL de NaOH 0.1 M en donde la formación de un precipitado rojo indicó la presencia de piruvato, para después leer la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro SmartSpec Plus (BioRad, Ciudad de México, México). Como un control para observar si la reacción se llevó a cabo correctamente, se realizó el mismo ensayo utilizando un medio enriquecido con piruvato comercial manejando también 2.5 mL de esta muestra y siguiendo la metodología antes mencionada.

Para determinar el contenido de acetil se trabajó según lo reportado por McComb & McCready (1957), en donde 200 µL de la solución de xantano previamente hidrolizada fueron colocados en viales con 400 µL de una mezcla 1:1 de hidroxilamina HCl 2 M y NaOH 3.5 M, se incubaron a temperatura ambiente por 2 min y seguido a esto, 200 µL de HCl 5.65 M y 200 µL de $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ a 0.37 M en HCl a 0.1 M fueron agregados, se mezcló esta solución en donde la formación de un precipitado de color marrón indicó la presencia de grupos acetil, leyendo valores de absorbancia a 540 nm.

Para el caso de ambos ensayos, se trabajó con una muestra de goma xantano comercial al 0.5% hidrolizándola en HCl 0.1 M a 100 °C por 4 h, para ser utilizada como control positivo, siguiendo las metodologías previamente descritas, y leyendo valores de absorbancia a 540 nm.

6.5 Escalamiento de la producción de goma xantano a nivel semi-piloto

Aquel tratamiento del nejayote semi-industrial que presentó los mejores resultados en cuanto a las variables estudiadas, fue utilizado como sustrato para la producción de la goma a nivel semi-piloto, en donde 8 L del medio de producción estéril suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ fueron agregados en un biorreactor New Brunswick Scientific Modelo Q 729400 (AccesoLab, Monterrey, N.L., México) de 14 L, para luego inocularlos con el pre-inóculo de la bacteria manejando las concentraciones mencionadas con anterioridad y adicionando al reactor aceite vegetal estéril como antiespumante a lo largo del proceso y a condiciones de agitación mediante la administración de un flujo volumétrico de aire de 5

LPM (litros por minuto). Durante el periodo de incubación, se llevaron a cabo muestreos en intervalos de 8 h, para realizar las respectivas cinéticas de crecimiento mediante ensayo de MTT y determinar la producción de goma siguiendo los protocolos ya establecidos, todo esto realizando la producción en tres lotes que sirvieron como repeticiones para los análisis estadísticos, y efectuar la comparación de medias por la prueba de diferencia significativa ($P < 0.05$) de Tukey, utilizando como variable independiente aquel medio de cultivo utilizado para la producción de xantano y como variables dependientes aquellos resultados en cuanto a rendimiento y actividad celular del cultivo.

6.5.1 Contenido de piruvato y acetilo covalentemente unido al polisacárido

Una vez obtenidas las muestras a partir del biorreactor, estas fueron molidas como se mencionó anteriormente para realizar los respectivos análisis de determinación de contenido de piruvato y acetil como se describió previamente, manejando concentraciones de xantano de 0.5 % y comparando los resultados obtenidos con los valores de absorbancia resultados de la muestra comercial de goma.

6.6 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante curvas no lineales de las ecuaciones mediante el software de Excel (Versión Professional Plus 2010). Se comparó tanto la producción así como la actividad celular del cultivo en el medio a base de nejayote industrial con lo obtenido a partir del control YGC, mientras que en el caso de los tratamientos a partir del residuo semi-industrial, la selección del suplemento del nejayote con mayor producción de goma xantano se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con diferencias significativas a una $P \leq 0.05$, utilizando el paquete estadístico SPSS (IBM Statistics Versión 20), evaluando la variable respuesta con una distribución normal de cada uno de los factores estudiados, tomando un mínimo de 3 repeticiones de los tratamientos (mencionados con anterioridad) y combinaciones de los mismos como variables independientes. Como variable dependiente se tomó la producción (g/L), y la

actividad celular por la prueba de MTT, usando tres repeticiones para los análisis estadísticos, en donde al momento de detectar diferencias significativas se efectuó una comparación de medias por la prueba de diferencia significativa ($P < 0.05$) de Tukey.

Para detectar si habían diferencias en el contenido de grupos piruvato y acetil entre las muestras, se realizó el respectivo análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de $P \leq 0.05$, evaluando la variable respuesta con una distribución normal de los factores estudiados, tomando un mínimo de 3 repeticiones y usando como variable dependiente los valores de absorbancia leídos a 540 nm, efectuando una comparación de medias por la prueba de diferencia significativa ($P < 0.05$) de Tukey, en dado caso de detectar diferencias significativas. Para el caso de los ensayos a partir de la muestra obtenida del biorreactor, se llevó a cabo una prueba T de student para muestras independientes ($P < 0.05$) y observar si se presentaba una diferencia significativa para el contenido de piruvato y acetil covalentemente unidos al polisacárido en comparación con la muestra de goma comercial.

7. RESULTADOS

7.1 Producción de goma xantano y actividad celular de *X. campestris* usando nejayote industrial

La actividad celular tuvo un aumento exponencial en las primeras 24 horas, mostrando posteriormente una disminución en comparación con el tratamiento con el medio YGC, en el cual se mantuvo la actividad celular durante el tiempo de incubación. Los valores de mayor absorbancia a una D.O. de 570 nm fueron de 3.884 y 2.713 para las muestras del medio control y el de nejayote industrial respectivamente a las 24 h de cultivo (Figura 1).

En el caso de la producción del xantano, se aprecia que a las 24 h de incubación la cantidad de goma obtenida fue la misma en ambos medios de fermentación. Posteriormente, la producción en el medio a base de nejayote no mostro un incremento, obteniendo resultados no mayores a 4 g/L hasta el final del ensayo. Por el contrario, en el caldo YGC, la producción de goma continuó aumentando hasta las 96 h, obteniendo rendimientos de hasta 9.3 g/L (Figura 1).

Fig. 1. Actividad celular (rojo) y producción de goma xantano (verde) del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando nejayote industrial. Las barras en cada tiempo representan la desviación estándar.

