

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**DISERTACIÓN DE GRADO**

**Nombre del estudiante:** Francisco Emilio Vega Yáñez

**Nombre del director de la disertación:** Sonia Margarita Estrella Vásquez

**Título de disertación:** Evaluación de distintos residuos agroindustriales utilizados como fuente de carbono para la producción de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. citri*

**Área en la que se inscribe la investigación:** Microbiología industrial

Quito, 2023

## EPÍGRAFE

*"Las personas que miran por primera vez a través de un microscopio dicen: 'Ahora veo esto' y luego 'veo aquello', e incluso un observador experto puede ser engañado. En estas observaciones he dedicado más tiempo del que muchos creerán, pero las he hecho con alegría."*

*Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)*

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que están apasionadas e interesadas por el fascinante mundo de los microorganismos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá Liliana, mi papá Wilson y mi hermano Mateo, y a toda mi familia por su incondicional apoyo a lo largo de toda mi vida.

A mi tío Mario Yáñez por haberme introducido en el mundo de las ciencias biológicas.

A mi querida profesora y directora Magaly Estrella por su compromiso y constante ayuda y apoyo en toda mi carrera universitaria.

A mi gran profesor Martin Marcial Coba por todo su tiempo, conocimiento, predisposición, rigurosidad y generosidad brindada.

A mis amigos de la carrera por haberme demostrado la importancia de la amistad.

A todos mis profesores de la universidad por todas las enseñanzas impartidas. En especial a Fernando Santacruz, Diana Astorga, Jeniffer Yáñez, Elena Granda y Doris Vela.

A Alexander Toaza de Agrocalidad por su gentileza y apoyo en la identificación de la bacteria.

A Nancy Nenger de la Universidad Central por su ayuda en el aislamiento del microorganismo.

Un especial agradecimiento a la gente de la sala de preparaciones de la facultad: Bolívar, Henry, Gabriela, Carolina y Diego por su ayuda en la parte experimental.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN .....	7
2. ABSTRACT .....	8
3. INTRODUCCIÓN .....	9
3.1. Agroindustria: impactos ambientales y aprovechamiento .....	9
3.2. Goma xantana .....	11
4. METODOLOGÍA .....	16
4.1. Aislamiento .....	16
4.2. Identificación molecular .....	17
4.3. Preparación de medios de cultivo .....	17
4.3.1. Medio de cultivo a base de melaza .....	17
4.3.2. Medio convencional de composición definida (MCD) .....	18
4.3.3. Medio de cultivo a base de vinaza .....	18
4.4. Preparación de inóculo .....	18
4.4.1. Inóculo en un medio a base de melaza .....	18
4.4.2. Inóculo para un medio a base de vinaza y para un medio convencional de composición definida .....	19
4.5. Estandarización del inóculo .....	19
4.6. Fermentación .....	19
4.7. Extracción y precipitación .....	19
4.8. Análisis estadísticos .....	20
5. RESULTADOS .....	20
5.1. Aislamiento .....	20
5.2. Identificación bioquímica .....	23
5.3. Identificación molecular .....	24
5.4. Estandarización del inóculo .....	25
5.5. Goma xantana precipitada y extraída .....	26
6. DISCUSIÓN .....	29
7. CONCLUSIONES .....	32
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
Firma del estudiante y fecha: .....	37
Firma de la directora de disertación y fecha: .....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la goma xantana (Buitrago-Rincon et al., 2022) .....	13
Figura 2. Esquema biosíntesis de goma xantana (Hahn et al., 2022) .....	15
Figura 3. Hojas de coliflor con sintomatología característica producida por <i>Xanthomonas campestris</i> .....	21
Figura 4. Hojas de col con sintomatología característica producida por <i>Xanthomonas campestris</i> .....	21
Figura 5. Colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> (dilución $10^{-5}$ ) de coliflor en agar nutritivo .....	22
Figura 6. Colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> (dilución $10^{-6}$ ) de coliflor en agar nutritivo .....	22
Figura 7. Colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> (dilución $10^{-5}$ ) de col en agar nutritivo .....	23
Figura 8. Colonias de <i>Xanthomonas campestris</i> (dilución $10^{-6}$ ) de col en agar nutritivo .....	23
Figura 9. Goma xantana extraída del medio de cultivo a base de melaza .....	27
Figura 10. Goma xantana extraída del medio de cultivo a base de vinaza .....	27
Figura 11. Goma xantana extraída del medio de cultivo con composición definida.....	27
Figura 12. Goma xantana producida por cada cepa en los tres medios de cultivo probados .....	28

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados bioquímicos.....	23
Tabla 2. Concentración y calidad ADN extraído .....	24
Tabla 3. Longitud de secuencias limpias y secuencias con ruido .....	24
Tabla 4. Resultados identificación en la base de datos EzBioCloud.....	24
Tabla 5. Resultados identificación en la base de datos Geneious Prime.....	25
Tabla 6. Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio de cultivo a base de melaza.....	25
Tabla 7. Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio de cultivo a base de vinaza.....	25
Tabla 8. Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio con composición definida.....	26

## 1. RESUMEN

La agroindustria genera cantidades considerables de residuos que muchas veces no son tratados de forma adecuada y pueden generar problemas ambientales en el futuro. Debido a su composición, los residuos agroindustriales pueden ser aprovechados como sustratos para la producción de metabolitos microbianos. En Ecuador, hay una limitada cantidad de estudios que proponen un uso alternativo para estos desechos. En este contexto, el presente trabajo se enfoca en la producción de goma xantana o también llamado xantano, un heteropolisacárido producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*, que tiene una amplia gama de aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética, agrícola y petrolera. Para la producción de goma xantana, se utilizaron dos desechos agroindustriales como fuentes alternativas de carbono: la melaza, un jarabe residual de la cristalización del azúcar, y la vinaza, un subproducto resultante de los procesos de destilación alcohólica. Además, se emplearon dos cepas diferentes de *Xanthomonas campestris*, una aislada de una planta de col y la otra de una planta de coliflor. Los resultados obtenidos indican que el medio basado en melaza presenta una mayor eficiencia en la producción de goma xantana en comparación con el medio basado en vinaza. También se observaron diferencias en ciertas características reológicas de la goma producida entre ambos medios. En cuanto a las diferentes cepas utilizadas, no se pudo determinar una diferencia significativa en la producción de xantano entre ellas.

## 2. ABSTRACT

Agribusiness generates considerable amounts of waste that is often not adequately treated and can cause environmental problems in the future. Due to its composition, agro-industrial residues can be used as substrates for the production of microbial metabolites. In Ecuador, there is a limited number of studies that propose an alternative use for these wastes. In this context, the present work focuses on the production of xanthan gum, or also called xanthan, a heteropolysaccharide produced by the bacterium *Xanthomonas campestris*, which has a wide range of applications in the food, cosmetic, agricultural and oil industries. For the production of xanthan gum, two agro-industrial wastes were used as alternative sources of carbon: molasses, a residual syrup from sugar crystallization, and vinasse, a by-product resulting from alcoholic distillation processes. In addition, two different strains of *Xanthomonas campestris* were used, one isolated from a cabbage plant and the other from a cauliflower plant. The results obtained indicate that the molasses-based medium presents a higher efficiency in the production of xanthan gum compared to the vinasse-based medium. Differences were also observed in certain rheological characteristics of the gum produced between both media. Regarding the different strains used, a significant difference in xanthan production could not be determined between them.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Agroindustria: impactos ambientales y aprovechamiento

La agricultura es uno de los hitos más trascendentes en la historia de la humanidad. Cambió la forma de vida de los seres humanos para siempre; permitió el desarrollo de asentamientos debido al sedentarismo, proporcionó una fuente segura de alimentos, contribuyó al crecimiento demográfico y al desarrollo de nuevas tecnologías, y dio paso a cambios sociales, económicos y estructurales en las poblaciones humanas (S. James Jr, 2021). Con el paso de los siglos, las relaciones productivas dentro y fuera del campo fueron cambiando y surge lo que se entiende actualmente como industria agrícola, la cual tiene sus orígenes en el siglo XX. Las crisis y cambios económicos, los avances tecnológicos, el incremento demográfico y la implementación de nuevas políticas son parte de los factores que permitieron el desarrollo de la agroindustria (Dimitri & Effland, 2020).

