

**METODOLOGÍA PARA BIOMODULAR LA PRODUCCIÓN DE
NANOCARBONATO DE CALCIO MEDIANTE EL USO DE ÁCIDOS
ORGÁNICOS COMO ADITIVOS**

5 Campo técnico de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, particularmente se refiere a la formación de materiales a partir de la biosíntesis de compuestos. En la presente invención la biosíntesis se realiza a partir de un microorganismo, donde el microorganismo es una bacteria y donde el compuesto biosintetizado es carbonato de calcio. La presente invención puede ser aplicada en ingeniería de tejidos para la regeneración de hueso, restauraciones dentales o en la liberación controlada de medicamentos.

Antecedentes de la invención

La precipitación de carbonatos de calcio se puede dar por vía química o biológica, por medio de métodos de supersaturación y difusión de carbonatos de amonio. Con más detalle, algunos investigadores han encontrado por ejemplo, que los nanocarbonatos de calcio sintetizada químicamente no es apta para el transporte de fármacos, debido a que ésta tiende a formar clústeres de tamaños micrométricos (lo cual es un problema para su procesamiento) y suelen introducir trazas de impurezas durante la síntesis. En estos casos, cuando se requiere un mineral con condiciones óptimas de pureza y homogeneidad implica consumir reactivos de alta pureza y precio, así como un despliegue técnico muy alto; lo que incrementa considerablemente los costos de producción. Algunos artículos científicos han reportado el uso de ácidos orgánicos en procesos de síntesis química de calcita, donde se ha observado que estos ayudan a modificar tanto los tamaños de grano, como la polimorfía del carbonato (calcita, vaterita o aragonita).

Por vía biológica existen diferentes rutas por las cuales se obtienen este tipo de minerales, ya sea implementando suelos ricos en urea o empleando proteínas específicas presentes en las conchas de algunas especies marinas, entre otras. Los métodos biológicos para inducir la producción de carbonatos de calcio han sido estudiados con varios microorganismos debido a que presentan grandes ventajas respecto a la producción por métodos químicos, como ser amigables con el ambiente, espontáneos, naturales y sostenibles.

Se encuentran en el estado del arte las patentes US20050214194A *Biological process for the preparation of mineral crystals using seeds*; WO2006066326A1 *Microbial biocementation*; CN1778934A *Preparation of calcium carbonate by microbe deposition*; CN101085880A *Nano layered calcium carbonate base bionic composite material and synthetic method thereof* y WO2008120979A1 *Microbiologically induced carbonate precipitation*, que se refieren a técnicas de biocementación, aplicaciones con microorganismos o productos

derivados de ellos. Estas tienen un fin específico que depende del campo en que se vayan a utilizar, principalmente en la industria del concreto o fabricación de biomateriales derivados. Sin embargo, dichos documentos no evidencian la aplicación de ácidos orgánicos como moduladores del crecimiento de las partículas de carbonato de calcio, aplicando una metodología *in situ* como la que se presenta en esta solicitud.

Además se encuentran investigaciones como I. Uad, J. Gonzales-Lopez, G.A. Silva-Castro, J.I. Vilchez, A. Gonzales-Martínez, D. Martín-Ramos, A. Rivadeneyra, M.A. Rivadeneyra, *Precipitation of Carbonates Crystals by Bacteria Isolated from a Submerged fixed-film Bioreactor used for the Treatment of urban Wastewater*, *Int. J. Environ. Res.* 8 (2014) 435–446. y N.K. Dhami, M.S. Reddy, A. Mukherjee, *Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages.*, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 304. doi:10.3389/fmicb.2014.00304 que mencionan que la bioprecipitación de carbonatos de calcio, empleando bacterias del genero *Bacillus spp.* es un método eficiente. No obstante, la morfología del material producido tiende a formar cúmulos, lo cual no resulta favorable para algunas aplicaciones.

Es por eso que se requieren estrategias que permitan modificar el fenómeno de la aglomeración y tamaño de partícula del carbonato de calcio, sin que lleguen a alterar el bioproceso llevado a cabo por los microorganismos. La presente invención utiliza ácidos orgánicos como una alternativa prometedora, ya que los grupos carboxilo de estos actúan en el proceso de crecimiento de los cristales de carbonato de calcio al ser adsorbidos por la superficie del carbonato variando el polimorfo obtenido y su morfología, además de modificar la forma en la que precipitan las partículas sin afectar el metabolismo del microorganismo.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido cítrico.

FIG. 2 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido málico.

FIG. 3 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido cítrico, adicionado al día 1.

FIG. 4 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido málico, adicionado al día 1.

FIG. 5 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido cítrico, adicionado al día 2.

FIG. 6 Comportamiento del pH vs. tiempo, durante el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio a diferentes concentraciones de ácido málico, adicionado al día 2.

FIG. 7 Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día cero.

FIG. 8 Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día cero

5 **FIG. 9** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día uno.

FIG. 10 Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día uno.

10 **FIG. 11** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día dos.

FIG. 12 Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día dos.

FIG. 13 Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados obtenidos del proceso de bioprecipitación a diferentes concentraciones y día de adición del
15 ácido cítrico. a) sin ácido, b) 0.05% día 0, c) 0.05% día 0, d) 0.10% día 1, e) 0.10% día 1 , f) 0.10% día 2, g) 0.10% día 2, h) 0.15% día 2 y i) 0.15% día 2.

FIG. 14 Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados obtenidos del proceso de bioprecipitación a diferentes concentraciones y día de adición del
20 ácido málico. a) sin ácido, b) 0.05% día 0, c) 0.05% día 0, d) 0.10% día 2, e) 0.15% día 2 y f) 0.15% día 2.

Descripción detallada

La presente invención divulga un método para biosintetizar carbonato de calcio mediante un
25 medio biológico, particularmente divulga un método para biosintetizar carbonato de calcio a partir de un inóculo bacteriano que involucra los pasos de preparar y esterilizar un medio de cultivo modificado con un modulador; incubar un inóculo bacteriano a condiciones de crecimiento en el medio de cultivo modificado y finalmente separar y purificar el carbonato de calcio precipitado obtenido mediante el inóculo bacteriano.

30 Se entiende por “biosintetizar” al proceso mediante el cual un microorganismo produce algún tipo de material como resultado de su metabolismo. Para efectos de la presente invención el microorganismo es una bacteria. La bacteria puede adquirirse a través de un laboratorio certificado.

35 *Preparar y esterilizar un medio de cultivo modificado*

El método de la presente invención inicia con la preparación y esterilización de un medio de cultivo modificado con un modulador. Para el crecimiento de los microorganismos y
40 biosíntesis de carbonatos de calcio es importante que el medio de cultivo en el que se encuentre tenga los componentes adecuados. En el proceso, se probaron diferentes medios

de cultivo con el fin de evaluar en cuál de ellos el microorganismo producía mayor cantidad de mineral, denominado medio de cultivo modificado.

La preparación del medio de cultivo se realiza mediante métodos convencionales y conocidos en la técnica, donde se garanticen los nutrientes y fuentes necesarias para que el microorganismo pueda metabolizar y biosintetizar un mineral. Que el medio de cultivo sea modificado implica que este puede ser una variante de un medio de cultivo comercial estándar para el mantenimiento de microorganismos. Entre los medios de cultivo estándares se encuentran los medios B4, M-3, M-3P, CC y SF.

Entre los componentes del medio de cultivo modificado se incluye al menos una fuente de carbono, al menos una fuente de proteína y al menos una sal de calcio. La fuente de carbono y la fuente de proteína se seleccionan de cualquier fuente de carbono o proteína adecuada para los microorganismos utilizados en la presente invención. Las fuentes de carbono incluyen pero no se limitan a glucosa, peptona, fructosa, sacarosa, metanol. Las fuentes de proteína incluyen pero no se limitan a triptona, peptona. Las sales de calcio se seleccionan entre acetato de calcio ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de calcio (CaSO_4), carbonato de calcio (CaCO_3), oxalato, fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fluoroclorofosfato cálcico $(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{Cl})\text{Ca}_5$ entre 0.01% y 0.5% p/v.

Para proceder a realizar la siembra del microorganismo, es necesario garantizar que el medio esté libre de bacterias o agentes que puedan contaminar el proceso, por lo cual es necesario esterilizarlo. La esterilización consiste en la destrucción de microorganismos o impurezas no deseadas para obtener un producto libre de microorganismos viables. La esterilización se puede realizar mediante métodos físicos y químicos. Entre los métodos físicos se encuentran calor húmedo, calor seco, incineración, aire caliente, pasteurización, ebullición, vapor, tindalización, radiación, entre otros. Entre los métodos químicos se encuentran la esterilización con alcohol (como etanol o alcohol isopropílico), aldehídos (como formol o glutaraldehído), fenoles (como ácido carboxílico y xilenol), óxido de etileno, peróxido de hidrógeno, entre otros.