7.2 Cualidades físico-químicos del xantano obtenido a partir de nejayote industrial

Los resultados de los análisis de los parámetros físico-químicos del xantano obtenido a partir de la muestra industrial del residuo cumplieron con las especificaciones establecidas con base a la Norma NRF-300-PEMEX-2012 para los parámetros de humedad así como de viscosidad, mostrando valores de 5.90% y 24.0 cP (centipouls) con una lectura a 600 r/min respectivamente, no así para el tamaño de partícula en donde se presentaron resultados de las dimensiones de esta con valores por debajo a las especificaciones requeridas (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis conforme a la Norma NRF-300-PEMEX-2012 de la goma xantano producida por *X. campestris* a partir de nejayote industrial

Parámetros	Especificación	Resultado
Humedad	12% máximo	5.90%
Tamaño de partícula		
< 425 µm	95% mínimo	8.5%
< 75 µm	50% máximo	1.4%
Viscosidad		
Lectura a 600 r/min	18 cP mínimo	24.0 cP
Lectura a 300 r/min	26 cP mínimo	33.0 cP
Lectura a 6 r/min	400 cP mínimo	400.0 cP
Lectura a 3 r/min	600 cP mínimo	700.0 cP
Gel a 10 min	6.13 Pa mínimo	6.6 Pa

7.3 Producción de xantano y actividad celular de *X. campestris* en nejayote semi-industrial

7.3.1 Rendimiento de goma xantano producido en nejayote

La medición de la producción del xantano se realizó en intervalos de 24 h utilizando la muestra semi-industrial del residuo (control negativo) así como tratamientos del mismo como sustrato del medio de fermentación en comparación con el control positivo (caldo YGC).

En cuando a los ensayos con volúmenes de 100 mL, en las primeras 24 h de cultivo, la producción es mayor en el medio a base de nejayote así como en los tratamientos del mismo suplementado con carbonato de calcio y sulfato de magnesio hepta-hidratado, en comparación con el medio YGC, manteniéndose valores similares de producción hasta el final del tiempo de fermentación en el caso de los tratamientos del residuo, no así para el control de YGC en donde se observó un aumento exponencial en la producción de goma hasta el final del cultivo. Además, la producción de goma se presentó hasta las 48 h en los tratamientos suplementados con extracto de levadura y $CaCO_3$ + $MgSO_4$•$7H_2O$. Se puede observar que aquellos tratamientos del residuo con extracto de levadura + $CaCO_3$, extracto de levadura + $MgSO_4$•$7H_2O$ y extracto de levadura + $CaCO_3$ + $MgSO_4$•$7H_2O$ no presentaron producción de goma (Figura 2).

Cabe destacar que aquel tratamiento que mostró mejores resultados en cuanto a producción del biopolímero fue el de nejayote suplementado con $CaCO_3$ obteniendo resultados de 5.7 g/L a las 120 h, siendo menor en comparación con la producción obtenida utilizando el medio YGC con valores de 7.36 g/L llegadas las mismas 120 h.

Fig. 2. Producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, utilizando volúmenes de 100 mL, de nejayote semi-industrial. Las barras en cada tiempo representan la desviación estándar.

Seguido a esto, se llevó a cabo la producción de xantano a partir de aquellos tratamientos de nejayote semi-industrial que mostraron producción del polisacárido, utilizando volúmenes de hasta un litro de medio.

Durante las primeras 24 h de cultivo, la producción de xantano fue mayor en aquellos tratamientos de nejayote, obteniendo rendimientos de hasta 3 veces más en comparación con el medio control (1.93 g/L) con valores de producción de 5.7 y 6.4 g/L para los medios de nejayote y nejayote + $CaCO_3$ respectivamente, en el caso del tratamiento del residuo suplementado con MgSO4•7H2O, este último mostró una producción de hasta 9.96 g/L siendo el que presento mejores resultados en cuanto a obtención del biopolímero y cuya producción se mantuvo constante hasta el final de la fermentación presentando un rendimiento máximo de 11.46 g/L a las 96 h siendo casi 3 veces mayor en comparación con la goma obtenida del medio YGC (4.16 g/L). Para el caso de los tratamientos del residuo suplementado con extracto de levadura y $CaCO_3$ + $MgSO_4$•$7H_2O$ no se mostró producción de xantano hasta las 48 h (Figura 3).

Fig. 3. Producción de goma xantano del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, utilizando volúmenes de 1 L, de nejayote semi-industrial

7.3.2 Actividad celular de *X. campestris* usando nejayote semi-industrial

La medición de actividad celular de *X. campestris* por ensayo MTT se realizó en intervalos de 24 h comparando los resultados de los tratamientos con el control positivo (caldo YGC).

Para el caso de los ensayos utilizando volúmenes de 100 mL, en la mayoría de los tratamientos presentaron un aumento en la actividad celular durante las primeras 48 h con valores de absorbancia comparables para el caso del tratamiento del nejayote + $CaCO_3$ y el control YGC (3.548 y 3.773 respectivamente), en donde después de este tiempo la actividad metabólica de la bacteria comienza a disminuir, no así para en el medio YGC en donde a partir de este tiempo se puede observar el comienzo de una fase estacionaria con valores constantes hasta el final del tiempo de fermentación, además del tratamiento del nejayote suplementado con extracto de levadura en el cual la actividad celular se mantuvo en aumento hasta las 72 h con un valor de absorbancia a D.O. de 570 nm de 3.787 (Figura 4).

Fig. 4. Actividad celular del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando volúmenes de 100 mL, de nejayote semi-industrial

Seguido a esto, se llevó a cabo la evaluación de la actividad celular del cultivo de *X. campestris* a partir de aquellos tratamientos que mostraron producción del polisacárido, utilizando volúmenes de hasta un litro de medio.

En cuanto a las pruebas realizadas, se logra apreciar en el medio control, como la actividad celular del cultivo es mayor en comparación con los tratamientos del nejayote con valores de absorbancia a D.O. de 570 nm de hasta 3.795 durante las primeras 24 h, en comparación con los valores más cercanos pertenecientes a el tratamiento del residuo + $CaCO_3$ con un valor de 2.639, en donde a partir de este tiempo la actividad metabólica de la bacteria aumentó hasta las 48 h para después mantenerse constante hasta el final de la fermentación, esto a diferencia del medio control en donde a partir de las primeras 24 h el cultivo comienza a entrar en una especia de fase estacionaria. En el caso del resto de los tratamientos, a partir de las 72 h los valores de absorbancia de cada uno logran mantenerse constantes hasta el final del ensayo siendo en estos menor la actividad celular en comparación con los otros dos tratamientos.