La agroindustria es muy importante para la economía de muchos países, contribuye a la producción de alimentos y fuentes de trabajo. Sin embargo, la intensificación y masificación de su actividad ha ocasionado la deforestación de nuevas áreas, desgaste y contaminación de los suelos, aire y agua (Miroshnik et al., 2021). Además de los impactos de la agroindustria en sí misma, también existen los provocados por los desechos producidos. La inmensa cantidad de residuos causa una serie de impactos ambientales, ya que las formas más comunes para su eliminación son la quema, que genera gases de efecto invernadero y el vertido no planificado en ríos, que aumenta el riesgo de inundaciones. Además, se tiende a acumular los residuos inapropiadamente y muchos de estos son ricos en fósforo, nitrógeno y otros minerales, que si llegaran a fuentes de agua, podrían promover el crecimiento de microalgas y plantas acuáticas, lo que llevaría al ecosistema a un proceso de eutrofización (Sadh et al., 2018). La alta cantidad de desechos agroindustriales que se generan anualmente dificulta su eliminación de los distintos ambientes (Martinez-Burgos et al., 2021). En 2013, la FAO reportó que se produjeron 250 millones de toneladas de desechos agroindustriales en el mundo, solamente en el procesamiento de diferentes cultivos agrícolas (Lopes & Ligabue-Braun, 2021). Concretamente, la producción de melaza de caña de azúcar y remolacha azucarera genera alrededor de 50 millones de toneladas en todo el mundo, y menos de la cuarta parte es comercializada para aplicaciones posteriores (Nikodinovic-Runic et al., 2013). En Ecuador, para el año 2008, el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar en Ecuador

(CINCAE, 2013) reportó que se generaron alrededor de 1 300 000 toneladas de bagazo de caña. Hoy en día, esa cantidad es mucho mayor. Vale la pena recalcar que la melaza de caña de azúcar es un subproducto de la producción del azúcar de mesa. Es el residuo que queda del procesamiento del jugo de caña de azúcar cuando entra a una etapa de evaporación, tiende a ser muy rica en carbohidratos, aproximadamente el 45% y 58% es sacarosa, glucosa y fructosa.

Otra industria que genera cantidades considerables de desechos es la que se encarga de destilar el alcohol etílico, durante la producción de alcohol se generan altas cantidades de desechos; la cantidad de subproductos de la destilación, como la vinaza, es 15 veces superior que la cantidad de alcohol producido (Zielińska et al., 2021).

La melaza, por su parte, al ser desechada de forma inadecuada, causa graves problemas. Por ejemplo, en 2013 se produjo un derrame de 1 400 litros de melaza en Honolulu (Hawái), lo cual provocó la muerte de toda la vida marina cercana debido a la desoxigenación. De igual forma, los productos inutilizables de la destilación del alcohol contaminan las fuentes de agua, el color oscuro dificulta el paso de la luz y, como consecuencia, disminuye el nivel de oxígeno. Además, su alta concentración de minerales puede generar eutrofización (Mikucka & Zieli, 2020b).

Los desechos agroindustriales poseen suficientes compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados como materias primas para la elaboración de otros productos, entre ellos biocombustibles como el bioetanol. Los desechos lignocelulósicos reemplazan la biomasa leñosa de los bosques. También se pueden obtener antioxidantes a partir de cáscaras de frutas como la naranja, piña o limón. Asimismo, se pueden producir antibióticos utilizando aceites vegetales o enzimas elaboradas con cáscaras de maíz, salvado de trigo o arroz (Sadh et al., 2018). En todos los productos mencionados, que pueden ser obtenidos a partir de residuos agroindustriales, intervienen microorganismos. Su gran diversidad a nivel taxonómico y fisiológico los vuelve increíblemente útiles para la elaboración de muchos productos. Por ejemplo, para la producción de pigmentos microbianos se pueden utilizar bacterias, hongos filamentosos, levaduras y algas. Además, el hecho de que los microorganismos sean capaces de utilizar sustratos económicos como los residuos de la industria agrícola convierte a los pigmentos microbianos en productos más rentables que los de origen vegetal (Lopes & Ligabue-Braun, 2021).

Los microorganismos poseen un variopinto de rutas metabólicas, pueden consumir muchos sustratos y producir una diversidad de metabolitos. Es por ello, que el ser humano ha desarrollado procedimientos y materiales para producir sustancias beneficiosas para sí mismo y que provienen de microorganismos. Por ejemplo, gran parte de la insulina que utilizan las personas que padecen de diabetes es producida por cepas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, que han sido modificadas genéticamente para que produzcan insulina (Baeshen et al., 2014). Otro ejemplo es la síntesis de vitaminas, usando especies de bacterias como *Pseudomonas denitrificans* y *Propionibacterium shermanii*. Para elaborar las vitaminas las bacterias requieren fundamentalmente de una fuente de carbono como glucosa o xilosa (Fang et al., 2017). Dichos sustratos de carbono pueden llegar a incrementar el costo del producto final, por ende, hay una tendencia a buscar sustratos de menor costo y, una alternativa son los residuos agroindustriales. Actualmente, se sabe que este tipo de residuos sirven para producir diversos metabolitos primarios y secundarios, por ejemplo, los hongos del género *Monascus* y *Rhodotorula* pueden elaborar pigmentos como los carotenos, a partir de materia rica en celulosa. La especie bacteriana *Bacillus subtilis*, tiene la capacidad de consumir desechos con lignocelulosa y sintetizar enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos y oligosacáridos. De entre la gran variedad de metabolitos producidos por microorganismos están las gomas de origen bacteriano que tienen características muy relevantes: alto peso molecular, no tienen efectos tóxicos, pueden ser aplicadas en diversas áreas y poseen una variedad de estructuras (Dos Santos et al., 2016). Un claro ejemplo de ello es la goma xantana, motivo de este trabajo investigativo.

### **3.2. Goma xantana**

*Xanthomonas campestris* es un bacilo Gram negativo aerobio obligado, motil debido a la presencia de flagelos polares, catalasa positivo, oxidasa negativo. Además, es un bacilo fermentador de lactosa y posee un metabolismo heterotrófico. Pertenece al género *Xanthomonas*, familia Xanthomonadaceae y a la subclase Gammaproteobacteria. Se estima que hay un total de 27 especies que resultan fitopatógenas, pudiendo infectar a 400 especies de plantas (Nakayinga et al., 2021). Sin embargo, también se estudian los patovares del género *Xanthomonas*, que se refieren a una cepa o conjunto de cepas que comparten características de patogenicidad muy específicas para uno o más hospederos. Es un nivel taxonómico por debajo del taxón especie (Lang et al., 2019). Concretamente, los patovares de *Xanthomonas campestris* dependen de lipopolisacáridos, polisacáridos de la pared celular, enzimas extracelulares del sistema de secreción tipo II y III, también

llamados T2SS y T3SS respectivamente. Todos estos factores determinan la especificidad por el hospedador, la virulencia y la patogénesis de la bacteria (Tang et al., 2021).