La esterilización se puede realizar en cualquier equipo conocido por una persona medianamente versada en la materia, por ejemplo en una autoclave que por medio de condiciones de presión y temperatura con vapor de agua destruye los microorganismos e impurezas presentes en el medio de cultivo modificado. Las condiciones de presión se encuentran entre 80 y 100 psi o entre 100 y 120 psi de presión; las condiciones de temperatura se encuentran entre 100 y 150°C, entre 110 y 130°C durante un periodo entre 1 y 120 minutos, entre 5 y 60 minutos o entre 10 y 30 minutos.

Para la modificación de la morfología de los carbonatos de calcio, se adicionan al medio de cultivo moduladores que alteran las propiedades físico-químicas del mismo, provocando que

el microorganismo module la configuración cristalográfica y morfológica de los carbonatos biosintetizados. Los moduladores pueden ser ácidos orgánicos como ácido málico, ácido oleico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido salicílico o ácido fórmico o cualquiera conocido por una persona medianamente versada en la materia. El modulador
5 tiene una relación respecto al medio del cultivo entre el 5 y el 50%, o entre el 5% y el 30%, particularmente entre el 10 y el 25%. El modulador puede ser adicionado en una ocasión, batch o semibatch.

Una vez esterilizado el medio, dependiendo del volumen que se desee hacer la muestra, se
10 toma 90% v/v de medio de cultivo y 10% v/v del inóculo bacteriano seleccionado, y se procede a cultivarlo en las condiciones de crecimiento adecuadas para la bacteria particular. De este cultivo se tomará el inóculo bacteriano para el proceso de biosíntesis.

Incubación del inóculo bacteriano

15 El método continúa con la incubación de un inóculo bacteriano en el medio de cultivo modificado, a condiciones de crecimiento. El inóculo bacteriano hace referencia a un volumen determinado de un cultivo del microorganismo en el medio de cultivo modificado, el cual contiene una cantidad determinada del microorganismo. El inóculo bacteriano se
20 agrega al medio de cultivo modificado en una proporción de entre un 80% a 90% de medio de cultivo por entre un 5% v/v y un 50% v/v de inóculo bacteriano, particularmente entre 10% v/v y 40% v/v, o entre 10% v/v y 30%v/v. Cada muestra se cubre con papel filtro y papel aluminio estéril para evitar el contacto directo con el ambiente y posibles contaminantes. El microorganismo del cual se obtiene el inóculo bacteriano, es una bacteria
25 capaz de metabolizar y sintetizar carbonatos de calcio. Para efectos de la presente invención la bacteria se selecciona de *Bacillus cereus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Myxococcus xanthus*. La presente invención puede realizarse mediante cualquier cepa de las especies mencionadas previamente.

30 Entre las cepas de *Bacillus cereus* se encuentran: ATCC 55675 (BP01), ATCC 13824 NCIB 2600 (*Bacillus cereus* var. fluorescens), ATCC 14603, ATCC 15816, ATCC 15817, ATCC 13472, ATCC 14737, ATCC 9592 (*Bacillus metiens*), ATCC 27877, ATCC 19637, ATCC 11950, ATCC 23261, ATCC 6464, ATCC 11773 (*Erwinia atroseptica*), ATCC 10876, ATCC 10987, ATCC 4342 (*Bacillus lacticola*), ATCC 21182, ATCC 7004
35 (*Bacillus albolactis*), ATCC 10702, ATCC 12480, ATCC 49063, ATCC 2 (*Bacillus agri*), ATCC 19265 (*Bacillus cereus* subsp. alesti), ATCC 21634, ATCC 12826, ATCC 21768, ATCC 21769, ATCC 21771, ATCC 21772, ATCC 9139, ATCC 21928, ATCC 27522, ATCC 31430, ATCC 43881, ATCC 246 (*Bacillus lactimorbus*), ATCC 21770 (*Bacillus cereus*), ATCC 21929 (*Bacillus cereus*), ATCC 13367, ATCC 31429,
40 ATCC 31293, ATCC 21366 (*Bacillus coagulans*), ATCC 25621 (*Bacillus medusa*), ATCC 7039 (*Bacillus metiens*), ATCC 14893 (*Bacillus subtilis*), ATCC 9818

(*Bacillus lactis*), ATCC 33018, ATCC 33019, ATCC 55055, ATCC 53522, ATCC 13366, ATCC 7064 (*Bacillus siamensis*), ATCC 11949, ATCC 10792 (*Bacillus cereus*), ATCC 27348, ATCC 23260 (*Bacillus endorhythmos*), ATCC 13061, ATCC 13062 (*Bacillus megaterium*), ATCC 25972, ATCC 14579, ATCC 19646, ATCC 49064, ATCC 11778, ATCC 39152.

Entre las cepas de *Bacillus subtilis* se encuentran ATCC 10783, ATCC 15818, ATCC 15819, ATCC 15245 (*Bacillus natto*), ATCC 15134 (*Bacillus uniflagellatus*), ATCC 13542, ATCC 13472, ATCC 15575, ATCC 27505, ATCC 21697 (*Achromobacter nitriloclastes*), ATCC 15811, ATCC 4925 (*Bacillus nigrificans*), ATCC 27370, ATCC 6051^a, ATCC 7003, ATCC 11838, ATCC 15563, ATCC 33234, ATCC 25369, ATCC 27689, ATCC 55033, ATCC 13933, ATCC 15244, ATCC 27328, ATCC 12695, ATCC 12100, ATCC 21554, ATCC 21555, ATCC 15561, ATCC 15562, ATCC 9799, ATCC 12711, ATCC 14593, ATCC 4944, ATCC 31002, ATCC 31004, ATCC 9943, ATCC 13407, ATCC 7067, ATCC 29056, ATCC 31524, ATCC 31526, ATCC 21359, ATCC 21360, ATCC 13954, ATCC 13955, ATCC 15044, ATCC 33677, ATCC 31003, ATCC 31522, ATCC 465 N., ATCC 12432, ATCC 43223, ATCC 13952, ATCC 13953, ATCC 14662, ATCC 15039, ATCC 15040, ATCC 15041, ATCC 15042, ATCC 15043, ATCC 15181, ATCC 15182, ATCC 15183, ATCC 15184, ATCC 21183, ATCC 21336, ATCC 49343, ATCC 6537, ATCC 21394, ATCC 8473, ATCC 31523, ATCC 31525, ATCC 31527, ATCC 29233, ATCC 14660, ATCC 14661, ATCC 31268, ATCC 4925, ATCC 55405, ATCC 9524, ATCC 15476, ATCC 23858, ATCC 23859, ATCC 7060, ATCC 7058, ATCC 7059, ATCC 7480 (*Bacillus endoparasiticus*), ATCC 21584, ATCC 31022, ATCC 21331, ATCC 21332, ATCC 21777, ATCC 21778, ATCC 6598 (*Bacillus licheniformis*), ATCC 49822, ATCC 23857, ATCC 19221, ATCC 9858, ATCC 21742, ATCC 4529, ATCC 35148, ATCC 33608, ATCC 19549, ATCC 19550, ATCC 21556, ATCC 31340, ATCC 49760, ATCC 53325, ATCC 14807, ATCC 21228, ATCC 15512, ATCC 15841, ATCC 10774, ATCC 31091, ATCC 31092, ATCC 31094, ATCC 31096, ATCC 31097, ATCC 39546, ATCC 39374, ATCC 11774, ATCC 15116, ATCC 35021, ATCC 31954, ATCC 19062, ATCC 23059, ATCC 53115, ATCC 15115, ATCC 13956, ATCC 21952, ATCC 82, ATCC 21603, ATCC 31785, ATCC 21697, ATCC 15477, ATCC 31098, ATCC 19162, ATCC 14617, ATCC 14618, ATCC 33713, ATCC 33714, ATCC 55422, ATCC 6461, ATCC 21007, ATCC 21770, ATCC 6984, ATCC 19163, ATCC 21663, ATCC 19217, ATCC 19219, ATCC 19220, ATCC 21005, ATCC 21006.

Entre las cepas de *Bacillus pasteurii* se encuentran: ATCC 11859, ATCC 6452, ATCC 700386, ATCC 6453. Entre las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* se encuentran ATCC 23350, ATCC BAA390, ATCC 23843, ATCC 31592, ATCC 23844, ATCC 23845, ATCC 53495, PTA 7548, ATCC 23842, PTA 7549, ATCC 49763, PTA 7791, PTA 7541, PTA 7545, PTA 7546, PTA 7790, PTA 7542, PTA 5819, PTA 7544, ATCC 68604, ATCC 700385.