Fig. 5. Actividad celular del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación, usando volúmenes de 1 L, de nejayote semi-industrial

7.4 Análisis de la goma xantano obtenida durante la fermentación usando nejayote

Al analizar la goma obtenida de la fermentación del nejayote se observó que la muestra obtenida a partir del control positivo presenta características que lo diferencian claramente del resto de las muestras, como lo son un mayor tamaño, así como una consistencia más esponjosa y una apariencia más limpia (coloración blanca); En el caso de las gomas obtenidas a partir de los tratamientos de nejayote semi-industrial se puede notar que estas cuentan con un menor tamaño y consistencia más compacta y dura en comparación con el control antes y después del secado, además de una coloración oscura. El polisacárido obtenido del medio a base del residuo industrial resultó con una coloración aún más oscura y al momento de secar este, perdió su característica esponjosa y resultó en un producto aún más compacto (Figura 6).

Fig. 6. Goma xantano producida a partir de medio a base nejayote industrial y semi-industrial con diferentes suplementos

7. 5 Producción de xantano y actividad celular en los cultivos

7.5.1 Producción de goma xantano a partir del nejayote

La producción del biopolímero utilizando el control YGC resultó superior a los 8 g/L, observando una diferencia significativa en la obtención del xantano comparándolo con la muestra obtenida a partir del nejayote industrial ($F_{4,5} = 87.068$; $p < 0.05$) la cual presentó un rendimiento de aproximadamente 3 g/L (Fig. 7).

Para aquellos tratamientos realizados utilizando como sustrato la muestra de residuo semi-industrial en volúmenes de 100 mL, la producción utilizando como sustrato el nejayote sin ningún aditivo fue de 5.1 g/L, siendo menor en comparación con el control positivo, también puede observarse una diferencia significativa en la producción del xantano entre tratamientos ($F_{18,26}$ = 144.598; $p<0.05$), siendo aquel de nejayote suplementado con $CaCO_3$ el que mostró mejores resultados con una producción de 5.7 g/L (Figura 8).

Fig. 7. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote industrial usando volúmenes de 100 mL. Las barras de las columnas representan la desviación estándar (HSD, α = 0.05).

Fig. 8. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 100 mL. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$).

Para los ensayos realizados utilizando los volúmenes de 1 L, se obtuvieron resultados que claramente difieren con lo obtenido en las pruebas anteriores, observando que la producción en el medio control disminuyó a la mitad (3.86 g/L) y fue menor en comparación con los tratamientos de nejayote, siendo en este caso que el tratamiento del residuo suplementado con $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ mostró los mejores resultados con una producción de 10.83 g/L al final del cultivo, siendo casi el doble de superior en comparación con los resultados obtenidos para este mismo tratamiento en los ensayos de 100 mL, observándose además una diferencia significativa en la producción del polisacárido entre los tratamientos ($F_{5,12} = 53.330$; $p<0.05$). En cuanto al tratamiento de nejayote + $CaCO_3$ se presentaron resultados similares en comparación con las pruebas anteriores, con una producción de 6.06 g/L (Figura 9).

Fig. 9. Producción de goma xantano al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 1 L. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

7.5.2 Actividad celular de *X. campestris* cultivada en medios a base de nejayote

En el caso de las pruebas realizadas utilizando el residuo industrial, los valores de absorbancia D.O. 570 nm en el medio YGC fueron mayores (más del doble) que en el medio de nejayote (3.636 y 1.506 respectivamente), en donde hay una diferencia significativa en la actividad celular del microorganismo entre tratamientos ($F_{4,5}$ = 660.080; p<0.05) (Figura 10).

Para los ensayos de 100 mL con la muestra de nejayote semi-industrial, aquellos tratamientos que presentaron los mayores valores de absorbancia al final del tiempo de fermentación, fueron los suplementados con extracto de levadura; extracto de levadura + $CaCO_3$ + $MgSO_4$•$7H_2O$ y extracto de levadura + $CaCO_3$, con valores a una longitud de onda de 570 nm de 3.198, 2.933 y 2.838 respectivamente, siendo menores en comparación con los valores obtenidos en el medio YGC (3.750), apreciándose diferencia significativa en la actividad celular del microorganismo entre tratamientos ($F_{18,26}$ = 37.636; p<0.05) (Figura 11).

Fig. 10. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote industrial. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. (HSD, α = 0.05).

Fig. 11. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 100 mL. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre casa columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

Los valores de absorbancia en aquellos ensayos realizados utilizando 1 L del sustrato de nejayote, mostraron números similares a aquellos obtenidos a partir de los ensayos con volúmenes de 100 mL, a excepción del tratamiento del residuo suplementado con extracto de levadura en donde se obtuvieron valores de D.O. a 570 nm de 2.154 y 3.198

respectivamente, siendo en este caso menor al valor obtenido a partir del medio control, en donde el medio de nejayote suplementado con $CaCO_3$ fue el que presento el mayor valor de absorbancia de 2.786 siendo aun así menor en comparación con el medio YGC, apreciándose diferencias entre la actividad celular del microorganismo y los tratamientos ($F_{5,12}$ = 72.094; p<0.05) (Figura 12).

Fig. 12. Valores de absorbancia del cultivo de *X. campestris* al final del tiempo de fermentación a partir de nejayote semi-industrial y tratamientos del mismo utilizando volúmenes de 1 L. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

7. 6 Contenido de grupos piruvato y acetil covalentemente unidos al polisacárido

El contenido de grupos piruvato se determinó en las muestras obtenidas a partir de ambos ensayos, comparando entre resultados obtenidos a partir de 100 mL así como comparando entre los valores obtenidos a partir de 1 L (Fig. 13), en donde se puede observar que para el caso de ambos ensayos, el contenido de piruvato en los tratamientos a base de nejayote fue menor en comparación a los valores obtenidos en el caso del control (YGC), así como también puede apreciarse que no hay una diferencia significativa entre los

tratamientos a base del residuo en ambos ensayos ($F_{8,18}$ = 68.334; p > 0.05); ($F_{8,18}$ = 77.076; p > 0.05), además se aprecia cómo los valores de absorbancia fueron similares para el caso del medio YGC en comparación con la muestra de goma comercial (0.153 y 0.148 en los ensayos de 100 mL respectivamente y de 0.131 y 0.148 para los ensayos de 1 L), siendo estos menores en el caso de lo obtenido a partir del ensayo llevado a cabo usando el control de medio enriquecido con piruvato comercial, en donde los valores fueron de 0.175 (D.O. 540 nm).