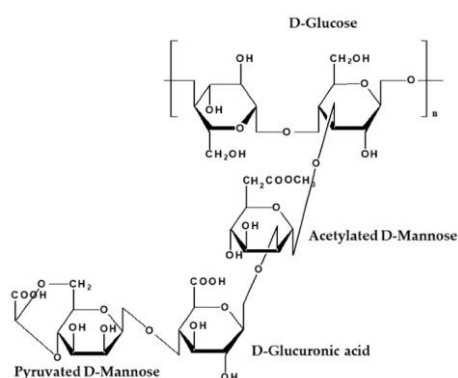
La especie *Xanthomonas campestris* es un importante fitopatógeno. El síntoma más común que produce son clorosis de color amarillo en forma de “V”, debido a que el patógeno circula por el sistema vascular de la planta. Posteriormente, se forman pudriciones de color negro en hojas por la producción de xantano que obstruye los vasos del xilema. La enfermedad fue descrita por Garman en 1884 a partir de lesiones en hojas de repollo; sin embargo, no logró identificar la bacteria. Un año más tarde, otra observación sugirió que la bacteria responsable era *Bacillus campestris* que formaba colonias de color amarillo en el agar (Vicente & Holub, 2013).

Las bacterias del género *Xanthomonas* tienen dos etapas cuando causan una infección en las plantas: epífita y endófito. En su forma epífita, la bacteria se adhiere a la planta por medio de proteínas como los polisacáridos y pili de tipo IV. Posteriormente, pasa a una forma endófito en la que atraviesa el tejido vegetal debido a la presencia de lesiones o ingresa por los estomas para llegar al sistema vascular (Nakayinga et al., 2021). Las bacterias se ubican específicamente en el xilema de la planta. Especies como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tienen la capacidad de metabolizar N-acetilglucosamina. Anteriormente, no se tenía evidencia de que bacterias puedan consumir este azúcar que forma parte del peptidoglicano. Sin embargo, pruebas *in vitro* afirman que *Xanthomonas campestris* por medio de los transportadores dependientes de proteína TonB (TonB-ExbB-ExbD y TBDT), tienen la capacidad de captar N-acetilglucosamina que proviene de las plantas y metabolizarlo (Boulanger et al., 2014).

Durante la infección intervienen otros factores como el *quorum sensing*, en *Xanthomonas campestris* el factor de difusión es un ácido graso, precisamente el ácido cis-11-metil-2-dodecenoico. Los procesos de detección de *quorum* juegan un papel muy importante durante la infección ya que regulan factores de virulencia como la expresión de enzimas, proteínas de adhesión o la motilidad de la bacteria (Samal, Biswajit. Chatterjee, 2019). Las biopelículas formadas por el patógeno son importantes factores de virulencia, ya que incrementan su tolerancia a factores ambientales, dificultando su erradicación de las plantas. La formación de la biopelícula y las interacciones en su interior están dadas por el *quorum sensing*. Además, los *biofilms* pueden garantizar la dispersión de los patógenos, ya que las células planctónicas que lo conforman pueden separarse de la estructura e infectar otras plantas (Sabuquillo & Cubero, 2021).

La bacteria *Xanthomonas campestris* produce diversos factores de virulencia cuando produce una infección vegetal, los cuales están estrechamente relacionados con los siguientes sistemas de secreción: T1S, T2S, T3S, T4S, T5S y T6S. A través de los seis sistemas mencionados se secretan: adhesinas que están involucradas en la adhesión al tejido vegetal, pueden ser fimbriales y no fimbriales, es decir, relacionadas a las proteínas filamentosas como los pili, en el género *Xanthomonas*. Las adhesinas más importantes son *XadA* y *XadB*. Enzimas extracelulares como las lipasas, proteasas, celulasas, xilanasas, endoglucanasas, poligalacturonasa que intervienen en la interacción del patógeno con la planta. Además se producen lipopolisacáridos y exopolisacáridos (Büttner & Bonas, 2010)

El exopolisacárido producido por *Xanthomonas campestris* es llamado goma xantana o xantano. Fue descubierto en 1950 por Allene Rosalind Jeanes y aprobado para el uso alimentario en 1969 por la FDA (Petri, 2015). La goma xantana es un heteropolisacárido formado por una cadena principal de D-Glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos. Además, tiene una cadena lateral de trisacáridos en el carbono 3: una unidad de ácido glucurónico entre dos unidades de manosa. La unidad de D-Manosa unida a la D-Glucosa presenta un grupo acetilo en la posición del carbono 6, en cambio en la unidad terminal de D-Manosa hay un residuo de ácido pirúvico como se puede observar en la figura 1 (Buitrago-Rincon et al., 2022).



**Figura 1.** Estructura química de la goma xantana (Buitrago-Rincon et al., 2022)

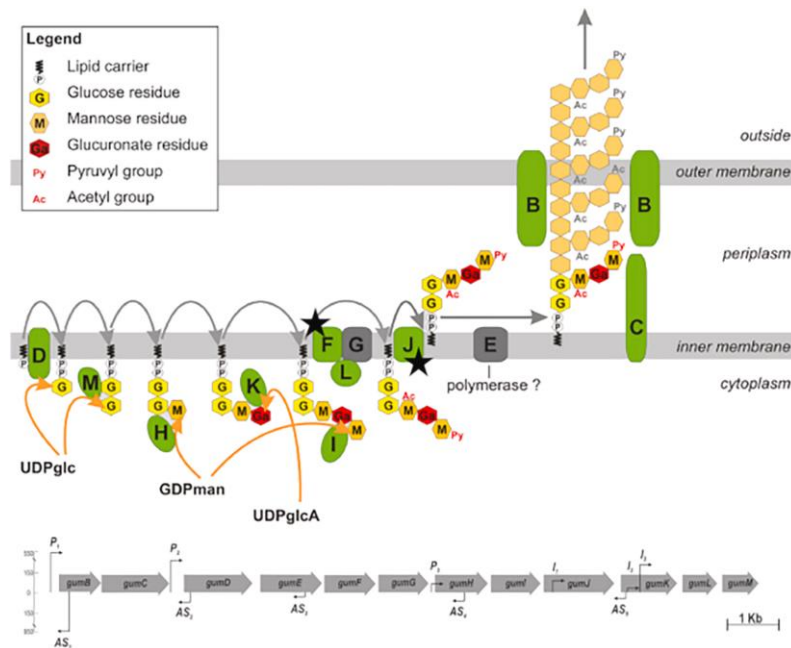
El xantano es altamente soluble en agua debido a su conformación polielectrolítica, forma soluciones de alta viscosidad a una concentración relativamente baja de goma xantana, además tiene características de un fluido no newtoniano (pseudoplásticas). Las fuerzas de cizallamiento, que físicamente se definen como las fuerzas internas que se generan cuando las distintas capas del fluido se deslizan una sobre

otra debido a una diferencia de velocidades, no tienen efecto sobre la goma xantana por lo que la viscosidad del exopolisacárido se mantendrá constante.

El xantano también es resistente a la degradación a diferentes concentraciones de pH y temperatura, lo cual lo vuelve altamente versátil para sus aplicaciones (García-Ochoa et al., 2000). Ciertas propiedades del xantano mencionadas anteriormente, están relacionadas con la estructura misma del heteropolisacárido. Por ejemplo, un factor que determina la viscosidad de la goma es la cantidad de residuos de piruvato, ya que se unen a los grupos hidroxilo de la D-Glucosa creando una red tridimensional.