Entre las cepas de *Myxococcus xanthus* se encuentran ATCC 25232, ATCC 29618, ATCC 27924, ATCC 27926, ATCC 27923, ATCC 27925, ATCC 31046, ATCC 27927, ATCC 27922, ATCC 25565.

5

La incubación consiste en mantener el microorganismo en las condiciones de crecimiento o reproducción, por un tiempo determinado. En este caso las condiciones de crecimiento del inóculo bacteriano son tiempo de incubación, temperatura y agitación. El tiempo de incubación se refiere al tiempo que tarda el microorganismo en biosintetizar el mineral deseado, este se encuentra entre 1 y 10 días, entre 2 y 7 días, entre 3 y 9 días, o entre 4 y 8 días. La temperatura se encuentra entre 10 y 40°C, entre 15 y 35°C o entre 20 y 35°C. Las condiciones de agitación se encuentran entre 50 y 1000 rpm, particularmente entre 80 y 500rpm, o entre 100 y 400rpm, o entre 200 y 300rpm. En una modalidad la agitación se realiza mediante un agitador orbital.

15

Separación del precipitado

Finalmente se realiza la separación que alude a la desunión de las partículas sólidas biosintetizadas del medio de cultivo líquido que las contiene. La separación sólido-líquido se puede realizar mediante cualquier método conocido por una persona medianamente versada en la materia, por ejemplo decantación, filtración, centrifugación, evaporación, flotación o cristalización, entre otros. En una modalidad la separación del precipitado se logra mediante centrifugación entre 2000 y 5000 rpm por un periodo entre 5 y 15 minutos. Las partículas sólidas obtenidas son el carbonato de calcio biosintetizado.

25

El carbonato de calcio precipitado obtenido mediante la presente invención puede estar en cualquiera de sus tres polimorfos: calcita, vaterita y aragonita, de acuerdo con las sales de calcio utilizadas en el medio de cultivo.

30

Con el fin de caracterizar los carbonatos biosintetizados se usan técnicas como Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) que permite realizar imágenes del producto obtenido con y sin moduladores, y así observar las diferencias morfológicas del precipitado. Sin los moduladores los precipitados son estructuras gruesas y muy aglomeradas, y después del proceso de biomodulación las estructuras comienzan a fraccionarse, las partículas que las conforman son más definidas y se ven menos aglomeradas. Simultáneamente se realizan pruebas de caracterización mineralógica de Difracción de rayos X (DRX) que permiten identificar las proporciones de las fases cristalinas del precipitado, y se observa que con la adición de los moduladores se ve favorecida una fase cristalina de los carbonatos denominada Vaterita, sobre Calcita, que es la fase prevaleciente en el proceso sin la implementación de los moduladores.

40

Opcionalmente se puede realizar una purificación después de la etapa de separación, esta purificación consiste en eliminar trazas de componentes del medio de cultivo que pueden quedar adheridas a las partículas sólidas. Este proceso se lleva a cabo mediante lavados consecutivos con agua y solventes orgánicos, por ejemplo metanol, etanol, butanol, propanol, éter, ésteres, ácidos orgánicos o cualquiera conocido por una persona medianamente versada en la materia, mediante procesos como sedimentación, centrifugación, precipitación o cualquiera conocido por una persona medianamente versada en la materia.

Algunas investigaciones han reportado que los medios ácidos tienen un efecto inhibitor del crecimiento de bacterias como *Bacillus cereus*, ya que esta crece en medios alcalinos. Además de esto, los ácidos orgánicos pueden modificar la resistencia térmica de las esporas de la bacteria, ya que adiciona iones H^+ al medio, lo que impide su crecimiento como menciona I. Leguerinel, P. Mafart, *Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of Bacillus cereus spores*, *Int. J. Food Microbiol.* 63 (2001) 29–34. doi:10.1016/S0168-1605(00)00394-9. Esto contrasta con la metodología presentada en esta solicitud donde el medio de cultivo se modifica mediante la adición de un ácido y las concentraciones y estrategias de cultivo empleadas hacen que el metabolismo de la bacteria no vea afectado.

Se debe entender que la presente invención no se halla limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, el cual solo se encuentra definido por las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Aislamiento del microorganismo

Se utilizó una cepa de *Bacillus cereus* U1/UPB, identificada molecularmente por el Laboratorio del Centro Nacional de Secuenciación Genómica (CNSG) de la Universidad de Antioquia. La cepa tuvo una adaptación previa al proceso de biomineralización de carbonato de calcio al medio M3 modificado (0.50% p/v de acetato de calcio y 0.40% p/v de triptona), en el cual se hicieron sembrados consecutivos, con duración de 6 días cada uno, hasta no observar variaciones en el pH entre réplicas, con el fin de asegurar que la bacteria se adaptara al nuevo medio y que su metabolismo y comportamiento dependieran exclusivamente del medio M3 modificado.

Ejemplo 2. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido cítrico adicionado al día cero como modulador en un medio de cultivo modificado

(a) Preparación y esterilización

El medio de cultivo M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y como modulador ácido cítrico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperaturas entre 18°C y 27°C.

(b) *Incubación*

- 5 En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo modificado obtenido en la etapa (a) y se adicionaron 10mL de inóculo bacteriano obtenido mediante el Ejemplo 1 en 90mL de medio M3 modificado. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C ± 1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm ± 2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6 lo que demuestra que el cultivo se estaba desarrollando bien, como se observa en la FIG. 1. En esta figura podemos ver que las muestras que contenían 0.10% y 0.15% p/v de ácido cítrico, su pH comenzó en aproximadamente 5, y que con el paso de los días este no pudo aumentar su valor. A diferencia de estos, la muestra que tenía 0.05% p/v de ácido cítrico comenzó con un pH de casi 6, por lo cual este aumentó con el paso de los días terminando en 9.

(c) *Separación*

Se tomaron 80 mL del cultivo y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se descartó el medio líquido y el precipitado se purificó. La purificación consistió en lavar 4 veces con agua destilada y 4 veces con alcohol al 90%, agitando en vórtex por 1 minuto entre cada fase de lavado. Posteriormente se secó la muestra en una incubadora a 30°C ± 1°C durante 24 horas.

(d) *Caracterización del producto*

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 3,3g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día cero como se observa en la FIG. 7. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido cítrico implementadas, las concentraciones de 0,15% y 0,10% p/v obtuvieron 0,0g/L y por el contrario con la otra concentración 0,05% p/v se obtuvo 2,3g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica Difracción de Rayos X (DRX) y se encontraron dos fases cristalinas denominadas Calcita (Ca) y Vaterita (Va) en diferentes proporciones dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración 0,05% Va: 85,8 y Ca: 14,2%. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador a 0,05% las estructuras tubulares se ven más definidas. (Ver FIG. 13)

Ejemplo 3. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido málico adicionado al día cero como modulador en un medio de cultivo modificado

(a) *Preparación y esterilización*

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido málico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente.

(b) *Inoculación*

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo obtenido en el Ejemplo 5 y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una velocidad de agitación de $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$.

- 5 Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 2. En esta figura se observa que las muestras con concentraciones de ácido málico de 0.10% y 0.15% p/v iniciaron con valores de pH de 5, y se mantuvo constante a través del tiempo. Por el contrario, la muestra con 0.05% p/v de ácido málico comenzó con un pH de aproximadamente 6, el cual aumento con el tiempo hasta
10 terminar en aproximadamente 8.5.

(c) *Separación*

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2

(d) *Caracterización del producto*

- 15 Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 2,2g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día cero como se observa en la FIG. 8. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido málico implementado, las concentraciones más altas (0,15% y 0,10%) obtuvieron 0,0g/L y por el contrario con la otra concentración (0,05%) se obtuvo 2,2g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2
20 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración de 0,05% Va: 94,9% y Ca: 5,1%. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador a 0,05% las estructuras se ven más definidas. (Ver FIG. 14)

25

Ejemplo 4. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido cítrico adicionado al día uno como modulador en un medio de cultivo modificado

(a) *Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado*

- 30 El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido cítrico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido cítrico se conservan en una nevera.

(b) *Inoculación*

- 35 En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato de calcio y el ácido cítrico se adicionaron al día 1 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una velocidad de agitación de $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$.
40 Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 3. Esta figura muestra que todas las muestras

comenzaron con un pH de 8, y que el día 1, en el que se les agrega el ácido cítrico, su pH disminuye. Para la muestra con 0.15% p/v de ácido cítrico su pH disminuyó hasta 5.25 y con el paso del tiempo no aumentó. Las muestras con 0.05% y 0.10% p/v de ácido cítrico disminuyeron su pH hasta 6.8 y 5.7 respectivamente, logrando con el paso del tiempo aumentar hasta terminar en 9.