Fig. 13. Contenido de piruvato en las muestras de goma obtenidas a partir de ambos ensayos (100 mL y 1 L) usando nejayote semi-industrial (MEPC = Medio Enriquecido con Piruvato Comercial). Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

Para el caso del contenido de grupos acetil, de igual manera se puede observar que no hay una diferencia, estadísticamente hablando, en los valores de absorbancia obtenidos entre los tratamientos a base del nejayote para ambos ensayos ($F_{6,14}$ = 81.749; p > 0.05);

($F_{6,14}$ = 61.581; $p > 0.05$) (Fig. 14), salvo aquel del residuo sin ningún aditivo (0.056 D.O. 540 nm) para el ensayo con volumen de 1 L siendo menor en comparación con el resto de resultados, apreciándose que como en el caso del contenido de piruvato, los valores de absorbancia son menores en comparación con el control de YGC así como lo obtenido con la muestra de goma comercial.

Fig. 14. Contenido de acetil en las muestras de goma obtenidas a partir de ambos ensayos (100 mL y 1 L) usando nejayote semi-industrial**.** Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre cada columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

7.7 Producción de xantano y actividad celular de *X. campestris* en nejayote semi-industrial a nivel semi-piloto

En el ensayo realizado a nivel semi-piloto, se logró apreciar un aumento exponencial tanto en la producción del biopolímero así como en la actividad celular del cultivo durante las primeras 16 h de la fermentación esto para el tratamiento del residuo suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, con valores de 3.2 g/L y 1.554 (D.O. 570 nm) respectivamente, manteniéndose ambos valores constantes a partir de las 72 h de cultivo y con un valor máximo de producción de 4.2 g/L a las 80 h con su respectiva absorbancia de 1.902 (Figura 15).

Fig.15. Actividad celular (rojo) y producción de goma xantano (verde) del cultivo de *X. campestris* durante la fermentación a nivel semi-piloto, usando nejayote semi-industrial.

7.8 Contenido de grupos piruvato y acetil covalentemente unidos al polisacárido

Para el caso del contenido de piruvato en la muestra de goma obtenida a partir del biorreactor, se logra apreciar que los valores de absorbancia son comparables a lo obtenido

a partir del ensayo realizado con la muestra comercial de xantano, mostrando valores de 0.107 y 0.148 respectivamente (D.O. 540 nm) siendo estos estadísticamente similares ($F_{4,2}$ = 3.522; $p > 0.05$) (Fig. 16), sirviendo esto como un indicador indirecto de la viscosidad de la muestra la cual podría ser similar a la del control usado, así como también lo es para el contenido de acetil donde los valores fueron de 0.130 y 0.127 para el caso de la muestra a partir del residuo y la goma comercial respectivamente ($F_{4,3}$ = 0.720; $p > 0.05$), esto último podría indicar acerca del peso molecular de la muestra, la cual se ha visto relacionada con el contenido de grupos acetil en particular.

Fig. 16. Contenido de piruvato y acetil en las muestras de goma obtenidas a partir del ensayo en biorreactor usando nejayote semi-industrial. Las barras de las columnas representan la desviación estándar. Diferentes letras sobre casa columna indican valores significativamente menores (Tukey HSD, α = 0.05).

8. DISCUSIÓN

Se han reportado diferentes clases de fuentes de carbono para la producción de goma xantano, en donde generalmente la concentración de carbono afecta en el rendimiento de conversión de azúcar al polisacárido (Kennedy & Bradsahw 1984; Woiciechowski *et al.*, 2004). Rosalam & England (2006) mencionan que como alternativas para la producción de xantano se han probado sustratos como arroz hidrolizado, cebada y harina de maíz, suero ácido y melaza de caña de azúcar, pero la glucosa sigue siendo la mejor opción en términos de rendimiento, suministro y calidad del producto.

La composición, así como las características fisicoquímicas del nejayote, representan una considerable fuente de carbono como lo es para la presencia de carbohidratos totales así como azúcares reductores totales (García-Depraect *et al.*, 2017), sirviendo como una potencial fuente de carbono para llevar a cabo este tipo de bio-procesos, en donde la capacidad degradativa de las bacterias depende directamente de la disponibilidad del sustrato (Acosta-Estrada *et al.*, 2014). Esto último podría explicar la razón por la cual tanto la producción de xantano así como la actividad celular del microorganismo usando como medio el nejayote industrial comenzó a disminuir a partir de las 24 h de cultivo (Figura 1), en donde a partir de este tiempo la disponibilidad de la fuente de carbono podría haber disminuido, o los nutrientes hayan sido consumidos por completo por parte del microorganismo y por ende se detuvo su actividad celular.

Aun así, la producción de goma xantano utilizando el nejayote industrial mostró resultados positivos para la obtención del biopolímero en las primeras 24 h de cultivo, en donde la cantidad de goma fue comparable con el control positivo, mostrando resultados de producción de 2.86 y 3 g/L para los medios de Nejayote y caldo YGC respectivamente. Como se puede observar (Figura 1), a partir de este tiempo el rendimiento en el medio a base de nejayote se mantuvo constante, obteniendo resultados no mayores a 4 g/L, a diferencia de lo mostrado en el medio YGC, en el cual la producción continuo aumentando hasta casi llegado el final del tiempo de fermentación, con resultados de 9.3 g/L.

En este estudio se logró obtener el biopolímero mediante la fermentación del nejayote como único sustrato, con rendimientos cercanos a los 4 y 5 g/L de xantano para los residuos industrial y semi-industrial respectivamente, lo cual es deseable ya que como

mencionan (Li *et al.,* 2016), para obtener la producción de goma usando sustratos alternativos la adición de nutrientes adicionales es requerida en la mayoría de los casos. Por ejemplo, extracto de levadura y muchas sales fueron adheridas al medio cuando una muestra de pulpa de tapioca fue usada como sustrato de fermentación, lo cual incremento el costo del proceso (Li *et al.,* 2016). Así, la utilización de materiales de bajo costo como único sustrato es deseable, siendo el caso obtenido en estos experimentos. Esto se relaciona a un estudio llevado a cabo por Katherine *et al*. (2017), donde reportaron la producción de goma xantano por *X. campestris* NCIM 2961 utilizando polvo de semilla de jaca como un nuevo sustrato, con una producción de goma (51.62 g/L); se observó al nivel óptimo del polvo de la semilla a 4 g/L, sin embargo cabe destacar que para la obtención de este rendimiento, el medio de cultivo tuvo que ser suplementado con otros aditivos como peptona, ácido cítrico, K_2HPO_4, KH_2PO_4, lo cual podría llegar a encarecer el proceso.
López *et al*. (2001) probaron cuatro cepas de *X. campestris* para observar si estas podían producir el polímero a partir de residuos de agua de aceitunas industrial como único sustrato, en donde un filtrado del residuo (diluido además en caldo YM) fue usado como medio de fermentación, en donde los máximos rendimientos de xantano fueron de 4 g/L a 40% de concentración de residuo y 2 g/L a un 20% por las cepas de *X. campestris* T646 y B-1459 S4LII, respectivamente, siendo rendimientos comparables a los obtenidos con ambas muestras de nejayote.