La producción de goma xantana en el interior de la célula requiere de los siguientes pasos: ensamblaje de los polisacáridos, la polimerización y el transporte hacia el exterior. En todo el proceso para elaborar xantano intervienen un total de 12 genes (*GumB-GumM*), los cuales se expresan en forma de operón, su región promotora se ubica antes del punto de inicio de transcripción del gen *GumB*.

Adicionalmente, el operón está regulado por factores de patogenicidad conocidos como genes *rpf* (Vojnov et al., 2001). Ver Figura 2. Las proteínas que codifican los genes del operón están reguladas según la fase de crecimiento y tienen diferentes niveles de transcriptoma y proteoma. Por ejemplo, los genes *GumB* y *GumC* (involucrados en la expulsión de goma) tienen una mayor expresión durante la fase estacionaria, se sugiere que forman un complejo proteico para evitar la degradación por proteasas periplásmicas. En cambio, el gen *GumL* (encargado de la piruvilación de manosa) se expresa con menor intensidad durante la fase estacionaria. Por su parte, el gen *GumD* (glicosiltransferasa) al sufrir regulaciones postraduccionales provoca que el nivel de proteoma se reduzca significativamente (Hahn et al., 2022).



**Figura 2.** Esquema biosíntesis de goma xantana (Hahn et al., 2022)

La goma xantana es un exopolisacárido fascinante, posee diversas propiedades que la convierten en un recurso sumamente versátil para un sin número de aplicaciones: en los alimentos se la usa en la fabricación de helados, sopas, bebidas, galletas y pan, debido a su capacidad de producir emulsiones estabilizadoras y espesas, también brinda estabilidad térmica e inclusive se la considera como un sustituto del gluten (Preichardt & Klaic, 2016) y (FACE, 2020). En la industria farmacéutica es usada como excipiente de tabletas e hidrogeles de soporte. La goma xantana también está presente en cosméticos tales como: pastas dentales, champús, productos dermatológicos y lociones (Petri, 2015). La goma inclusive puede estar en fungicidas que se aplican a nivel agrícola. Debido a los múltiples usos de la goma xantana, su mercado a nivel mundial está valorado en 1,9 mil millones de dólares y se espera que en los próximos 8 años el mercado de la goma crezca 5,9% anualmente (Yahoo Finance, 2022).

## Objetivos

### General

- Determinar que desecho agroindustrial es más idóneo como fuente alterna de carbono para la producción de goma xantana

## Específicos

- Evaluar el rendimiento de producción de goma xantana en medios de cultivo que contengan melaza y vinaza.
- Comparar ciertas características reológicas, como la viscosidad, entre la goma elaborada en un medio con melaza y la goma producida en un medio con vinaza

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Aislamiento

El muestreo se realizó en la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador. En las parcelas correspondientes a cultivos de coliflor y col, se identificaron plantas con síntomas característicos de infección por *Xanthomonas campestris*. Estos incluyeron, la observación de hojas con clorosis amarilla en forma de "V". Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología e inmediatamente fueron procesadas. Para esto, se cortaron fragmentos de 5 mm<sup>2</sup>, correspondientes únicamente la parte sintomática de las hojas. Evitando utilizar la parte necrótica de las hojas debido a la alta presencia de microorganismos saprófitos. A continuación, las hojas fueron lavadas en un vaso de precipitación con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar los microorganismos indeseados, y luego se lavaron con agua destilada. En total, el proceso se repitió por 4 veces.

Una vez desinfectado el tejido vegetal, se procedió a preparar diluciones seriadas. En primer lugar, los fragmentos de las hojas se colocaron en un tubo con agua destilada y se maceraron con un agitador de cristal. Una vez que el color del agua cambió, se tomó 1 ml de la suspensión de agua con las hojas maceradas y se añadió en 9 ml de agua destilada. Este proceso se repitió hasta llegar a la dilución 10<sup>-6</sup>. Finalmente, se inocularon 100 µl en superficie de agar nutritivo de las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis. Finalmente, se eligieron las colonias con las siguientes características para los análisis bioquímicos y moleculares posteriores: colonias con forma redonda, elevada y de color amarillo, altamente mucosa, con bordes completos.

## **4.2. Identificación molecular**

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante específicamente para bacterias Gram negativas. Posteriormente, al mismo tiempo que se determinó su pureza, el material genético extraído se cuantificó espectrofotométricamente mediante el equipo *Nano spectrophotometer*.

Posteriormente, el gen 16S del ARNr fue amplificado, los cebadores universales 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1540R (TACGGYTACCTTGTTACGACT). El protocolo usado en el termociclador fue el siguiente: 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, los pasos 3 y 5 se repetirán 35 ciclos y finalmente se terminará con 72°C por 10 minutos.

Los amplicones de la PCR fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X durante 1 hora a 120V.

Finalmente, las muestras fueron secuenciadas mediante el método de Sanger en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Para la identificación de los aislamientos, las secuencias fueron alineadas en bases de datos como GenBank, utilizando la herramienta BLAST, y EzBioCloud.

## **4.3. Preparación de medios de cultivo**

### **4.3.1. Medio de cultivo a base de melaza**

A la melaza, primeramente, se le midió el pH con un pHmetro y se anotaron sus características organolépticas. Seguidamente, se elaboró un medio de crecimiento específico para la fase de adaptación, con una composición mínima basada en: 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl y 100 g/l de sucrosa. Se prepararon cultivos sucesivos del medio adaptativo, en total se elaboraron 4 pases de 200 ml por cada cepa de *Xanthomonas campestris* obtenida. Con el propósito de facilitar la adaptación de los cultivos, se colocó una cantidad adicional de sucrosa de 5 g y 20 g en el primer y segundo pase. Sin embargo, en el tercer y cuarto pase, se colocaron 40 ml de melaza cruda. (Kalogiannis et al., 2003). Posteriormente, se agregó 4 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a la melaza para mejorar el rendimiento y la productividad de goma xantana durante la fermentación.

Finalmente, el medio a base de melaza usado para la fermentación estuvo compuesto por 8% de melaza con fosfato dipotásico (Rajyaguru et al., 2021).

#### **4.3.2. Medio convencional de composición definida (MCD)**

Este medio maximiza la producción de goma xantana y sirvió como comparación para los dos medios de prueba que contienen desechos agroindustriales. Este medio fue previamente descrito por Velu et al., (2016), y se compone de 40.72 g/l de glucosa, 9.84 g/l de peptona, 4.97 g/l de fosfato monopotásico, 3.02 g/l de sulfato de amonio y 0.1134 g/l de cloruro férrico hexahidratado.

#### **4.3.3. Medio de cultivo a base de vinaza**

El desecho agroindustrial fue recolectado en la destiladora de ron: “Romeros & Sons”. A la vinaza se agregó 20 g/l de glicerol, 3 g/l de extracto de levadura 1.5 g/l de sulfato de amonio y 0.1 g/l de urea para que existan suficientes fuentes de carbono y nitrógeno durante la fermentación (Souza Silverio et al., 2021). Finalmente, la concentración de vinaza fue de 10% en el medio de cultivo, es decir, para preparar 300 ml del medio, se añadió 30 ml de vinaza.

### **4.4. Preparación de inóculo**

#### **4.4.1. Inóculo en un medio a base de melaza**

Para el inóculo de *Xanthomonas campestris* destinado a propagarse en un medio de cultivo a base de melaza, se requirió que las bacterias se adapten previamente a un entorno con altos niveles de azúcares. En consecuencia, se hizo una fase de adaptación a través de subcultivos sucesivos. Se partió de las colonias aisladas y purificadas en el medio YPG (*Yeast Peptone Glucose* por sus siglas en inglés). Con un asa redonda, se recogió una colonia característica de *Xanthomonas campestris* que fue inoculada en un Erlenmeyer con 200 ml del caldo elaborado para la fase de adaptación y que correspondió al primer pase. El matraz fue incubado a 28-30°C por 24 horas, con agitación de 100 rpm. Una vez que se observó turbidez en el caldo, tras el tiempo de incubación, se recogieron 20 ml con una pipeta serológica estéril y se inocularon en el Erlenmeyer con 200 ml del medio de cultivo para la fase de adaptación bajo las mismas condiciones de incubación. Este mismo procedimiento se realizó hasta llegar al cuarto pase, el cual sirvió como inóculo para la fermentación con melaza de caña de azúcar (Kalogiannis et al., 2003).