(c) *Separación*

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2

Caracterización del producto

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 3,4g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día uno como se observa en la FIG. 9. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido cítrico implementadas, la concentración más alta de ácido (0,15%) obtuvo 0,0g/L y por el contrario con las otras concentraciones (0,05% y 0,10%) obtuvieron entre 3,3g/L y 3,4g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración de 0,05% Va: 94,5 y Ca: 5,5% y para 0,10% Va: 97,9% y Ca: 2,1. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 13)

Ejemplo 5. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido málico adicionado al día uno como modulador en un medio de cultivo modificado

(a) *Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado*

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido málico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido málico se conservan en una nevera.

(b) *Inoculación*

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato de calcio y el ácido málico se adicionaron al día 1 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C $\pm$ 1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm $\pm$ 2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 4. La figura muestra que todas las muestras comenzaron con un pH de 8, y que al día 1 en que se adicionó el ácido málico, su valor disminuyó. Para la muestra que contenía 0.15% p/v de ácido málico su pH disminuyó hasta 5.3, y con el tiempo no aumentó. Por otro lado, las muestras con 0.05% y 0.10% p/v de ácido

málico disminuyeron su pH hasta 6.7 y 5.8 respectivamente, aumentando su valor con el paso del tiempo hasta obtener un valor de 8.5.

(c) *Separación*

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el

5 Ejemplo 2

Caracterización del producto

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 3,0g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día uno como se observa en la FIG. 10. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido málico implementadas, la concentración más alta de
10 ácido (0,15%) obtuvo 0,0g/L y por el contrario con las otras concentraciones (0,05% y 0,10%) obtuvieron un precipitado alrededor de 3,0g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración de 0,05% Va: 91,0% y Ca: 9,0% y para 0,10% Va: 93,3% y Ca: 6,7%. Y por microscopía
15 electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 14)

Ejemplo 6. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido cítrico adicionado al día dos como modulador en un medio de cultivo modificado

20

(a) *Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado*

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido cítrico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por
25 aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido cítrico se conservan en una nevera.

(b) *Inoculación*

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato
30 de calcio y el ácido cítrico se adicionaron al día 2 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C $\pm$ 1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm $\pm$ 2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 5. La figura muestra que todas las muestras
35 comenzaron con un pH de 8 y que comenzó a aumentar, pero el día 2 que se adicionó el ácido cítrico el pH disminuyó. Para las muestras con 0.05%, 0.10% y 0.15% p/v de ácido cítrico los pH disminuyeron hasta 7, 6.5 y 6 respectivamente, pero con el paso del tiempo el pH aumento hasta aproximadamente 8.5.

(c) *Separación*

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el
40 Ejemplo 2

Caracterización del producto

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 2,3g/L y 2,5g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día dos como se observa en la FIG. 11. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido cítrico implementado. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración de 0,05% Va: 100,0% y Ca: 0,0%; para 0,10% Va: 92,6% y Ca: 7,4% y para 0,15% Va: 96,7% y Ca: 3,3%. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 13)

Ejemplo 7. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido málico adicionado al día dos como modulador en un medio de cultivo modificado

(a) Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido málico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido málico se conservan en una nevera.

(b) Inoculación

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato de calcio y el ácido málico se adicionaron al día 2 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C $\pm$ 1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm $\pm$ 2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 6. La figura muestra que todas las muestras comenzaron con un pH de 8, y que su valor comenzó a aumentar, pero el día 2 que se adicionó el ácido málico el pH disminuyó. Para las muestras con 0.05%, 0.10% y 0.15% p/v de ácido málico, el pH disminuyó hasta 6.8, 6.5 y 6 respectivamente, pero con el paso del tiempo el valor aumentó hasta llegar a 8.5.

(c) Separación

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2

Caracterización del producto

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 2,7 g/L y 3,0g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día dos como se observa en la FIG. 12. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido málico implementado. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración

de 0,05% Va: 91,7% y Ca: 8,3% y para 0,10% Va: 92,4% y Ca: 7,6%. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 14)

REIVINDICACIONES

1. Un método para biosintetizar carbonato de calcio a partir de un inóculo bacteriano que comprende:
 - 5 (a) preparar y esterilizar un medio de cultivo modificado con un modulador;
 - (b) incubar un inóculo bacteriano a condiciones de crecimiento en el medio de cultivo modificado; y,
 - (c) separar el carbonato de calcio precipitado.
- 10 2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa (a) el medio de cultivo modificado comprende: una fuente de carbono, una fuente de proteína y una sal de calcio.
3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa (a) el modulador es
15 un ácido orgánico que se selecciona entre ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico y ácido sórbico.
4. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa (a) el modulador se encuentra en una concentración de entre 0.01% y 0.40% p/v.
20
5. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en el etapa (b) el inóculo bacteriano se obtiene a partir de una bacteria que se selecciona de: *Bacillus cereus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Myxococcus xanthus*.
- 25 6. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa (b) el inóculo bacteriano tiene una relación del 10% respecto medio de cultivo modificado.
7. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde en la etapa (b) las condiciones de crecimiento son: tiempo de incubación entre 4 y 8 días, temperatura entre 20 y 35°C y
30 agitación entre 100rpm y 400rpm.
8. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, donde el carbonato de calcio se selecciona del grupo de calcita, vaterita o aragonita.
- 35 9. Un carbonato de calcio obtenido mediante el método de la Reivindicación 1.

RESUMEN

La presente invención divulga un método para la obtención de carbonato de calcio por medio de una biosíntesis de un inóculo bacteriano, el método comprende preparar un medio de cultivo con un modulador, incubar un inóculo bacteriano en el medio de cultivo a condiciones de crecimiento para finalmente separar el carbonato de calcio obtenido. El producto de la presente invención se caracteriza por ser carbonato de calcio polimorfo con diferentes morfologías, que varían de acuerdo al modulador que se utilice, al día de adición y a la concentración del mismo.

10

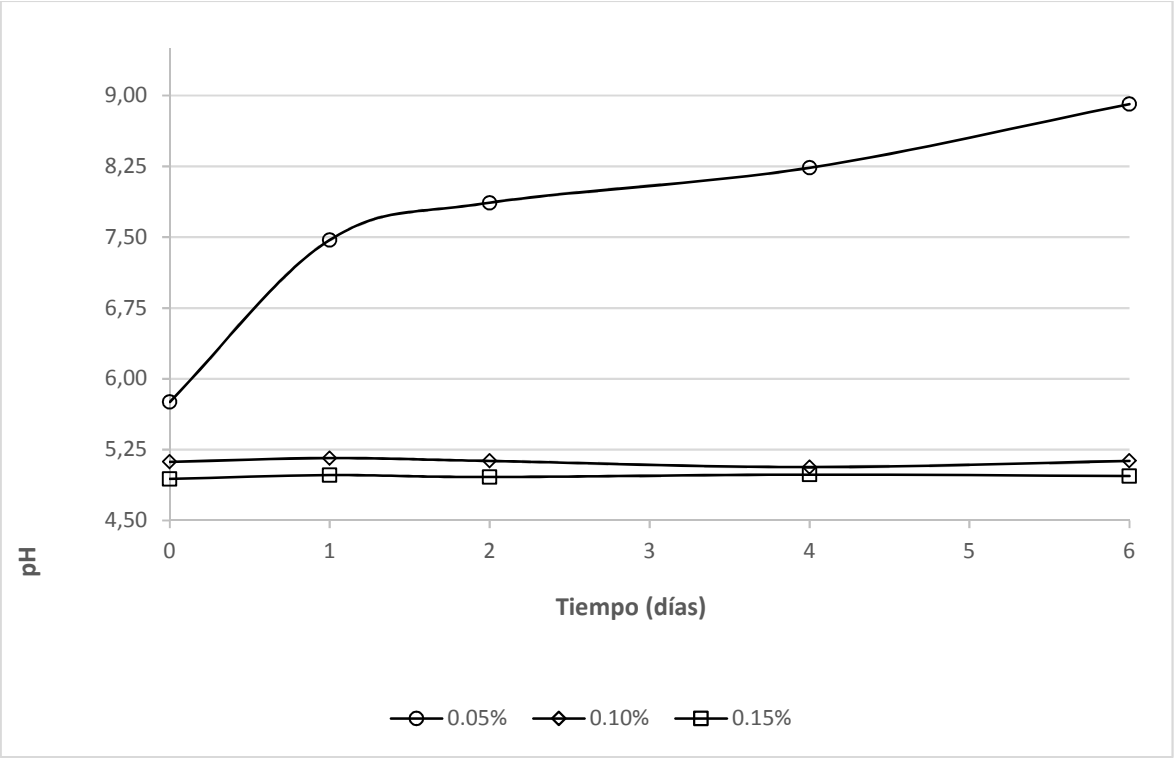


FIG. 1

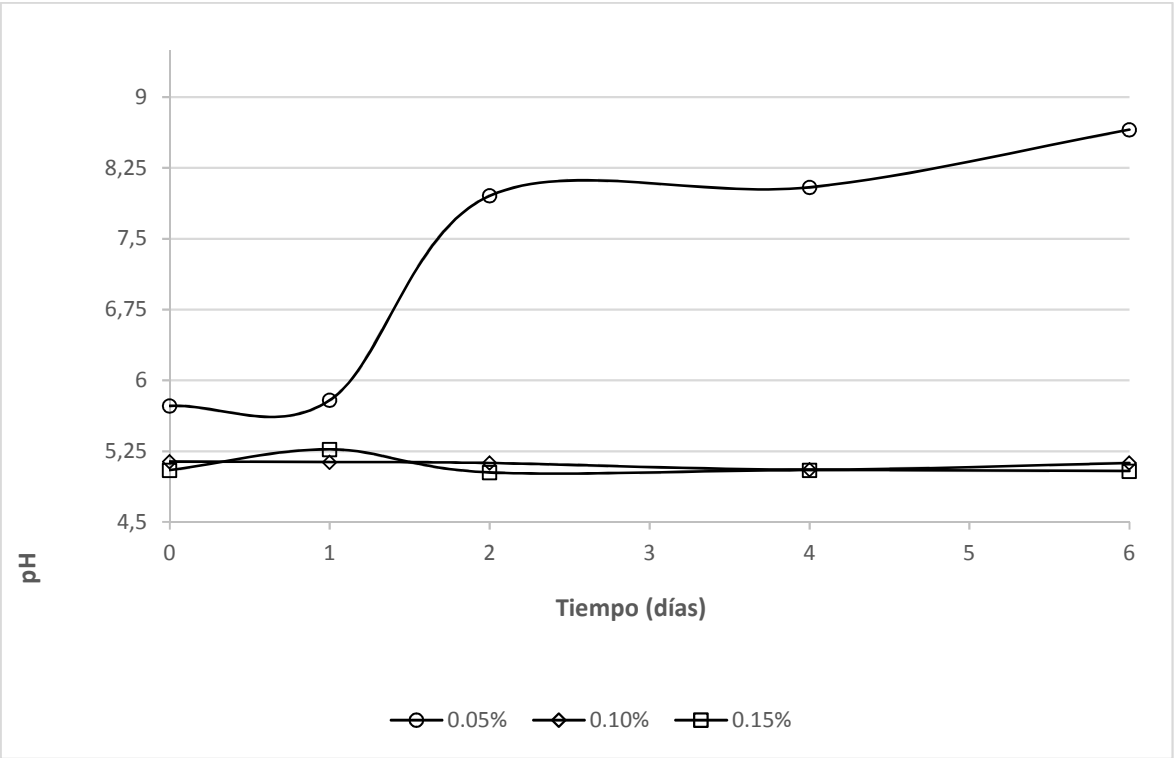


FIG. 2

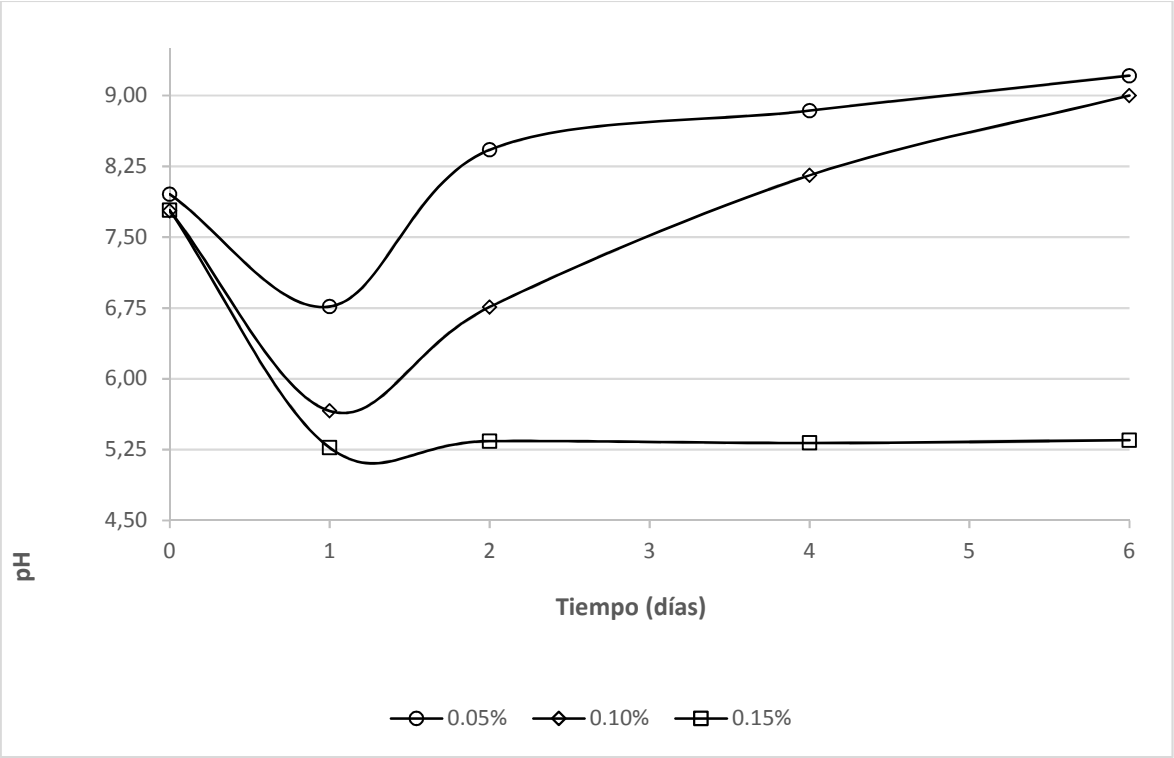


FIG. 3

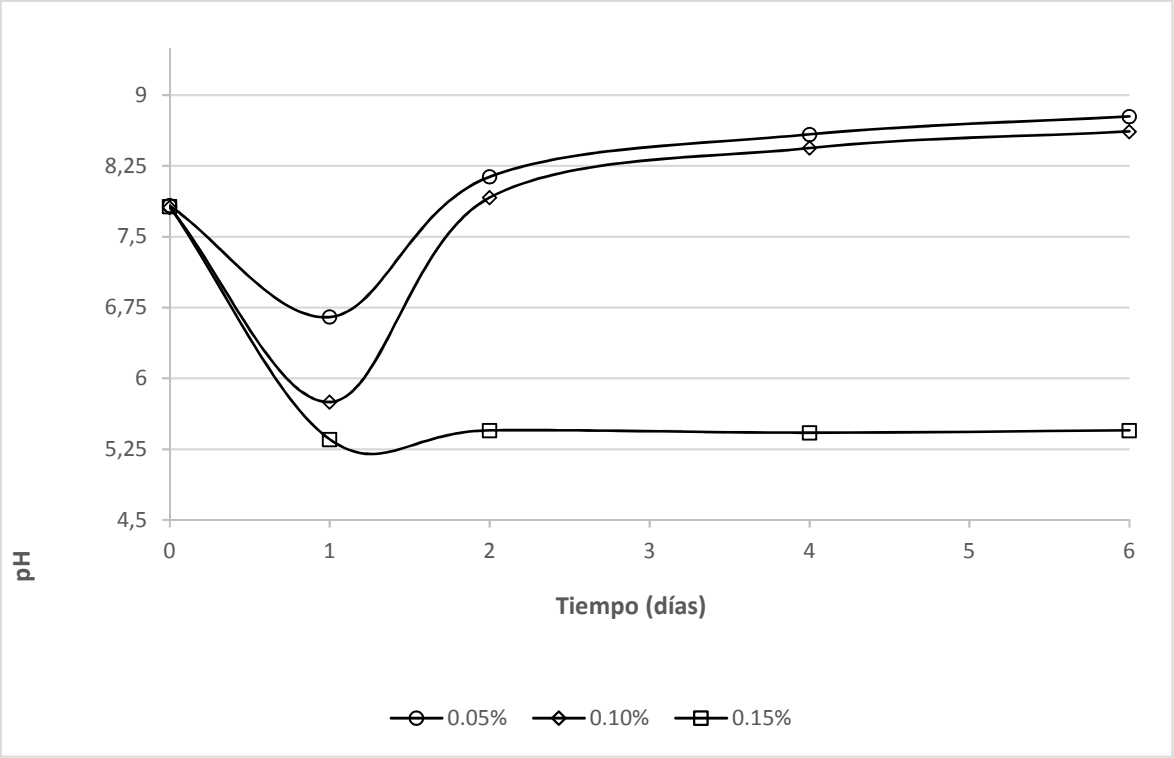


FIG. 4

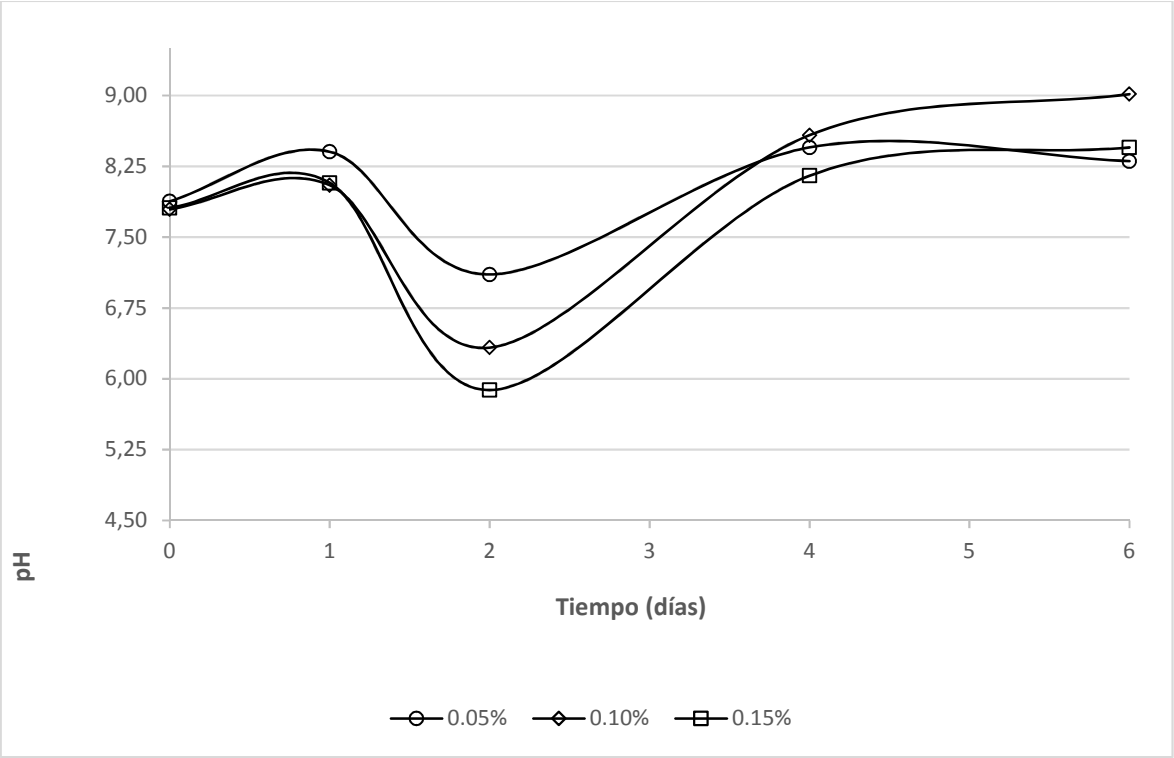


FIG. 5

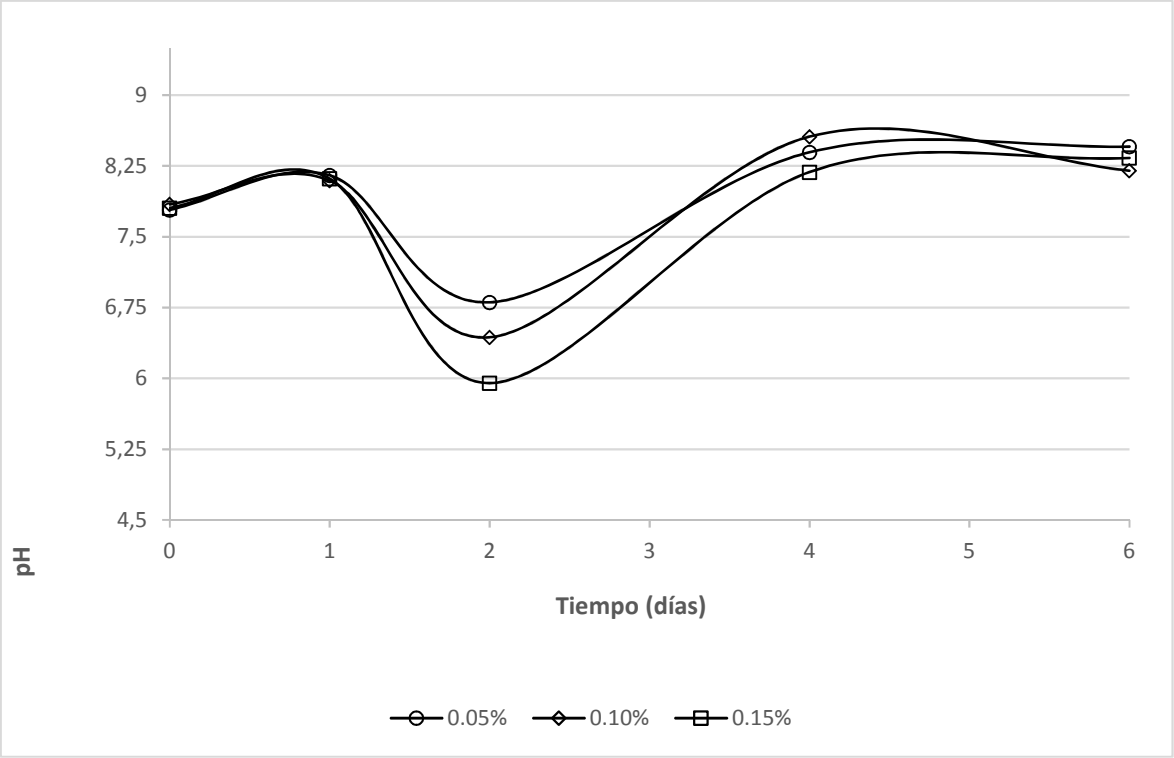


FIG. 6

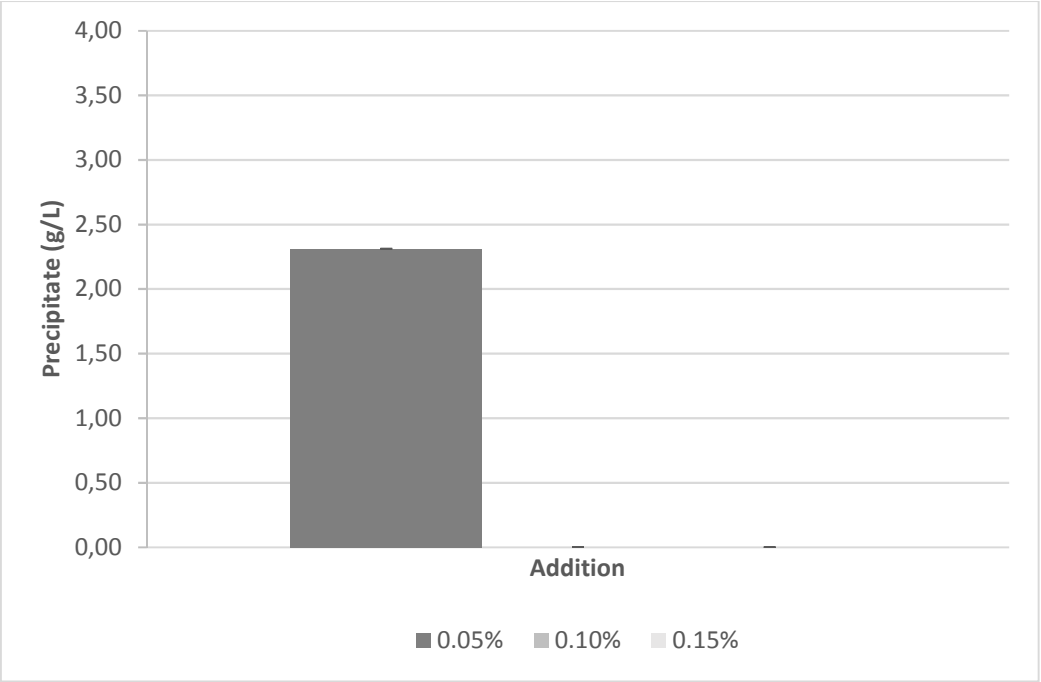


FIG. 7

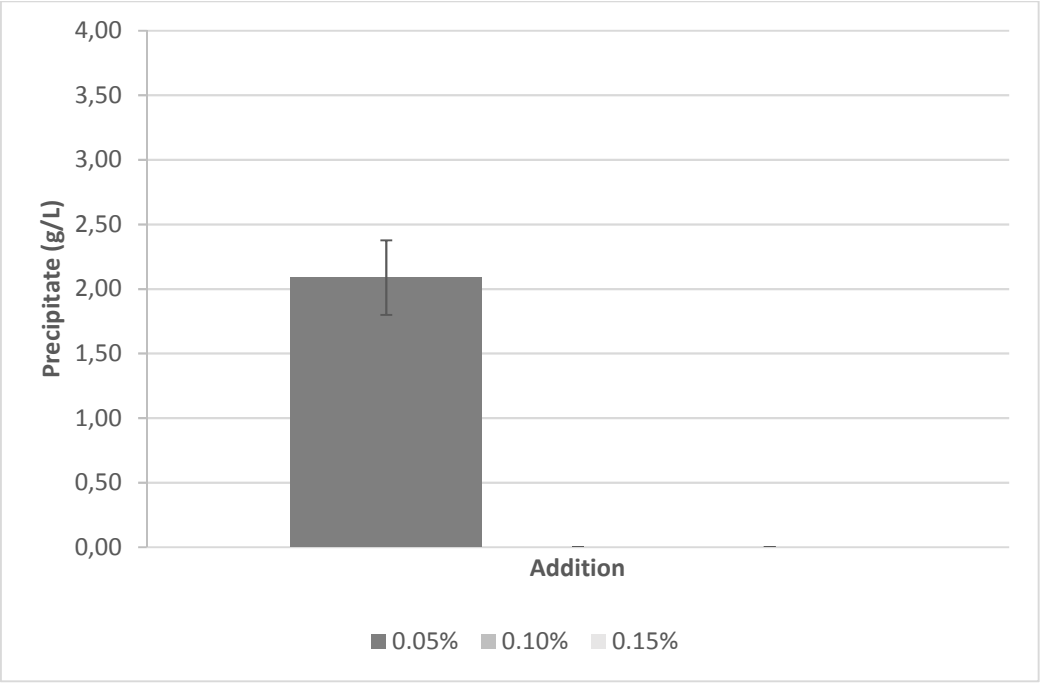


FIG. 8

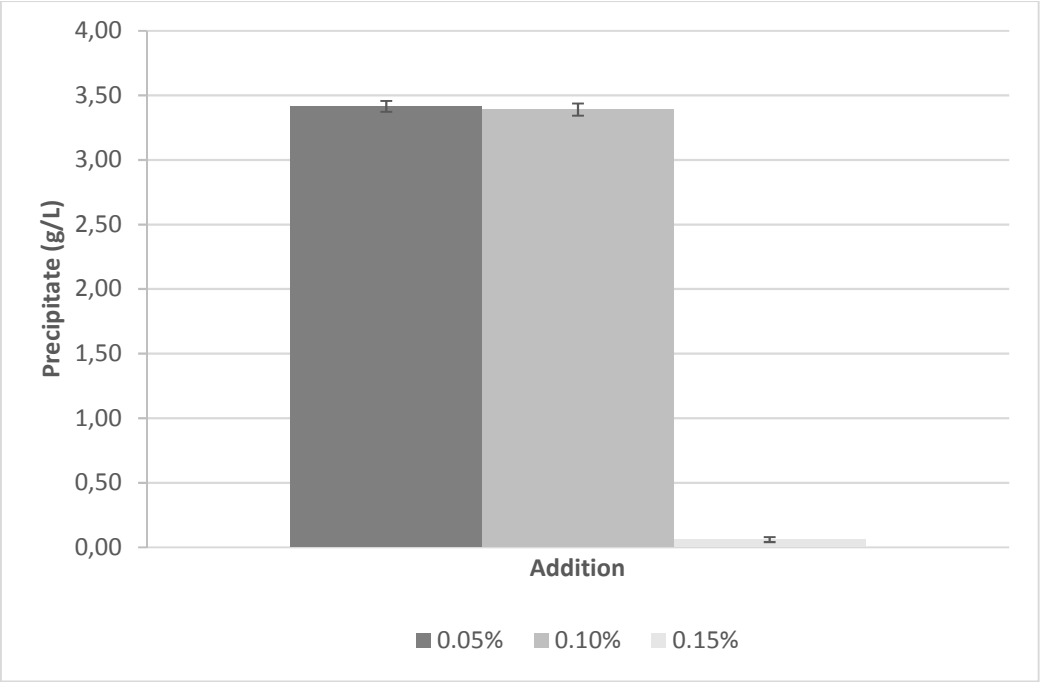


FIG. 9

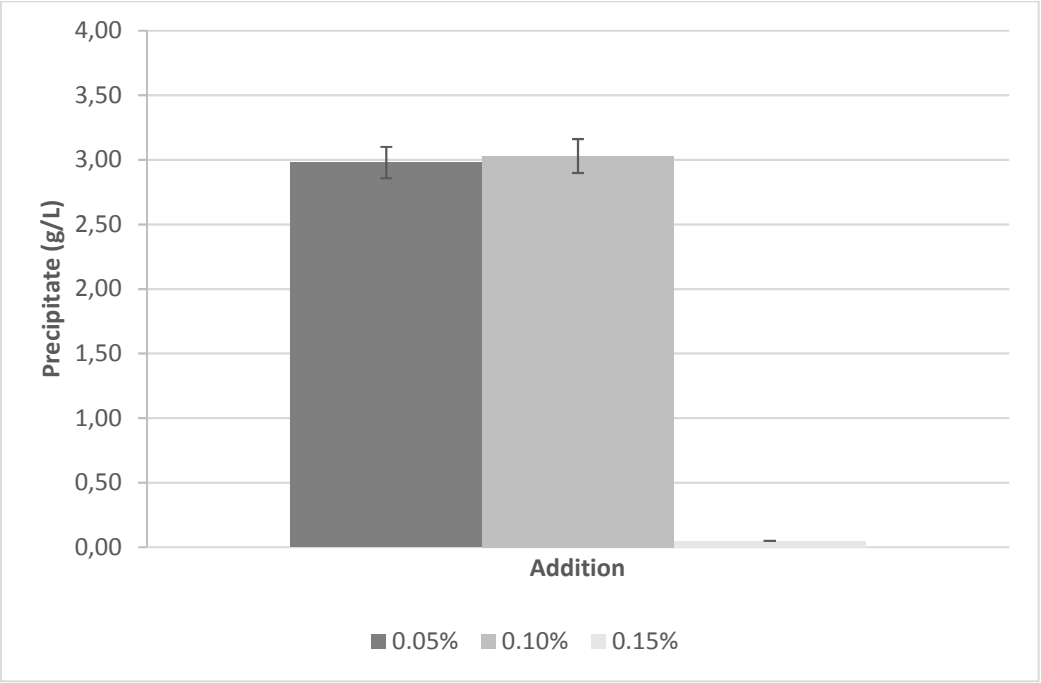


FIG. 10

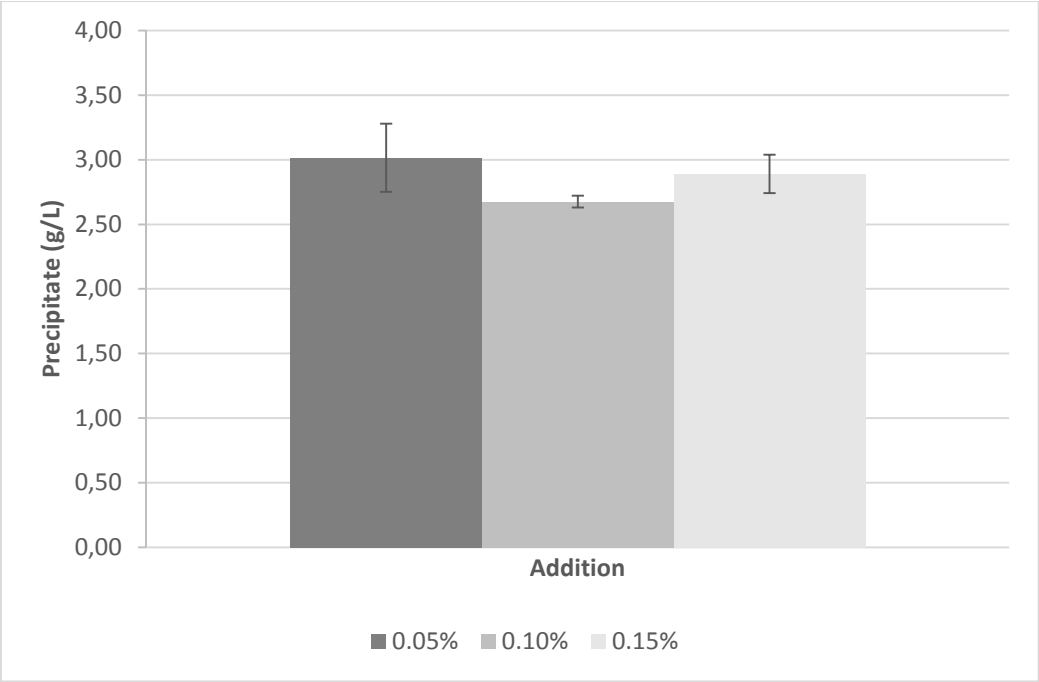


FIG. 11

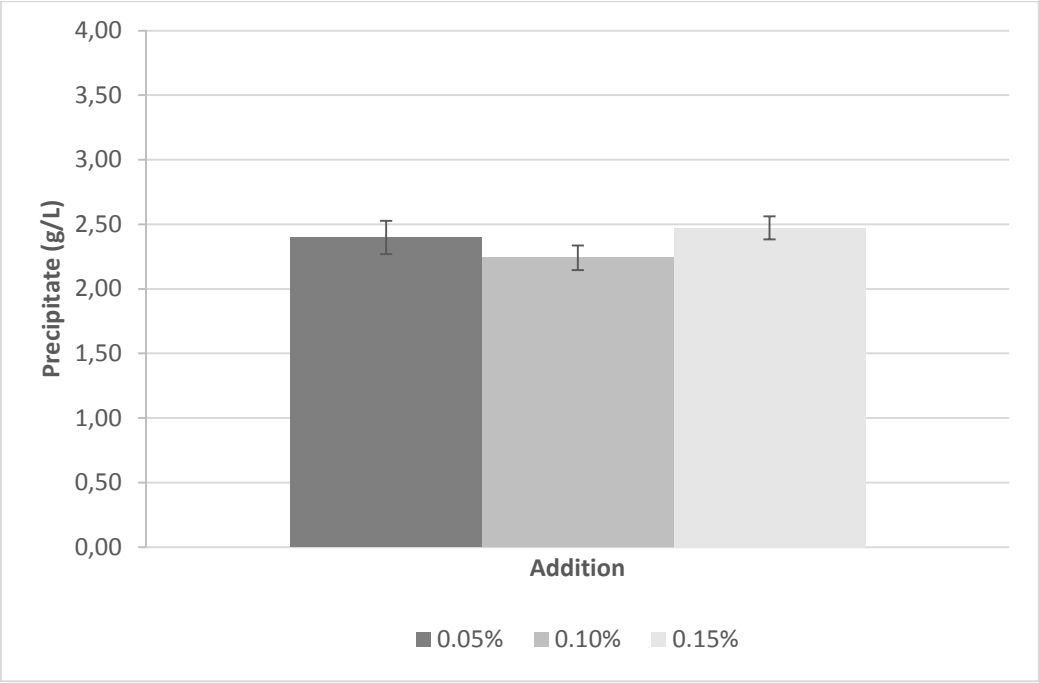


FIG. 12

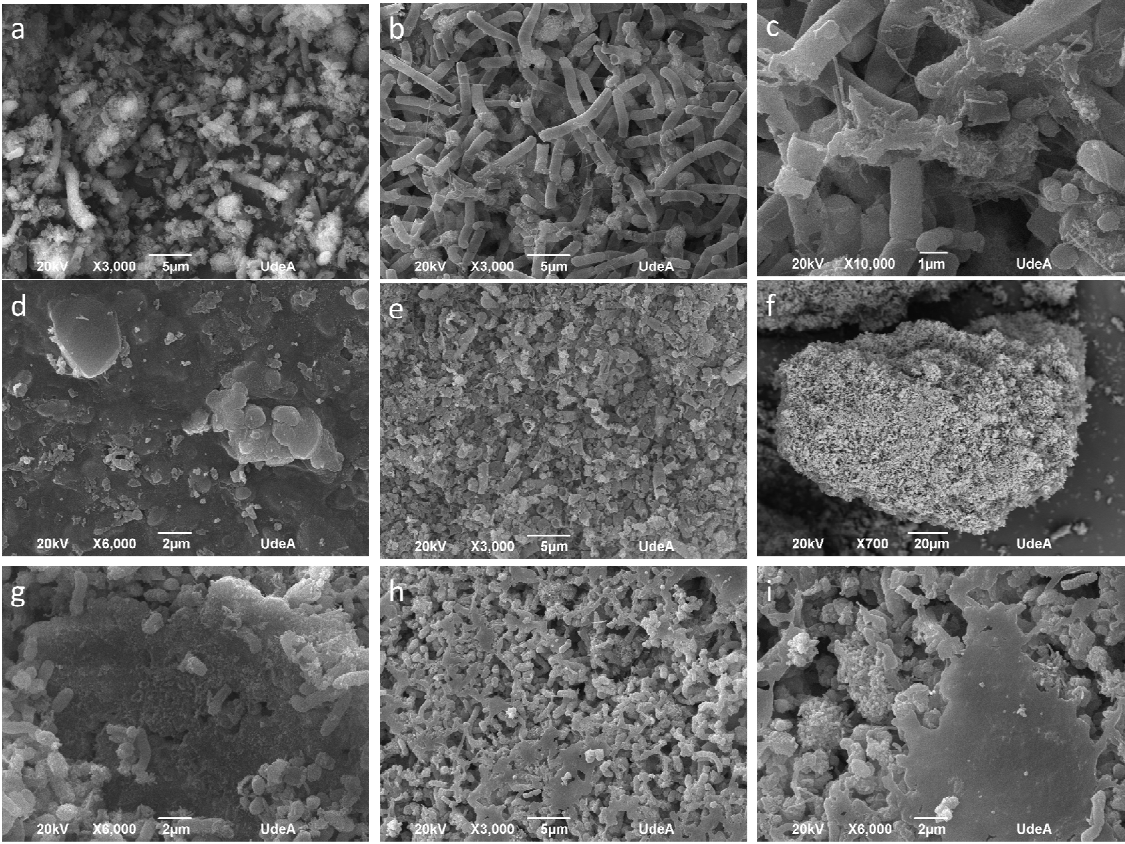


FIG. 13

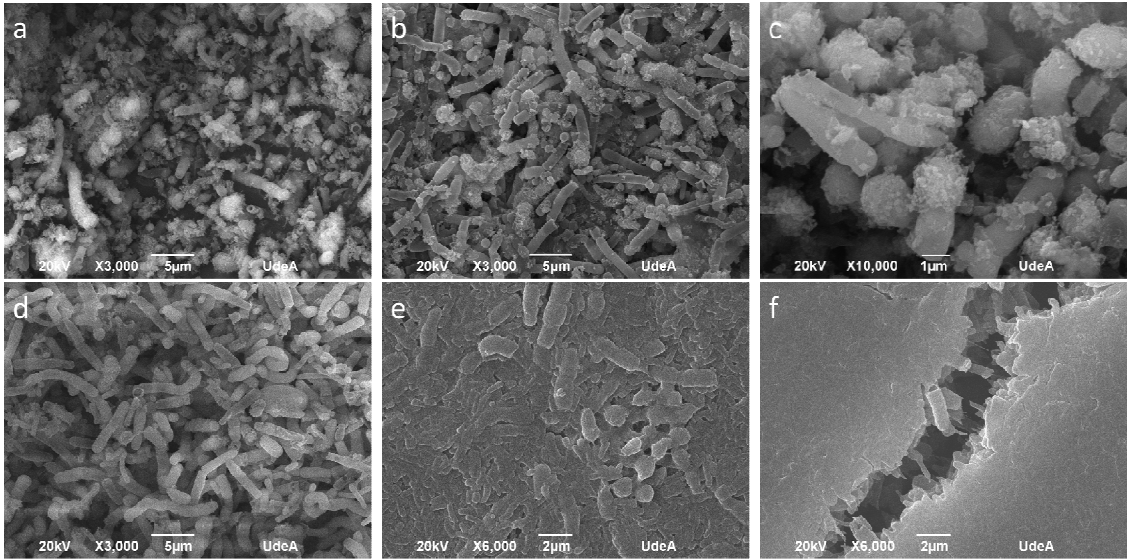


FIG. 14