Woiciechowski *et al*. (2004) utilizando bagazo de yuca como sustrato (residuo en la obtención de almidón) lograron obtener la producción de xantano evaluando un hidrolizado de este residuo en combinación con diversas fuentes de nitrógeno, en donde el máximo rendimiento fue de 14 g/L cuando la fermentación fue llevada a cabo con un medio suplementado con nitrato de potasio. Siendo este valor mayor en comparación al resultado obtenido para la producción de goma a partir del nejayote (semi-industrial) suplementado con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, en donde el mayor rendimiento se observó a las 72 h de cultivo con una producción de 4.83 g/L para el ensayo en volúmenes de 100 mL, así como en el ensayo de 1 L donde la producción de goma en este mismo medio alcanzó los 6.46 g/L al final de la fermentación. Destacando que los demás tratamientos suplementados con esta fuente de nitrógeno no mostraron producción de xantano (Figura 2). Estos resultados son similares con lo reportado por Moshaf *et al.*

(2011) en donde mediante la metodología de superficie de respuesta y utilizando residuos de palmera datilera, produjeron goma utilizando *X. campestris* PTCC1473; en donde mediante el modelo estadístico pudieron concluir que un bajo nivel de nitrógeno conducía a una mayor producción de xantano, explicando que durante la fermentación microbiana, la producción de goma es mayor en los medios que contienen mayores proporciones de carbono a nitrógeno (C/N) (Moshaf *et al.,* 2011), por lo tanto, a mayor concentración de nitrógeno, la relación C/N disminuye afectando en la producción de xantano. Esto último podría explicar por qué aun cuando la actividad metabólica del tratamiento de nejayote suplementado con extracto de levadura mostró valores de absorbancia similares a los obtenidos con el control positivo (Figura 3) no presentó los mejores resultados en cuanto a producción de goma.

Esto también está respaldado por hallazgos anteriores que indicaron el efecto inhibitorio de altas concentraciones de nitrógeno tanto en el crecimiento como en la producción de goma xantano en donde Kalogiannis y colaboradores en el 2003 lograron la producción del biopolímero por la cepa de *X. campestris* ATCC 1395 usando melazas de remolacha azucarera, en donde también se reporta el como el extracto de levadura tuvo un efecto negativo tanto en la producción de xantano como en la biomasa obtenida.

Gunasekar *et al*. (2014) produjeron goma xantano por fermentación de pulpa de tapioca pre-tratada con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico, en donde el máximo rendimiento fue de 7.1 g/L obtenido con un pre-tratamiento a una concentración de ácido de 0.5%. Estos valores en producción del polímero fueron similares al máximo rendimiento obtenido de xantano con aquel tratamiento del nejayote suplementado con $CaCO_3$ (7.6 g/L) en los ensayos de 1 L por lo que una pre-hidrolisis del residuo podría funcionar como una estrategia para aumentar estos valores de producción, sin embargo, el mismo autor hace referencia a que un aumento en la concentración de ácido sulfúrico causa la formación de sustancias inhibitorias que disminuyen la producción de la goma y afectan la energía de las células inhibiendo y dañando las actividades biológicas de los microorganismos (Taherzadeh *et al.,* 2000; Li *et al.,* 2016), además de que la viscosidad del xantano obtenido fue disminuyendo conforme aumento la concentración de ácido, por lo que debería de buscarse aquella concentración de acidez que resulte en un rendimiento y calidad del producto que influya positivamente en el proceso.

Usando la cepa NRRL B-1459 de *X. campestris pv. campestris* Faria *et al.* (2011) produjeron xantano usando caldo de caña de azúcar diluido como principal fuente de carbono, en donde a diferencia de este trabajo, ellos llevaron la fermentación a condiciones de 750 rpm logrando obtener xantano con el peso molecular y contenido total de azucares deseado, aun cuando al parecer un aumento en la velocidad de agitación logro obtener resultados positivos en cuanto a la obtención del biopolímero, el estudio no se enfocó en determinar rendimientos de producción, por lo que el uso de tales velocidades de agitación deberán ser evaluadas para llevar a cabo experimentos a esta clase de condiciones.

Li *et al.* (2016) lograron obtener xantano a partir de la fermentación de residuos de cocina en donde la goma obtenida presento una estabilidad térmica similar a una muestra comercial y en donde la producción fue mayor en tratamientos de los residuos diluidos obteniendo hasta 11 g/L al final del tiempo de fermentación, comparado con el tratamiento no diluido y una cantidad alrededor de 4 g/L, siendo este último valor comparable a los resultados obtenidos para los tratamientos de producción de goma (inclusive igual al rendimiento de 3.65 g/L a partir de la muestra industrial), por lo que el diluir la muestra podría ser una estrategia a considerar para poder aumentar la obtención de xantano, inclusive el rendimiento obtenido en el ensayo de 1 L del tratamiento de nejayote + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ mostró una producción similar (10.83 g/L) al resultado obtenido de aquel tratamiento del residuo de cocina diluido.

Después de su inoculación, Li *et al.* (2016) reportaron que las células comenzaron la fase de crecimiento exponencial cerca de la 2 h y entrando a una fase estacionaria alrededor de las 22 h, donde después de 38 h se mantuvo sin cambios, concordando con los resultados obtenidos de actividad celular usando el control positivo de caldo YGC, en donde a partir de las 24 h comenzó la fase estacionaria y se mantuvo constante hasta el final del cultivo, no así para los tratamientos con nejayote semi-industrial (Figura 3), en donde fue a partir de las 48 h en donde se puede observar que la actividad celular de los microorganismos se mantuvo constante concordando con los tiempos en los cuales dejó de producirse de manera exponencial el xantano, esto para los tratamientos del residuo sin aditivos y suplementado con $CaCO_3$ + $MgSO_4 \cdot H_2O$; extracto de levadura y $CaCO_3$ + $MgSO_4 \cdot H_2O$. Esto puede deberse a las propias limitaciones físicas del sistema de fermentación liquida, donde la misma viscosidad del medio limita el intercambio de gases y la mezcla del medio.

(Woiciechowski *et al.,* 2004). Un incremento en la viscosidad del medio de fermentación (por el aumento en la concentración de goma producida) interfiere con la transferencia de oxígeno, y esto podría reducir o detener la actividad microbiana, incluso si la fuente de carbono es disponible en el medio.