#### **4.4.2. Inóculo para un medio a base de vinaza y para un medio convencional de composición definida**

Para ambas fermentaciones se elaboró el medio YM o también llamado Malta-Levadura compuesto de: 3 g/l de extracto de malta, 3 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 10 g/l de glucosa y agua destilada (Demirci et al., 2019). En este medio se inocularon las bacterias aisladas en YPG, bajo las condiciones de incubación ya descritas.

#### **4.5. Estandarización del inóculo**

La cuantificación del inóculo para las tres fermentaciones se determinó mediante recuento en placa. Para esto, se prepararon diluciones seriadas en base 10, 9 ml de agua destilada estéril, desde la dilución  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ . Se sembraron 100  $\mu$ l en superficie (agar nutriente) de las siguientes diluciones:  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ . Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonia en la dilución más idónea y se realizó el cálculo de la concentración de bacterias, expresada en UFC/ml.

El porcentaje del inóculo con respecto a los tres medios probados fue de 10% siguiendo las indicaciones de García-Ochoa et al. (2000). En el que se sugiere que el tamaño ideal de un inóculo para la fermentación de goma xantana va desde un 5% hasta un 10% del medio utilizado.

#### **4.6. Fermentación**

La fermentación duró 96 horas, debido a que en ese tiempo se alcanzó la producción máxima de goma xantana. La temperatura de incubación fue de entre  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y el pH del medio se mantuvo entre 7 - 7.5 y a una agitación constante de 150 rpm (Leela & Sharma, 2000).

El volumen final para cada fermentación fue de 300 ml para cada tratamiento, además cada medio de cultivo probado se lo realizó por duplicado.

#### **4.7. Extracción y precipitación**

Después de 4 días de fermentación, se retiraron los matraces de la incubadora y se homogenizó su contenido. Seguidamente, se recolectó todo el medio de cultivo en el que ocurrió la fermentación en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 4 000 rpm durante

30 minutos. Se almacenó el sobrenadante y se descartó el sedimento que contenía la biomasa celular. Finalmente, al sobrenadante se le agregó etanol al 96% en una proporción de 1:4 con el objetivo de precipitar la goma xantana (Demirci et al., 2019). Se utilizó una pipeta de 20 ml estéril para separar el alcohol de la goma xantana. Seguidamente, se secó en un horno a 40°C durante toda la noche. El pesaje de la goma se realizó en una balanza analítica.

#### **4.8. Análisis estadísticos**

Primeramente, se hizo la prueba de Shapiro–Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Luego se realizó un modelo ANOVA de dos vías para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre las variables cualitativas (cepa y medio de cultivo) y la variable cuantitativa (producción de goma xantana). Finalmente, se hizo una prueba post hoc, concretamente la prueba de Tukey.

Todos los cálculos estadísticos fueron hechos en el programa RStudio.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Aislamiento**

Se recolectaron 6 hojas de plantas crucíferas que presentaban sintomatología característica producida por *Xanthomonas campestris*: 3 de coliflor y 3 de col. El principal criterio de selección fue la clorosis amarilla en forma de “V”. Figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Hojas de coliflor con sintomatología característica producida por *Xanthomonas campestris*

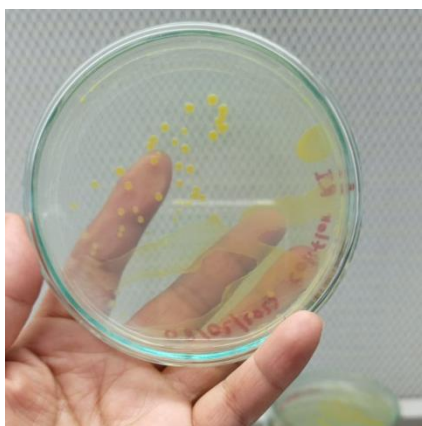


**Figura 4.** Hojas de col con sintomatología característica producida por *Xanthomonas campestris*

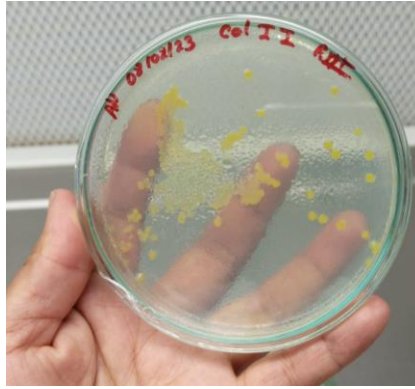
Las colonias que se obtuvieron en agar nutritivo fueron: circulares, amarillas, muy mucosas, elevadas. Figuras 5 – 8.



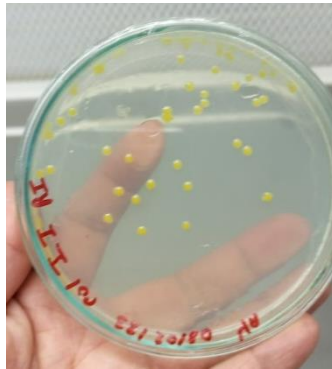
**Figura 5.** Colonias de *Xanthomonas campestris* (dilución  $10^{-5}$ ) de coliflor en agar nutritivo



**Figura 6.** Colonias de *Xanthomonas campestris* (dilución  $10^{-6}$ ) de coliflor en agar nutritivo



**Figura 7.** Colonias de *Xanthomonas campestris* (dilución  $10^{-5}$ ) de col en agar nutritivo



**Figura 8.** Colonias de *Xanthomonas campestris* (dilución  $10^{-6}$ ) de col en agar nutritivo

## 5.2. Identificación bioquímica

El equipo Biolog fue usado para identificar las colonias aisladas mediante patrones bioquímicos. Se colocaron colonias puras en un buffer de dilución y se ajustó su absorbancia de 0,5 a 0,8 a 600 nm. Posteriormente, se usaron placas de 96 pocillos y se inoculó 200  $\mu$ l del buffer de dilución. La placa se incubó a 28°C durante 24 horas para luego ser analizada en el equipo.

**Tabla 1.** Resultados bioquímicos

Origen aislamiento	Identificación
Col	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv vesicatoria</i>
Coliflor	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv vesicatoria</i>

### 5.3. Identificación molecular

Después de haber realizado la extracción de ADN, se midió su concentración y calidad. Ver Tabla 2.

**Tabla 2.** *Concentración y calidad ADN extraído*

Origen aislamiento	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Relación <b>260/280</b>
Col	70	1,94
Coliflor	60	1,85

La secuenciación la realizaron en Macrogen (Corea) a través del método Sanger. Una vez enviadas las secuencias se las analizaron en el programa *Geneious Prime*, en el que se realizó la limpieza de las secuencias, eliminando el ruido existente. Ver Tabla 3.