Gomashe *et al*. (2013) utilizaron aislamientos de *X. campestris* NRRL-B-1449 para llevar a cabo la fermentación de goma a partir de melazas de remolacha de azúcar, en donde después de 24 h de incubación, el pH del cultivo disminuyó debido a que el xantano es de naturaleza ácida y el pH del medio generalmente decrece durante la fermentación debido a los grupos ácidos presentes en el biopolímero (Barua *et al.,* 2014) (De Monaco-Lopes *et al.,* 2015), razón por la cual se optó por un tratamiento con carbonato de calcio ya que este sirve como un agente de buffer, reduciendo las fluctuaciones de pH en el cultivo, en donde quizá debido a esto último, este mismo tratamiento mostró el mejor resultado de producción (5.7 g/L) en comparación con los demás al menos en los primeros ensayos y manteniendo resultados constantes al momento de llevar el escalamiento a un volumen mayor (1 L).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, fueron similares a lo reportado por Gomashe *et al*. (2013), en donde a condiciones de incubación de 28°C y 500 rpm obtuvieron un rendimiento máximo de 3.59 g/L, en comparación con los 3.65 g/L producidos a partir de nejayote industrial. Además de que reportan en su experimento que a velocidades de agitación de 150 rpm no obtuvieron producción del polímero a diferencia del resultado obtenido en donde a 120 rpm la bacteria si logró llevar a cabo su proceso de fermentación, aun así podría considerarse el aumentar las condiciones de agitación de este proceso debido a que el flujo de aire es muy importante en la producción de goma xantano, debido a que el microorganismo involucrado es estrictamente aeróbico. Sin embargo, los niveles altos de oxígeno disuelto requieren altas velocidades de aireación, lo que resulta en un estrés hidrodinámico y pueden causar daño celular y afectar negativamente el rendimiento de la goma. Sin embargo, también se deben considerar otros aspectos al optimizar tales condiciones de operación, debido a que una mayor velocidad de agitación y flujo de aire, pueden aumentar el costo del proceso (Casas *et al.,* 2000) (De Monaco-Lopes *et al.,* 2015).

Otros informes han reportado diferentes rendimientos de producción de xantano, a los obtenidos en este trabajo, que utilizan residuos agroindustriales como el extracto de algarroba, 17 g/L y residuos de cítricos, 14.5 g/L en donde diferentes fuentes de extracción podrían explicar los rendimientos significativamente diferentes de varias fuentes de carbono (Zakeri *et al.,* 2017). Por lo tanto el presente estudio ofrece una alternativa en cuanto a la obtención de este biopolímero, cuyo rendimiento y producción pueda ser comparable a lo obtenido con las fuentes de carbono que se utilizan normalmente y además que los posteriores análisis de calidad del producto obtenido a partir de nejayote puedan cumplir con los parámetros de calidad requeridos por parte de los consumidores.

Otra razón de rendimientos menores en comparación con el control positivo, pudo deberse a que el nejayote podría contar con alta concentración de compuestos sin reaccionar y una calidad inferior en comparación con otras fuentes de carbono comerciales haciendo también que el proceso de purificación posterior se vuelve más complicado (Rosalam & England 2006), podemos observar esto último en el caso de la muestra de goma obtenida del tratamiento con nejayote industrial en donde el xantano recuperado inclusive después del proceso de precipitación con isopropanol, siguió mostrando un aspecto más oscuro y compacto antes y después del proceso de secado, a diferencia del xantano obtenido del tratamiento con caldo YGC cuyo producto cumple con las especificaciones por parte de las normas de calidad al presentar un producto con coloración blanca (o más claro).

Así mismo, al momento de llevar a cabo el escalamiento de la producción de xantano a nivel semi-plioto se optó primero por realizar los ensayos en medios con volúmenes de hasta 1 L, esto con el propósito de observar si este bio-proceso podía llevarse a cabo a volúmenes mayores, y aumentando la velocidad de agitación, esto debido a que la velocidad del agitador no debe mantenerse constante durante todo el proceso, ya que la transferencia de masa de oxígeno puede verse dramáticamente afectada a causa del aumento de la viscosidad del mismo medio como lo mencionan García-Ochoa *et al*. (2000), pudiendo observar cómo en el caso del medio control (YGC) la producción, no así la actividad celular del cultivo, se vio afectada, obteniendo resultados menores en comparación con los ensayos previos 7.36 y 3.86 g/L, esto último puede deberse a que la disolución de xantano en el caldo conduce a un aumento dramático de la viscosidad y, por

lo tanto, se logra una fuerte disminución en la velocidad de transferencia de masa gas-líquido si la velocidad de transferencia de oxígeno no aumenta a medida que aumenta la velocidad del agitador (Casas *et al*., 2000) lo que claramente pudo llevar a una disminución en la producción del biopolímero.

Esto último difiere con el resto de rendimientos obtenidos a partir de los tratamientos del residuo de nejayote donde claramente se aprecia que la obtención del xantano prácticamente se mantuvo constante e inclusive fue mayor en algunos de los ensayos, optando por aquel suplementado con $MgSO_4 \bullet H_2O$ para llevar a cabo el escalamiento del bioproceso a nivel de biorreactor, este último con resultados máximos de producción de 5.53 g/L mostrando una disminución en comparación con los ensayos previos, entre las razones por las cuales se pudo llevar a cabo esta disminución se destaca en el trabajo de Rosalam & Englan 2006 en donde las diferentes fases de crecimiento y quizá una alteración al medio de cultivo, como lo pudo ser una mayor cantidad de sólidos no filtrables del nejayote o una mayor cantidad de nutrientes limitantes quizá no hayan influido en la estructura principal de la composición del polisacárido pero sí podrían llegar a afectar la estructura de las cadenas laterales y por ende la masa molecular y el rendimiento. Dado que diferentes cultivos requerirían diferentes medios y condiciones óptimas, se ha optado por la realización de estudios sobre los nutrientes necesarios para la variación de la cadena lateral del producto y la optimización en la biosíntesis de la goma de xantano (Rosalam & Englan 2006).

Para el caso de los resultados obtenidos a partir de los experimentos usados para determinar el contenido de grupos piruvato y acetil, se logró apreciar que todas la muestras de goma obtenidas a partir de los diferentes tratamientos y ensayos mostraron presencia para estos grupos, aunque en menor cantidad si se compara con los controles utilizados, estos valores podrían ayudar a inferir acerca de algunas de las propiedades reológicas del xantano, como lo mencionan López y col. 2004, en donde una aparente baja viscosidad en comparación con muestras comerciales está relacionado con niveles inferiores de grupos piruvato, así como se ha demostrado que un alto contenido de acetil como característica está relacionado con muestras de xantano con alto peso molecular y por ende produciendo soluciones con alta viscosidad (De Monaco-Lopes *et al.*, 2015). Sin embargo, también se menciona que los niveles de sustitución de acetil y piruvato varían con las condiciones de

crecimiento y otros parámetros (Becker, 1998), por lo que deberán de tomarse en cuenta para trabajos futuros el adecuar las condiciones a las cuales se cultiva el microorganismo, además, también debe de tenerse en cuenta que la composición del medio de producción también afecta a la estructura molecular del xantano (De Monaco-Lopes *et al.*, 2015), por lo que es de esperarse que en un medio sin todos los requerimientos nutricionales como lo es el nejayote se obtenga un producto con menor cantidad de estos grupos en comparación con los controles. Para el caso de los resultados obtenidos a partir del biorreactor, se apreció que no hay una diferencia estadísticamente hablando, para el caso de los valores de absorbancia obtenidos de los grupos estudiados, por lo que se infiere que al menos este tipo de bioprocesos puede ser llevado a cabo a volúmenes mayores y obtener productos con propiedades similares a lo mostrado con muestras comerciales; sin embargo, pruebas para determinar la viscosidad así como el peso molecular de las muestras, deberán de ser necesarios para poder confirmar esto último.

9. CONCLUSIONES

Se logró establecer la producción de goma xantano utilizando como sustrato el residuo agroindustrial nejayote, obteniendo resultados similares en cuanto a producción del biopolímero durante las primeras horas del cultivo.

El xantano producido cumplió con las especificaciones establecidas para los parámetros de humedad y viscosidad, no así para el tamaño de la partícula, con base a lo establecido por la Norma NRF-300-PEMEX-2012.

El extracto de levadura como aditivo del nejayote tiene un efecto negativo en la producción de xantano, no así para el crecimiento del microorganismo.

El mejor tratamiento de nejayote semi-industrial, fue el medio suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10.83 g/L) al final de la fermentación.

Los valores de piruvato y acetil del xantano obtenido a nivel semi-piloto, fueron similares a una muestra comercial.

El costo del medio de producción utilizado a nivel semi-piloto (nejayote + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) es significativamente menor (0.21$ MXN/L) en comparación al medio de cultivo control (46.00$ MXN/L).

La producción de goma xantano se puede escalar a nivel semi-piloto mediante el uso de este sustrato de bajo costo.

10. PERSPECTIVAS

Para complementar los resultados obtenidos, se propone determinar la viscosidad intrínseca y el peso molecular de la goma xantano obtenida de nejayote semi-industrial

Para determinar la viscosidad, se usará un viscosímetro Brookfield DV (II) LDV (CTR), y las muestras se van a diluir hasta alcanzar una medición de goma en intervalos de 2 a 10 g/L a 25°C.

La viscosidad del polímero (n) se obtendrá y se determinará el peso molecular de la goma usando la ecuación de Mark-Houwink

$$[n] = KM^{a}$$

en donde ***M*** es el peso molecular del polímero y en donde ***K*** y ***a*** son las constantes de Mark-Houwink (***K*** = 1,7 x 10^{-4} y ***a*** = 1,14) (García-Ochoa, 2000).

11. LITERATURA CONSULTADA

Acosta-Estrada BA, Lazo-Vélez MA, Nava-Valdez Y, Gutiérrez-Uribe JA, y Serna-Saldívar SO. 2014. Improvement of dietary fiber, ferulic acid and calcium contents in pan bread enriched with nejayote food additive from with maize (*Zea mays*). Journal of Cereal Science 60: 264-269.

Barua R, Alam J, Salim M, Shamim Ashrafee T. 2014. Small scale production and characterization of xanthan gum synthetized by local isolates of *Xanthomonas campestris*. Indian journal of Experimental Biology. 54: 151-155.

Barua R, Jahangir A., Salim M, y Ashrafee ST. 2016. Small scale production and characterization of xanthan gum synthesized by local isolates of *Xanthomonas campestris*. Indian Journal of Experimental Biology 54:151-155.

Becker A, Katzen F, Puhler A, y Ielpi L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Applied Microbiology and Biotechnology 50: 145-152.

Bello Gil D, Carrera Bocourt E, Díaz Maqueira Y. 2006. Determinación de azúcares totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA 2: 45-50.

Borges CD, De Paula RCM, Feitosa JPA, y Vendruscolo CT. 2009. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola pv pruni* strain 106. Carbohydrate Polymers 75: 262-268.

Blanco-Gámez EA, Sánchez-González EA, Valladares MN, Olvera C. 2008. Identificación de microorganismos aislados del nejayote. Revista salud pública y nutrición 13: 1-5.

Casas JA, Santos VE, y García-Ochoa F. 2000. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enzyme and Microbial Technology 26:282-291.

Cheng R, Lin L, y Zhang YK. 2012. Hydrogen peroxide (H_2O_2) supply significantly improves xanthan gum production mediated by *Xanthomonas campestris in vitro*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 39: 799–803.

De Monaco Lopes B, Lopes Lessa V, More Silva B, Da Silva Carvalho Filho MA, Schinitzler E, y Gustavo Lacerda L. 2015. Xanthan gum: Properties, production conditions, quality and economic perspective. Journal of Food and Nutrition Research 54: 185-194.

Díaz Montes E, Castro-Muñoz R, y Yáñez-Fernández J. 2016. An overview of nejayote, a nixtamalization byproduct. Ingeniería Agrícola y Biosistemas. 8: 41-60.

Domínguez-Espinosa R, y Pacho-Carrillo D. 2003. Efluentes de la industrialización del maíz: ¿contaminante o recurso valioso? Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán, 54-63. doi: http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2016.03.002

Faria S, de Oliveira Petkowicz CL, Lemos de Morais SA, Hernandez Terrones MG, de Resende MM, de Franc FP, Cardoso VL. 2011. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. Carbohydrate Polymers 86: 469– 476.

Felicia Katherine R, Muthukumaran C, Sharmila G, Manoj Kumar N, Tamilarasan K, y Jaiganesh R. 2017. Xanthan gum production using jackfruit-seed-powder-based medium: optimization and characterization. Biotechnology 7: 248-257.

Figueroa-González I, Quijano G, Ramírez G, y Cruz Guerrero A. 2011. Probiotics and prebiotics–perspectives and challenges. Journal of Science Food Agriculture 91: 1341-1348.

García-Depraect O, Gómez-Romero J, León-Becerril E, y López-López A. 2017. A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. International Journal of Hydrogen Energy 42: 5820-5831.

García-Ochoa F, Santos VE, Fritsch AP. 1992. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. Enzyme and Microbial Technology 14: 991–996.

García-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, y Gómez E. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances 18: 549-579.

Gomashe AV, Dharmik PG, y Fuke PS. 2013. Optimization and production of xanthan gum by *Xanthomonas Campestris* NRRL-B-1449 from sugar beet molasses. The International Journal of Engineering and Science. 5: 52-55.

González R, Reguera E, Figueroa JM, y Martínez JL. 2003. Study of the Influence of nejayote and other additives on the cohesive strength and electric properties of black agglomerates. Journal of Applied Polymer Science 90: 3965-3972.

Gunasekar V, Reshma KR, Greeshma Treesa, Gowdhaman D, Ponnusami V. 2014. Xanthan from sulphuric acid treated tapioca pulp: Influence of acid concentration on xanthan fermentation. Carbohydrate Polymers 102: 669-673.

Gutiérrez-Uribe JA, Rojas-García C, García-Lara S, y Serna-Saldivar O. 2010. Phytochemical analysis of waste water (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. Journal of Cereal Science, 52: 410–416.

Kalogiannis S, Iakovidou G, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA, y Skaracis GN. 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. Process Biochemistry 39: 249-256.

Kennedy JF, y Bradshaw IJ. 1984. Production, properties and applications of xanthan. Progress of Industrial Microbiology 19: 319-371.

Li R, y Feke DL. 2015. Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of xanthan gum in aqueous solution: Effects of pyruvate group. Carbohydrate Polymers 124: 216-221.

Li P, Li T, Zeng Y, Li X, Jiang X, Wang Y, Xie T, Zhang Y. 2016. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LRELP-1using kitchen waste as the sole substrate. Carbohydrate Polymers 151: 684–691.

Lopez MJ, Moreno J, Ramos-Cormenzana. 2001. *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* STRAIN SELECTION FOR XANTHAN PRODUCTION FROM OLIVE MILL WASTEWATERS. Wat. Res. Vol. 35, No. 7: 1828–1830.

Meraz KAS, Vargas SMP, Maldonado JTL, Bravo JMC, Guzman MTO, Maldonado EAL. 2016. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation–flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*, 284: 536–542.

Moshaf S, Hamidi-Esfahani Z, Azizi MH. 2011. Optimization of conditions for xanthan gum production from waste date in submerged fermantation. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 5 (9): 549-552.

Niknezhad VS, Ali Asadollahi M, Zamani A, Biria D, y Doostmohammadi M. 2015. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. Food Sci. Biotechnol. 24:453-460.

Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Lizardi J, Rascon-Chu A, Márquez-Escalante JA, Gardea A, Martínez-López AL, y Guerrero V. 2009. Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. Food Chemistry 115: 1286- 1290.

Olguín-Arteaga GM, Amador-Hernández M, Quintanar-Guzmán A, Díaz-Sánchez F, Sánchez-Ortega I, Castañeda-Ovando A, Ávila-Pozos R, y Santos-Lopez EM. 2015. Correlación de entalpías de gelatinización con los índices de absorción de agua y de solidos solubles en agua de sémolas, granillos y harinas de maíz nixtamalizado. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 14: 303-310.

Panyu L, Ting L, Yu Z, Xiang L, Xiaolong J, Yabo W, y Tonghui X. 2016. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas* campestris LRELP-1using kitchen waste as the sole substrate. Carbohydrate Polymers 151: 684-691.

Paz-Samaniego R, Carvajal-Millan E, Brown-Bojorquez F, Rascón-Chu A, López-Franco YL, Sotelo-Cruz N, y Lizardi-Mendoza J. 2015. Gelation of arabinoxylans from maize wastewater-effect of alkaline hydrolysis conditions on the gel rheology and microstructure. Wastewater Treatment Engineering, 101-114. doi: 10.5772/61022

Rice EW, Baird RB, Eaton AD, y Clesceri LS. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. AWWA catalog no: 10085. 1496 p.

Rosalam L & Englan D. 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas camprestris* ssp. Enzyme and Microbial Technology. 39: 197-207.

Rosentrater KA. 2006. A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. Waste Management 26: 284–292.

Rottava I, Batesini G, Silva MF, Lerin L, Oliveira D, Padilha F, Toniazzo G, Mossi A, Cansian R, Luccio M, y Treichek H. 2009. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohydrate Polymers 77: 65-71.

Salmerón-Alcocer A, Rodríguez-Mendoza N, Pineda-Santiago V, Cristiani-Urbina E, Juárez-Ramírez C, Ruiz-Ordaz N, Galíndez-Mayer J. 2003. Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor. Journal of Environmental Engineering and Science 2: 401-406.

Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Liden G. 2000. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology 53: 701–708.

Valderrama-Bravo C, Gutiérrez-Cortez E, Contreras-Padilla M, Rojas-Molina I, Mosquera JC, Rojas-Molina A, Beristain F, y Rodríguez-García ME. 2012. Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels in maize processing. Journal of Food Engineering 110: 478-486.

Velu S, y Velayutham V. 2014. Comparative study of xanthan gum production using syntheic substrate by *Xanthomonas campestris* and local isolated strain. International Journal of ChemTech Research 6: 2475-2483.

Velu S, Velayutham V, y Manickkam S. 2016. Optimization of fermentation media for xanthan gum production from *Xanthomonas campestris* using response surface methodology and artificial neural network techniques. Indian Journal of Chemical Technology 23: 353-361.

Woiciechowski AL, Soccol CR, Rocha SN, Pandey A. 2004. Xanthan gum production from cassava bagasse hydrolysate with *Xanthomonas campestris* using alternative sources of nitrogen. Applied Biochemistry and Biotechnology. 118: 305-312.

Zakeri A, Pazouki M, y Vossougi M. 2015. Kinetics investigation of cell growth, xanthan production and sugar cane molasses consumption by *Xanthomonas campestris.* Iranian Journal of Chemical Engineering 12: 84-92.

Zakeri A, Pazouki M, Manouchehr. 2017. Use of response surface methodology analysis for xanthan biopolymer production by *Xanthomonas campestris*: focus on agitation rate, carbon source, and temperature. Iran. J. Chem. Chem. Eng. 36: 173-183.