**Tabla 3.** *Longitud de secuencias limpias y secuencias con ruido*

Secuencia	Sin limpiar	Limpia
2027F	1498 pb	876 pb
2127F	1487 pb	706 bp

Una vez que se obtuvieron las secuencias limpias, se utilizaron dos bases de datos para su identificación: por un lado, la base de datos de 16S del *EzBioCloud*; y, por otro lado, la base de datos del mismo programa *Geneious Prime*. Los resultados obtenidos se describen en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** *Resultados identificación en la base de datos EzBioCloud*

Secuencia	EzBioCloud	Similitud
2027F	<i>Xanthomonas campestris</i>	99,66%
2127F	<i>Xanthomonas campestris</i>	99,82%

**Tabla 5.** Resultados identificación en la base de datos Geneious Prime

Secuencia	Geneious Prime	Similitud
2027F	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv campestris</i>	99,8%
2127F	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>pv nigromaculans</i>	100%

Una vez identificada la bacteria, se procedió a conferir un código para cada cepa. La especie de *Xanthomonas campestris* que proviene de la col será “C”, mientras que la que proviene de la coliflor será “CF”.

#### 5.4. Estandarización del inóculo

Para garantizar la misma cantidad de bacterias para las distintas fermentaciones que se realizaron, se llevó a cabo el procedimiento de conteo en placa, debido a que la turbidez del medio a base de melaza dificultaba su medición en el espectrofotómetro. Los resultados que se observan en la Tabla 6, corresponden a los distintos conteos en placa del inóculo a base de melaza que se realizaron en cajas Petri con agar nutriente después de 24 horas de incubación. De igual forma, las Tablas 7 y 8 indican el número de colonias presentes en el inóculo que fue usado para el medio MDC y para el medio a base de vinaza

**Tabla 6.** Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio de cultivo a base de melaza

Cepa	Repetición	Dilución	UFC	UFC/ml
C	2	$10^{-3}$	140	$14 \times 10^5$
CF	2	$10^{-3}$	137	$13,7 \times 10^5$

**Tabla 7.** Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio de cultivo a base de vinaza

Cepa	Repetición	Dilución	UFC	UFC/ml
C	1	$10^{-6}$	20	$20 \times 10^7$
C	2	$10^{-6}$	14	$14 \times 10^7$
CF	1	$10^{-6}$	7	$7 \times 10^7$
CF	2	$10^{-6}$	13	$13 \times 10^7$

**Tabla 8.** Resultados del conteo en placa del inóculo para el medio con composición definida

Cepa	Repetición	Dilución	UFC	UFC/ml
C	1	10 <sup>-6</sup>	15	15x10 <sup>7</sup>
C	2	10 <sup>-6</sup>	14	14x10 <sup>7</sup>
CF	1	10 <sup>-6</sup>	8	8x10 <sup>7</sup>
CF	2	10 <sup>-6</sup>	14	14x10 <sup>7</sup>

La primera fermentación que se realizó fue la del medio de cultivo a base de melaza. La concentración del inóculo realizada por la cepa *Xanthomonas campestris* de la col (C) y de la coliflor (CF) fue de 14x10<sup>5</sup> y 13,7x10<sup>5</sup>, respectivamente.

Para las siguientes fermentaciones de los dos medios restantes: MDC y medio a base de vinaza, el inóculo fue estandarizado a 14x10<sup>5</sup> y 13,7x10<sup>5</sup>, según la cepa usada. Para lograr esto, utilizó la siguiente fórmula ( $V1 * C1 = V2 * C2$ ), ya que siempre se partió de una concentración mayor como se puede observar en las Tablas 7 y 8.

### 5.5. Goma xantana precipitada y extraída

Se observó que la consistencia de la goma en cada medio de cultivo fue diferente. Por ejemplo, el xantano resultante del medio a base de melaza fue de color oscuro, además era más líquido y menos viscoso que la goma de los otros dos medios, ver figura 9. En cambio, la goma xantana que provenía del medio de cultivo a base de vinaza tenía una composición más viscosa y con un color menos oscuro, ver figura 10. Finalmente, el xantano del medio con composición definida tenía otras características, como un color blanco-crema, tenía cierta consistencia de gelatina y no era líquida, (Figura 11).



**Figura 9.** *Goma xantana extraída del medio de cultivo a base de melaza*

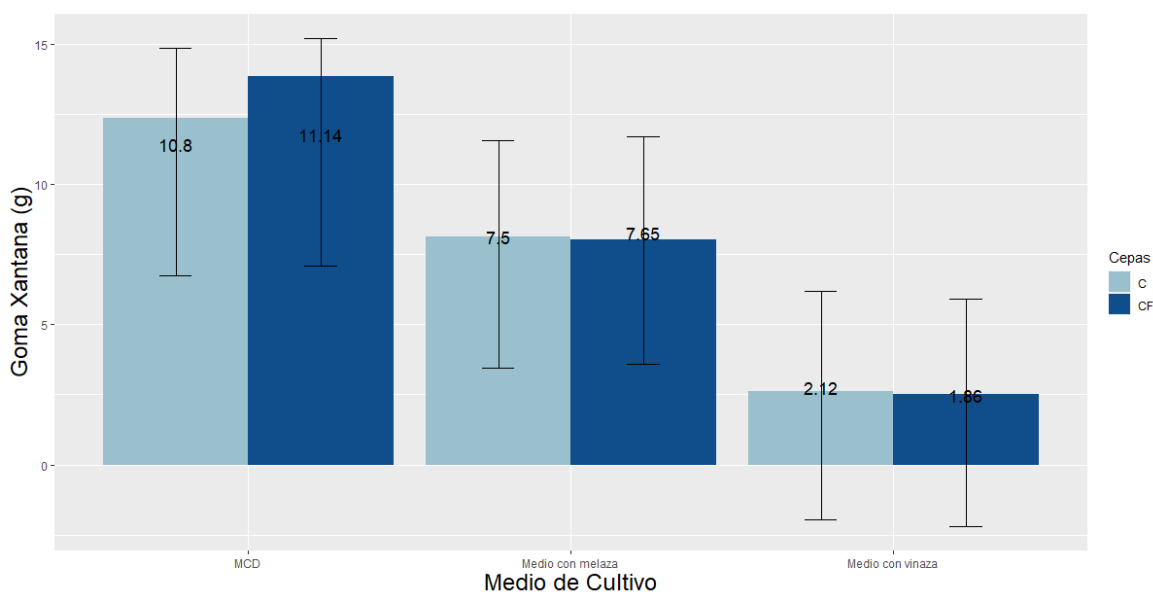


**Figura 10.** *Goma xantana extraída del medio de cultivo a base de vinaza*



**Figura 11.** *Goma xantana extraída del medio de cultivo con composición definida*

## 5.6. Producción de goma xantana



**Figura 12.** Goma xantana producida por cada cepa en los tres medios de cultivo probados

Los promedios calculados y desviaciones estándar de las fermentaciones en los tres medios de cultivo fueron los siguientes: en el medio MCD, la cepa C produjo 10.8 g  $\pm$  2.27 g de goma xantana, mientras que la cepa CF tuvo un promedio de 11.14 g  $\pm$  3.80 g. Por otro lado, en el medio a base de melaza, la cepa C sintetizó 7.5 g  $\pm$  0.91 g de goma xantana, mientras que cepa CF tuvo un valor de 7.65 g  $\pm$  0.52 g. Finalmente, en el medio que contenía vinaza, la cepa C tuvo una producción de 2.12 g  $\pm$  0.73 g de goma xantana, mientras que la cepa CF tuvo un valor medio de producción de 1.86 g  $\pm$  0.89 g.

En base a los resultados del modelo ANOVA realizado, se puede afirmar que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la producción de goma xantana entre las distintas cepas probadas. El valor p obtenido fue de 0,89851. Además, no hay evidencia significativa para concluir que existe una relación entre la cepa utilizada y el medio de cultivo en términos de la producción de goma xantana. El valor p para este

parámetro fue de 0,98091. Sin embargo, se encontró una diferencia significativa en la variable del medio de cultivo, lo que indica que el medio utilizado sí influye en la producción de goma xantana. El valor p para esta variable fue de 0,00162.

La prueba de Tukey del factor "Medio" indica lo siguiente: la diferencia entre el medio de melaza y el medio con composición definida no es significativa, con un valor p de 0,1002155. Por otro lado, se encontró evidencia para concluir que hay una diferencia significativa entre el medio con composición definida y el medio a base de vinaza, con un valor p de 0,0144256. De manera similar, se puede afirmar que hay una diferencia significativa entre el medio a base de melaza y el medio de vinaza, con un valor p de 0,0013610.

## 6. DISCUSIÓN

Un factor primordial que determina la cantidad de goma xantana en cada medio de cultivo es la cantidad de carbohidratos disponibles en el medio de cultivo. Además, incrementa el crecimiento celular y la cantidad de goma xantana producida (Niknezhad et al., 2014). En general, la melaza está compuesta por 75-85% de sólidos, de los cuales el 30-36% es sacarosa, el 10-17% es fructosa o glucosa, y existen pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados y cenizas (Carioca et al., 2011). En consecuencia, hay una gran cantidad de azúcares que pueden ser consumidos por la bacteria *Xanthomonas campestris*. En contraste, la vinaza contiene pocos azúcares que pueden ser metabolizados por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Se estima que la vinaza promedio tiene un 2% de azúcares residuales que no fueron transformados en etanol durante la fermentación. Además, la vinaza contiene aminoácidos conocidos como melanoidinas, los cuales son responsables de su color característico (Mikucka & Zieli, 2020). Esta gran diferencia en la concentración de azúcares en los medios podría ser una

razón para entender las distintas cantidades de goma xantana producida. En el caso del medio de cultivo con vinaza, incluso se ha tenido que aumentar la cantidad de fuentes de carbono en forma de glicerol. Vale la pena recalcar que la vinaza posee una cantidad de etanol no destilado lo cual funcionaría como un factor adverso para el crecimiento de *Xanthomonas campestris* (Mikucka & Zieli, 2020).

Sin embargo, la producción de goma xantana en el medio a base de melaza fue menor que en el medio con composición definida. Esto podría explicarse por lo siguiente, en el medio que contenía melaza tenía una concentración muy alta de azúcares en comparación al otro medio, especialmente de fructosa. En trabajos pasados, se ha evidenciado que una cantidad elevada de fructosa tiende a disminuir la cantidad de goma xantana producida (Demain, 1979).

Una característica muy marcada en la goma producida en el medio a base de melaza es que fue más líquida en comparación con la goma de los otros dos medios probados. Una posible explicación es la concentración de sales en el medio. La melaza tiene una buena cantidad de azúcares, pero muy pocas sales. La cantidad de compuestos como el cloruro de sodio o las sales de calcio tiene un impacto significativo en la viscosidad del xantano. Si su concentración es menor al 0,5%, la viscosidad de la goma disminuye (Smith & Pacett, 1982).

En el caso del medio a base de melaza, solo se agregó una sal (fosfato dipotásico). Sin embargo, el medio a base de vinaza y el medio con composición definida tenían otras sales como cloruro de sodio, cloruro férrico, fosfato monopotásico. Otro factor clave que determina la viscosidad del xantano es la cantidad de acetilación en su residuo de manosa. Estudios pasados realizados por Smith & Pacett, (1982) han evidenciado el efecto de la cantidad de acetilo y piruvato en la goma xantana. Mediante ingeniería genética, se logró manipular la expresión de los siguientes genes: gen *F*, gen *L*, gen *G*, que se encargan de

sintetizar la acetilasa I, que modifica la manosa interna, la cetalasa, que piruvila la manosa exterior, y una acetilasa, respectivamente. Los resultados mostraron que las gomas con una alta cantidad de residuos de piruvato son más viscosas, mientras que aquellas con una alta cantidad de grupos acetilo presentan una viscosidad más baja. Finalmente, podría haber otro factor que puede explicar el cambio de consistencia de la goma xantana producida en el medio a base de melaza. Uno de ellos, es la aireación, que es un factor sustancial que interviene en las características reológicas de la goma. Una mayor aireación aumenta la biomasa celular, la viscosidad de la goma y una mayor capacidad de tolerar la degradación térmica (Assis et al., 2014). En otros estudios que evalúan parámetros óptimos para la producción de goma xantana, se usa una aireación de 1 vv, siendo vv una medida de aireación (Psomas et al., 2007). En el presente trabajo, en el equipo usado para la incubación no se podía controlar el factor de la aireación. En tal caso, la agitación usada en el actual estudio pudo haber sido menor de la necesaria.

El microorganismo que más frecuentemente se usa para la producción de goma xantana es la especie *Xanthomonas campestris*. Sin embargo, existe diferente cantidad de goma producida a nivel de patovar. Por ejemplo, en estudios anteriores realizados por Rottava et al. (2009). Se estudió diferentes especies del género *Xanthomonas*. Más específicamente, se comparó la producción de goma xantana de los siguientes microorganismos: *Xanthomonas melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* y más de siete distintos patovares de *Xanthomonas campestris*. Los resultados indican que *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* y *Xanthomonas campestris* pv *campestris* fueron las cepas que más goma xantana produjeron. Sin embargo, la cantidad de goma xantana fue muy cercana en distintos patovares en *Xanthomonas campestris*. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las diferentes especies de *Xanthomonas campestris* también mostraron resultados similares en la producción de goma xantana.

Aunque se observó una diferencia de xantano producido en el medio con composición definida, esta diferencia no fue estadísticamente significativa según el análisis de varianza (ANOVA) realizado. En cuanto a la reología de la goma xantana producida, se sabe que, según estudios previos como los realizados por Gumus et al. (2010), también puede variar según la cepa de *Xanthomonas* utilizada. Se comparó la viscosidad de la goma sintetizada por cepas de tipo silvestres aisladas de plantas como el nogal, el pimiento, la begonia y el anturio, con cepas descritas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Los resultados sugieren que la viscosidad de la goma xantana producida por las cepas aisladas de las plantas es menor que la generada por la cepa descrita. Esto podría explicar la gran semejanza de la consistencia de la goma xantana obtenida en este estudio usando dos cepas de *Xanthomonas campestris* de tipo silvestre aisladas de plantas de col y de coliflor.

## 7. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo a base de melaza resultó ser más eficiente que el de base de vinaza en términos de producción de goma xantana. Se observó una producción significativamente mayor de goma xantana en el medio de cultivo a base de melaza en comparación con el medio de cultivo a base de vinaza. Sin embargo, se encontró que la consistencia del xantano producido en ambos medios de cultivo era diferente en comparación con el medio de cultivo con composición definida. Esto sugiere que factores como la concentración de azúcares y sales, nivel de aireación o piruvilación pueden haber afectado la reología de las gomas producidas.
- Se encontró que las dos cepas de *Xanthomonas campestris* evaluadas mostraron valores muy similares de producción de goma xantana en todos los medios de

cultivo utilizados. Esto sugiere que las cepas no fueron un factor influyente en la producción del heteropolisacárido.

- Para futuras aplicaciones de la goma xantana producida en los medios de cultivo evaluados en este estudio, se requieren más investigaciones para comprender el impacto de la reología en diversas aplicaciones que se le quisiera dar a la goma.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assis, D. D. J., Brandão, L. V., Sousa, L. S., Padilha, F. F., & Druzian, J. I. (2014). A Study of the Effects of Aeration and Agitation on the Properties and Production of Xanthan Gum from Crude Glycerin Derived from Biodiesel Using the Response Surface Methodology. 2769–2785. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0723-7>
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Boulanger, A., Zischek, C., Lautier, M., Jamet, S., Rival, P., Carrère, S., Arlat, M., & Lauber, E. (2014). The plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* exploits N-Acetylglucosamine during infection. *MBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01527-14>
- Buitrago-Rincon, D. L., Sadtler, V., Mercado, R. A., Roques-Carmes, T., Benyahia, L., Durand, A., Ferji, K., Marchal, P., Pedraza-Avella, J. A., & Lemaitre, C. (2022). Effect of Silica Nanoparticles in Xanthan Gum Solutions: Evolution of Viscosity over Time. *Nanomaterials*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/nano12111906>
- Büttner, D., & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 107–133. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>
- Carioca, J. O. B., Federal, U., & Estadual, U. (2011). Ethanol Production from Sugar-Based Feedstocks. In *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition, Vol. 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00184-7>
- Demain, A. (1979). *Nutritional Studies on Xanthan Production by Xanthomonas campestris NRRL Nutritional Studies on Xanthan Production by Xanthomonas campestris NRRL B1459*. May. <https://doi.org/10.1128/AEM.37.6.1186-1192.1979>
- Demirci, A. S., Palabiyik, I., Apaydın, D., Mirik, M., & Gumus, T. (2019). Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *Lwt*, 101, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.018>
- Dimitri, C., & Effland, A. (2020). From farming to food systems: The evolution of US agricultural production and policy into the 21st century. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 35(4), 391–406. <https://doi.org/10.1017/S1742170518000522>

- Dos Santos, F. P., Oliveira, A. M., Nunesa, T. P., De Farias Silva, C. E., & De Souza Abud, A. K. (2016). Bioconversion of agro-industrial wastes into xanthan gum. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 145–150. <https://doi.org/10.3303/CET1649025>
- FACE. (2020). *Clasificación de los alimentos sin gluten*.
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gómez, E. (2000). Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549–579. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00050-1)
- Hahn, J., Koch, D., Niehaus, K., & Ortseifen, V. (2022). Analysis of Gum proteins involved in xanthan biosynthesis throughout multiple cell fractions in a “single-tube.” *Journal of Proteomics*, 257(February), 104513. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104513>
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D. A., & Skaracis, G. N. (2003). Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*, 39(2), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00067-0)
- Lang, J. M., Pérez-Quintero, A. L., Koebnik, R., DuCharme, E., Sarra, S., Doucoure, H., Keita, I., Ziegler, J., Jacobs, J. M., Oliva, R., Koita, O., Szurek, B., Verdier, V., & Leach, J. E. (2019). A pathovar of *Xanthomonas oryzae* infecting wild grasses provides insight into the evolution of pathogenicity in rice agroecosystems. *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00507>
- Leela, J. K., & Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 23(6), 687–689. <https://doi.org/10.1007/s004499900054>
- Lopes, F. C., & Ligabue-Braun, R. (2021). Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(March). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.589414>
- Martinez-Burgos, W. J., Bittencourt Sydney, E., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Magalhães, A. I., de Carvalho, J. C., Karp, S. G., Porto de Souza Vandenberghe, L., Junior Letti, L. A., Thomaz Soccol, V., de Melo Pereira, G. V., Rodrigues, C., Lorenci Woiciechowski, A., & Soccol, C. R. (2021). Agro-industrial wastewater in a circular economy: Characteristics, impacts and applications for bioenergy and biochemicals. *Bioresource Technology*, 341(July). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125795>
- Mikucka, W., & Zieli, M. (2020a). *Distillery Stillage : Characteristics , Treatment , and Valorization*.
- Mikucka, W., & Zieli, M. (2020b). Mikucka-Zielińska2020\_Article\_DistilleryStillageCharacterist.pdf. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 770–793.
- Miroshnik, S., Nemykina, O., Bochkareva, E., & Kozhushko, S. (2021). *Environmental*

*problems of the agro-industrial complex : a lawyer ' s view. 08035.*

- Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V., & Tinzaara, W. (2021). Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>
- Niknezhad, S. V., Francisco, S., Asadollahi, M. A., Zamani, A., & Biria, D. (2014). Production of xanthan gum by Xanthomonas species using starch as carbon source. *Minerva Biotecnologica*, November.
- Nikodinovic-Runic, J., Guzik, M., Kenny, S. T., Babu, R., Werker, A., & O'Connor, K. E. (2013). Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 84). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407673-0.00004-7>
- Petri, D. F. S. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23). <https://doi.org/10.1002/app.42035>
- Preichardt, L. D., & Klaic, P. M. A. (2016). Xanthan gum application in food. *Xanthan Gum: Applications and Research Studies, January 2016*, 2–31.
- Psomas, S. K., Liakopoulou-kyriakides, M., & Kyriakidis, D. A. (2007). Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. 35, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.036>
- Rajyaguru, B., Varma, A., Kharkwal, A., & Singh, J. (2021). Biosynthesis of Xanthan Gum by Xanthomonas campestris Using Cane Molasses as a Carbon Source. *Nature Environment and Pollution Technology*, 20(5), 2017–2021. <https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.V20I05.018>
- S. James Jr, H. (2021). Introduction to the Handbook on the Human Impact of Agriculture. In *Handbook on the Human Impact of Agriculture* (Edward Elg, pp. 1–11). Edward Elgar Publishing. <https://doi.org/10.4337/9781839101748.00008>
- Sabuquillo, P., & Cubero, J. (2021). Biofilm formation in xanthomonas arboricola pv. Pruni: Structure and development. *Agronomy*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy11030546>
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Samal, Biswajit. Chatterjee, S. (2019). Bacterial quorum sensing facilitates Xanthomonas campestris pv. campestris invasion of host tissue and to maximize disease symptom. 1–35.
- Smith, I. H., & Pacett, G. W. (1982). *Recovery of Microbial Polysaccharides*. 119–129.
- Souza Silverio, M., Perez Calegari, R., Ferreira Lima Leite, G. M., Maciel Lewandowski Meira Prado, L., Chaves Martins, B., Alberto da Silva, E., Piotrovski Neto, J., Gomig, A., & Sampaio Baptista, A. (2021). Vinasse From the Brazilian Lignocellulosic Ethanol Process: Chemical Composition and Potential for Bioprocesses. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, 15(1), 42–68. <https://doi.org/10.18011/bioeng2021v15n1p42-68>

- Tang, J. liang, Tang, D. J., Dubrow, Z. E., Bogdanove, A., & An, S. qi. (2021). *Xanthomonas campestris* Pathovars. *Trends in Microbiology*, 29(2), 182–183. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.003>
- Vicente, J. G., & Holub, E. B. (2013). *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, 14(1), 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
- Vojnov, A. A., Slater, H., Daniels, M. J., & Dow, J. M. (2001). Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 768–774. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.768>
- Zielińska, M., Bułkowska, K., & Mikucka, W. (2021). Valorization of distillery stillage for bioenergy production: A review. *Energies*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/en14217235>

**Firma del estudiante y fecha:**

A handwritten signature in blue ink, reading "Francisco Veja Yáñez". The signature is written in a cursive style with a large initial 'F'.

Francisco Emilio Veja Yáñez

Quito, 16 de junio de 2023

**Firma de la directora de disertación y fecha:**

A handwritten signature in blue ink, reading "Mgtr. Sonia M. Estrella V.". The signature is written in a cursive style with a large initial 'S'.

Mgtr. Sonia M. Estrella V.

Quito, 16 de junio de 2023

**Firma de la Coordinadora de la Carrera de Microbiología y fecha:**

Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito,