

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

**"DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA"**

TESIS DE GRADO

LISBETH SOFIA HERNÁNDEZ RUIZ

CARNET 10805-13

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE INGENIERÍA
LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

**"DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA"**

TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA

POR
LISBETH SOFIA HERNÁNDEZ RUIZ

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADA

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, NOVIEMBRE DE 2018
CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.

VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO

VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS

SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

DECANA: MGTR. KAREN GABRIELA MORALES HERRERA DE ZUNIGA

VICEDECANO: MGTR. OSMAN CARRILLO SOTO

SECRETARIA: MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN

DIRECTOR DE CARRERA: DR. MARIO RENE SANTIZO CALDERON

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

LIC. BLANCA CONCEPCIÓN CALLEJAS RIVERA

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ISIS ARACELY LÓPEZ CIFUENTES DE GALVEZ

ING. JOSÉ ANGEL LOPEZ RUANO

ING. KARIM SOFIA PAZ ABDO

Guatemala, 14 de septiembre de 2018

Mgtr. Alejandra Ortíz
Secretaria de Facultad
Facultad de Ingeniería

El motivo de la presente es para informarle que el informe final del Trabajo de Graduación titulado: "**DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARÁCTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA**". De la estudiante **Lisbeth Sofia Hernández Ruiz** quien se identifica con número de carné 1080513. Después de haber revisado el informe final y de acuerdo con los requerimientos establecidos por la Facultad de Ingeniería de la Universidad Rafael Landívar doy como aprobado dicho trabajo.

Sin otro particular, me suscribo de Ud.

Atentamente,



Lic. Blanca Callejas
Asesora



Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado de la estudiante LISBETH SOFIA HERNÁNDEZ RUIZ, Carnet 10805-13 en la carrera LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL, del Campus Central, que consta en el Acta No. 02290-2018 de fecha 6 de noviembre de 2018, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

"DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA"

Previo a conferírsele el título de INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL en el grado académico de LICENCIADA.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 20 días del mes de noviembre del año 2018.



MGTR. MARYA ALEJANDRA ORTIZ PATZAN, SECRETARIA
INGENIERÍA
Universidad Rafael Landívar

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo del presente trabajo de graduación fue encontrar la mejor fuente de carbono entre sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y manitol, con la que se obtuviera una mayor producción de celulosa bacteriana al utilizar bacterias provenientes de la Kombucha. Así como encontrar la concentración ideal de la mejor fuente de carbono y caracterizar la pureza de la celulosa bacteriana obtenida.

El medio utilizado para el cultivo fue el Hestrin Schramm (HS), donde a excepción de la fuente de carbono utilizada, el resto de sus componentes se agregaron en la misma concentración. Las condiciones de cultivo también se mantuvieron iguales para todas las muestras.

Para la fermentación se utilizó un medio líquido, se mantuvo en condición estática en una incubadora a 30°C. Se manejo un tiempo de fermentación de 4 días para todos los experimentos. También se manejaron condiciones estériles para que los resultados obtenidos no fueran afectados por bacterias ajenas a la Kombucha. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

Los resultados obtenidos a partir de la variación de la fuente de carbono indican que se obtuvo un mayor rendimiento de celulosa bacteriana al usar Glucosa como fuente de carbono obteniendo $0.1079 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g de peso seco. Mientras que la peor fuente de carbono fue la Fructosa. Posteriormente se varió la concentración de Glucosa en un rango de 60 a 100 g/L. De donde se obtuvo una mayor producción de celulosa bacteriana al utilizar 60 g/L de glucosa obteniendo $0.0921 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g de peso seco.

DESCRIPTORES: celulosa bacteriana, kombucha, espectroscopía infrarroja, glucosa.

ÍNDICE

1	Introducción	15
1.1	Lo escrito sobre el tema	16
1.2	Resumen crítico del marco teórico	18
1.2.1	Celulosa bacteriana	18
1.2.2	Especies bacterianas	20
1.2.3	Función fisiológica de celulosa bacteriana	20
1.2.4	Formación de capa gelatinosa	21
1.2.5	Estructura de celulosa bacteriana	22
1.2.6	Puentes de hidrógeno en la celulosa	25
1.2.7	Características de la celulosa bacteriana	26
1.2.8	Biosíntesis de celulosa bacteriana	27
1.2.9	Síntesis de precursor de celulosa	28
1.2.10	Formación de microfibrillas	34
1.2.11	Aplicaciones de la celulosa bacteriana	34
1.2.12	Kombucha	36
1.2.13	Fermentación	38
1.2.14	Fermentación en Kombucha	38
1.2.15	Condiciones de cultivo	39
1.2.16	Cultivo agitado y estático	40
1.2.17	Té	40
1.2.18	Composición química del té	41
1.2.19	Medio HS	41
1.2.20	Fuentes de carbono	41
1.2.21	Sacarosa	42
1.2.22	Glucosa	42
1.2.23	Fructosa	42
1.2.24	Maltosa	42
1.2.25	Manitol	43
1.3	Espectroscopía infrarroja	43
1.3.1	Interpretación de espectroscopía vibracional	44
1.3.2	Índice de cristalización	44

1.3.3	Índice de asimetría	45
1.3.4	Energía de puentes de hidrógeno	45
2	Planteamiento del Problema.....	46
2.1	Objetivos	48
2.1.1	Objetivo general	48
2.1.2	Objetivos específicos.....	48
2.2	Hipótesis	48
2.2.1	Hipótesis nula	48
2.2.2	Hipótesis alternativa	48
2.3	Lista de variables	48
2.3.1	Variables independientes	48
2.3.2	Variables dependientes	49
2.4	Definición de variables	49
2.4.1	Variables independientes	49
2.4.2	Variables dependientes	50
2.5	Alcances y límites	51
2.5.1	Alcances.....	51
2.5.2	Límites.....	51
2.6	Aporte	52
3	Método.....	53
3.1	Sujetos y Unidades de análisis	53
3.1.1	Sujetos.....	53
3.1.2	Unidades de análisis	53
3.2	Instrumentos	53
3.2.1	Equipo e instrumentos.....	53
3.2.2	Reactivos utilizados en la metodología	57
3.3	Procedimiento	59
3.3.1	Acondicionamiento de muestra de Kombucha	60
3.3.2	Preparación de muestras del experimento No. 1.....	61
3.3.3	Preparación de muestras del experimento No. 2.....	62
3.3.4	Extracción de celulosa.....	63
3.4	Diseño y metodología estadística	64

3.4.1	Localización.....	64
3.4.2	Diseño experimental.....	64
3.4.3	Descripción de las unidades experimentales.....	65
3.4.4	Variable respuesta.....	65
3.4.5	Metodología de análisis.....	66
4	Presentación y análisis de resultados.....	69
4.1	Variación de fuentes de carbono.....	69
4.2	Variación de glucosa.....	71
4.3	Espectro Infrarrojo de la Celulosa Bacteriana.....	73
5	Discusión de resultados.....	75
5.1	Rendimiento según fuente de carbono utilizada.....	75
5.2	Efecto de concentración en rendimiento.....	78
5.3	Espectroscopía infrarroja.....	79
6	Conclusiones.....	81
7	Recomendaciones.....	82
8	Referencias.....	83
9	Anexos.....	91
9.1	Abreviaturas.....	91
9.2	Glosario.....	93
9.3	Procedimiento.....	97
9.4	Datos obtenidos.....	102
9.4.1	Experimento No. 1.....	102
9.4.2	Experimento No. 2.....	102
9.5	Cálculos.....	103
9.5.1	Cálculos resultados.....	103
9.5.2	Calculo propagación de error.....	105
9.6	Espectro de celulosa 20 micrones.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Productores de celulosa bacteriana.	20
TABLA 2. Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana.	36
TABLA 3. Instrumentos y equipo utilizado.	53
TABLA 4. Composición del medio HS.	57
TABLA 5. Composición de fuentes de carbono utilizadas en medio HS.	57
TABLA 6. Cantidad de reactivos utilizados en el experimento No. 1.	57
TABLA 7. Variación de concentración de glucosa en medio HS.	58
TABLA 8. Cantidad de reactivos utilizados en el experimento No. 2.	58
TABLA 9. Experimentos realizados y su variable respuesta.	65
TABLA 10. Cantidad de CB producida según fuente de carbono y su rendimiento.	69
TABLA 11. Análisis de ANOVA para el experimento No. 1.	70
TABLA 12. Cantidad de CB producida según cantidad de glucosa utilizada y su rendimiento.	71
TABLA 13. Análisis de ANOVA para el experimento No. 2.	72
TABLA 14. Comparación de picos del espectro experimental con el teórico.	74
TABLA 15. Índices de cristalinidad y energía de puentes de hidrógeno de la celulosa bacteriana obtenida.	74
TABLA 16. Imágenes por paso del procedimiento y de resultados obtenidos.	97
TABLA 17. Datos obtenidos durante el experimento No. 1.	102
TABLA 18. Datos obtenidos durante el experimento No. 2.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Micrografía electrónica de barrido de celulosa bacteriana y célula de <i>Acetobacter xylinum</i> KJ-1.....	21
FIGURA 2. Una micrografía de barrido de superficie liofilizada de gel de celulosa bacteriana.	22
FIGURA 3. Formas aloformas de la celulosa.....	23
FIGURA 4. Diferencia entre celulosa I y celulosa II.	23
FIGURA 5. Distinción entre la celulosa I α y I β	24
FIGURA 6. Modelo esquemática de microfibrillas de celulosa bacteriana en comparación con una “micela con flecos”.....	24
FIGURA 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de membrana de celulosa bacteriana en cultivo estático (a) y célula bacterial con cintas de celulosa adheridas. .	25
FIGURA 8. (a) Estructura molecular del polímero de celulosa, (b) Patrón de puentes de hidrógeno para la celulosa I.	26
FIGURA 9. Puentes de hidrógeno inter-cadena (a) e intra-cadena (b) en la celulosa. .	26
FIGURA 10. Ilustración esquemática de la biogénesis de celulosa bacteriana y formación de microfibrilla.	27
FIGURA 11. Vías del metabolismo del carbono en <i>Acetobacter xylinum</i>	29
FIGURA 12. Ruta convencional de la pentosa fosfato.	30
FIGURA 13. Ciclo de Krebs.	31
FIGURA 14. Proceso de glucólisis. Las enzimas que catalizan las reacciones son las siguientes: 1. Hexoquinasa; 2. Fosforilasa; 3. Fosfoglucomutasa; 4. Fosfoglucosa isomerasa; 5. PFK; 6. ALD; 7. Triosa fosfato isomerasa; 8. NAD-dependiente GAPDH; 9. 3-PGA quinasa; 10. Fosfogliceromutasa; 11. Enolasa; 12. Piroquinasa.	32
FIGURA 15. Las cinco reacciones reversibles del sistema PTS.....	33
FIGURA 16. Agrupaciones de levaduras en una matriz de bacterias del ácido acético y celulosa.	37
FIGURA 17. Imagen de (a) superficie y (b) transversal de una membrana de celulosa bacteriana obtenida por cultivo estático.	40

FIGURA 18. Regiones del espectro vibracional fundamental con ciertas frecuencias de grupos característicos. 43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Comparación de CB húmeda producida por fuente de carbono.	69
GRÁFICA 2. Cantidad de CB seca producida según fuente de carbono.	70
GRÁFICA 3. Comparación de CB húmeda producida y cantidad de carbón consumida.	71
GRÁFICA 4. Cantidad de CB seca producida por concentración de glucosa.	72
GRÁFICA 5. Espectro infrarrojo de la Celulosa Bacteriana obtenida mostrando Transmitancia vs. Frecuencia.	73
GRÁFICA 6. Espectro teórico Infrarrojo y de Raman para la celulosa.....	74
GRÁFICA 7. Espectro teórico de celulosa 20 micrones.....	107

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1. Procedimiento general.....	59
DIAGRAMA 2. Procedimiento de acondicionamiento de Kombucha.....	60
DIAGRAMA 3. Procedimiento para el experimento No. 1.....	61
DIAGRAMA 4. Procedimiento para el experimento No. 2.....	62
DIAGRAMA 5. Procedimiento de la extracción y purificación de celulosa.....	63
DIAGRAMA 6. Esquematización del experimento No. 1.	64
DIAGRAMA 7. Esquematización del experimento No. 2.	65

1 INTRODUCCIÓN

La celulosa bacteriana es un polímero que tiene múltiples aplicaciones debido a su pureza, alto grado de cristalinidad, y que es no tóxica, no alergénica, y biocompatible. Pero no se ha expandido su uso debido a que actualmente el proceso de producción de celulosa bacteriana es altamente ineficiente. Por lo que en los estudios recientes sobre la celulosa se han concentrado en encontrar las condiciones de fermentación óptimas para su producción (Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012).

Las investigaciones realizadas se han enfocado en encontrar una especie capaz de producir una alta cantidad de celulosa, estudiar los efectos de los posibles nutrientes en el medio y las condiciones de cultivo, así como estudiar el mecanismo de síntesis de celulosa para lograr modificarlo y conseguir una síntesis más rápida (Ross, Mayer, & Benziman, 1991).

De los múltiples estudios realizados sobre la celulosa bacteriana, solo una minúscula parte se ha dedicado a estudiar la producción de celulosa por microorganismos presentes en la Kombucha. La Kombucha es una bebida producida por la fermentación de té con azúcar por una asociación simbiótica de bacterias y levaduras, donde de la gran cantidad de bacterias presentes se ha encontrado que algunas de ellas son productoras de celulosa. Especialmente se ha encontrado, que estas bacterias productoras de celulosa provenientes de la Kombucha presentan características distintas a las mismas bacterias cuando provienen de otras fuentes como frutas (Nguyen, Flanagan, Gidley, & Dykes, 2008).

Por lo que en este estudio se buscó conseguir la mayor producción de celulosa bacteriana en el medio Hestrin Schramm al variar cinco fuentes de carbono que fueron sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y manitol. El medio fue inoculado con un 10% de Kombucha que contiene las bacterias productoras de celulosa.

Para el estudio se aprovecharon resultados encontrados por otras investigaciones con bacterias provenientes de la Kombucha, como el efecto de los tamaños de recipiente para el cultivo, ya que esto afecta la cantidad de celulosa producida en la superficie del medio, qué un cultivo estático es preferible a uno agitado, y que las bacterias provenientes de la Kombucha prefieren un pH menor al usualmente usado para la producción de celulosa (Goh, y otros, 2012).

Se utilizó el medio Hestrin Schramm en lugar de té verde o negro debido a que investigaciones previas muestran que con él se produce una mayor cantidad de celulosa bacteriana al usar bacterias provenientes de la Kombucha (Nguyen, Flanagan, Gidley, & Dykes, 2008).

De todas las posibles fuentes de carbono que se puede utilizar para la producción de celulosa bacteriana algunas de las más comunes son sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, y manitol. Por lo que estas se escogieron debido a su fácil disponibilidad y que

en otros estudios de bacterias productoras de celulosa bacteriana han demostrado buenos resultados (Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012).

Para obtener una mayor diversidad de microorganismos, el inóculo fue una mezcla de cinco variedades de Kombucha. Esto se debe a que distintos nutrientes y condiciones de cultivo resultan en una variedad distinta de bacterias y levaduras (Dufresne & Farnworth, 2000).

Este estudio aporta información de cómo obtener una mayor producción de celulosa bacteriana. Que se puede aprovechar en una gran cantidad de industrias y que puede presentar una alternativa a toda la celulosa bacteriana desperdiciada en la producción de Kombucha alrededor del mundo (Vandamme, De Baets, Vanbalaen, Joris, & De Wulf, 1998).

1.1 LO ESCRITO SOBRE EL TEMA

Actualmente no se han realizado estudios en Guatemala sobre la Kombucha ni sobre la producción de celulosa bacteriana. La mayoría de los estudios microbiológicos realizados internacionalmente de la Kombucha hasta el momento han sido enfocados a la producción de celulosa en conjunto por todas las bacterias presentes en la solución. Esto se debe a que ciertas especies pueden ser difíciles de aislar y la dependencia exclusiva en rasgos fenotípicos puede conllevar su mala identificación (Raspor & Goranovic, 2008).

Adicionalmente, estudios sobre el cultivo tienden a ser de pequeña escala y por consiguiente solo se investiga una pequeña cantidad de las posibles bacterias que se pueden presentar. La mayoría de los estudios sobre producción de celulosa mencionados a continuación se limitan al uso de cepas productoras de celulosa procedentes de ciertos frutos.

Hestrin y Schramm (1954), realizaron uno de los primeros trabajos sobre producción de celulosa bacteriana, empleando *Acetobacter xylinum* en cultivo estático. En ese estudio se encontró que la producción de celulosa se realiza en función del suministro de oxígeno, tanto para cultivo estático como agitado, pues bajo una atmósfera de nitrógeno no hubo producción significativa, mientras que la producción óptima se encontró utilizando aire enriquecido.

Posteriormente Hestrin y Schramm (1954), desarrollaron un medio compuesto por: glucosa 2 % (p/v), peptona 0.5 %, extracto de levadura 0.5 %, fosfato disódico 0.27 % y ácido cítrico 0.115 % a pH 6.0; este medio se conoce como HS y es uno de los más utilizados en estudios de producción de celulosa bacteriana. Esto se debe a que es fácil intercambiar la fuente de carbono y la de nitrógeno por la deseada, así como evaluar la producción de celulosa al cambiar la concentración de solo uno de los compuestos.

El-Salam (2004) logró aislar bacterias de la familia *Acetobacteraceae*, de la Kombucha, que son las únicas bacterias que se han podido aislar, pero especies de

Gluconacetobacter y *Lactobacillus* también han sido identificadas (Trovatti, Serafim, Freire, Silvestre, & Neto, 2011). Las cepas más importantes de estos géneros son aquellas que producen celulosa bacteriana, como *Komagataeibacter xylinus*, que fue recientemente clasificada como *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada, Hoshino, & Ishikawa, 1997) (también previamente conocida como *Acetobacter xylinum*) y es considerada como una de las bacterias con mayor producción de celulosa y es la más estudiada (Mikkelsen, Flanagan, Dykes, & Gidley, 2009).

Mayser et al. (1995) encontraron que la población de levaduras es más variada en su composición. Levaduras identificadas incluyen especies del género *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hansesiaspora*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces* y *Saccharomycoides* (Chen & Liu, 2000). El rol de las levaduras en la fermentación de la Kombucha es convertir la sacarosa en ácidos orgánicos, dióxido de carbono y etanol, siendo el último utilizado después por bacterias del ácido acético para formar acetaldehído y ácido acético. Bacterias del ácido acético también usan glucosa derivada de la levadura para sintetizar celulosa bacteriana y ácido glucónico (Dufresne & Farnworth, 2000).

Goh et al. (2012), estudio factores que afectan el rendimiento de celulosa bacteriana producida en la Kombucha. Donde encontró que el mayor rendimiento de celulosa se encontró al usar una concentración de sacarosa de 90 g/L. Demostró que, a diferencia de otras bacterias, las provenientes de la Kombucha son capaces de crecer y producir celulosa a un pH menor a 3. La cantidad de bacterias y levaduras generalmente es 10^4 - 10^6 ufc por ml de kombucha después de 10 días de fermentación, con las levaduras ligeramente superando el número de bacterias. Los conteos microbianos son mayores en el líquido que en la película de celulosa.

También demostró que el grosor y cantidad de celulosa bacteriana obtenida aumenta con el tiempo de fermentación, donde la producción de celulosa termina cuando han transcurrido dos semanas o hasta haber consumidos todos los nutrientes. La producción de celulosa bacteriana incrementa correspondientemente con mayor área superficial y profundidad.

Mientras que Nguyen et al. (2008), investigaron los efectos del uso de varias fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento de celulosa producida por la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* procedente de la Kombucha, que debido a su origen muestra mayor rendimiento en un cultivo estático que en uno agitado. La combinación con la que se obtuvo un mayor rendimiento de celulosa fue con 20 g/L de manitol y 40 g/L de licor de maíz fermentado.

Dudman (1959), presentó un estudio acerca del efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulosa empleando como microorganismo *Acetobacter acetigenum* y encontró que el uso de glicerol como fuente de carbono aumenta la producción de celulosa en un 40 %, comparado con glucosa y fructosa.

Para las fuentes de carbono complejas, este mismo autor muestra cómo al utilizar melaza hidrolizada se obtienen producciones hasta 88 % superiores a las alcanzadas en medios con glucosa como fuente de carbono. El aumento en la producción se atribuye a que el uso de glucosa como única fuente de carbono promueve la producción por parte del microorganismo de ácido (ceto) glucónico, lo que no beneficia la producción de celulosa puesto que este ácido no sólo disminuye la cantidad de glucosa disponible para su polimerización, sino que conduce a niveles de pH que afectan la viabilidad celular.

Hong y Qiu (2008) emplearon harina de konjac hidrolizada con hidróxido de calcio y como microorganismo *Acetobacter aceti subsp. xylinus* ATCC 23770 y encontraron que la producción de celulosa fue tres veces mayor que al emplear glucosa como fuente de carbono. Donde el uso de la una fuente de carbono compleja reduce los costos de producción asociados a la procuración de la fuente de carbono.

Kurosumi et al. (2009) compararon el uso de diversos jugos de fruta (naranja, piña, manzana, pera japonesa y uva) como fuente de carbono en un medio H-S modificado con éstos (medio I), con el medio H-S suplementado con glucosa, sacarosa y fructosa ajustados en la proporción en que se encuentran en los respectivos jugos de fruta (medio II), y con un medio compuesto por el jugo de fruta al que solamente se le ajustó el pH inicial (medio III). El microorganismo fue *Acetobacter xylinum*. La mayor producción de celulosa se obtuvo con el medio I para todos los jugos de fruta empleados, lo que, según los autores, se debe a la presencia de las fuentes de nitrógeno propias del medio HS y a algunos compuestos adicionales presentes en las frutas que favorecen el crecimiento del microorganismo y la producción de celulosa.

Naritomi et al. (1998), buscaron incrementar la producción de celulosa al estudiar el efecto de la adición de algunos cosustratos como CO₂, etanol y ácidos orgánicos en un medio con *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* BPR3001A. Los resultados muestran que la adición de etanol y lactato al medio de cultivo incrementa la producción de celulosa en 16 % y 22 % respectivamente. Por el contrario, se observó que la adición de CO₂ inhibe el crecimiento del microorganismo y por ello disminuye la producción de celulosa. (Hestrin & Schramm, 1954)

1.2 RESUMEN CRÍTICO DEL MARCO TEÓRICO

1.2.1 Celulosa bacteriana

Mientras “celulosa” es una palabra que fue dada en los inicios del último siglo por Anselme Payen, a la sustancia que constituye la pared celular de las plantas, la celulosa bacteriana (CB) es un producto extracelular de las bacterias del ácido acético que fue descrita por Louis Pasteur como “una forma de piel húmeda, voluminosa, gelatinosa, y resbalosa...” (Ring, 1982). Aunque la porción sólida en la masa gelatinosa es menos que uno por ciento, es casi celulosa pura que no contiene lignina.

La celulosa es la molécula natural de mayor abundancia y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros de la tierra (Jonas & Farah, 1998). Anualmente se

producen 1011 a 1012 toneladas a partir de fuentes de origen vegetal. Actualmente, la celulosa puede obtenerse de diversas fuentes:

- De origen vegetal, procedente de plantas leñosas. Donde el contenido de celulosa en la madera es de 40 a 50% (Pettersen, 1984).
- De organismos de diferentes reinos: Fungi (*Dictyostelium*), Monera (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*), Animal (*Tunicidae*).
- Por síntesis enzimáticas *in vitro*
- Síntesis química *in vitro* a partir de derivados de glucosa bencilados.

La síntesis *in vitro* mediante reacción química permite la obtención de cantidades mínimas de polímero, su perfeccionamiento puede llevarla a ser una alternativa a la celulosa vegetal. La celulosa bacteriana (CB) por su pureza y estructura cristalina destaca como fuente alterna a la de origen vegetal.

La celulosa es un polímero que representa el principal componente de la pared celular de las plantas, y varios organismos pertenecientes a diferentes reinos son capaces de sintetizarla. La producción de CB en el reino Monera está diversificada, la síntesis se observa en especies dentro de los géneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea* y *Gluconacetobacter*, a este último pertenece *G. xylinum*, la especie con mayor capacidad productora. Esta bacteria es el arquetipo para el estudio de biogénesis de CB, ya que el producto es de alta pureza y de estructura similar a la de origen vegetal (Chávez-Pacheco, Martínez-Yee, Contreras-Zentella, & Escamilla-Marván, 2004).

De acuerdo con Brown (1986), la película de celulosa bacteriana es “muy fuerte, especialmente si se realizaba un intento para rasgarla a través de su plano de crecimiento”. A mediados de 1980 se realizaron las primeras mediciones de tensión-deformación. Los modelos de Young resultaron en 16-18 GPa isotrópicamente a través de la superficie del plano, que es extraordinariamente alto para un material bidimensional de una sustancia orgánica, y su medición mejoró a 30 GPa. Actualmente para sus formas cristalinas puras, la Celulosa I tiene 138 GPa, la Celulosa II tiene 88 GPa, la Celulosa III_I tiene 87 GPa, y la Celulosa III_{II} tiene 58 GPa.

La celulosa es una materia prima de múltiples propósitos: es material de construcción, generación de fibras textiles y fabricación de papel, además, sus derivados (ésteres, acetatos, nitratos) están implicados en diversos procesos industriales.

Debido a su alto grado de cristalinidad, pureza, conformación reticulada y estructura tridimensional, la celulosa bacteriana es atractiva en diversas aplicaciones más especializadas, especialmente en el área de salud esto debido a que una vez purificada, la celulosa bacteriana es no tóxica, no alergénica, y biocompatible (Vandamme, De Baets, Vanbalaen, Joris, & De Wulf, 1998).

1.2.2 Especies bacterianas

La celulosa bacteriana es producida por bacterias de diversos géneros, de donde las cepas *Acetobacter* son las mejor conocidas. Las bacterias del género *Acetobacter* producen celulosa a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol (Keshk & Sameshima, 2005).

Las bacterias del ácido acético se pueden obtener de bebidas fermentadas, o en la naturaleza se encuentran en frutas o vegetales en descomposición (Jesus, Andres, & Magno, 1971).

La razón por la que los microorganismos generan celulosa ha sido cuestionada repetidamente por biólogos. Algunos consideran que las bacterias aeróbicas producen una película para mantener una posición cercana a la superficie de la solución (Hestrin & Schramm, 1954) (Valla & Kjosbakken, 1982). Otros asumen que las bacterias generan celulosa para protegerse de la luz ultravioleta (Williams & Cannon, 1989). Y otra teoría propone que las bacterias producen una capa para protegerse a sí mismas de enemigos o iones de metales pesados, mientras que los nutrientes pueden ser proveídos fácilmente por medio de difusión.

TABLA 1. Productores de celulosa bacteriana.

Género	Estructura de Celulosa
<i>Acetobacter</i>	Película extracelular compuesta de cintas
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas cortas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas
<i>Pseudomonas</i>	Fibrillas no distinguibles
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas cortas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No bien definida

Fuente: Jonas & Farah (1998).

1.2.3 Función fisiológica de celulosa bacteriana

Las bacterias productoras de celulosa se distinguen porque el polímero producido se encuentra en forma de agregado extracelular. En hábitat natural, muchos microorganismos sintetizan polisacáridos extracelulares que envuelven las células, y la celulosa bacteriana es un ejemplo de este polisacárido. Dependiendo de la especie *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *A. xylinum* o *Sarcina ventriculi*, la celulosa facilita la adhesión celular en interacciones simbióticas o confiere protección mecánica, química y biológica dentro del hábitat natural. En el caso de la Kombucha, las células productoras son atrapadas en la red del polímero, que mantiene la población en la interfase aire-líquido (Ross, Mayer, & Benziman, 1991).

La matriz polimérica facilita el suministro de nutrientes a la célula, ya que estos se concentran mejor debido a las propiedades de adsorción con las que cuenta la estructura

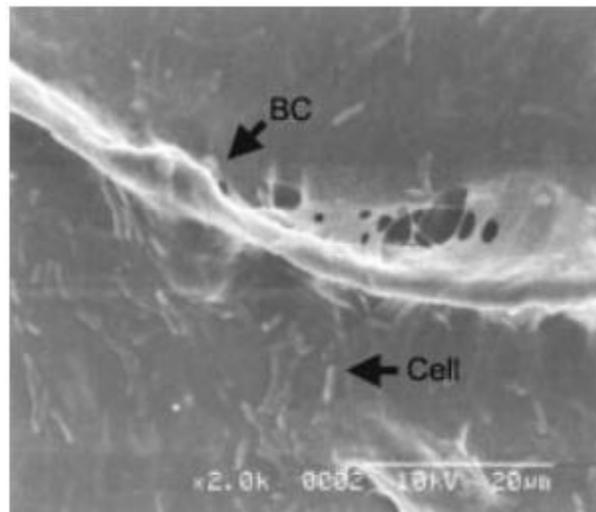
de celulosa, así la matriz polimérica genera condiciones más favorables para el microorganismo que el medio acuoso. Así la celulosa se produce en forma de película en la interfase aire/líquido, y la celulosa provee una matriz superficial firme donde los microorganismos aerobios estrictos puedan estar cerca de la fase gaseosa o pueden almacenar su alimento (Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska, 2005).

1.2.4 Formación de capa gelatinosa

El mecanismo de formación de gel fue determinado como se describe a continuación. En la fase inicial, las bacterias incrementan su población al tomar el oxígeno disuelto y producen una cierta cantidad de celulosa en toda la fase líquida como se puede observar con la apariencia de una turbidez en el medio. Cuando se utiliza todo el oxígeno disuelto, solo las bacterias cercanas a la superficie pueden mantener su actividad para producir celulosa.

Aunque estas bacterias pueden llevar a cabo división celular, la población en la región superficial no incrementa exponencialmente, pero debería alcanzar un número de equilibrio, mientras que el resto de las bacterias en el líquido se adhieren al gel y se mueven al fondo del recipiente. Estas bacterias bajo las superficies no están “muertas” sino están en un estado de “hibernación”, por lo que se pueden reactivar y usarse como inoculación para una nueva operación de cultivo (Yamanaka, y otros, 1989) (Iguchi & Yamanaka, 1997).

FIGURA 1. Micrografía electrónica de barrido de celulosa bacteriana y célula de *Acetobacter xylinum* KJ-1



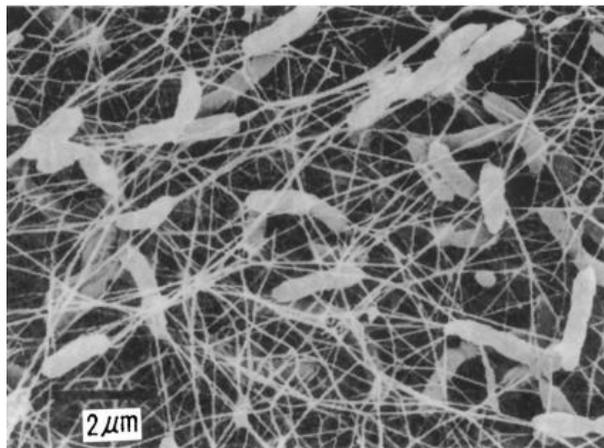
Fuente: Changjin, Chung, Lee, & Kim (2002).

Respecto a la formación de gel en condiciones estáticas, es una tendencia generalmente observada que el grosor, así como el rendimiento de celulosa incrementa súbitamente, después de unos días del período de inducción, hasta que el ritmo tiende a disminuir después de una semana o diez días.

1.2.5 Estructura de celulosa bacteriana

El polímero está conformado de residuos de glucosa unidos por un enlace covalente entre el carbono 1 y el 4 (β_{1-4}) formando una cadena lineal. Su estructura está formada por 2000 a 14000 unidades de β -(1,4) glucosa en cadenas no ramificadas. Las cadenas lineales del polímero se asocian (cristalizan) por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. La celulosa es un biopolímero insoluble en agua que posee regiones con un alto ordenamiento (cristalinas), y otras donde el grado de ordenamiento es bajo.

FIGURA 2. Una micrografía de barrido de superficie liofilizada de gel de celulosa bacteriana.



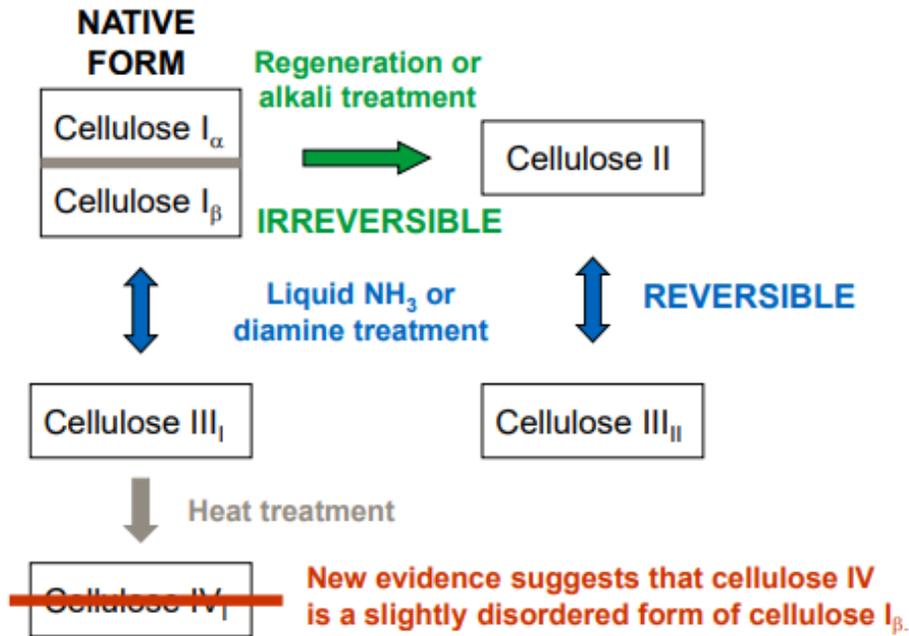
Fuente: Frants & Schiebold (1943).

Después del advenimiento del microscopio electrónico, se reveló que el gel celulósico húmedo formado por las bacterias estaba compuesto de una asamblea al azar de cadenas que forman una estructura denominada “microfibrilla” con un diámetro menor de 100 Å (Frants & Schiebold, 1943).

Las microfibrillas tienen polaridad unidireccional y son de grosor variable. El mecanismo de cristalización da origen a dos aloformas de celulosa, si las microfibrillas se orientan en forma paralela se sintetiza celulosa I, mientras que si el arreglo es antiparalelo se obtiene celulosa II. La aloforma predominante en la naturaleza es la celulosa I, y bajo tratamiento químico a partir de la celulosa I o II (por mercerización industrial) se forma la celulosa III y IV que se diferencian por su estructura cristalina. Estas formas dan lugar al polimorfismo de la celulosa (O'Sullivan, 1997) (Akerholm, Hinterstoisser, & Salmén, 2004).

La celulosa II se forma al disolver la celulosa o por regeneración, o al sumergirla en una solución alcalina concentrada (> 10% NaOH). Su textura parecida a la seda significa que es utilizada en la industria textil. Cuando la celulosa cambia de celulosa I a celulosa II, su estructura pasa de ser paralela a antiparalela. Esto sucede cuando el NaOH humedece los cristales y las cadenas de celulosa se reacomodan ya que un arreglo antiparalelo es más favorable termodinámicamente a un arreglo paralelo (Kontturi, 2015).

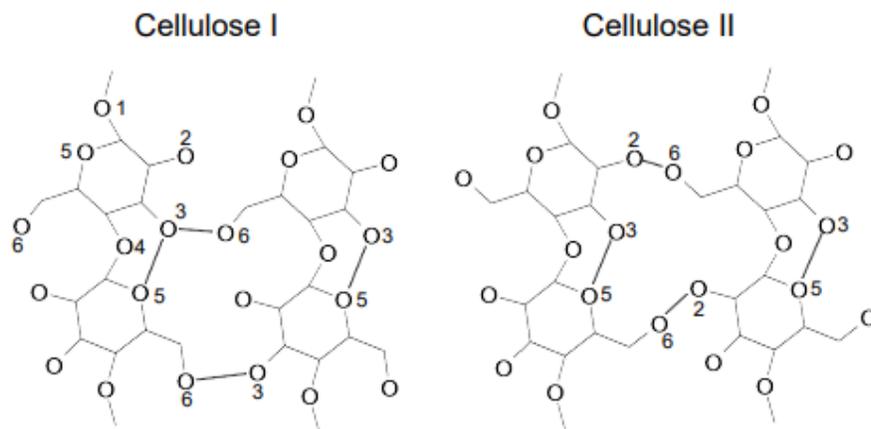
FIGURA 3. Formas aloformas de la celulosa.



Fuente: Kontturi (2015).

Con la emergencia de la difracción de rayos X al inicio del siglo, se observó que la celulosa bacteriana corresponde cristalográficamente a la celulosa I, que es común con la celulosa de origen vegetal, en donde dos unidades celobiosas están ordenadas paralelamente en la unidad celular, y que las moléculas de celulosa tienden a cambiar su orientación plana durante el proceso de secado (Mark & Susich, 1929).

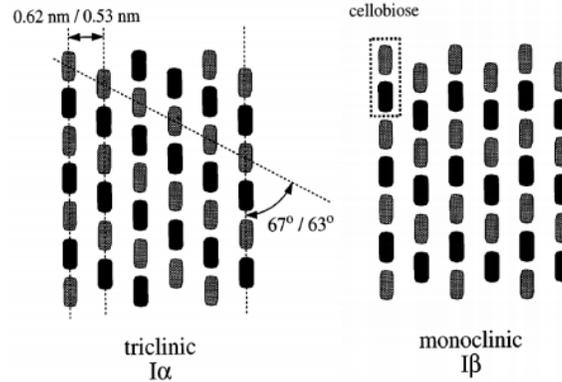
FIGURA 4. Diferencia entre celulosa I y celulosa II.



Hydrogen bonding patterns are different.

Fuente: Kontturi (2015).

FIGURA 5. Distinción entre la celulosa I_α y I_β .

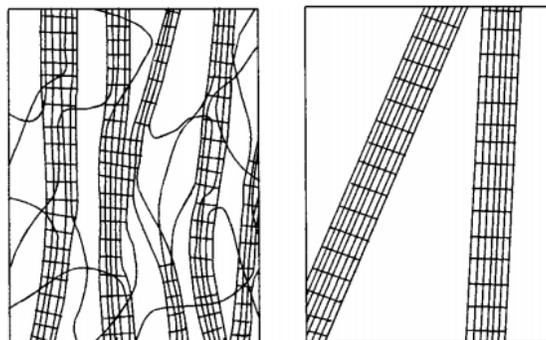


Fuente: Baker, Helbert, Sugiyama, & Miles (1997).

La celulosa bacteriana se distingue por su alto grado de cristalinidad (mayor a 60%) y sus cristales están compuestos de celulosa tipo I_α y I_β , y la relación de estas dos formas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura). Aunque la producción de celulosa bacteriana tipo I_α es predominante.

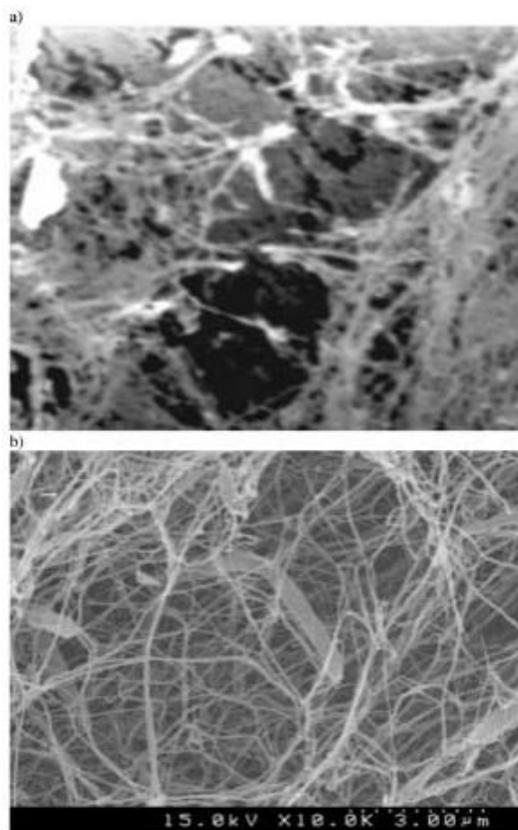
La celulosa de las paredes celulares tiene una estructura más complicada. La estructura de la microfibrilla es tan simple como la mostrada en el lado derecho de la Figura 5, comparada a la “micela con flecos” concebida anteriormente para la textura de fibras vegetales. La celulosa es uno de los mejores ejemplos en la naturaleza en donde moléculas de cadena larga están alineadas paralelamente en su forma extendida. Esta es una estructura idealizada en la producción de seda artificial y que se ha tratado de simular en las últimas décadas con el objetivo de desarrollar fibras super-fuertes y cristales de cadena extendida (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000).

FIGURA 6. Modelo esquemática de microfibrillas de celulosa bacteriana en comparación con una “micela con flecos”.



Fuente: Iguchi, Yamanaka, & Budhiono (2000).

FIGURA 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de membrana de celulosa bacteriana en cultivo estático (a) y célula bacterial con cintas de celulosa adheridas.



Fuente: Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska (2005).

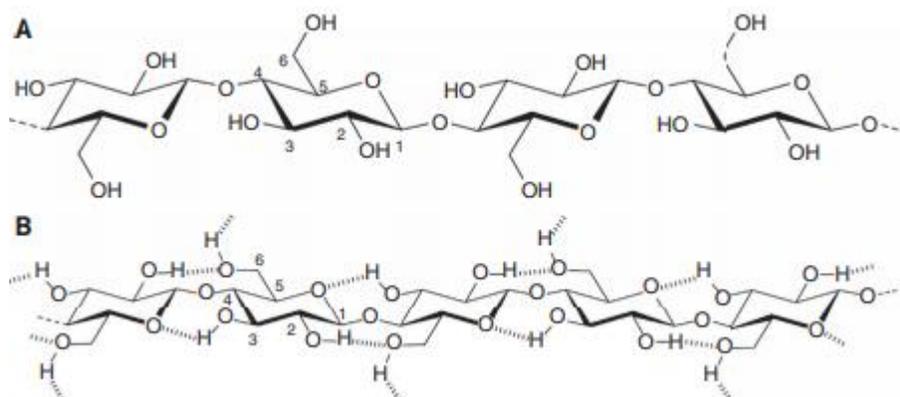
Las microfibrillas se cristalizan en paquetes y cintas, que alcanzan un grosor de 1 a 9 μm y forman una estructura reticulada estabilizada por puentes de hidrógeno. La condensación de las cintas da lugar a la estructura tridimensional o macroestructura de la CB. La macroestructura es dependiente de las condiciones de cultivo, como si el cultivo es agitado o estático. En cultivo estático se genera una “película o nata” en la interfase aire/líquido. En cultivo agitado se logra un menor grado de agrupamiento, la cantidad de planos paralelos es menor y se forman gránulos irregulares, cadenas fibrosas o ramificadas (Yamanaka, Tabuchi, Morinaga, & Yoshinaga, 2000).

1.2.6 Puentes de hidrógeno en la celulosa

Un puente de hidrógeno es interacción de atracción entre un átomo de hidrógeno como un átomo electronegativo, como nitrógeno, oxígeno o flúor, que provee de otra molécula o grupo químico.

La celulosa se presenta en la forma de cadenas largas y delgadas, polímero de cadenas enlazadas de 1-4 β -D-glucosa.

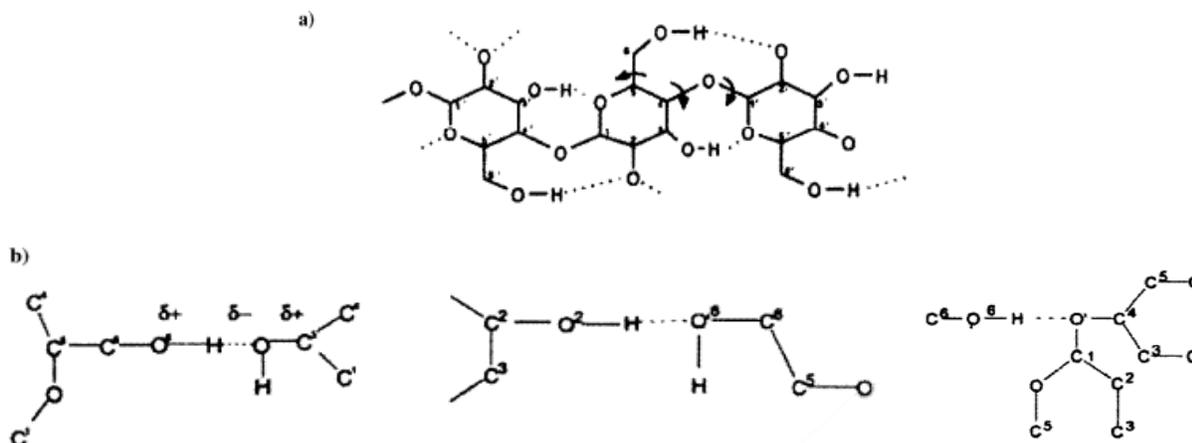
FIGURA 8. (a) Estructura molecular del polímero de celulosa, (b) Patrón de puentes de hidrógeno para la celulosa I.



Fuente: Tashiro & Kobayashi (1991).

Grupos hidroxilo en C2, C3, y C6 contribuyen a la formación de varios tipos de puentes de hidrógeno inter- e intra- molecular. La formación de puentes de hidrógeno no solo tiene una fuerte influencia en las propiedades físicas de la celulosa, incluyendo solubilidad, reactividad hidroxila, y cristalinidad.

FIGURA 9. Puentes de hidrógeno inter-cadena (a) e intra-cadena (b) en la celulosa.



Fuente: Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska (2005).

Pero también desempeña un rol importante en las propiedades mecánicas de la celulosa. Según Tashiro y Kobayashi (1991), los puentes de hidrógeno contribuyen un 20% de la energía de deformación a la celulosa.

1.2.7 Características de la celulosa bacteriana

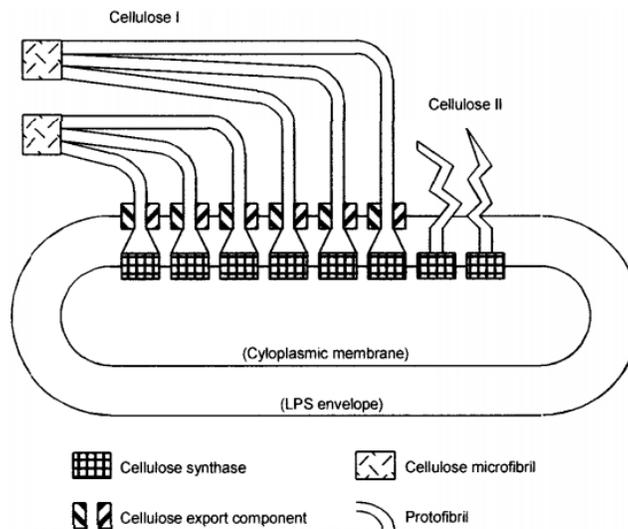
En general, la CB es estable en soluciones básicas, pero es susceptible a hidrólisis alcalina bajo condiciones drásticas (NaOH 1 M, 170° C). Diversos agentes oxidantes pueden afectar sus propiedades al romper las cadenas y alterar la estructura.

El mecanismo de síntesis de CB le confiere una pureza superior a la presente en cualquier fuente vegetal, lo cual le otorga características sólo presentes en la celulosa de origen bacteriano: alto grado de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. La celulosa tiene alta capacidad para absorber agua y debido a un menor diámetro de las microfibrillas, la CB posee una mayor área superficial que la presente en la celulosa de madera. Además de estas propiedades fisicoquímicas de importancia industrial, la CB es inerte metabólicamente, no tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto, propiedades de particular importancia para fines biomédicos y cosméticos (Klemm, Schmauder, & Heinz, 2002).

1.2.8 Biosíntesis de celulosa bacteriana

La síntesis de celulosa consta de dos etapas principales: la conversión de la fuente de carbono en uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), que es el sustrato usado para producir celulosa; y la segunda etapa es la formación de celulosa y su secreción al medio de cultivo (Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009).

FIGURA 10. Ilustración esquemática de la biogénesis de celulosa bacteriana y formación de microfibrilla.



Fuente: Brown (1989).

La primera etapa inicia con el ingreso del sustrato al microorganismo, luego se convierte en glucosa-6-fosfato debido a la enzima glucoquinasa, después se transforma en glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa. En el siguiente paso, la glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa por la enzima UDPG pirofosforilasa; y finalmente la enzima celulosa-sintasa polimeriza la glucosa y se forma celulosa (Ross, Mayer, & Benziman, 1991).

La segunda etapa es la polimerización de la glucosa seguida por la excreción de la celulosa al medio de cultivo. El microorganismo posee una serie de poros de 3.5 nm alineados diametralmente en la membrana celular. En la cara interna de la membrana se encuentra el complejo enzimático celulosa-sintasa rodeando cada uno de los poros. La

celulosa es secretada al medio de cultivo como una subfibrilla elemental de 1.5 nm de diámetro; al juntar estas subfibrillas se forma una microfibrilla y el empaquetamiento de microfibrillas produce las fibras y las cintas de celulosa (Marx-Firgini & Pion, 1974).

1.2.9 Síntesis de precursor de celulosa

La celulosa sintetizada es un producto final del metabolismo del carbono, que dependiendo del estado fisiológico de la célula involucra ya sea la ruta de la pentosa fosfato o el ciclo de Krebs, junto con la glucólisis (Ross, Mayer, & Benziman, 1991) (Tonouchi, Tsuchida, Yoshinaga, Beppu, & Horinouchi, 1996).

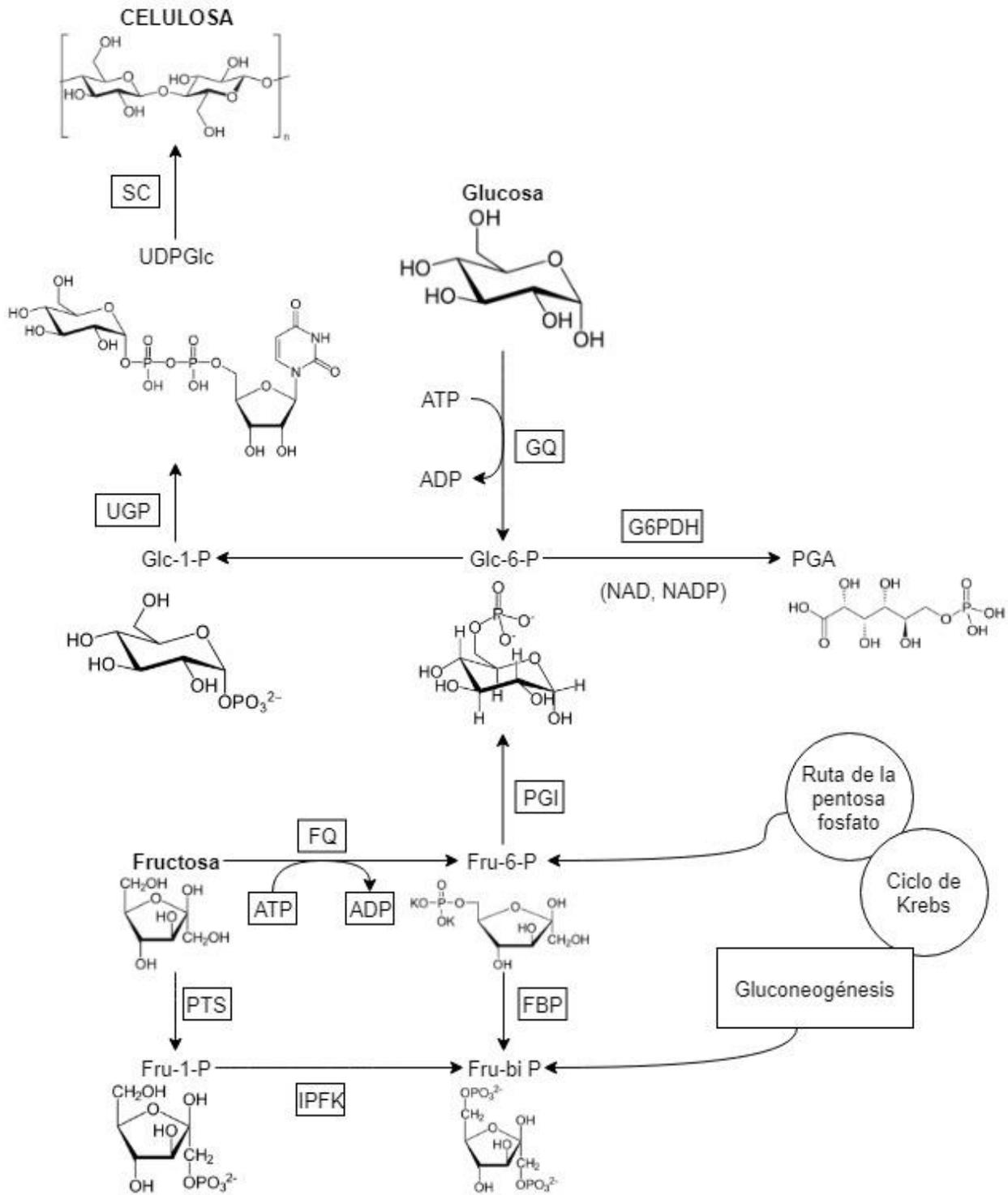
La glucólisis no opera en bacterias del ácido acético ya que estas no sintetizan una enzima crucial en este proceso, la fosfofructosa quinasa (Ross, Mayer, & Benziman, 1991). En *Acetobacter xylinum*, la síntesis de celulosa está estrechamente asociada con los procesos catabólicos de oxidación y consume hasta el 10% de la energía derivada de reacciones catabólicas (Ross, y otros, 1987). La producción de celulosa bacteriana no interfiere con otros procesos anabólicos (Ross, Mayer, & Benziman, 1991).

Acetobacter xylinum convierte varios compuestos de carbono, como hexosas, glicerol, dihidroxiacetona, piruvato, y ácidos dicarboxílicos en celulosa, usualmente con el 50% de eficiencia. Los últimos compuestos entran al ciclo de Krebs y debido a la descarboxilación de oxalacetato a piruvato, llevan a cabo una conversión a hexosas por medio de gluconeogénesis, similar al glicerol, dihidroxiacetona, e intermediarios de la ruta de la pentosa fosfato.

El precursor directo es UDPGlc, que es producto de la ruta convencional, común a muchos organismos, incluyendo plantas, e involucra la fosforilación de glucosa en glucosa-6-fosfato (Glc-6-P), catalizada por glucoquinasa. Seguida por la isomerización de este intermediario a Glc- α -1-P, catalizada por fosfoglucomutasa, y la conversión del último metabolito a UDPGlc por la UDPGlc pirofosforilasa.

Esta última enzima parece ser crucial para la síntesis de celulosa, ya que algunos mutantes negativos de la celulosa (Cel⁻) son específicamente deficientes en esta enzima (Valla, y otros, 1989), aunque exhiben actividad sintetizadora de celulosa. Además, la actividad pirofosforilasa varía entre las cepas de *A. xylinum* y la actividad más alta reportada fue en *A. xylinum* ssp. *Sucrofermentans* BPR2001. Esta última prefiere fructosa como fuente de carbono, muestra una actividad alta de fosfoglucoisomerasa, y posee un sistema de fosfotransferasas, dependiente del fosfoenolpiruvato. El sistema cataliza la conversión de fructosa a fructosa-1-fosfato y a fructosa-1,6-bifosfato.

FIGURA 11. Vías del metabolismo del carbono en *Acetobacter xylinum*.



Fuente: Ross, Mayer, & Benziman (1991).

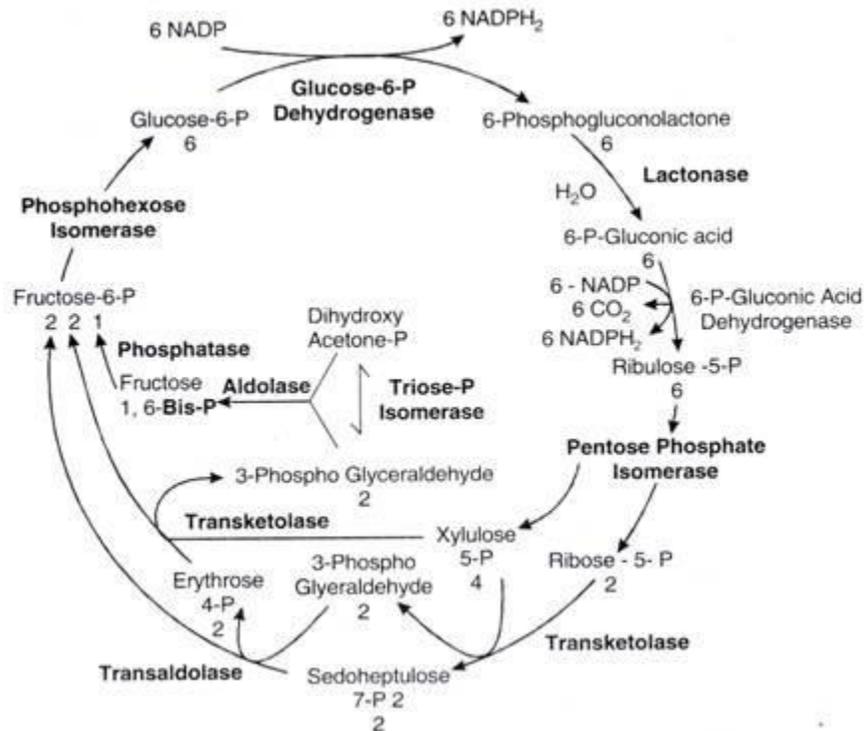
- **Ruta de la pentosa fosfato**

La ruta de la pentosa fosfato se lleva a cabo en la síntesis de celulosa para la oxidación de carbohidratos (Ross, Mayer, & Benziman, Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria, 1991).

La ruta de la pentosa fosfato es una fuente considerable de poder reductor e intermediarios metabólicos para procesos biosintéticos. Algunas, pero no todas, de las enzimas en la ruta se encuentran en el citosol y los plástidos de la célula, aunque la precisa distribución de sus actividades varía.

En células no-fotosintéticas, la ruta de la pentosa fosfato es una fuente de reductores para procesos como la síntesis de ácidos grasos y la asimilación de nitrógeno inorgánico, y mantiene el potencial redox necesario para protegerse de estrés oxidativo. La sección reversible no-oxidativa de la ruta es la fuente de esqueletos de carbono para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos aromáticos, fenilpropanoides y sus derivados (Kruger & Von Schaewen, 2003).

FIGURA 12. Ruta convencional de la pentosa fosfato.



Fuente: Kruger & Von Schaewen (2003).

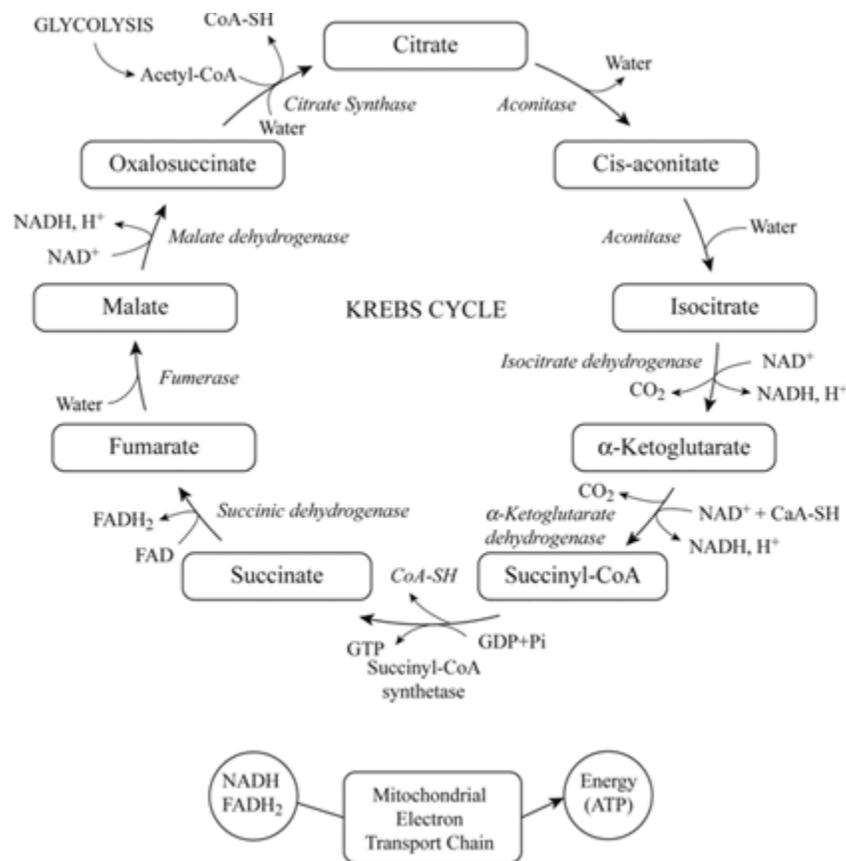
- **Ciclo de Krebs**

El ciclo de Krebs se lleva a cabo en la síntesis de la celulosa para la oxidación de ácidos orgánicos y compuestos relacionados (Ross, Mayer, & Benziman, Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria, 1991).

El ciclo de Krebs, también conocido como el ciclo de ácido tricarboxílico o el ciclo Szent-Györgyi-Krebs, es una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas, que es de gran importancia en todas las células que utilizan oxígeno como parte de su respiración celular. Otras reacciones relevantes al ciclo son las de la glucólisis y oxidación de piruvato antes del ciclo de Krebs, y las de la fosforilización oxidativa que suceden después del ciclo. Además, provee precursores para muchos compuestos, entre ellos los aminoácidos, y es útil para células que llevan a cabo fermentación (Lowenstein, 1969).

El ciclo libera energía almacenada por la oxidación de Acetil-CoA, que es una molécula derivada de carbohidratos, grasas, y proteínas, que se convierte en dióxido de carbono y energía química en la forma de trifosfato de adenosina (ATP).

FIGURA 13. Ciclo de Krebs.



Fuente: Lowenstein (1969).

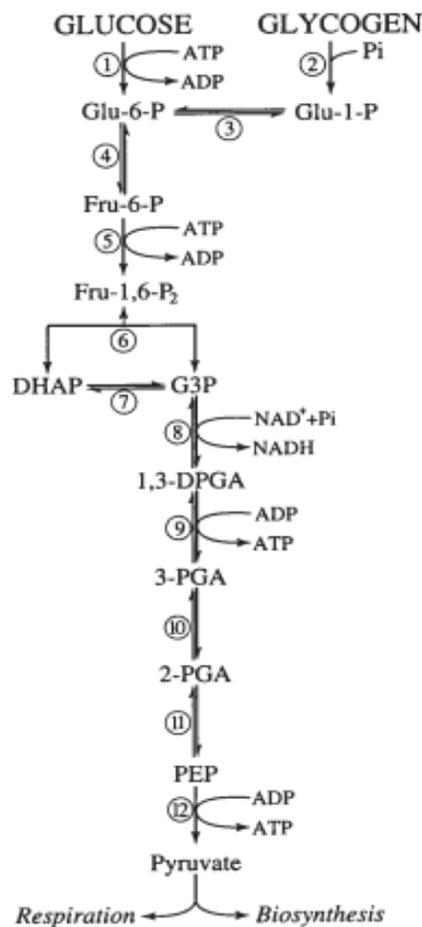
- **Glucólisis**

Tonouchi et al (1996), ha reportado actividad de fosfofructoquinasa en *Acetobacter xylinum ssp. SuCrofermentans* BPR2001. Lo que indica actividad glucolítica, lo que significa que la glucosa puede ser metabolizada anaeróbicamente.

En el año 1940, la glucólisis fue la mayor ruta metabólica que fue completamente caracterizada. Sigüientes estudios han mostrado que es proceso metabólico “central” y que se encuentra presente, al menos en parte, en todos los organismos. La glucólisis evolucionó como un proceso anaeróbico catabólico que lleva a cabo dos funciones fundamentales. Primero, oxide hexosas para generar ATP, reductores y piruvato, y produce bloques de construcción para anabolismo.

La glucólisis también es un proceso anfibólico, ya que puede funcionar en reversa para generar hexosas a partir de muchos compuestos de bajo peso molecular en una gluconeogénesis que es dependiente de energía.

FIGURA 14. Proceso de glucólisis. Las enzimas que catalizan las reacciones son las siguientes: 1. Hexoquinasa; 2. Fosforilasa; 3. Fosfoglucomutasa; 4. Fosfoglucosa isomerasa; 5. PFK; 6. ALD; 7. Triosa fosfato isomerasa; 8. NAD-dependiente GAPDH; 9. 3-PGA quinasa; 10. Fosfogliceromutasa; 11. Enolasa; 12. Piroquinasa.

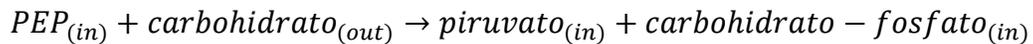


Fuente: Plaxton (1996).

- **Sistema Fosfotransferasa (PTS)**

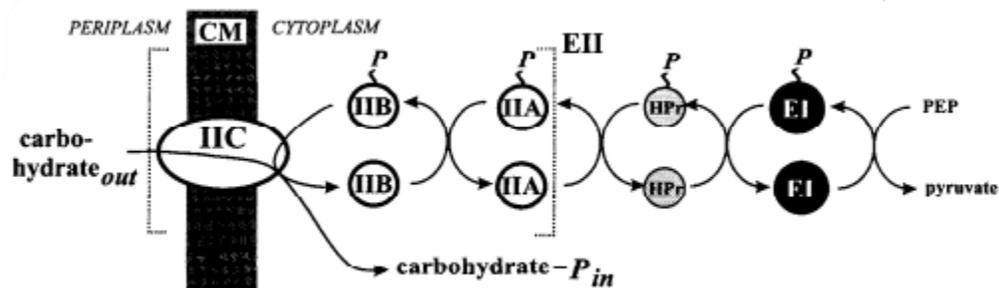
Tonouchi et al (1996), investigaron varias actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de celulosa, y demostraron la existencia de un sistema de fosfotransferasa para el consumo de fructosa en células productoras de celulosa.

El Sistema Fosfotransferasa funciona para transportar más de 20 carbohidratos dentro de la célula bacteriana. El PTS consiste en dos proteínas citoplásmicas que enlazan energía (Enzima I y HPr) y un rango de Enzimas II que son específicas para carbohidratos. Las enzimas transportan y realizan una fosforilación de ciertos carbohidratos y modulan las respuestas celulares según la disponibilidad de carbohidratos. Sin importar la especie bacterial o el carbohidrato, todos los PTS que han sido caracterizados catalizan el siguiente proceso general que conlleva al consumo de azúcares y hexitoles, que se refieren como carbohidratos PTS:



La reacción se lleva a cabo en cinco pasos consecutivos, completamente reversibles, de la transferencia del grupo fosforilo (P), que es catalizada por la Enzima I (EI), la proteína HPr, y Enzimas II (EII).

FIGURA 15. Las cinco reacciones reversibles del sistema PTS.



Fuente: Kotrba, Inui, & Yukawa (2001).

Para el transporte del carbohidrato, la Enzima I se autofosforila del fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosforilo a la proteína HPr. Luego el grupo fosforilo es entregado al carbohidrato por medio de la Enzima II compuesta de tres dominios fundamentales IIA, IIB y IIC. El dominio IIA es fosforilado por HPr y pasa el fosfato al dominio IIB. La fosforilación del carbohidrato que es translocado por el dominio transmembrana IIC, resulta en una estructura intracelular carbohidrato-fosfato (Kotrba, Inui, & Yukawa, 2001).

- **Gluconeogénesis**

La gluconeogénesis puede ocurrir desde el oxalacetato por vía de piruvato por medio de las enzimas oxalacetato descarboxilasa y piruvato fosfato diquinasas.

La gluconeogénesis es una ruta metabólica que lleva a la síntesis de glucosa de piruvato y otros precursores no-carbohidratos, incluso en organismos no-fotosintéticos. Este proceso se lleva a cabo en todos los organismos y las reacciones son esencialmente las mismas, que llevan a formar una molécula de glucosa a partir de dos de piruvato. Por lo que, en esencia, es una glucólisis en reversa, y comparte siete enzimas con este proceso (Nelson & Cox, 2000).

1.2.10 Formación de microfibrillas

El mecanismo de formación, así como la estructura de microfibrillas ha sido estudiado extensivamente en las últimas décadas combinando el conocimiento de biogénesis (Brown, Willison, & Richardson, 1976). Actualmente se cree que las moléculas de celulosa sintetizadas en el interior de la célula bacteriana son hiladas fuera por “componentes exportadores de celulosa” o boquillas que forma una proto-fibrilla de alrededor 2-4 nm de diámetro, y las proto-fibrillas son agrupadas en una forma de una microfibrilla en forma de listón de 80 x 4 nm (Brown A. M., 1989).

La cinética de producción de celulosa por bacterias ha sido estudiada desde 1050 y se ha establecido que el rendimiento de la celulosa incrementa exponencialmente con tiempo, al menos en los rangos de menor conversión. Se asume comúnmente que la bacteria produce un cierto número de iniciadores de cadena a los cuales se les adiciona monómeros para formar celulosa y que la población bacteriana obedece la ley de crecimiento bacteriano.

$$N_t = N_0 e^{\alpha t} \quad (1)$$

Donde N_t y N_0 son el número de bacterias en el tiempo t y 0 respectivamente, y una constante, α está relacionada con el tiempo de generación de bacteria promedio τ :

$$\alpha = \left(\frac{1}{\tau}\right) \ln 2 \quad (2)$$

1.2.11 Aplicaciones de la celulosa bacteriana

Hoy en día en la industria se le ha empezado a dar uso a la celulosa bacteriana, esto debido a su alta pureza e inusuales propiedades fisicoquímicas. Una vez purificada, la celulosa bacteriana es no tóxica, no alergénica, y biocompatible (Duvey V. , Saxena, Singh, Ramana, & Chauhan, 2002). Algunos productos comerciales son Biofill, que es un producto para cubrir heridas y Gengiflex, material utilizado para elaborar implantes dentales (Chawla, Bajaj, Survase, & Singhal, 2009) (Fontana, y otros, 1990) (Yoshinaga, Tonouchi, & Watanabe, 1997).

También es posible obtener derivados de la celulosa bacteriana, como acetato de celulosa (Kim, Nishiyama, & Kuga, 2002). Y se puede obtener una tasa controlable de biodegradación e hidrofobicidad, lo que expande sus posibles aplicaciones.

Bradley (2010), estudio el uso de materiales biodegradables, incluyendo la celulosa, como empaques de alimentos. En este caso se confirmó la viabilidad de estos tipos de empaques manteniendo la seguridad de los alimentos al detectar la salida o

entrada de cualquier contaminante al alimento. Y se comprobó que no hubo traspaso de contaminantes a través del empaque.

Una membrana de Celulosa Bacteriana ofrece una alta capacidad sónica (propiedades comparables a una película de aluminio o titanio), actualmente en el área de medicina, se ha utilizado la celulosa bacteriana debido a la alta fuerza mecánica en estado hidratado, su permeabilidad a líquidos y gases y la poca irritación dérmica que provoca su contacto, la postulan como un sustituto de piel en la terapia de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones de la epidermis (Pacheco, Yee, Zentella, & Marván, 2017).

La celulosa bacteriana se puede organizar en láminas de 100 micrómetros de grosor, alrededor del grosor del papel normal, por un proceso de síntesis húmeda. La celulosa bacteriana es candidata para la producción de papel electrónico. La celulosa produce un sustrato robusto con una estructura de microfibrillas que permite que se le implante dopantes al papel, que son impurezas que se implantan en la red cristalina para alterar las propiedades eléctricas u ópticas. Se le puede aplicar una solución a la celulosa con dopantes conductivos y tintes electrocrómicos que se adhieren a la estructura cristalina. Los tintes pueden cambiar de tono con la aplicación del voltaje adecuado y al colocarse en estructura de píxeles puede permitir la formación de imágenes (Shah & Brown, 2005).

Maneerung et al. (2008), desarrollaron un compuesto de celulosa bacteriana y nanopartículas de plata que tiene un mayor efecto microbiano para proteger las heridas de organismos Gramnegativos como Grampositivos. Klemm et al. (2001), desarrollaron implantes vasculares para microcirugía con un reactor que produce celulosa bacteriana en forma tubular. Sus propiedades mecánicas son similares a las obtenidas con tejidos vasculares naturales (Backdahl, y otros, 2006). Su estructura tridimensional permite su uso como soporte en ingeniería de tejidos ya que facilita el anclaje y proliferación de las células que conformarán el tejido nuevo. Los hidrogeles formados por celulosa bacteriana y colágeno presentan resistencia a la compresión de varios órdenes de magnitud mayor que la de la estructura de celulosa, y cercana a la del tejido cartilaginoso, lo que hace de este material compuesto un candidato para la sustitución de tejidos (Nakayama, y otros, 2004).

La celulosa bacteriana se puede utilizar para recubrir sensores de glucosa que normalmente se recubren con celulosa de origen vegetal. Con celulosa bacteriana aumenta su vida útil y su estabilidad al contacto con la sangre.

Se puede tener impacto sobre diversos productos industriales como se muestra a continuación:

TABLA 2. *Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana.*

Industria	Aplicaciones
Cosmética	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas. Generación de uñas artificiales
Textil	Material de alta absorción acuosa
Refinería	Material para absorción de toxinas y aceites.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad
Alimentos	Aditivo de alimentos, emulsificante, fibra dietética.
Maquiladora	Componente de partes y refacciones
Turística	Ropa deportiva y equipo de acampar
Investigación	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía
Tecnología	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos
Medicina	Fabricación de “Piel artificial” en terapia de quemaduras Componente en implantes dentales.

Fuente: Pacheco, Yee, Zentella, & Marván (2017).

Respecto a la elaboración de papel se han evaluado las propiedades mecánicas del papel que se obtiene al añadir un pequeño porcentaje de celulosa bacteriana a las fibras de celulosa vegetal, este tipo de papel posee mejores propiedades mecánicas que los que se fabrican utilizando únicamente celulosa vegetal.

Al efectuar la biosíntesis de celulosa bacteriana en presencia de fibras vegetales, aumenta la resistencia a la tracción y al desgarró, de igual manera sucede cuando se añaden películas de celulosa bacteriana desintegradas a pastas de papel, o cuando se coloca una película de celulosa bacteriana sobre una hoja de papel, al secar, se duplicaron los índices de desgarró y de estallido en un papel añadiendo hasta un 5% de celulosa bacteriana a una formulación de pasta. Por lo que al brindar capacidad de refuerzo en el papel se ha logrado proponer el uso de la celulosa bacteriana para restaurar documentos degradados y obtener un papel de alta calidad. (Santos, Carbajo, & Villar)

Las propiedades emulsificantes, cohesivas y de absorción, además de no provocar reacciones alérgicas en la aplicación dérmica, así como en la elaboración de alimentos, se le asegura un futuro a la celulosa bacteriana en aplicaciones en la industria alimentaria y cosméticas. El punto crítico para la explotación de este recurso está en incrementar los niveles de producción y abatir los costos. La generación de un sistema productivo eficiente será la base para iniciar a aprovechar las cualidades del recurso natural y renovable como lo es la celulosa bacteriana (Pacheco, Yee, Zentella, & Marván, 2017).

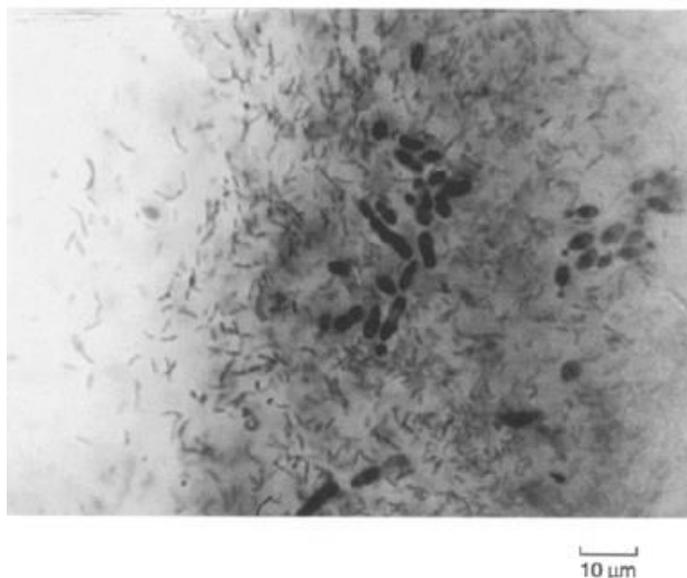
1.2.12 Kombucha

La Kombucha es una bebida producida por la fermentación de té y azúcar por una asociación simbiótica de bacterias y levaduras formando un “hongo” (Dufresne & Farnworth, 2000). El té es fermentado por la presencia de una película celulosa, “hongo”,

que reposa en la superficie del líquido, formando una capa nueva después de cada fermentación completada.

La Kombucha se originó en China en el año 220 AC durante la dinastía Tsin, y era valorada por sus propiedades energizantes y purificantes (Roche, 1998). En el año 414, el doctor Kombu llevó la Kombucha de Corea a Japón para curar los problemas digestivos del emperador. Luego se introdujo como “té Kvass” a Rusia por mercaderes orientales y luego hacia Europa del este y el resto de Europa al fin del siglo veinte. Esta bebida es producida frecuentemente en el hogar por fermentación utilizando un “hongo” compartido de hogar a hogar. La bebida es fermentada tradicionalmente durante 8-10 días. A partir de esta fermentación, la Kombucha tiene un sabor agrio burbujeante, parecido al vinagre de manzana (sidra), obtenida por la fermentación (Blanc, 1996) (Reiss, 1994).

FIGURA 16. Agrupaciones de levaduras en una matriz de bacterias del ácido acético y celulosa.



Fuente: Reiss (1994).

Los mayores metabolitos identificados en la Kombucha son: ácido láctico, ácido acético, ácido glucónico, ácidos glucurónicos, etanol y glicerol (Blanc, 1996). La kombucha contiene una simbiosis de levaduras osmófilas (principalmente *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Pichia* spp.) y bacterias del ácido acético (*Acetobacter xylinum*, *A. xylinoides*, *Bacterium gluconicum*) utilizadas para la fermentación utilizando un azúcar como sustrato. La composición microbiana específica depende de la preparación individual de la bebida.

La Kombucha ha sido consumida en múltiples países por siglos y se han reportado varios efectos medicinales. Se ha mostrado que tiene efectos positivos en las actividades gástricas, intestinales y glandulares, así para superar arteriosclerosis, excreción de

toxinas, diabetes, nerviosismo, y problemas de envejecimiento. También puede actuar como un laxante y se conoce que alivia el reumatismo, artritis, y hemorroides. También se ha reportado su efecto antioxidante (Dufresne & Farnworth, 2000).

1.2.13 Fermentación

El término fermentación proviene de la palabra latina *fermentum*. La definición histórica describe fermentación como el proceso en donde ocurren cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas microbianas ya sea en presencia o ausencia de oxígeno. La fermentación se puede describir como “respiración sin aire”. La ciencia de fermentación se llama enzimología y el primer enzimólogo fue Louis Pasteur.

Actualmente la fermentación es un proceso metabólico en donde carbohidratos o compuestos relacionados son parcialmente oxidados con la liberación de energía en la ausencia de receptores de electrones externos, compuestos orgánicos producidos por la descomposición de carbohidratos. Durante la fermentación, sucede la oxidación incompleta de compuestos orgánicos y por esta razón se obtiene menos energía que en comparación con la oxidación aeróbica del compuesto.

La fermentación industrial se refiere ya sea a procesos aerobios o anaerobios, mientras que la fermentación en un contexto bioquímico describe solamente procesos anaeróbicos. La fermentación industrial, describe un proceso de operaciones que utilizan un cambio químico inducido por un organismo vivo o enzima, particularmente bacterias, levaduras, u hongos, que producen un producto específico.

El proceso de fermentación se compone de tres etapas principales: preparación de inóculo, selección de medio de cultivo y producción de biomasa (o metabolitos) de interés. Como término general, los procesos de fermentación se pueden dividir mediante dos directrices: 1. el tipo de producto de la fermentación a obtener y 2. la presencia o ausencia de oxígeno (Chojnacka, 2010).

1.2.14 Fermentación en Kombucha

La Kombucha se prepara tradicionalmente al fermentar té negro, endulzado con sacarosa, con una capa de celulosa donde existe una simbiosis de levaduras y bacterias del ácido acético, y un 10% de inóculo de Kombucha ya preparada. Durante la fermentación se produce una nueva capa de celulosa sobre la anterior. Las levaduras fermentan la sacarosa y la transforman en fructosa, glucosa y etanol (Reiss, 1994) (Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, & Teuber, 1995). Luego las bacterias del ácido acético convierten la glucosa a ácido glucónico y la fructosa en ácido acético.

El té negro y la azúcar blanca son los mejores sustratos para la preparación de Kombucha, aunque también se puede utilizar té verde (Reiss, 1994). La cafeína y las xantinas relacionadas de la infusión de té estimulan la síntesis de celulosa por la bacteria (Balentine, Wiseman, & Bouwens, 1997). El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol y el etanol por su parte puede ayudar a las bacterias del ácido acético a crecer y producir ácido acético (Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996).

Se ha reportado que el etanol y el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patogénicas y consecuentemente proveen protección contra la contaminación de la Kombucha (Teoh, Heard, & Cox, 2004).

Las fermentaciones realizadas en el hogar usualmente son de 1 a 2 litros, mientras que la fermentación comercial es conducida en volúmenes de 100 L. Análisis del líquido fermentado ha revelado la presencia de ácidos acéticos, lácticos y glucónicos como componentes mayoritarios (Frank, 1995). Los mayores metabolitos que se obtienen de la fermentación de la Kombucha incluyen: monosacáridos, varios tipos de ácidos orgánicos y vitaminas (Malbasa, Loncár, Djurié, & Dosenovic, 2008).

Solo unas pocas bacterias claves están involucradas en la fermentación de Kombucha, como *Acetobacter spp.*, especialmente cepas productoras de celulosa de *Acetobacter xylinum*, aunque cepas de *Gluconobacter* y *Lactobacillus* se pueden encontrar. Un amplio espectro de levaduras se ha reportado incluyendo especies de *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycoides*, *Shizosaccharomyces*, *Torulospora*, y *Zygosaccharomyces* (Jankovic & Stojanovic, 1994).

1.2.15 Condiciones de cultivo

En la preparación tradicional de Kombucha los únicos nutrientes provienen del té utilizado y de la sacarosa. Donde el té está compuesto de polifenoles, cafeína, aminoácidos, carbohidratos, ceniza, vitaminas, minerales, y compuestos insolubles como proteínas. El contenido de nitrógeno en el té representa un 4.5 o 6%, donde la mitad son aminoácidos libres, y un quinto proviene de la cafeína y compuestos relacionados. La fuente de carbono de la celulosa bacteriana son los carbohidratos.

Los medios utilizados a escala laboratorio substituyen los nutrientes provenientes del té por otros compuestos. Un medio de cultivo común contiene un sacárido, una fuente de nitrógeno (extracto de levadura o licor de maíz fermentado), sulfato de nitrógeno, fosfato de potasio y sulfato de magnesio. Además, lo ideal es agregar una solución de vitaminas.

El cultivo se lleva a cabo en condiciones estáticas, la condición ideal para bacterias que proveen de la Kombucha, a una temperatura de 28-30°C. Algunos autores han observado que la máxima producción de celulosa tanto para glucosa como para sacarosa se logra a 30°C. A 25°C y 35°C las producciones son similares en sí, pero menores que a 30°C, mientras a 40°C no existe crecimiento del microorganismo y consecuente no se observa producción de celulosa (Oikawa, Ohtori, & Ameyama, 1995) (Carreño & Caicedo, 2005).

La fermentación inicia al agregar una alícuota de una solución de inoculación al medio de cultivo. Durante el cultivo el medio se vuelve turbio y se forma una película blanca en la superficie y su grosor incrementa progresivamente con el tiempo (Iguchi, Yamanaka, & Budhiono, 2000). Las bacterias aérobicas solo producen celulosa en la proximidad a la superficie, así que la productividad depende principalmente en el área

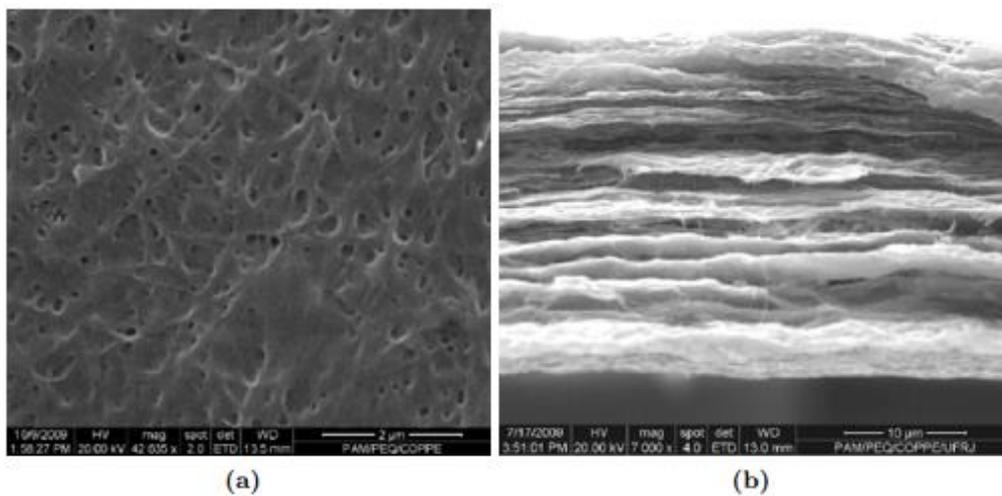
superficial, no en el volumen del recipiente. Media vez no se agite el sistema, el gel circular esta adherido a la pared interior del recipiente y se desliza lentamente al fondo cuando su grosor aumenta (Masaoka, Ohe, & Sakota, 1993).

1.2.16 Cultivo agitado y estático

En cultivo estático, la celulosa se forma como una película estática en el cultivo. La producción de celulosa en un cultivo agitado es más baja que en un cultivo estático. Sin embargo, un sistema de cultivo estático es ineficiente en el aspecto industrial, debido a que requiere un largo tiempo de cultivo y mucha más mano de obra. Recientemente se ha estudiado la producción masiva de celulosa bacteriana en un cultivo agitado (Changjin, Chung, Lee, & Kim, 2002).

Aunque el rendimiento de las cepas provenientes de la Kombucha siempre son más altas en un cultivo estático debido a que han sido acondicionadas de esa forma (Krystynowicz, Czaja, & Wiktorowska-Jezierska, 2002).

FIGURA 17. Imagen de (a) superficie y (b) transversal de una membrana de celulosa bacteriana obtenida por cultivo estático.



Fuente: Carreño (2011).

1.2.17 Té

Las plantas de té pertenecen a la familia *Theaceae* y provienen de dos variedades principales: *Camellia sinensis* var. *sinensis* y *Camellia sinensis* var. *Assamica* (Hara, Luo, Wickremaishinghe, & Yamanishi, 1995). Las primeras hojas apicales son recogidas del arbusto de hoja perenne y pueden ser procesadas por distintos métodos.

El té verde es secado inmediatamente con o sin un paso para desactivar las enzimas. El té negro, la forma más popular alrededor del mundo, es el resultado de la oxidación de los polifenoles de la hoja durante un proceso enzimático de múltiples etapas. Nuevos complejos polifenoles son formados durante el procesamiento del té negro.

1.2.18 Composición química del té

Los mayores componentes de las hojas de té verde pertenecen al grupo polifenol, que constituye un 25-35% del peso (Balentine, Wiseman, & Bouwens, 1997). Los polifenoles predominantes del té son los flavonoles de donde las catequinas (flavan-3-ol) son las principales. Estos compuestos contribuyen a la amargura, astringencia, y un sabor residual dulce.

En el té negro la oxidación de los polifenoles durante el procesamiento causa la formación de catequinas y complejos de ácido gálico como teaflavinas, ácidos teaflavinicos, teauribiginos o teasiensis. Las metalxantinas están presentes un 2-4% como cafeínas y una pequeña cantidad de teofilina y teobromina (Hara, Luo, Wickremaishinghe, & Yamanishi, 1995).

El té contiene muchos aminoácidos, pero la teanina, específica a la planta del té, es el más abundante, representando el 50% del total de los aminoácidos. La degradación del aminoácido está involucrada en la biogénesis del aroma del té. Otros actores en el desarrollo del aroma son la clorofila, carotenoides, lípidos, y compuestos volátiles que no son constituyentes principales del té. Los compuestos volátiles de las hojas del té han sido estudiados extensivamente y se han aislado 600 diferentes moléculas.

El té también contiene carbohidratos, vitaminas E, K, A, bajos niveles de vitaminas B y C (únicamente en el té verde). El té también provee cantidades necesarias de potasio, manganeso, e iones de flúor a la dieta (Hara, Luo, Wickremaishinghe, & Yamanishi, 1995).

1.2.19 Medio HS

El medio HS fue desarrollado por M. Schramm y S. Hestrin para el crecimiento de *Acetobacter xylinum*. El medio HS se utiliza para el crecimiento de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, y para pruebas de esterilidad. También es el medio más utilizado en estudios de producción de celulosa bacteriana (Hestrin & Schramm, 1954). Está compuesto de 20 g/L de glucosa, 5 g/L peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.7 g/L de Na_2HPO_4 , 1.15 g/L de ácido cítrico, agua, y pH final de 5. La glucosa utilizada en el medio se puede reemplazar con otras fuentes de carbono, siendo la más eficiente Manitol y licor de maíz fermentado como fuente de nitrógeno.

1.2.20 Fuentes de carbono

La fuente de carbono es el carbohidrato o sacárido utilizado como nutriente principal en un medio. Los carbohidratos son bloques de construcción para macromoléculas. Estos se pueden dividir en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos. Los monosacáridos y disacáridos que tiene menor peso molecular son conocidos como azúcares.

Según lo reportado por Hermann (1928) y Reiss (1994), se tiene una idea de la actividad metabólica causada por la presencia de cada fuente de carbono en la fermentación de la Kombucha. Por acción de las levaduras presentes en la Kombucha, la sacarosa, glucosa, fructosa, y maltosa son fermentadas a etanol.

1.2.21 Sacarosa

La sacarosa es un disacárido compuesto de dos monosacáridos, glucosa y fructosa. La glucosa y la fructosa están enlazadas por medio de un enlace entre C1 de la glucosa y C2 de la fructosa. Este es un enlace glicosídico. Una hidrólisis puede romper el enlace glicosídico, separando la glucosa y fructosa (Lunn, 2008).

Por acción de las levaduras presentes en la Kombucha, la sacarosa es hidrolizada en glucosa y fructosa.

1.2.22 Glucosa

La glucosa es un monosacárido. Tiene seis átomos de carbono por lo que es clasificada como una hexosa. Es el monosacárido más abundante. El isómero D-glucosa ocurre ampliamente en la naturaleza, mientras que L-glucosa no. La glucosa se puede obtener como hidrólisis de varios carbohidratos, como la lactosa, sacarosa, maltosa, celulosa, glucógeno, etc.

La glucosa es utilizada como fuente de energía en la mayoría de los organismos. Donde por glucólisis, el ciclo de Krebs, y fosforilación oxidativa, la glucosa es oxidada en dióxido de carbono y agua, liberando energía en la forma de ATP.

La glucosa también es la aldohexosa más ampliamente utilizada por organismos vivos, ya que, a comparación de otras aldohexosas, reacciona específicamente con los grupos amino de varias proteínas. Esto se debe a que tiene una forma cíclica más estable, y pasa menos tiempo en su forma de cadena abierta ya que sus grupos hidroxílicos están ubicados en la posición ecuatorial (Bunn & Higgins, 1981).

Por acción de las bacterias del ácido acético en la Kombucha, la glucosa es convertida en ácido glucónico.

1.2.23 Fructosa

La fructosa es un monosacárido presente en la naturaleza en compañía de la glucosa, con quién forma un disacárido. Posee seis átomos de carbono y adopta una estructura cíclica gracias a la estabilidad de su hemicetal y puentes de hidrógeno internos. La fructosa puede ser fermentada anaeróbicamente por levaduras o bacterias (Hyvonen & Koivistoinen, 1982).

Por acción de las bacterias del ácido acético en la Kombucha, la fructosa es metabolizada exclusivamente en ácido acético, nunca en ácido glucónico.

1.2.24 Maltosa

La maltosa es un disacárido formado por dos unidades de glucosa con un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$. Posee seis átomos de carbono, por lo que es una hexosa. Las dos unidades de glucosa están en su forma piranosa y tienen un enlace glicosídico (O'Sullivan C. , 1872).

Por acción de las bacterias del ácido acético en la Kombucha, solo se produce una pequeña cantidad de ácido acético en presencia de maltosa.

1.2.25 Manitol

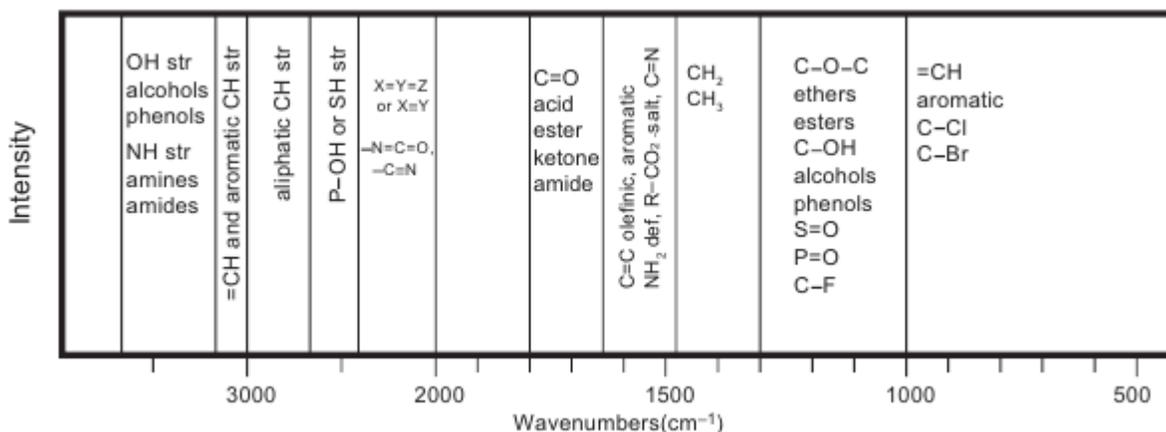
El manitol fue descubierto por Joseph Louis Proust en 1806. Es un tipo de alcohol de azúcar, específicamente es un isómero del sorbitol, otro alcohol de azúcar, y los dos solo difieren por la orientación de su grupo hidroxilo en el carbono 2. El manitol se produce por la hidrogenación de la fructosa. El manitol es una de las fuentes de energía y almacenaje de carbono más abundante en la naturaleza ya que es producida por una variedad de organismos (Ellis & Krantz, 1941).

1.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopía vibracional incluye varias técnicas, de las cuales las más importantes son la infrarroja media (IR), infrarroja cercana, y espectroscopía de Raman. La infrarroja media y la espectroscopía de Raman proveen vibraciones fundamentalmente características que sirven para elucidar la estructura molecular de las sustancias. La espectroscopia infrarroja mediana mide el amplio armónico y bandas de combinación de algunas de las vibraciones fundamentales (solo los modos de mayor frecuencia) y es una técnica excelente para una cuantificación rápida y exacta (Larkin, 2011).

La espectroscopía vibracional se utiliza para estudiar un amplio rango de tipo de muestras y se puede llevar a cabo una simple prueba de identificación hasta un análisis profundo cuantitativo o cualitativo. Las muestras se pueden analizar ya sea en bulto o en cantidades microscópicas en un amplio rango de temperaturas y estados físicos (gases, líquidos, látex, polvo, películas, fibras, etc.). La espectroscopía infrarroja se prefiere para vibraciones asimétricas de grupos polares (Larkin, 2011).

FIGURA 18. Regiones del espectro vibracional fundamental con ciertas frecuencias de grupos característicos.



Fuente: Larkin (2011).

La espectroscopía infrarroja mide las transiciones entre los niveles de energía molecular vibracional como resultado de la absorción de radiación infrarroja media. Esta

interacción entre luz y materia es una condición de resonancia que involucra la transición dipolar eléctrica entre los niveles de energía vibracional.

Las bandas infrarrojas son caracterizadas por la frecuencia (energía), intensidad (carácter polar o polarización), y forma de la banda (ambiente de los enlaces). Ya que los niveles de energía vibracional son únicos para cada molécula, el espectro infrarrojo provee una “huella” de una molécula particular. La frecuencia de estas vibraciones moleculares depende de las masas de los átomos, su configuración geométrica, y la fuerza de sus enlaces químicos. El espectro provee información de la estructura molecular, dinámica, y ambiente (Larkin, 2011).

1.3.1 Interpretación de espectroscopía vibracional

Se utiliza dos tipos de enfoques para la interpretación de espectroscopía vibracional y para la elucidación de la estructura molecular.

1. El uso de teoría de grupos con cálculos matemáticos de las formas y frecuencias de las vibraciones moleculares.
2. Uso de las frecuencias empíricas características de los grupos funcionales.

Muchas frecuencias empíricas de grupos funcionales han sido explicadas y refinadas utilizando el enfoque teórico matemático. Y en general, muchos problemas de identificación son resueltos utilizando el enfoque empírico. Ciertos grupos funcionales muestran vibraciones características en la que solo los átomos en ese grupo particular son desplazados. Ya que estas vibraciones son mecánicamente independientes del resto de la molécula, estos grupos vibracionales tendrán una frecuencia característica, que permanecen relativamente constantes sin importar en que parte de la molécula se encuentra el grupo (Larkin, 2011).

Típicamente se utiliza un análisis de frecuencia de grupos para revelar la presencia y ausencia de varios grupos funcionales en la molécula, y así elucidando la estructura molecular de la sustancia. El espectro vibracional puede ser dividido en las regiones mostradas en la Gráfica 1. Estas regiones se pueden dividir como se muestra a continuación:

- Tramo X-H de las frecuencias más altas ($3700-2500\text{ cm}^{-1}$)
- Tramo $X\equiv Y$, y tramo asimétrico de enlaces dobles cumulativos $X=Y=Z$ ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$)
- Tramo $X=Y$ ($2000-1500\text{ cm}^{-1}$)
- Deformación X-H ($1500-1000\text{ cm}^{-1}$)
- Tramo X-Y ($1300-600\text{ cm}^{-1}$)

1.3.2 Índice de cristalización

El índice de cristalización (IC) se ha utilizado para describir la cantidad relativa de material cristalino en la celulosa. El IC en celulosa se puede medir utilizando varias técnicas incluyendo la difracción de rayos X (XRD), resonancia nuclear magnética (RMN) de estado sólido, espectroscopía infrarroja (IR), y la espectroscopía de Raman. El índice

de cristalización se puede determinar por dos formas usando espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier.

El radio de absorbancia de 1372 cm^{-1} (A_{1372}) y 2900 cm^{-1} (A_{2900}). Que fue sugerido por Nelson y O'Connor como el Índice de Cristalinidad Total.

$$IC = \frac{A_{1372}}{A_{2900}} \quad (3)$$

Y el radio de absorbancia de 1430 cm^{-1} (A_{1430}) y 893 cm^{-1} (A_{893}) que fue propuesto por O'Connor en 1958 como el Índice de Orden Lateral, que es un índice empírico. La absorbancia en 1420 y 894 cm^{-1} es sensible a la cantidad de estructura cristalina y estructura amorfa en la celulosa, por lo que bandas más anchas en estos puntos reflejan una estructura más desordenada (O'Connor, Du Pré, & Mitcham, 1958).

$$IC = \frac{A_{1430}}{A_{893}} \quad (4)$$

Se debe considerar que este método solo provee valores relativos, debido a que el espectro siempre contiene contribuciones de ambas regiones cristalinas y amorfas.

1.3.3 Índice de asimetría

El índice de asimetría (a/b) es el radio entre ancho de segmentos a media altura de la banda de absorción OH. Este tiende a indicar la uniformidad de las muestras de celulosa.

1.3.4 Energía de puentes de hidrógeno

La energía de los puentes de hidrógeno (E_H , kJ) se calcula con la siguiente fórmula:

$$E_H = \left(\frac{1}{K}\right) \left(\frac{v_0 - v}{v_0}\right) \quad (5)$$

Donde:

v_0 = Frecuencia estándar correspondientes a los grupos OH libres (cm^{-1})

v = Frecuencia de los grupos OH enlazados (cm^{-1})

$K = 1.6 \times 10^{-2} \text{ Kcal}^{-1}$

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La celulosa vegetal está siendo utilizada extensivamente en las industrias textiles y papeleras, en 2015 se produjo 7 millones de toneladas de pulpa de celulosa y el 60% fue utilizado para la industria textil (Global Market Insights, 2017). La celulosa de origen vegetal es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, representando 1.5×10^{12} toneladas de la producción anual de biomasa (Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005). Se encuentra como un componente estructural, pero frecuentemente se encuentra enlazado a otros polímeros como pectina, lignina, arabinosa, entre otros.

Debido a esto la producción de celulosa bacteriana puede presentarse como una alternativa al material de origen vegetal en una variedad de campos, especialmente debido a que la celulosa bacteriana se produce en estado puro (libre de otros polímeros como lignina) y en forma cristalina.

La celulosa bacteriana también se ha utilizado como sustituto del plástico utilizándola como envoltura de alimentos. Esto ofrece una alternativa al sobreuso de materiales plásticos que ha llevado a una gran acumulación de desechos. Actualmente se producen alrededor de 380 millones de toneladas de plástico cada año. Y desde 1950 a 2015, se ha producido un estimado de 6.3 billones de toneladas de plástico, donde 9% ha sido reciclado, 12% ha sido incinerado y 79% se ha acumulado en rellenos o está contaminando la naturaleza (Geyer, Jambeck, & Law, 2017).

La celulosa bacteriana se puede aprovechar como un producto secundario de la producción de Kombucha cuya demanda ha aumentado en los últimos años en Estados Unidos. Para 2023 se estima un crecimiento de 23% del mercado de la Kombucha, cuando en 2016 la industria tenía un valor de \$760.0 millones (Grand View Research, 2018). Mientras que para 2023 el mercado de celulosa bacteriana registrará un crecimiento de 14% y alcanzará un valor de \$570 millones partiendo de un valor de \$250 millones en 2017 (Market Research Reports, 2018).

Desafortunadamente, el costo actual de la celulosa bacteriana permanece muy elevado para hacerlo atractivo comercialmente, donde el medio de cultivo representa un 30% del costo total (Miller & Churchill, 1986). Debido a esto se debe determinar la producción de celulosa con bacterias provenientes de Kombucha en diversos medios y fuentes de carbono. Pero también se necesita una mejora en los procesos de fermentación basada en una mayor intuición en los antecedentes genéticos de la biosíntesis de la celulosa, que puede llevar al desarrollo de un proceso más económico para la producción de celulosa bacteriana.

Es por ello que se plantea la siguiente pregunta de investigación, ¿es posible determinar el rendimiento de la producción de celulosa bacteriana por microorganismos provenientes de la Kombucha en medio Hestrin Schramm y caracterizar su pureza?

Con el fin de responder la pregunta de investigación, se plantean además las siguientes interrogantes:

¿Es posible comparar el porcentaje de rendimiento de la celulosa bacteriana obtenida al utilizar sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, y manitol?

¿Es posible determinar la concentración óptima al utilizar la mejor fuente de carbono utilizando un rango de concentración de 60 a 100 g/L?

¿Es posible comprobar la pureza de la celulosa bacteriana obtenida al utilizar espectrometría infrarroja?

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo general

Evaluar el rendimiento y caracterización de la celulosa bacteriana producida por microorganismos provenientes de la Kombucha en medio Hestrin Schramm a escala laboratorio.

2.1.2 Objetivos específicos

- Comparar el rendimiento porcentual de celulosa obtenida al utilizar Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa, y Manitol.
- Determinar la concentración óptima entre un rango de 60 a 100 g/L de la mejor fuente de carbono para obtener el mayor rendimiento de celulosa.
- Comprobar la pureza de la celulosa bacteriana obtenida por medio de espectroscopia infrarroja.

2.2 HIPÓTESIS

2.2.1 Hipótesis nula

- **Ho1:** No existe diferencia significativa en el rendimiento porcentual de celulosa obtenida al utilizar Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa, y Manitol.
- **Ho2:** No existe diferencia significativa al variar la concentración de la fuente de carbono con mayor rendimiento.
- **Ho3:** No existe diferencia significativa de la pureza obtenida de la celulosa proveniente en comparación con celulosa vegetal.

2.2.2 Hipótesis alternativa

- **Ho1:** Si existe diferencia significativa en el rendimiento porcentual de celulosa obtenida al utilizar Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa, y Manitol.
- **Ho2:** Si existe diferencia significativa al variar la concentración de la fuente de carbono con mayor rendimiento.
- **Ho3:** Si existe diferencia significativa de la pureza obtenida de la celulosa proveniente en comparación con celulosa vegetal.

2.3 LISTA DE VARIABLES

2.3.1 Variables independientes

- Fuentes de carbono
- Concentración de fuente de carbono.
- pH
- Tiempo de fermentación

2.3.2 Variables dependientes

- Porcentaje de rendimiento obtenido de producción de celulosa bacteriana.
- Pureza de celulosa bacteriana obtenida

2.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES

2.4.1 Variables independientes

- **Fuentes de carbono**

Definición Conceptual: una fuente de carbono se refiere a cualquier molécula que contiene carbono (carbohidrato, aminoácido, ácido graso, dióxido de carbono) que es utilizada por un organismo para la síntesis de sus moléculas orgánicas. El Carbono es un elemento básico para el desarrollo de la vida como se conoce y es el mayor elemento en todas las clases de macromoléculas. Todas las células requieren carbono como su mayor nutriente, ya que, en una base de peso seco, una típica célula está compuesta de 50% de carbono (Gomez, 2011).

Definición Operacional: para encontrar cuál era el nutriente ideal para el conjunto de bacterias presentes en la Kombucha se utilizaron cinco fuentes de carbono: Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Maltosa, y Manitol. La fuente de carbono del medio Hestrin Schramm solo fue reemplazada por cada una de las cinco fuentes de carbono analizadas.

- **Concentración de fuente de carbono**

Definición Conceptual: la concentración es la abundancia de un constituyente dividido por el volumen total de una mezcla, comúnmente es una mezcla que contiene un soluto y un disolvente. La concentración de masa se define como la masa de un constituyente dividido por el volumen de la mezcla usando como unidades kg/m^3 que es igual a g/L (IUPAC, 1996).

Definición Operacional: para las cinco fuentes de carbono utilizadas se utilizó la misma concentración en el medio de cultivo utilizado, 20 g/L. Al encontrar la mejor fuente de carbono, se varió la concentración entre 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, y 100 g/L para encontrar la concentración ideal para el crecimiento de la celulosa.

- **pH**

Definición Conceptual: el pH se define como la concentración de iones de hidrogeno presentes en una solución. Se utiliza una escala logarítmica para especificar el nivel de acidez o basicidad de una solución (Buck, Rondini, & Covington, 2002).

Definición Operacional: el pH que se mantenga en la solución durante el tiempo de cultivo indica el avance de la fermentación. Es necesario un pH inicial bajo para que se pueda dar inicio a la fermentación. El pH inicial de 3.5 fue el mismo en todas las muestras para que se diera el mismo ritmo de fermentación.

- **Tiempo de fermentación**

Definición Conceptual: el tiempo en el cual se cultiva microorganismos en un medio líquido o sólido para convertir sustancias orgánicas en biomasa o en productos (IUPAC, 1996).

Definición Operacional: el tiempo de fermentación para cada experimento fue de 4 días. Contando exactamente 96 horas desde que empezaba la fermentación en el medio hasta que se retiraba la celulosa bacteriana.

2.4.2 Variables dependientes

- **Porcentaje de rendimiento obtenido de producción de celulosa bacteriana**

Definición Conceptual: el rendimiento porcentual obtenido de celulosa bacteriana es una razón peso de la celulosa bacteriana obtenida entre la cantidad de fuente de carbono agregada al medio. Este rendimiento está basado en el peso seco de la celulosa (Goh, y otros, 2012).

Definición Operacional: la celulosa bacteriana obtenida de cada muestra fue purificada al calentar por una hora en una solución de NaOH 0.5% para eliminar cualquier componente orgánico. Luego se lavó tres veces con agua destilada para remover componentes del medio u otros residuos. Luego se secó por 6 horas a 110°C. Según el peso seco obtenido de celulosa se encontró el mejor rendimiento según la mejor fuente de carbono y la concentración óptima (Nguyen, Flanagan, Gidley, & Dykes, 2008).

- **Pureza de celulosa bacteriana obtenida**

Definición Conceptual: los espectros infrarrojos de compuestos orgánicos ofrecen una abundancia de bandas que son característica para ciertas unidades estructurales. Debido a esto la espectroscopía infrarroja es utilizada ampliamente como un método de identificación de compuestos desconocidos. Un espectro infrarrojo común contiene alrededor de 4000 puntos de cata y un software especializado es utilizado para este propósito (Kondagula & Molt, Infrared Spectrometric Purity Control of Chemical Substances using R, 2010).

Definición Operacional: para realizar la determinación de pureza de una muestra, se pueden realizar comparación de espectros infrarrojos al realizar una regresión de una muestra potencialmente contaminada y compararla con un espectro teórico. El coeficiente de correlación resultante, R, es una medida de la similitud de los dos espectros (Kondagula & Molt, 2009).

2.5 ALCANCES Y LÍMITES

2.5.1 Alcances

En este trabajo de graduación se trató de encontrar las condiciones en donde se obtuviera un mayor rendimiento de celulosa bacteriana. Esto se realizó al encontrar la mejor fuente de carbono entre cinco alternativas. Y luego se varió la concentración de la mejor fuente de carbono para encontrar aquella concentración donde el rendimiento fuera mayor.

La investigación involucró pruebas a nivel laboratorio, manteniendo condiciones estériles para que se mantuviera las mismas condiciones en todas las muestras. En el primer experimento solo se varió la fuente de carbono y el resto de las condiciones permanecieron iguales. Y al analizar los resultados, se observó la fuente de carbono con mayor rendimiento. Por lo que en el segundo experimento se varió la concentración de la mejor fuente de carbono. Por último, se purificó la celulosa bacteriana obtenida y el material seco se utilizó para obtener un espectro infrarrojo que identificaba la pureza del material obtenido.

2.5.2 Límites

Debido a la dificultad de aislar cepas individuales de bacterias provenientes de la Kombucha por medio de características fenotípicas, se tuvo que trabajar con la combinación de bacterias presentes en la Kombucha. Por lo que los resultados obtenidos no son reproducibles con variedades distintas de Kombucha debido a que cada clima y temperatura genera una simbiosis distinta de bacterias y levaduras.

Originalmente se iba a trabajar con una cepa de *Gluconacetobacter Kombuchae*, que es una bacteria fijadora de nitrógeno y productora de celulosa al mismo tiempo. Pero debido a la presencia de una gran variedad de bacterias del género *Gluconacetobacter* en la Kombucha, su aislamiento involucra un alto grado de dificultad. Y al tratar de aislarla por su característica fijadora de nitrógeno no fue posible determinar su aislamiento exitoso debido a la posible presencia de una bacteria competidora y la falta de producción de celulosa visible. Para asegurar su presencia hubiera sido necesario realizar una prueba de genes para verificar que se había aislado una cepa de *Gluconacetobacter Kombuchae*.

Todas las muestras solo se trabajaron en triplicado por falta de reactivos para preparar el medio de cultivo. Y el tiempo de fermentación fue 4 días debido a la disponibilidad del laboratorio donde se trabajó.

Se realizó una prueba de espectroscopía infrarroja debido a la disponibilidad del equipo y que no era necesario realizar ningún tratamiento a la muestra. También no se pudo comparar por medio de regresión los espectros infrarrojos de la celulosa bacteriana obtenida y del patrón teórico. Esto se debió a que la biblioteca del equipo utilizado no contaba con un espectro infrarrojo para la celulosa, el material más cercano con el que contaba fue el Rayón, que es una fibra artificial celulósica. El índice de asimetría no se pudo calcular ya que no se tenía las alturas medias de los picos del espectro.

2.6 APORTE

A las industria cosmética, textil, papelera, de alimentos, como una forma de obtener una mayor cantidad de materia prima con alta pureza y con inusuales propiedades fisicoquímicas.

Al campo de la Medicina, como un proceso para obtener un material puro y biocompatible que puede proteger heridas y reemplazar tejidos vasculares naturales.

A las empresas productoras de Kombucha, como una forma de aprovechar un material que normalmente se desecha después de la fermentación de la bebida.

A la Universidad Rafael Landívar, como un aporte de información de la producción de celulosa bacteriana en el medio Hestrin Schramm.

A los estudiantes o personas interesadas en ampliar la investigación, se presenta un aporte de conocimientos e información de la producción de celulosa bacteriana y la posible modificación del medio de cultivo con distintas fuentes de carbono o nitrógeno.

3 MÉTODO

3.1 SUJETOS Y UNIDADES DE ANÁLISIS

3.1.1 Sujetos

- Licda. Ana Luisa Mendizábal, Investigadora Laboratorio de Instrumentación Química Analítica, Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, que ofreció conocimiento sobre espectrometría infrarroja.

3.1.2 Unidades de análisis

- La solución de inoculación utilizada fue una mezcla de cinco variedades de Kombucha, tres producidas personalmente y dos compradas. Las tres producidas eran variedades de té negro, té de jazmín, y té negro con naranja. Las dos compradas de Mother Nature Foods eran una variedad de té verde con cardamomo y otra de té verde con fresa y limón.
- La celulosa bacteriana producida en medio HS usando distintas fuentes de carbono.
- El medio de cultivo Hestrin Schramm al cual se le cambió la concentración de sus componentes.
- Fuentes de carbono utilizadas: sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, y manitol.
- Concentración ideal de fuente de carbono para obtener el mayor rendimiento de celulosa bacteriana.
- Diagrama de espectroscopia infrarroja de celulosa para comparación de pureza de celulosa bacteriana obtenida.

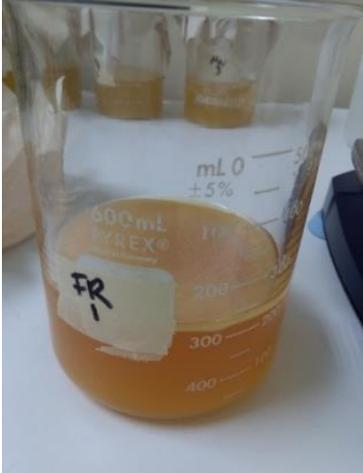
3.2 INSTRUMENTOS

3.2.1 Equipo e instrumentos

TABLA 3. Instrumentos y equipo utilizado.

Cantidad	Instrumento /Equipo	Descripción	Imagen
2	Estufa	Estufa Velp Scientifica con agitador magnético y placa cerámica que es resistente a corrosión. Rango: 0 a 400°C	

Cantidad	Instrumento /Equipo	Descripción	Imagen
1	Balanza Analítica	Balanza Mettler Toledo modelo AB204. Rango: 10 mg a 210 g Incerteza: ± 0.00005 g	
1	Incubadora	Incubadora Lab-Line modelo 100. Con convección por gravedad Rango: 20 a 60°C	
1	Horno	Horno VWR de Convección por gravedad. Mecanismo de calentamiento por 3 lados. Rango: 70 a 230°C	
1	Autoclave	Autoclave Gemmy Co modelo TC-406 de acero inoxidable. Tiempo de calentamiento: 30 min para 121°C Rango: 121-132°C 1.2 a 2.0 kg/cm ²	

Cantidad	Instrumento /Equipo	Descripción	Imagen
1	Campana	Campana para seguridad biológica Thermo. Serie 1300, clase II, tipo A2. De acero inoxidable.	
1	Espectrómetro Infrarrojo	Espectrómetro FT-IR PerkinElmer modelo 100.	
1	Potenciometro	Rango medición: -2.00 – 16.00 Temperatura medición: -5 – 110°C Incerteza: ± 0.05 pH	
1	Espátula	Utilizada para remover la celulosa del medio.	
15	Beakers 500 ml	Recipientes con las mismas dimensiones para contener el medio. Incerteza: ± 25 ml	

Cantidad	Instrumento /Equipo	Descripción	Imagen
15	Beakers 100 ml	Recipientes para purificar la celulosa Incerteza: ± 5 ml	
5	Frascos 1000 ml	Frascos para preparación del medio y esterilización	
1	Pipeta 10 ml	Para medir solución de inoculación. Incerteza: ± 0.05 ml	
1	Pipeteador	Para utilizar con las pipetas.	
1	Termómetro	Medición de temperatura de medio. Rango: -20 a 110°C Incerteza: $\pm 0.5^\circ\text{C}$	

Fuente: elaboración propia (2018).

3.2.2 Reactivos utilizados en la metodología

- Experimento No. 1

TABLA 4. Composición del medio HS.

Compuesto	g/L
Fuente de carbono	20
Peptona	5
Extracto de Levadura	5
Na ₂ HPO ₄	2.7
Ácido Cítrico	1.15

Fuente: Hestrin & Schramm (1954).

TABLA 5. Composición de fuentes de carbono utilizadas en medio HS.

Compuesto	g/L
Manitol	20
Fructosa	20
Glucosa	20
Sacarosa	20
Maltosa	20

Fuente: elaboración propia (2018).

Los reactivos utilizados en el Experimento No. 1 fueron los siguientes. Tomando en cuenta que la cantidad de medio utilizada por muestra fue de 225 ml y que se trabajó en triplicado.

TABLA 6. Cantidad de reactivos utilizados en el experimento No. 1.

Materiales	Cantidad	Unidad
Manitol	13.50	g
Fructosa	13.50	g
Glucosa	13.50	g
Sacarosa	13.50	g
Maltosa	13.50	g
Peptona	33.75	g
Extracto de Levadura	33.75	g
Na ₂ HPO ₄	18.23	g
Ácido Cítrico	7.76	g
NaOH 0.5 M	1.00	L

Fuente: elaboración propia (2018).

- **Experimento No. 2**

A continuación, se muestra la cantidad de glucosa utilizada por muestra según la concentración utilizada.

TABLA 7. Variación de concentración de glucosa en medio HS.

Cantidad Glucosa (g/L)	g por 90 ml
60	5.4
70	6.3
80	7.2
90	8.1
100	9

Fuente: elaboración propia (2018).

Además, se muestra la cantidad total de reactivos considerando que se trabajó con un volumen menor de 90 ml de medio por muestra debido a la menor disponibilidad de glucosa.

TABLA 8. Cantidad de reactivos utilizados en el experimento No. 2.

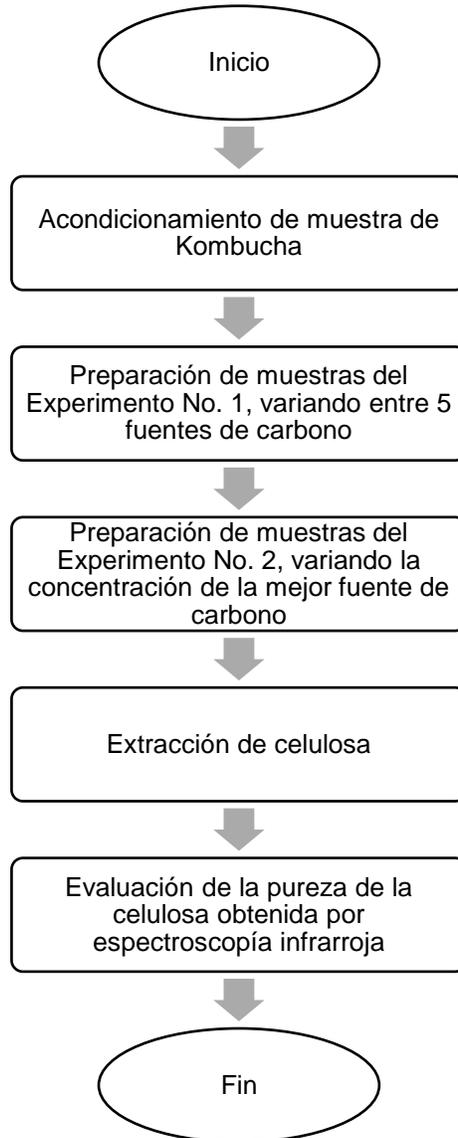
Materiales	Cantidad	Unidad
Glucosa	108	g
Extracto de Levadura	13.5	g
Na ₂ HPO ₄	7.29	g
Ácido Cítrico	3.105	g
NaOH 0.5 M	1	L

Fuente: elaboración propia (2018).

3.3 PROCEDIMIENTO

En el procedimiento descrito a continuación busca determinar las condiciones donde se obtiene un mayor rendimiento de celulosa bacteriana al utilizar como inóculo Kombucha que contiene varias bacterias productoras de celulosa. A continuación, se muestra el procedimiento general describiendo todos los pasos que se realizaron.

DIAGRAMA 1. *Procedimiento general.*

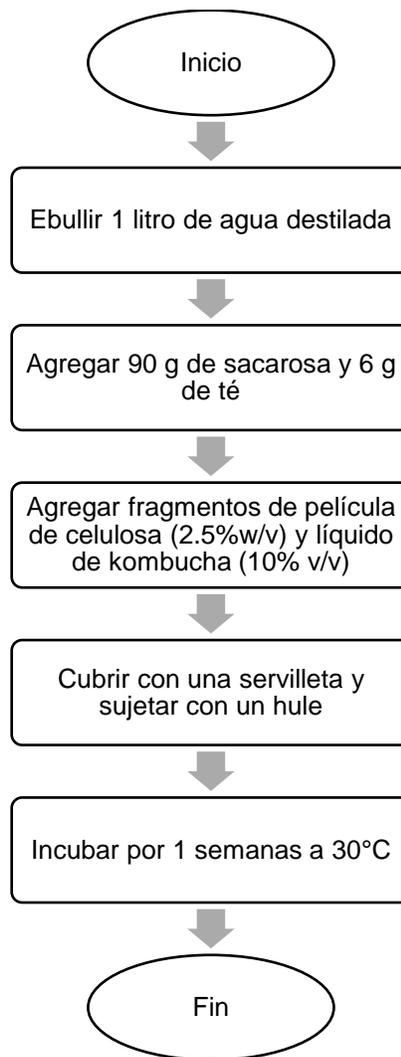


Fuente: elaboración propia (2018).

3.3.1 Acondicionamiento de muestra de Kombucha

Para la solución de inoculación se utilizó una mezcla de 5 variaciones de Kombucha, donde tres de las variaciones fueron producidas personalmente y las otras dos variaciones son de origen comercial, producidas por Mother Nature Foods. Las variaciones fueron té verde con fresa y limón, té verde con cardamomo, té negro con naranja, té verde con jazmín, y te negro. Las 5 variaciones se mezclaron en condiciones equitativas. Cada muestra de kombucha se mantiene cada semana con el procedimiento descrito a continuación:

DIAGRAMA 2. Procedimiento de acondicionamiento de Kombucha.

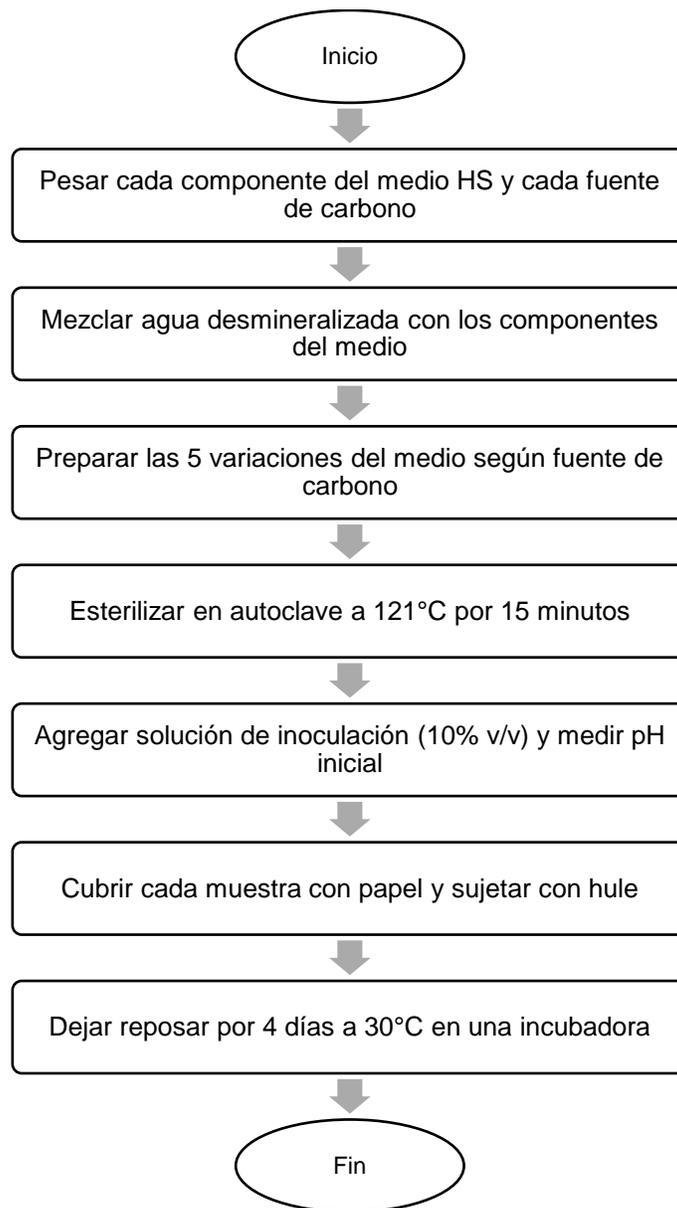


Fuente: elaboración propia (2018).

3.3.2 Preparación de muestras del experimento No. 1

En el experimento No. 1, se determinó la mejor de 5 fuentes de carbono que fueron sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y manitol. En beakers de 500 ml con las mismas dimensiones se agrega el medio Hestrin Schramm (HS) y parte de la solución de inóculo (10% v/v). Todas las muestras se deben preparar en condiciones estériles para evitar la presencia de microorganismos no deseados. Por lo que se esterilizó el medio y los recipientes en un autoclave por 15 minutos a 121 °C. Las muestras se deben mantener en un lugar sin iluminación directa, preferiblemente en oscuridad, y con un buen flujo de aire.

DIAGRAMA 3. Procedimiento de preparación de muestras para el experimento No. 1.

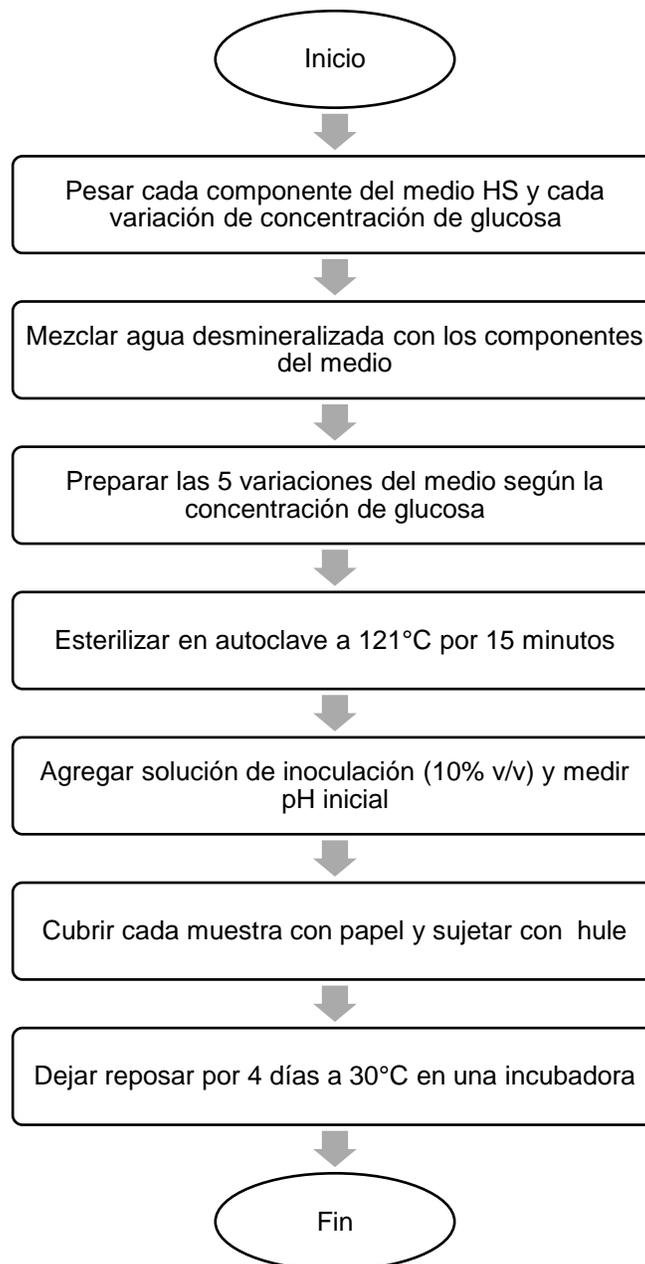


Fuente: elaboración propia (2018).

3.3.3 Preparación de muestras del experimento No. 2

En el experimento No. 2, se determinó la mejor concentración de glucosa en un rango de 60 a 100 g/L. En beakers de 500 ml con las mismas dimensiones se agrega el medio Hestrin Schramm (HS) y parte de la solución de inoculo (10% v/v). Todas las muestras se deben preparar en condiciones estériles para evitar la presencia de microorganismos no deseados. Por lo que se esterilizó el medio y los recipientes en un autoclave por 15 minutos a 121 °C. Las muestras se deben mantener en un lugar sin iluminación directa, preferiblemente en oscuridad, y con un buen flujo de aire.

DIAGRAMA 4. Procedimiento de preparación de muestras para el experimento No. 2.

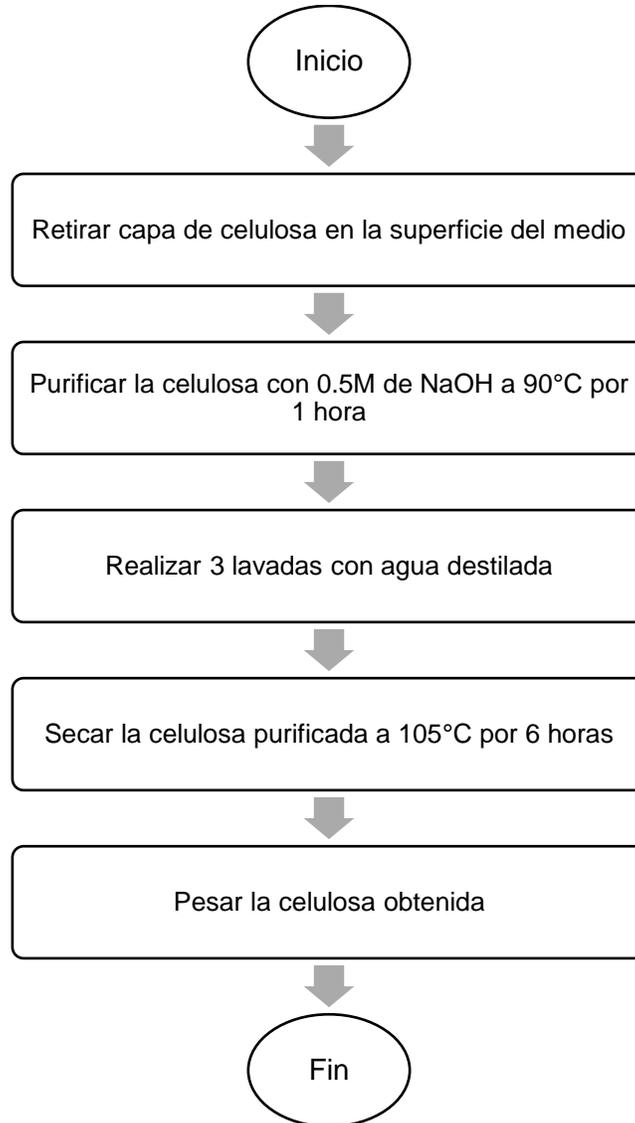


Fuente: elaboración propia (2018).

3.3.4 Extracción de celulosa

Al finalizar la fermentación después de 4 días, se retiró la capa de celulosa formada en la superficie del medio. Luego se purificó con hidróxido de sodio para separar células de otros componentes orgánicos que se encuentran adheridas a la celulosa. Para esto la celulosa en NaOH 0.5 M se calentó por 1 hora a 90°C. Y luego se realizó tres lavadas con agua destilada. La celulosa purificada se secó en un horno a 105°C y pesó la celulosa obtenida.

DIAGRAMA 5. Procedimiento de la extracción y purificación de celulosa.



Fuente: elaboración propia (2018).

3.4 DISEÑO Y METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.4.1 Localización

Laboratorio de Concalidad en el Campus Central de la Universidad Rafael Landívar, ubicado en Vista Hermosa III, zona 16 de la Ciudad de Guatemala.

3.4.2 Diseño experimental

Se efectuaron dos experimentos. Todas las pruebas se realizaron en triplicado. En los dos experimentos la única condición que se varió fue la fuente de carbono utilizada y su concentración.

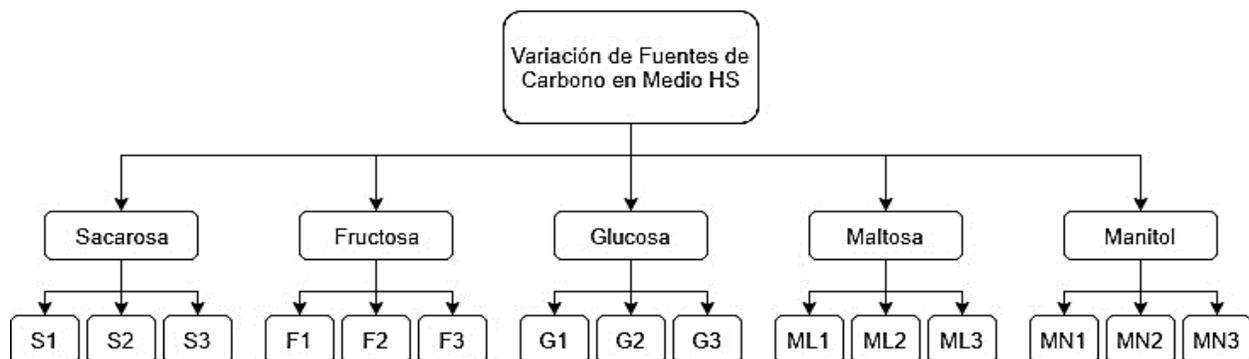
Las variables que se mantuvieron constantes en los dos experimentos tenían los siguientes valores:

- Tiempo de incubación: 4 días
- Temperatura de incubación: 30°C
- pH inicial: 3.5
- Tamaños de recipientes: 500 ml
- Concentración de peptona: 5 g/L
- Concentración de extracto de levadura: 5 g/L
- Concentración de Na₂HPO₄: 1.9035 g/L

a) Experimento No. 1

Todos los componentes del medio HS permanecieron constantes, la única variación fue la fuente de carbono utilizada. Pero las cinco fuentes de carbono se agregaron en la misma concentración, de 20 g/L.

DIAGRAMA 6. Esquematización de las muestras y sus repeticiones en el experimento No. 1.

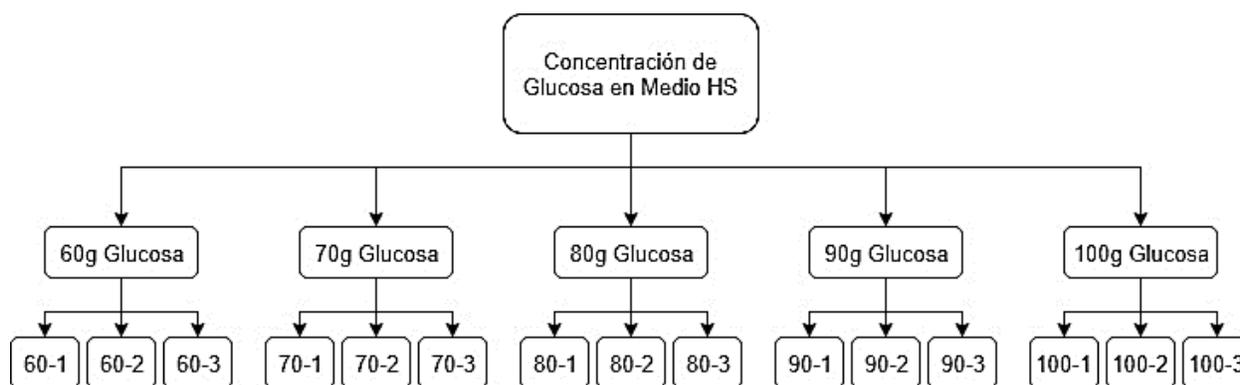


Fuente: elaboración propia (2018).

b) Experimento No. 2

En el medio HS solo se varió la concentración de glucosa. Para la cantidad de los demás componentes del medio HS se mantuvieron constantes.

DIAGRAMA 7. Esquematización de las muestras y sus repeticiones en el experimento No. 2.



Fuente: elaboración propia (2018).

3.4.3 Descripción de las unidades experimentales

- **Experimento No. 1:** la celulosa bacteriana obtenida al variar entre 5 fuentes de carbono en medio Hestrin Schramm.
- **Experimento No. 2:** la celulosa bacteriana obtenida al variar la concentración de la mejor fuente de carbono de las cinco utilizadas.
- **Evaluación de la pureza de la celulosa obtenida:** la celulosa bacteriana purificada y seca, comparada con el espectro teórico de la celulosa.

3.4.4 Variable respuesta

TABLA 9. Experimentos realizados y su variable respuesta.

Experimento	Variable respuesta
Experimento No. 1 Variación entre cinco fuentes de carbono	Porcentaje de rendimiento de la celulosa bacteriana seca obtenida
Experimento No.2 Variación de concentración de mejor fuente de carbono	Porcentaje de rendimiento de la celulosa bacteriana seca obtenida
Evaluación de pureza de la celulosa obtenida	Espectro infrarrojo de la celulosa bacteriana obtenida

Fuente: elaboración propia (2018).

3.4.5 Metodología de análisis

En ambos experimentos se midió el rendimiento de celulosa bacteriana producida en base de la cantidad de fuente de carbono presente en el medio. El peso de celulosa bacteriana es aquel obtenido después del proceso de secado.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso de celulosa bacteriana } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Concentración de fuente de carbono } \left(\frac{g}{L}\right)} * 100$$

Para determinar si había una diferencia significativa entre los resultados de rendimiento de todas las muestras del Experimento No. 1 y del Experimento No. 2 se utilizó un análisis ANOVA de un factor, que se utiliza para chequear si las medias de dos o más grupos son significativamente diferentes. Las fórmulas utilizadas en el análisis son.

Para calcular la media del rendimiento de celulosa entre las muestras y la población total:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

\bar{x} = media aritmética

x_i = valores

n = número de datos

Para la suma de cuadrados entre los grupos, comparando la media de cada muestra con la media total:

$$SC_{Entre} = n_1(\bar{x}_1 - \bar{x}_T)^2 + n_2(\bar{x}_2 - \bar{x}_T)^2 + \dots + n_k(\bar{x}_k - \bar{x}_T)^2$$

n_i = número de datos en cada muestra

\bar{x}_i = media de cada muestra

\bar{x}_T = media total de la población

Para la media cuadrada entre los grupos, la suma de cuadrados se divide entre los grados de libertad:

$$MC_{Entre} = \frac{n_1(\bar{x}_1 - \bar{x}_T)^2 + n_2(\bar{x}_2 - \bar{x}_T)^2 + \dots + n_k(\bar{x}_k - \bar{x}_T)^2}{k - 1}$$

n_i = número de datos en cada muestra

\bar{x}_i = media de cada muestra

\bar{x}_T = media total de la población

k = número de muestras

Para la suma de cuadrados dentro de los grupos, se suma las sumatorias de la desviación de cada dato de la muestra con su media:

$$SC_{Dentro} = \sum_i^n (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum_i^n (x_{i2} - \bar{x}_2)^2 + \dots + \sum_i^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2$$

n = número de datos en cada muestra

x_{ij} = datos en cada muestra

\bar{x}_i = media de cada muestra

Para la media cuadrada dentro de los grupos, la suma de cuadrados dentro de los grupos se divide por la población menos el número de muestras:

$$MC_{Dentro} = \frac{\sum_i^n (x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum_i^n (x_{i2} - \bar{x}_2)^2 + \dots + \sum_i^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2}{N - k}$$

n = número de datos en cada muestra

x_{ij} = datos en cada muestra

\bar{x}_i = media de cada muestra

N = cantidad en población

k = número de muestras

Para calcular el estadístico F se utiliza las medias cuadradas entre y dentro de los grupos:

$$F = \frac{MC_{Entre}}{MC_{Dentro}}$$

MC_{Entre} = media cuadrada entre los grupos

MC_{Dentro} = media cuadrada dentro de los grupos

Si el estadístico F es mayor que la F crítica, entonces se puede rechazar la hipótesis nula. También se puede rechazar si el valor p es mayor que el nivel de significancia (α).

Según los datos obtenidos del espectro infrarrojo de la celulosa bacteriana se logró calcular el Índice de Cristalinidad Total:

$$IC = \frac{A_{1372}}{A_{2900}}$$

A_{1372} = Absorbancia a 1472 cm^{-1}

A_{2900} = Absorbancia a 2900 cm^{-1}

El Índice de Orden Lateral:

$$IC = \frac{A_{1430}}{A_{893}}$$

A_{1430} = Absorbancia a 1430 cm^{-1}

A_{893} = Absorbancia a 893 cm^{-1}

Y la energía de puentes de hidrógeno:

$$E_H = \left(\frac{1}{K}\right) \left(\frac{v_0 - v}{v_0}\right)$$

v_0 = Frecuencia estándar correspondientes a los grupos OH libres (cm^{-1})

v = Frecuencia de los grupos OH enlazados (cm^{-1})

$K = 1.6 \times 10^{-2} \text{ Kcal}^{-1}$

Para la comparación de valores del espectro infrarrojos de la celulosa bacteriana obtenida y espectro teórico de la celulosa se calculó un porcentaje de error.

$$\%Error = \frac{cm^{-1} Teórico - cm^{-1} Experimental}{cm^{-1} Teórico} * 100$$

$cm^{-1} Teórico$ = frecuencia del espectro teórico

$cm^{-1} Experimental$ = frecuencia del espectro experimental

4 PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

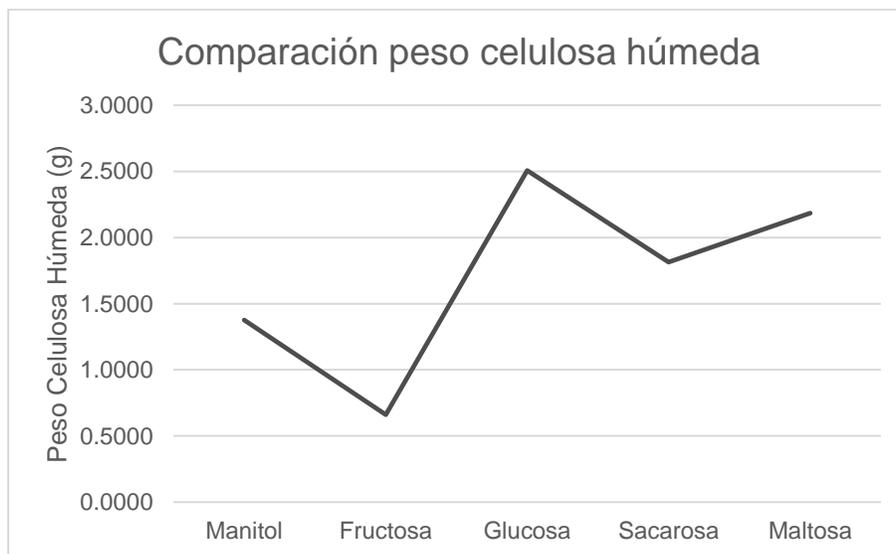
4.1 VARIACIÓN DE FUENTES DE CARBONO

TABLA 10. Cantidad de CB producida según fuente de carbono y su rendimiento.

Fuente de Carbono	Peso CB Húmeda Promedio $\pm 8.66 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Seca Promedio $\pm 8.66 \times 10^{-5}$ (g)	Producción CB (g/L)	Rendimiento	Varianza
Manitol	1.3766	0.0108	$0.0433 \pm 5.64 \times 10^{-5}$	$0.2167 \pm 5.87 \times 10^{-7}\%$	3.53×10^{-6}
Fructosa	0.6607	0.0055	$0.0219 \pm 3.37 \times 10^{-5}$	$0.1093 \pm 2.49 \times 10^{-7}\%$	9.11×10^{-7}
Glucosa	2.5068	0.1079	$0.4316 \pm 4.46 \times 10^{-4}$	$2.1580 \pm 1.47 \times 10^{-5}\%$	8.20×10^{-4}
Sacarosa	1.8151	0.0214	$0.0857 \pm 9.96 \times 10^{-5}$	$0.4287 \pm 1.46 \times 10^{-6}\%$	1.03×10^{-5}
Maltosa	2.1846	0.0285	$0.1140 \pm 1.28 \times 10^{-4}$	$0.5700 \pm 2.16 \times 10^{-6}\%$	2.36×10^{-5}

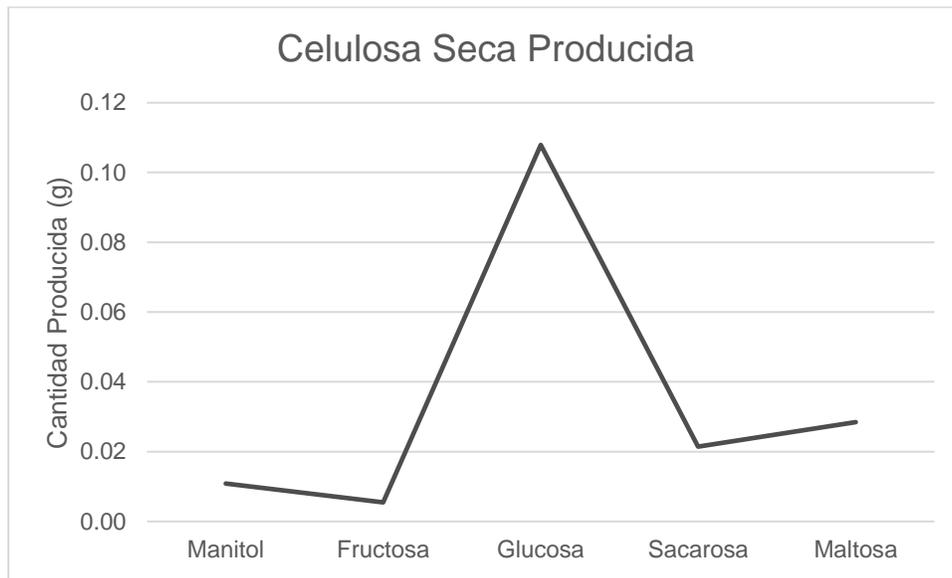
Fuente: elaboración propia (2018).

GRÁFICA 1. Comparación de CB húmeda producida por fuente de carbono.



Fuente: elaboración propia (2018).

GRÁFICA 2. Cantidad de CB seca producida según fuente de carbono.



Fuente: elaboración propia (2018).

TABLA 11. Análisis de ANOVA para el experimento No. 1.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrada	F	Valor P	F crítica
Entre Grupos	8.40×10^{-4}	4	2.10×10^{-4}	1.2227	0.3609	3.4781
Dentro de Grupos	1.72×10^{-3}	10	1.72×10^{-4}			
Total	2.56×10^{-3}	14				

Fuente: elaboración propia, 2018.

Para el análisis ANOVA de un factor se utilizó un nivel de significancia, α , de 0.05. Se puede observar que el estadístico F es menor que el valor de la F crítica, $1.2227 < 3.4781$. Por lo cual no existe diferencia significativa en el rendimiento de celulosa bacteriana entre las cinco fuentes de carbono por lo que se acepta la hipótesis nula.

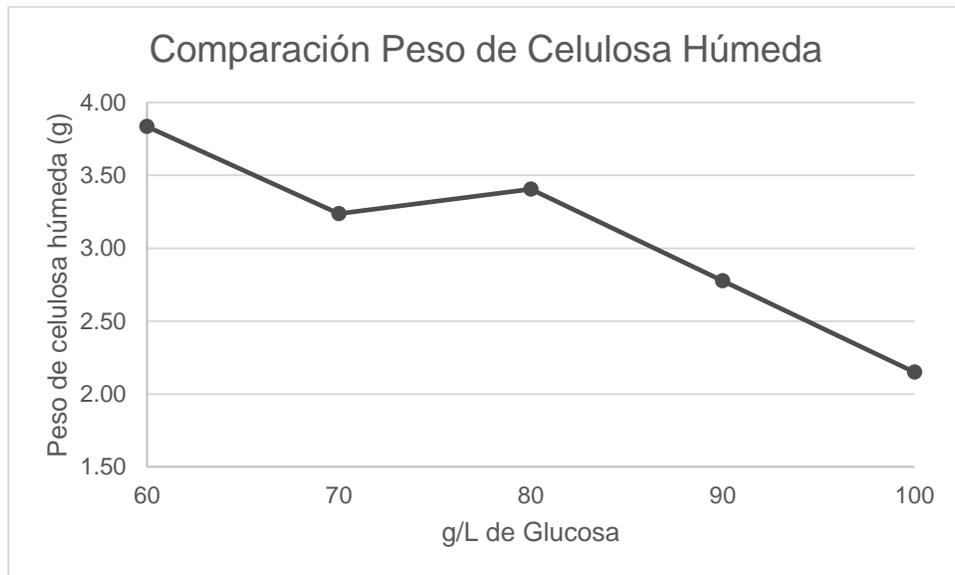
4.2 VARIACIÓN DE GLUCOSA

TABLA 12. Cantidad de CB producida según cantidad de glucosa utilizada y su rendimiento.

Contenido de Glucosa (g/L)	Peso CB Húmeda Promedio $\pm 8.66 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Seca Promedio $\pm 8.66 \times 10^{-5}$ (g)	Producción CB (g/L)	Rendimiento	Varianza
60	3.8344	0.0921	$0.9213 \pm 1.48 \times 10^{-3}$	$1.5356 \pm 2.37 \times 10^{-5}\%$	2.94×10^{-5}
70	3.2370	0.0291	$0.2907 \pm 4.83 \times 10^{-4}$	$0.4152 \pm 3.72 \times 10^{-6}\%$	4.50×10^{-6}
80	3.4042	0.0338	$0.3377 \pm 5.57 \times 10^{-4}$	$0.4221 \pm 4.05 \times 10^{-6}\%$	9.27×10^{-6}
90	2.7759	0.0286	$0.2857 \pm 4.75 \times 10^{-4}$	$0.3174 \pm 2.82 \times 10^{-6}\%$	9.16×10^{-7}
100	2.1492	0.0153	$0.1527 \pm 2.64 \times 10^{-3}$	$0.1527 \pm 1.03 \times 10^{-6}\%$	1.18×10^{-7}

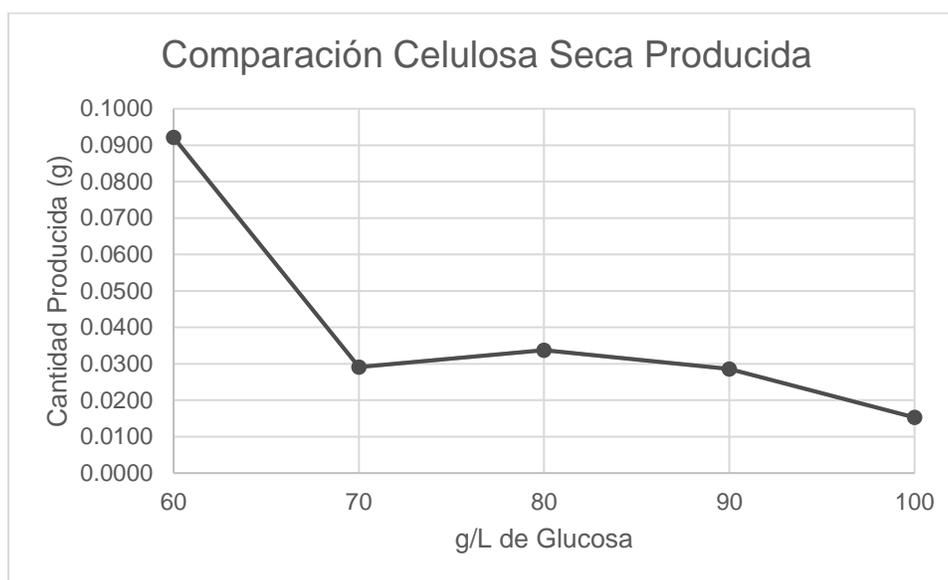
Fuente: elaboración propia (2018).

GRÁFICA 3. Comparación de CB húmeda producida y cantidad de carbón consumida.



Fuente: elaboración propia (2018).

GRÁFICA 4. Cantidad de CB seca producida por concentración de glucosa.



Fuente: elaboración propia (2018)

TABLA 13. Análisis de ANOVA para el experimento No. 2.

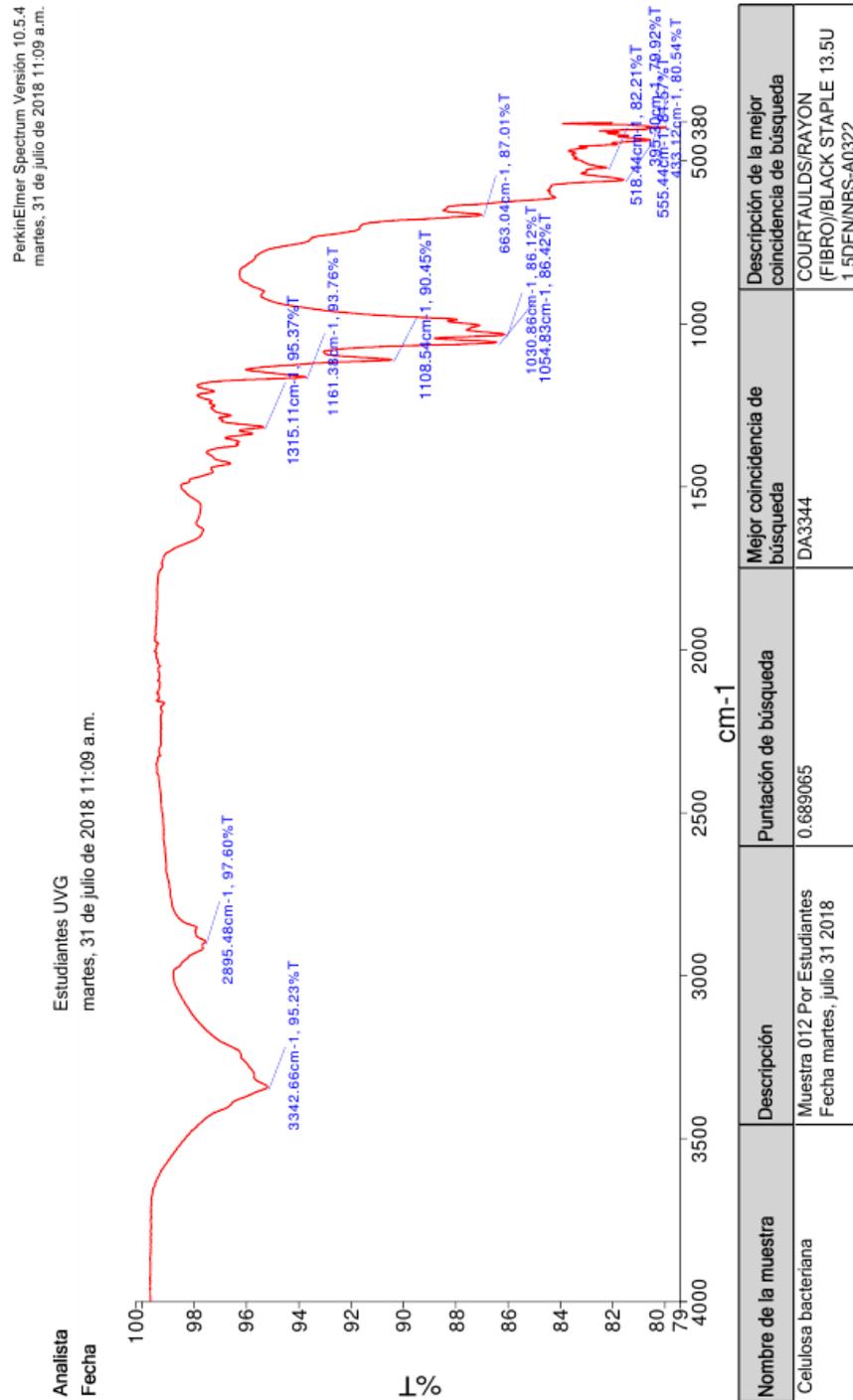
Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrada	F	Valor P	F crítica
Entre Grupos	3.65×10^{-4}	4	9.12×10^{-5}	10.3116	0.0014	3.4781
Dentro de Grupos	8.85×10^{-5}	10	8.85×10^{-6}			
Total	4.53×10^{-4}	14				

Fuente: elaboración propia (2018).

Para el análisis ANOVA de un factor se utilizó un nivel de significancia, α , de 0.05. Se puede observar que el estadístico F es mayor que el valor de la F crítica, $10.3116 > 3.4781$. Por lo cual si existe diferencia significativa en el rendimiento de celulosa bacteriana entre las cinco concentraciones de la mejor fuente de carbono por lo que se acepta la hipótesis alternativa.

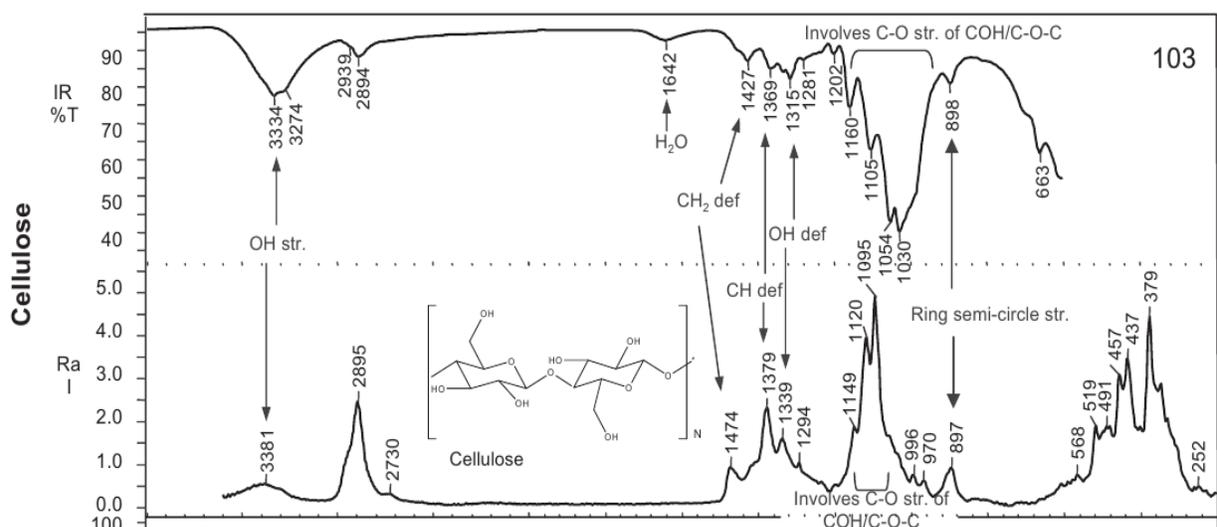
4.3 ESPECTRO INFRARROJO DE LA CELULOSA BACTERIANA

GRÁFICA 5. Espectro infrarrojo de la Celulosa Bacteriana obtenida mostrando Transmitancia vs. Frecuencia.



Fuente: UVG (2018).

GRÁFICA 6. Espectro teórico Infrarrojo y de Raman para la celulosa.



Fuente: Larkin (2011).

TABLA 14. Comparación de picos del espectro experimental con el teórico.

%T	cm ⁻¹ Experimental	cm ⁻¹ Teórico	%Error
79.92	395.30	379	4.3008%
80.54	433.12	437	0.8879%
82.21	518.44	519	0.1079%
81.57	555.44	568	2.2113%
87.01	663.04	663	0.0060%
86.12	1030.86	1030	0.0835%
86.42	1054.83	1054	0.0787%
90.45	1108.54	1105	0.3204%
93.76	1161.38	1160	0.1190%
95.37	1315.11	1315	0.0084%
97.6	2895.48	2894	0.0511%
95.23	3342.66	3334	0.2597%
		Promedio	0.7029%

Fuente: elaboración propia (2018)

TABLA 15. Índices de cristalinidad y energía de puentes de hidrógeno de la celulosa bacteriana obtenida.

	A ₁₃₇₂ /A ₂₉₀₀	A ₁₄₃₀ /A ₈₉₈	E _H
Valor	0.9877	1.0147	0.39 kJ

Fuente: elaboración propia (2018).

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 RENDIMIENTO SEGÚN FUENTE DE CARBONO UTILIZADA

En el presente trabajo se buscó determinar la mejor de cinco fuentes de carbono, con la cual se puede llegar a obtener un mayor rendimiento de producción de celulosa bacteriana. La fuente de carbono es el carbohidrato o sacárido utilizado en el medio el medio de cultivo como nutriente. En este caso el medio utilizado es el Hestrin Schramm (HS) que ha sido utilizado extensivamente para la producción de celulosa bacteriana. La única variable en el Experimento No. 1 fue la fuente de carbono utilizada mientras que el resto de las condiciones se mantuvieron constantes.

Se fuentes de carbono utilizadas fueron: sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa, y manitol. Cada variación del medio HS mantuvo las mismas concentraciones de todos sus componentes y la fuente de carbono siempre se utilizó a una concentración de 20 g/L, que es la concentración de fuente de carbono determinada inicialmente por el medio Hestrin Schramm. Además, todas las muestras se prepararon en triplicado.

El medio HS contenía 10% de una solución de inóculo. Y para asegurar la diversidad de bacterias y levaduras en la solución de inóculo, esta fue preparada de 5 variaciones de Kombucha en volumen equitativo. Donde 3 de las variaciones son producidas personalmente (las variaciones fueron de té negro, té negro con naranja, y té verde con jazmín) y las otras 2 variaciones son distribuidas comercialmente por Mother Nature Foods (de té verde con cardamomo y té verde con fresa y limón).

Al preparar cada variación del medio se aseguró la precisión de la cantidad de cada componente utilizado. Así como se aseguró la esterilidad durante el proceso para asegurar que no hubiera presencia de bacterias ajenas a la Kombucha durante la fermentación. Esto para evitar que cualquier bacteria ajena compitiera por el uso de nutrientes.

La fuente de carbono fue esterilizada separadamente, ya que altas temperaturas causan su degeneración, donde por ejemplo la glucosa es una azúcar reductora y reacciona con aminoácidos a altas temperaturas por medio de la reacción de Maillard. Por lo que se esteriliza físicamente con filtros de 0.2 micras donde se asegura que no pasan microorganismos por los poros.

El medio de cada muestra y sus triplicados se colocaron en beakers de 500 ml del mismo tamaño. Ya que la producción de celulosa bacteriana está afectada por el tamaño superficial del recipiente donde se llevó a cabo el cultivo, obteniendo un mayor rendimiento al utilizar un recipiente más grande (Goh, y otros, 2012). Esto se debe a que la película de celulosa se forma en la interfase aire-líquido por bacterias aeróbicas, por lo que a mayor área superficial hay mayor producción de celulosa bacteriana.

Pero en casos de que se use recipientes de gran profundidad, pero con poca área superficial, las células en la gran cantidad de medio producen dióxido de carbono que eventualmente se va acumulando debajo de la película. Y debido a que la parte de la inferior de la película tiene un ambiente menos aeróbico, el crecimiento celular y la formación de la película son inhibidos ya que las bacterias acéticas son aerobias estrictas.

Para todas las muestras se mantuvo el mismo tiempo de cultivo, de 4 días, a una temperatura de incubación de 30°C que es la ideal para obtener un mayor rendimiento de producción de celulosa bacteriana para bacterias presentes en la Kombucha (Nguyen, Flanagan, Gidley, & Dykes, 2008). También todas las muestras tuvieron un pH inicial de 3.5 después de la adición de la solución de inóculo.

Después de 4 días de cultivo en todas las muestras se formó una capa de celulosa en la superficie del medio, pero según la fuente de carbono utilizada la capa de celulosa variaba de color, textura y grosor. La capa de celulosa bacteriana fue removida cuidadosamente del medio y trasladada a otro recipiente. Esta celulosa bacteriana obtenida podía contener residuos del medio y material orgánico de las bacterias o levaduras. Por lo que, para purificar la celulosa, esta fue sumergida en una solución de hidróxido de sodio 0.5 M y calentada a 90°C por 1 hora. Donde el calentamiento remueve toda la materia orgánica presente en la película de celulosa.

Posteriormente la celulosa fue lavada tres veces con agua desmineralizada para remover posibles restos de materia orgánica. Por último, para remover el agua presente se secó la celulosa por 6 horas a 105°C. Donde esta temperatura asegura la evaporación del agua presente y evita la degeneración de la celulosa. La celulosa bacteriana obtenida al final de este procedimiento fue pesada y a partir de este dato se calculó el rendimiento de producción de celulosa a partir de la cantidad de fuente de carbono agregada.

A partir de estos resultados, la fuente de carbono con la que se obtiene un mayor rendimiento de producción de celulosa bacteriana fue la glucosa. De la cual se obtuvo $0.1079 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g de celulosa bacteriana seca que corresponde a una producción de $0.4316 \pm 4.46 \times 10^{-4}$ gramos por litros de medio HS, y un rendimiento de $2.3978 \pm 1.47 \times 10^{-5}\%$. Según los 4 días de fermentación se obtuvo una producción de 0.0011 g/h. El análisis de varianza muestra que no hay una diferencia significativa del rendimiento obtenidos entre las fuentes de carbono por lo que se comprueba la hipótesis nula.

Según lo observado en este estudio, donde la glucosa obtuvo una mayor producción de celulosa, se ha sugerido generalmente que la glucosa se convierte más fácilmente en ácido glucónico y ácido ceto-glucónico que acelera su producción de celulosa ya que el proceso de síntesis es más directo (Masaoka, Ohe, & Sakota, 1993) (Yamanaka, y otros, 1989). Por lo que al consumirse estos ácidos en la síntesis de celulosa se obtiene un incremento de pH al final de la fermentación en comparación a otros medios con otras fuentes de carbono.

Para otras bacterias, la presencia de estos ácidos durante la fermentación inhibe el crecimiento de celulosa. Pero como se puede observar, el mayor rendimiento obtenido al utilizar glucosa se puede deber a que las bacterias provenientes de la Kombucha no son afectadas por un pH menor.

Esto se puede deber a que la Kombucha necesita un medio ácido para poder llevar a cabo la fermentación por lo que siempre necesita un 10% de solución de inóculo que disminuye el pH del medio. Esta solución de inoculación permite un inicio rápido de la fermentación (Sievers, Lanini, Weber, Schuler-Schmid, & Teuber, 1995) y protege al medio de la formación de mohos y crecimiento de microorganismos no deseados (Frank, 1995).

Investigaciones anteriores que han utilizado medio Hestrin Schramm han registrado un mayor rendimiento de celulosa al utilizar glucosa debido a la presencia de citratos provenientes del ácido cítrico utilizado. Los citratos son productos intermedios del ciclo de Krebs que se oxidan fácilmente y se ha comprobado que son estimulantes de crecimiento de celulosa bacteriana. Esto se debe a que los citratos se oxidan primero que la glucosa, dejando a la glucosa disponible para la síntesis de celulosa (Dudman, 1959) (Schramm, Gromet, & Hestrin, 1957). Además, también funciona como buffer, manteniendo el pH en el rango óptimo para la síntesis de celulosa.

Otra sustancia presente en el medio que colabora a la fermentación, pero no a la síntesis de celulosa es el etanol. Según lo reportado por Hermann (1928), las levaduras presentes transforman la sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa en etanol, que sirve como fuente de energía para las bacterias del ácido acético que oxidan el etanol en ácido acético. Estas mismas bacterias también producen ácido láctico. Estos ácidos protegen a las levaduras de otras especies que no están adaptadas a un medio ácido.

Dependiendo de la fuente de carbono utilizado se produce una cantidad distinta de metabolitos. En el caso de la sacarosa y fructosa, estos producen la mayor cantidad de etanol, siendo mayor la producción con fructosa. Al utilizar glucosa, la cantidad de etanol producida es mínima, por lo que se obtiene una menor cantidad de ácido acético, y es otra razón por la que con esta fuente de carbono el pH final es mayor.

Al utilizar fructosa o glucosa, se obtiene la mayor cantidad de ácido láctico producido al décimo día de fermentación. Mientras que, con sacarosa, su nivel es mayor al sexto día de fermentación (Reiss, 1994).

Considerando porque las otras fuentes de carbono no tuvieron un rendimiento elevado, en el caso de la sacarosa, esta es hidrolizada en glucosa y fructosa, por lo que la síntesis de celulosa lleva un proceso más largo. Ya que después de hidrolizarse, por acción de las bacterias del ácido acético, la glucosa es convertida en ácido glucónico que se convierte eventualmente en celulosa. Mientras que la fructosa es metabolizada casi exclusivamente a ácido acético, nunca a ácido glucónico. Por lo que se puede decirse que, del contenido de sacarosa en el medio, solo un 50% procede a convertirse a celulosa mientras que la fructosa solo produce una cantidad mínima.

Esto se logró comprobar en las muestras que utilizaron fructosa como fuente de carbono. Donde la celulosa obtenida fue mínima comparada a otras fuentes de carbono. Y en un caso, la cantidad de celulosa obtenida era tan minúscula que después del proceso de calentado y lavado esta no fue cuantificable.

En el caso de la maltosa, se genera una pequeña cantidad de ácido acético. Pero igual esta fuente de carbono no es utilizada tan efectivamente como la glucosa, resultando en ser la segunda mejor.

Y el Manitol, aunque se ha reportado como la mejor fuente de carbono para la producción de celulosa con *Gluconacetobacter xylinus*, la interacción con otras bacterias presentes en la Kombucha o tal vez un medio más ácido no contribuyó a una producción elevada de celulosa.

Otra observación que se tuvo al observar las capas de celulosa formadas por cada fuente de carbono fue la gran variación del color, grosor y textura de la celulosa. Pero en el caso de la sacarosa, se obtuvo una capa gruesa sobre el medio, pero después de la purificación y secado la celulosa obtenida fue minúscula.

A partir de esto se concluyó que el grosor de la capa de la película formada en la superficie del medio no fue una buena indicación de una mayor producción de celulosa. Estos resultados sugieren que hay diferencias considerables en la densidad entre películas según el medio y el carbohidrato utilizado. Como fue comprobado por Dudman (1959) al utilizar seis medios para producir celulosa de *Acetobacter acetigenum*.

5.2 EFECTO DE CONCENTRACIÓN EN RENDIMIENTO

Después de concluir de que la glucosa era la mejor fuente de carbono. Se preparó cinco variaciones del medio HS usando distintas concentraciones de 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, y 100 g/L. Este rango fue escogido ya que usando Sacarosa con bacterias provenientes de la Kombucha se había encontrado que su concentración óptima era a 90 g/L (Goh, y otros, 2012).

Pero según lo observado por los resultados, la mayor producción de celulosa bacteriana se obtuvo al usar 60 g/L de glucosa obteniendo $0.0921 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g de celulosa seca, que indica una producción de $0.9213 \pm 1.48 \times 10^{-3}$ g/L y un rendimiento de $1.5356 \pm 2.37 \times 10^{-5}\%$. Y al usar concentraciones mayores se obtuvo un rendimiento decreciente. Según el análisis de varianza si hay una diferencia significativa entre el rendimiento obtenido a diferentes concentraciones por lo que se comprueba la hipótesis alternativa.

Aunque según los resultados encontrados en el Experimento No. 1 con glucosa a 20 g/L, se obtuvo un rendimiento de $2.1580 \pm 1.47 \times 10^{-5}\%$, lo que indica que, aunque la producción sea menor se obtiene un mayor rendimiento a una concentración menor.

Esto indica que el uso de una mayor cantidad de fuente de carbono en un medio resulta en un pH mayor, lo que inhibe la fermentación y la producción de celulosa

bacteriana (Ishihara, Matsunaga, Hayashi, & Tisler, 2002). En este caso se observó una mayor producción de celulosa al tener una menor concentración de glucosa de 60 g/L, lo que confirma esta teoría. Según los resultados obtenidos por Goh *et al.* (2012), las bacterias del ácido acético provenientes de la Kombucha son capaces de crecer y producir celulosa a un pH < 3.0, por lo que las beneficia una menor concentración con un pH bajo. Mientras que según Bergey y Holt (1994), el óptimo pH para el crecimiento de *Acetobacter* spp. es entre 5.4 y 6.3, pero que también puede ocurrir crecimiento a un pH de 4.0-4.5 y se puede dar un crecimiento mínimo a 7.0-8.0. Esta discrepancia en los resultados se puede deber a la variabilidad de la microflora presente en la Kombucha (Chen & Liu, 2000).

Una concentración de 60 g/L de glucosa equivale a 6% de presencia de una fuente de carbono en el medio. Donde al observar los resultados de Dudman (1959), obtuvo una mayor producción de celulosa en una concentración de 2% y en 5% al utilizar succinato (que se comporta similar al citrato) con *Acetobacter acetigenum*, con lo que obtuvo 0.08 g y 0.58 g de celulosa seca respectivamente después de 40 días de fermentación. Por lo que se comprueba que la glucosa produce mayor celulosa al utilizar una menor concentración de fuente de carbono.

5.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

En el espectro infrarrojo se puede observar que todas las bandas de absorción identificadoras de la celulosa observadas en el espectro teórico corresponden con las obtenidas en el espectro experimental. El porcentaje de error entre las frecuencias del espectro teórico y el experimental promedian a 0.7029%, lo que es un valor bajo que comprueba que no hay diferencia significativa y comprueba la hipótesis nula.

La banda en 1430 cm^{-1} , asignada a la vibración simétrica de flexión del grupo CH_2 , se conoce como la “banda de cristalización”, lo que indica que la celulosa obtenida tiene estructura cristalina en lugar de amorfa. La banda de absorción en 898 cm^{-1} , asignada para el alargamiento de C-O-C en enlaces β -(1→4)-glicosídicos, esta designada como una banda de absorción “amorfa”, por lo que una baja intensidad indica que la celulosa no ha tomado una forma amorfa.

La energía de puentes de hidrógeno obtenida de la muestra de celulosa bacteriana indica un alto número de puentes de hidrógeno y consecuentemente un mayor grado de cristalinidad.

La banda ancha entre 3700 y 3000 cm^{-1} , que es debido a la vibración de alargamiento del enlace -OH, provee información relevante sobre los puentes de hidrógeno. La asignación de los puentes de hidrógeno intramoleculares en O(2)H—O(6) y O(3)H—O(5), y el enlace intermolecular en O(6)H—O(3) en la estructura celular cristalina se muestran en 3410-3460 cm^{-1} , 3340-3375 cm^{-1} , y 3230-3310 cm^{-1} respectivamente (Ciolacu, Kovac, & Kokol, 2010).

Según el mayor pico obtenido en esta área en 3342.66 cm^{-1} , se observa que hay una mayor cantidad de enlaces intramoleculares entre $\text{O}(3)\text{H}-\text{O}(5)$, con una ligeramente menor cantidad de intensidad en el área $3230\text{-}3310\text{ cm}^{-1}$ indicando una menor presencia de enlaces intermoleculares entre $\text{O}(6)\text{H}-\text{O}(3)$.

Generalmente se aceptaba que, en la estructura de la celulosa vegetal, los enlaces intramoleculares de tipo $\text{O}(3)\text{H}-\text{O}(5)$ y $\text{O}(2)\text{H}-\text{O}(6)$ están presentes en ambos lados de la cadena. Es conocido y aceptado que estos puentes de hidrógeno interpretan un rol importante en determinar las propiedades conformacionales y mecánicas de la celulosa.

El alto grado de cristalinidad también se puede observar en la banda en 3342.66 cm^{-1} , donde muestras de celulosa con menor cristalinidad tienen bandas con mayor intensidad. Por lo que una banda con menor intensidad indica un mayor grado de cristalización.

También muestras de celulosa con bajo grado de cristalización, no muestran picos definidos entre 1315 cm^{-1} y 1161 cm^{-1} . Ya que la celulosa cristalina emite vibraciones más definidas en esta área resultando en picos agudos. Específicamente una celulosa amorfa no mostraría un pico en 1427 cm^{-1} que indica un enlace CH_2 , así como no se mostraría un pico en 898 cm^{-1} . Debido a esto el radio A_{1430}/A_{898} es una medida sensible del grado de cristalinidad (O'Connor, Du Pré, & Mitcham, 1958). Por lo que el valor de 1.0147 en este índice es un valor adecuado de cristalinidad ya que indica que no hay una gran diferencia de intensidad entre los dos picos ya que los dos se encuentran formados distintivamente, ya que si uno de los picos no se formara habría una menor diferencia de intensidad y el valor del índice sería menor lo que indicaría un valor bajo de cristalización.

6 CONCLUSIONES

1. La fuente de carbono en donde se obtuvo un mayor rendimiento de celulosa bacteriana fue la glucosa. Con la cual se obtuvo $0.1079 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g después de cuatro días de fermentación, que corresponde a una producción de $0.4316 \pm 4.46 \times 10^{-4}$ g/L, y un rendimiento de $2.1580 \pm 1.47 \times 10^{-5}\%$. Esto se debe a que la Glucosa se beneficia por la presencia de citratos del ácido cítrico utilizado y se convierte más fácil en ácido glucónico y ácido ceto-glucónico que resulta en un proceso de síntesis de celulosa más directo. Además, las bacterias provenientes de la Kombucha tienen resistencia a un pH menor generado por la presencia de estos ácidos.
2. Al variar la concentración de glucosa en el medio HS, se obtuvo un mayor rendimiento al utilizar la menor concentración de 60 g/L. Con lo cual se obtuvo $0.0921 \pm 8.66 \times 10^{-5}$ g después de cuatro días de fermentación, que corresponde a una producción de $0.9213 \pm 1.48 \times 10^{-3}$ g/L y un rendimiento de $1.5356 \pm 2.37 \times 10^{-5}\%$. Esto se debe a que concentraciones mayores generan un pH mayor que no favorece a la síntesis de celulosa bacteriana y las bacterias provenientes de la Kombucha crecen mejor a un pH menor de 3.
3. El espectro infrarrojo comprueba que se obtuvo celulosa de alta pureza. Esto se logró debido a que el espectro infrarrojo de celulosa bacteriana producida corresponde al espectro teórico de la celulosa. Donde todas las bandas se encuentran en la misma ubicación, con un promedio de porcentaje de error de 0.7029%. También se encontró que la celulosa bacteriana producida es cristalina y no amorfa. Lo que fue comprobado al obtener un índice de cristalinidad A_{1430}/A_{898} con valor de 1.0147, al tener un pico de baja intensidad en 898 cm^{-1} , la baja intensidad de la banda ancha en 3342.66 cm^{-1} , la presencia de picos definidos en 1315 cm^{-1} , 1161 cm^{-1} , y 1427 cm^{-1} . El pico en 3342.66 cm^{-1} muestra la predominancia de enlaces intramoleculares O(3)H—O(5) con una menor presencia de enlaces intermoleculares entre O(6)H—O(3).

7 RECOMENDACIONES

1. Encontrar la mejor combinación de fuente de carbono y fuente de nitrógeno con bacterias provenientes de la Kombucha.
2. Variar la concentración de glucosa en el medio HS usando un rango menor de 10 g/L a 60 g/L para analizar su rendimiento en concentraciones bajas.
3. Utilizar melaza hidrolizada, harina de konjac, y glicerol como fuentes de carbono con bacterias provenientes de la Kombucha.
4. Aislar la bacteria *Gluconacetobacter Kombuchae* de la Kombucha ya que es una bacteria productora de celulosa bacteriana y fijadora de nitrógeno. Y encontrar sus concentraciones óptimas de fuente de carbono y nitrógeno.
5. Determinar el pH inicial más conveniente para obtener un mayor rendimiento de celulosa bacteriana con bacterias provenientes de la Kombucha.
6. Determinar el día de fermentación con mayor producción de celulosa bacteriana y el día donde la producción finaliza.
7. Utilizar jugos de frutas que son desechados de otros procesos como fuente de carbono y de nutrientes para la producción de celulosa bacteriana.
8. Encontrar una relación entre la cantidad de fuente de carbono consumida y la celulosa bacteriana producida tomando en cuenta la evaporación al ambiente.
9. Determinar los efectos en la producción de celulosa bacteriana al adicionar citratos, acetatos, succinatos, y etanol.

8 REFERENCIAS

- Akerholm, M., Hinterstoisser, B., & Salmén, L. (2004). Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 339(3), 569-578.
- Backdahl, H., Helenius, G., Bodina, U., Nannmark, B., Jahansson, B., Risberg, P., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141-2149.
- Baker, A. A., Helbert, W., Sugiyama, J., & Miles, M. J. (1997). High-resolution atomic force microscopy of native Valonia cellulose I microfibrils. *J. Struct. Biol.*, 119, 129-138.
- Balentine, D., Wiseman, S., & Bouwens, L. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(37), 693-704.
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: Williams and Wilkins.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, H., & Kalinowska, H. (2005). Bacterial Cellulose. *Biopolymers online*.
- Blanc, P. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*(18), 139-142.
- Brown, A. J. (1986). *J. Chem. Soc.*, 49, 172.
- Brown, A. M. (1989). *Cellulose: Structural and Functional Aspects*. Ellis Horwoodide.
- Brown, R. M., Willison, J. H., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 73, 4565-4569.
- Buck, R., Rondini, S., & Covington, A. (2002). Measurement of pH. Definition, Standards, and Procedures. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 2169-2200.
- Bunn, H. F., & Higgins, P. J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213, 222-224.
- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307-335.
- Carreño, L. (2011). *Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química, Bogotá.

- Carreño, L., & Caicedo, L. (2005). Producción de Membranas de Celulosa Bacteriana a Partir de Diferentes Fuentes de Carbono. *Memorias, II Simposio sobre Biofábricas*.
- Changjin, S., Chung, S., Lee, J., & Kim, S. (2002). Isolation and Cultivation Characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 Producing Bacterial Cellulose in Shaking cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 12(5), 722-728.
- Chávez-Pacheco, J. L., Martínez-Yee, S., Contreras-Zentella, M., & Escamilla-Marván, E. (2004). Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 18-25.
- Chawla, P., Bajaj, I., Survase, S., & Singhal, R. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107-124.
- Chen, C., & Liu, B. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 834-839.
- Chojnacka, K. (2010). *Chemical Engineering and Chemical Process Technology: Fermentation Products*. EOLSS Publications. Obtenido de <http://www.eolss.net/sample-chapters/c06/e6-34-09-09.pdf>
- Ciolacu, D., Kovac, J., & Kokol, V. (2010). The effect of the cellulose-binding domain from *Clostridium cellulovorans* on the supramolecular structure of cellulose fibers. *Carbohydrate Research*, 345, 621-630.
- Dudman, W. F. (1959). Cellulose Production by *Acetobacter acetigenum* and other *Acetobacter* spp. *J. gen. Microbiol*, 21, 312-326.
- Dudman, W. F. (1959). Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium. *J. gen. Microbiol.*, 327-337.
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Res. Int.*, 33, 409-421.
- Duvey, V., Saxena, L., Singh, L., Ramana, K., & Chauhan, R. (2002). Pervaporation of binary water - ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 27(3), 163-171.
- Ellis, F. W., & Krantz, J. C. (1941). Sugar alcohols: Metabolism and toxicity studies with mannitol and sorbitol in man and animals. *J. Biol. Chem.*, 141, 147-154.
- El-Salam, S. (2004). 16S rRNA gene sequenc detection of acetic acid baceria isolated from tea kombucha. *BMC Bioinforma*, 5, 113.
- Fan, M., Dai, D., & Huang, B. (2012). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres*. Brunel University, Department of Civil Engineering. London, PR China: Fujian Agricultural and Forestry University.

- Fontana, J., De Souza, A., Fontana, C., Torriani, I., Moreschi, J., & Gallotti, B. (1990). Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25(1), 253-264.
- Frank, G. W. (1995). *Kombucha - Healthy beverage and natural remedy from the Far East* (9va ed.). Austria: Wilhelm Ennsthaler.
- Frants, E., & Schiebold, E. (1943). *J. Makromol. Chem*, 1, 4.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (19 de Julio de 2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7).
- Global Market Insights. (2017). *Cellulose Fibers Market Size by Application, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast*. Ocean View, DE.
- Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., & Bhat, R. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19(1), 109-117.
- Gomez, F. (2011). Carbon Source. En M. Gardaud, R. Amils, J. Cernicharo, J. Cleavesll, W. Irvine, D. Pinti, & M. Viso, *Encyclopedia of Astrobiology*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Grand View Research. (2018). *Kombucha market size, share & trends analysis report by flavor, distribution channel, region, and segment forecasts, 2018-2025*. Obtenido de <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/kombucha-market>
- Hara, Y., Luo, S., Wickremaishinghe, R., & Yamanishi, T. (1995). Biochemistry of processing black tea. *Food Reviews International*(11), 457-471.
- Hermann, S. (1928). Über die sogenannte 'Kombucha'. *Biochem. Zeitschrift*, 192, 176-199.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum: Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2).
- Hong, F., & Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain Acetobacter aceti ssp. xylinus ATCC 23770. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545-549.
- Hyvonen, L., & Koivistoinen, P. (1982). Fructose in Food Systems. *Nutritive Sweeteners*, 133-144.

- IARNA. (2012). *Análisis sistémico de la deforestación en Guatemala y propuesto de políticas para revertirla*. Guatemala: Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA), URL.
- Iguchi, M., & Yamanaka, S. (1997). Industrial use of bacterial cellulose - a review. *Proc. Int. Workshop Green Polym. Bandung-Bogor*, 47-54.
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35, 261-270.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., & Tisler, V. (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 986-991.
- IUPAC. (1996). *Green Book* (2da. ed.).
- Jesus, E. G., Andres, R. M., & Magno, E. T. (1971). A study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse texture nata. *Philipp. J. Sci.*, 100, 41-52.
- Jonas, R., & Farah, L. (1998). Production and applications of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 101-106.
- Keshk, S., & Sameshima, K. (2005). Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology*, 4(6), 478-482.
- Kim, D., Nishiyama, Y., & Kuga, S. (2002). Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 9, 361-367.
- Klein, D. W., Lansing, M., & Harley, J. (2006). *Microbiology* (6ta. ed.). New York: McGraw-Hill.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie*, 44, 3358-3393.
- Klemm, D., Schmauder, H., & Heinz, T. (2002). *Bacterial cellulose in Biopolymers: Polysaccharides from prokariots* (Vol. 5). (A. Steinbüchel, Ed.) Wiley.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603.
- Kondagula, F., & Molt, K. (2009). Infrared Spectrometric Purity Control of Organic Liquids and Water. *Clean*, 37(12), 955-962.
- Kondagula, F., & Molt, K. (2010). *Infrared Spectrometric Purity Control of Chemical Substances using R*. Universität Duisburg-Essen, Department of Chemistry, Duisburg, Germany. Obtenido de <https://www.r-project.org/conferences/useR-2010/abstracts/Kondagula+Molt.pdf>

- Kontturi, E. (2015). *Cellulose: structure, morphology, and crystalline forms*. Aalto University, School of Chemical Engineering.
- Kotrba, P., Inui, M., & Yukawa, H. (2001). Bacterial Phosphotransferase System (PTS) in Carbohydrate Uptake and Control of Carbon Metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 502-517.
- Kruger, N. J., & Von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 236-246.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., & Wiktorowska-Jeziarska, A. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29, 189-195.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2012). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333-335.
- Larkin, P. (2011). *Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Oxford: Elsevier.
- Liu, C., Hsu, W., Lee, F., & Liao, C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol.*, 13, 407-415.
- Lowenstein, J. (1969). *Methods in Enzymology, Volume 13: Citric Acid Cycle*. Boston: Academic Press.
- Lunn, J. E. (2008). Sucrose Metabolism.
- Maneerung, T., Tokura, S., & Rujiravanit, R. (2008). Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 43-51.
- Mark, H., & Susich, G. B. (1929). Über den Bau des kristallisierten Anteils der Cellulose III. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 4, 431.
- Market Research Reports. (2018). *Forecast of global microbial and bacterial cellulose market 2023*. Lewes, DE. Obtenido de <http://www.sbwire.com/press-releases/global-microbial-and-bacterial-cellulose-market-will-grow-at-a-cagr-148-and-reach-usd-570-million-by-2023-from-usd-250-million-in-2017-1020458.htm>
- Marx-Firgini, M., & Pion, B. (1974). Kinetic investigations of biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 338(2), 382-393.
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18-22.
- Mayser, P., Fromme, S., Letzmann, C., & Grunder, K. (1995). The yeast spectrum of the tea fungus kombucha. *Mycoses*, 38, 289-295.

- Mikkelsen, D., Flanagan, B., Dykes, G., & Gidley, M. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xilinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.*, *107*, 576-583.
- Miller, T., & Churchill, B. (1986). Substrates for large-scale fermentations in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Amer. Soc. Microbiol.*, 122-136.
- Nakayama, A., Kakugo, A., Gong, J., Osada, Y., Takai, M., Erata, T., & Kawano, S. (2004). High Mechanical Strength Double-Network Hydrogel with Bacterial Cellulose. *Advanced Functional Materials*, *14*(11), 1124-1128.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H., & Yoshinaga, F. (1998). Effects of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *85*(6), 598-603.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. USA: Worth Publishers.
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Curr Microbiol*, *57*, 449-453.
- O'Connor, R. T., Du Pré, E. F., & Mitcham, D. (1958). Applications of Infrared Absorption Spectroscopy to Investigations of Cotton and Modified Cottons. *Textile Research Journal*, *28*(5), 382-392.
- Oikawa, T., Ohtori, T., & Ameyama, M. (1995). Production of Cellulose from D-Arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *59*(8), 1564-1565.
- O'Sullivan, A. (1997). Cellulose: The structure slowly unravels. *Cellulose*, *4*(3), 173-207.
- O'Sullivan, C. (1872). On the transformation-products of starch. *Journal of the Chemical Society*, *25*(1872), 579-588.
- Pacheco, C., Yee, M., Zentella, C., & Marván, E. (2017). Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter Xylinum*: Biosíntesis y Aplicaciones. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químicas-Biológicas*.
- Pettersen, R. C. (1984). The Chemical Composition of Wood. *Advances in Chemistry*, *207*.
- Plaxton, W. C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, *47*, 185-214.
- Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol*, *28*, 253-240.
- Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*(198), 258-261.

- Ring, G. J. (1982). *Cellulose and Other Natural Polym. System.* (R. M. Brown, Ed.) New York: Plenum.
- Roche, J. (1998). *The history and spread of Kombucha.* Obtenido de <http://users.bestweb.net/~om/~kombu/roche.html>
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. *Microbiol Rev.*, 55(1), 35-58.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., . . . Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279-281.
- Schramm, M., Gromet, Z., & Hestrin, S. (1957). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: Substrates and inhibitors. *Biochem. J.*, 67, 669.
- Shah, J., & Brown, M. (2005). Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 353-355.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., & Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*(18), 590-594.
- Tashiro, K., & Kobayashi, M. (1991). Theoretical Evaluation of Three-Dimensional Elastic Constants of Native and Regenerated Celluloses: Role of Hydrogen Bonds. *Polymer*, 32, 1516-1526.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Beppu, T., & Horinouchi, S. (1996). Characterization of the Biosynthesis Pathway of Cellulose from Glucose and Fructose in *Acetobacter xylinum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(8), 1377-1379.
- Trovatti, E., Serafim, L., Freire, C., Silvestre, A., & Neto, C. (2011). *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydr. Polym.*, 86, 1417-1420.
- Valla, S., & Kjosbakken, J. (1982). Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *Microbiology*, 128, 1401-1408.
- Valla, S., Coucheron, D. H., Fjaervik, E., Kjosbakken, J., Weinhouse, H., Ross, P., . . . Benziman, M. (May de 1989). Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Molecular and General Genetics*, 217(1), 26-30.
- Vandamme, E., De Baets, S., Vanbalaen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 93-99.

- Williams, W. S., & Cannon, R. E. (1989). Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2448.
- Yamada, Y., Hoshino, K., & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1244-1251.
- Yamanaka, S., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (2000). Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, 7, 213-225.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141-3125.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). Research Progress in production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its application as a New Industrial Material. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 61(2), 219-224.

9 ANEXOS

9.1 ABREVIATURAS

Medio HS	Medio Hestrin Schramm
ufc	Unidad Formadora de Colonias
CB	Celulosa Bacteriana
GPa	Gigapascal
Å	Ångström
µm	Micrómetro
UDP	Uridina Difosfato
UDPG	Uridina Difosfato Glucosa
nm	Nanómetro
IR	Infrarrojo
SC	Síntesis de Celulosa
UGP	Pirofosforilasa UDPGlc
Glc-1-P	Glucosa-1-Fosfato
PGM	Fosfoglucomutasa
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
GQ	Glucoquinasa
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PGA	Ácido 6-fosfogluconico
PGI	Fosfoglucoisomerasa
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfato
FQ	Fructoquinasa
PTS	Sistema fosfotransferasa
Fru-1-P	Fructosa-1-fosfato
IPFK	Fructosa-1-fosfato quinasa
Fru-bi P	Fructosa-1,6-bi-fosfato
FBP	Fructosa-1,6-bi-fosfato fosfatasa
Acetil CoA	Acetil coenzima A
PEP	Fosfoenolpiruvato
IR	Infrarrojo
IC	Índice de cristalización
XRD	Difracción de rayos X
RMN	Resonancia nuclear magnética
a/b	Índice de asimetría
Kcal	Kilocalorías

9.2 GLOSARIO

Aminoácido	Un aminoácido es un compuesto orgánico que contiene un grupo amina (NH ₂) y un grupo carboxilo (COOH). Los aminoácidos son la base de las proteínas.
Amorfo	Amorfo es un adjetivo que hace referencia a aquello que carece de una forma fija o estable.
Bacterias del ácido acético	Las bacterias del ácido acético son un grupo de bacterias Gramnegativas que oxidan azúcares o etanol y producen ácido acético durante la fermentación.
Biopolímero	Los biopolímeros son macromoléculas sintetizadas por seres vivos. Que también incluyen materiales biocompatibles con el ser vivo.
Celulosa Bacteriana	La celulosa bacteriana es un compuesto orgánico con fórmula (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n producida por ciertos tipos de bacterias.
Celulosa Vegetal	La celulosa vegetal es un polisacárido que es un importante componente estructural de la pared celular de las plantas y varias formas de algas.
Cepa	Una cepa es una población de células de una sola especie descendientes de una única célula. Es un rango taxonómico de bajo nivel usado dentro de una especie.
Citosol	El citosol es el líquido que se encuentra dentro de las células y que constituye la mayoría del fluido intracelular.
Citrato	Un citrato es la sal del ácido cítrico. Es el primer compuesto intermedio del ciclo de Krebs, formado por la condensación entre el acetil-CoA y el oxalacetato.
Cultivo estático	Un cultivo estático donde no hay movimiento del líquido del medio durante la fermentación, por lo que el medio permanece en la misma posición.
Disacárido	Un disacárido es un tipo de glúcido formado por la condensación (unión) de dos monosacáridos mediante un enlace O-glucosídico.

Enzima	Las enzimas son catalizadores biológicos macromoleculares. Las enzimas aceleran las reacciones químicas.
Espectroscopía	La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante.
Fibrillas	Las fibrillas son materiales biológicos estructurales que se encuentran en casi todos los organismos vivos. Las fibrillas tienden a tener diámetros alrededor de 10-100 nanómetros.
Fosforilación	La fosforilación es la adición de un grupo fosfato a cualquier otra molécula. En el metabolismo, es el mecanismo básico de transporte de energía.
Fuente de Carbono	Fuente de carbono se refiere a cualquier molécula que contenga carbono (carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, dióxido de carbono) que es utilizada por el organismo para la síntesis de sus moléculas orgánicas.
Hexosa	Las hexosas son monosacáridos formados por una cadena de seis átomos de carbono. Su fórmula general es $C_6H_{12}O_6$. Su principal función es producir energía.
In vitro	Los estudios in vitro son los realizados con microorganismos, células, o moléculas biológicas fuera de su contexto biológico. Los estudios se realizan tradicionalmente en equipo de laboratorio como tubos de ensayo, frascos, y placas Petri.
Isómero	Isómeros son moléculas que tienen la misma fórmula química pero sus átomos se encuentran ordenados de forma distinta, produciendo propiedades físicas y químicas diferentes.
Konjac	Konjac es el nombre común de una planta asiática con el nombre <i>Amorphophallus konjac</i> que tiene un bulbo comestible.
Kombucha	La Kombucha es una bebida fermentada de té negro o verde, ligeramente alcohólica, levemente

efervescente, y dulce. Es tomada por sus supuestos beneficios a la salud.

Macromoléculas

Las macromoléculas son moléculas muy grandes, como una proteína, comúnmente creadas por la polimerización de unidades más pequeñas (monómeros).

Melaza hidrolizada

La melaza, o miles finales, son los residuos de la cristalización final de la azúcar, de los cuáles no se puede obtener más azúcar por medios físicos. La melaza hidrolizada es aquella tratada con ácido sulfúrico.

Metabolito

Un metabolito es el intermediario del producto final de un metabolismo. El término metabolito está restringido a moléculas pequeñas.

Monosacárido

Los monosacáridos son azúcares simples, o los glúcidos más sencillos. No se hidrolizan, es decir, no se descomponen en otros componentes más simples. Poseen de tres a siete átomos de carbono.

Oxidación

La oxidación es el proceso y el resultado de oxidar. La oxidación suceden cuando un átomo pierde una cierta cantidad de electrones.

pH

El pH es una escala logarítmica utilizada para especificar la acidez o basicidad de una solución acuosa.

Plástidos

Los plástidos son orgánulos celulares eucarióticos, propios de las plantas y algas. Su función principal es la producción y almacenamiento de importantes compuestos químicos usados por la célula.

Polifenol

Los polifenoles son una clase estructural de compuestos químicos principalmente naturales, pero también sintéticos o semisintéticos, que se caracterizan por la presencia de múltiples unidades grandes de fenoles.

Polímero

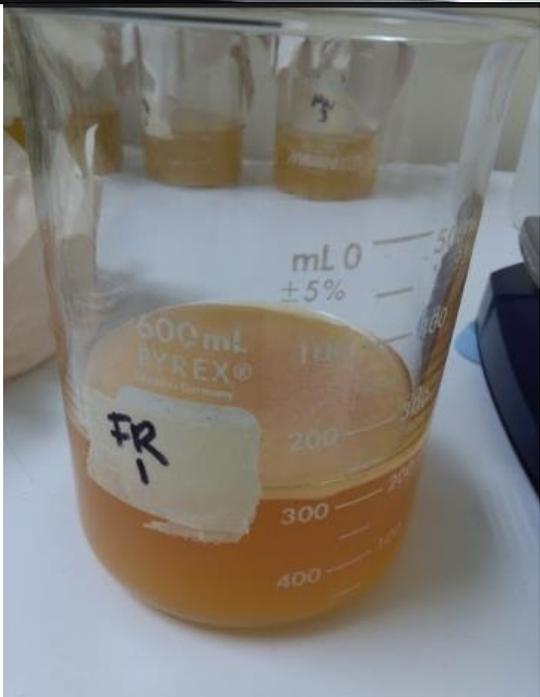
Un polímero es una molécula grande, o macromolécula, compuesta de muchas subunidades repetidas.

Polimorfismo	El polimorfismo es el efecto donde al cristalizarse una misma molécula se apila en el espacio de varias formas creando estructuras cristalinas diferentes. Cada polimorfo tiene su propio patrón de difracción, y sus propiedades químicas y físicas son distintas.
Rasgos fenotípicos	El fenotipo es la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos cuentan con rasgos físicos como conductuales. Son característica so rasgos observables de un organismo.
Sacárido	El sacárido, glúcido, o carbohidrato, es una biomolécula compuesta de carbono, hidrógeno, y oxígeno, cuya principal función en los seres vivos es brindar energía inmediata y estructural.
Simbiosis	Simbiosis es cualquier tipo de interacción biológica cercana y por un largo plazo entre dos tipos de organismos biológicos. La interacción suele ser mutualista donde todos los simbioses salen beneficiados.
Solución de Inóculo	Es una solución que contiene microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfiere a un huésped. O la solución que transfiere organismos simbióticos o patógenos a un cultivo.
Substrato	El substrato es una especie química que se considera el objeto de la acción de otros reactivos.

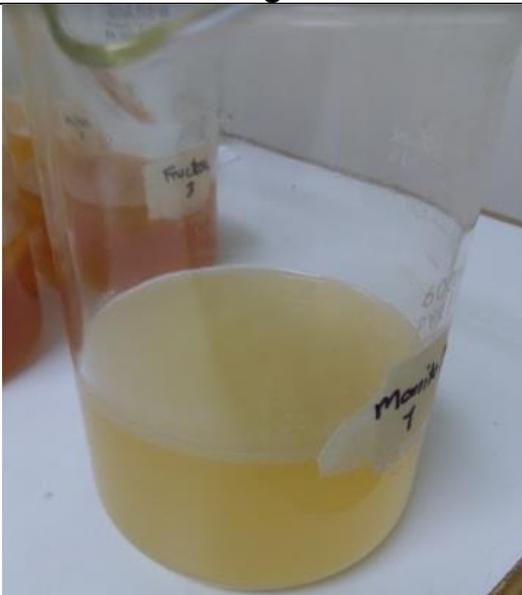
9.3 PROCEDIMIENTO

TABLA 16. Imágenes por paso del procedimiento y de resultados obtenidos.

Descripción procedimiento	Imagen
Preparación de Kombucha	
Precalentamiento de medio	
Filtración de solución con fuente de carbono	

Descripción procedimiento	Imagen
Preparación de cada medio por fuente de carbono	
Purificación de celulosa obtenida	
Celulosa obtenida utilizando fructosa	

Descripción procedimiento	Imagen
Celulosa obtenida utilizando sacarosa	
Celulosa obtenida utilizando glucosa	
Celulosa obtenida utilizando maltosa	

Descripción procedimiento	Imagen
<p data-bbox="201 233 607 302">Celulosa obtenida utilizando manitol</p>	
<p data-bbox="201 827 643 932">Crecimiento de celulosa en las 15 muestras con distintas concentraciones de glucosa</p>	
<p data-bbox="201 1373 570 1442">Beakers con muestras de celulosa húmeda</p>	

Descripción procedimiento	Imagen
Beakers con celulosa en solución de NaOH 0.5 M	

Fuente: elaboración propia (2018).

9.4 DATOS OBTENIDOS

9.4.1 Experimento No. 1

TABLA 17. Datos obtenidos durante el experimento No. 1.

No. Corrida	Fuente de Carbono	Peso Bolsa vacía $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso Bolsa con CB Mojada $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso Bolsa con CB Seca $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Húmeda $\pm 7.07 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Seca $\pm 7.07 \times 10^{-5}$ (g)
1	Manitol	0.8256	1.4647	0.8257	0.6391	0.0001
2		0.7554	2.8632	0.7730	2.1078	0.0176
3		0.8587	2.2415	0.8735	1.3828	0.0148
1	Fructosa	0.8490	2.2015	0.8578	1.3525	0.0088
2		0.7700	1.3995	0.7776	0.6295	0.0076
3		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0
1	Glucosa	0.8613	4.4194	1.1338	3.5581	0.2725
2		1.0610	2.1839	1.0731	1.1229	0.0121
3		1.0473	3.8868	1.0864	2.8395	0.0391
1	Sacarosa	0.9617	2.9122	0.9820	1.9505	0.0203
2		0.7519	3.2929	0.7899	2.5410	0.038
3		0.8124	1.7661	0.8184	0.9537	0.006
1	Maltosa	0.9775	4.5208	1.0322	3.5433	0.0547
2		0.8995	2.5510	0.9235	1.6515	0.0240
3		0.8706	2.2297	0.8774	1.3591	0.0068

9.4.2 Experimento No. 2

TABLA 18. Datos obtenidos durante el experimento No. 2.

No. Corrida	Contenido Glucosa (g/L)	Peso Bolsa vacía $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso Bolsa con CB Mojada $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso Bolsa con CB Seca $\pm 5 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Húmeda $\pm 7.07 \times 10^{-5}$ (g)	Peso CB Seca $\pm 7.07 \times 10^{-5}$ (g)
1	60	1.0073	4.6396	1.0816	3.6323	0.0743
2		0.9772	5.0239	1.0496	4.0467	0.0724
3		0.9380	4.7621	1.0677	3.8241	0.1297
1	70	0.9860	3.5916	1.0069	2.6056	0.0209
2		0.9885	3.7646	1.0086	2.7761	0.0201
3		1.0002	5.3295	1.0464	4.3293	0.0462
1	80	0.9899	4.1170	1.0116	3.1271	0.0217
2		1.0494	3.7454	1.0672	2.6960	0.0178
3		1.0022	5.3916	1.0640	4.3894	0.0618
1	90	1.0464	4.2038	1.0810	3.1574	0.0346
2		1.0200	4.2558	1.0524	3.2358	0.0324
3		1.0835	3.0179	1.1022	1.9344	0.0187
1	100	1.0268	3.4824	1.0452	2.4556	0.0184
2		1.0424	3.3853	1.0582	2.3429	0.0158
3		1.0220	2.6711	1.0336	1.6491	0.0116

9.5 CÁLCULOS

9.5.1 Cálculos resultados

- **Peso de celulosa bacteriana húmeda**

El peso de la Celulosa Bacteriana húmeda se encontró al restar el peso de la bolsa de papel con la celulosa húmeda y el peso de la bolsa vacía.

$$W_{CB \text{ Húmeda}} = W_{Bolsa \text{ con CB}} - W_{Bolsa}$$

$$W_{CB \text{ Húmeda}} = 1.4647 \text{ g} - 0.8256 \text{ g}$$

$$W_{CB \text{ Húmeda}} = 0.6391 \text{ g}$$

- **Peso promedio de celulosa bacteriana húmeda**

Para obtener el peso promedio de la celulosa bacteriana húmeda se utilizó el peso obtenido por cada triplicado de las muestras.

$$\bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = \frac{W_{CBH1} + W_{CBH2} + W_{CBH3}}{3}$$

$$\bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = \frac{0.6391 \text{ g} + 2.1078 \text{ g} + 1.3828 \text{ g}}{3}$$

$$\bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = 1.3766 \text{ g}$$

- **Peso de celulosa bacteriana seca**

El peso de la Celulosa Bacteriana seca se encontró al restar el peso de la bolsa de papel con la celulosa seca y el peso de la bolsa vacía.

$$W_{CB \text{ Seca}} = W_{Bolsa \text{ con CB}} - W_{Bolsa}$$

$$W_{CB \text{ Seca}} = 0.8257 \text{ g} - 0.8256 \text{ g}$$

$$W_{CB \text{ Húmeda}} = 0.0001 \text{ g}$$

- **Peso promedio de celulosa bacteriana seca**

Para obtener el peso promedio de la celulosa bacteriana seca se utilizó el peso obtenido por cada triplicado de las muestras.

$$\bar{W}_{CB \text{ Seca}} = \frac{W_{CBS1} + W_{CBS2} + W_{CBS3}}{3}$$

$$\bar{W}_{CB \text{ Seca}} = \frac{0.0001 \text{ g} + 0.0176 \text{ g} + 0.0148 \text{ g}}{3}$$

$$\bar{W}_{CB \text{ Seca}} = 0.0108 \text{ g}$$

- **Producción de celulosa bacteriana en gramos por litro**

El promedio de la celulosa seca obtenida se dividió por la cantidad de medio utilizada.

$$\text{Producción CB} = \frac{\bar{W}_{CB \text{ Seca}}}{V_{\text{Medio HS}}}$$

$$\text{Producción CB} = \frac{0.0108 \text{ g}}{0.25 \text{ L}}$$

$$\text{Producción CB} = 0.0433 \text{ g/L}$$

- **Rendimiento de celulosa bacteriana**

El rendimiento de la celulosa bacteriana se calculó por la producción de celulosa bacteriana seca obtenida por litro de medio dividida entre la concentración de fuente de carbono utilizada por litro de medio HS.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Producción CB} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\text{Concentración Fuente de Carbono} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} * 100$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{0.0433 \text{ g/L}}{20 \text{ g/L}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = 0.2167\%$$

- **Índice de cristalinidad A_{1372}/A_{2900}**

Para obtener los datos se ubicaron los picos en 1372 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} respectivamente en el espectro infrarrojo obtenido. Y para cada pico se ubicó en el eje y su porcentaje de transmitancia.

$$IC = \frac{A_{1372}}{A_{2900}} = \frac{96.5}{97.7} = 0.9877$$

- **Índice de cristalinidad A_{1430}/A_{893}**

Para obtener los datos se ubicaron los picos en 1430 cm^{-1} y 893 cm^{-1} respectivamente en el espectro infrarrojo obtenido. Y para cada pico se ubicó en el eje y su porcentaje de transmitancia.

$$IC = \frac{A_{1430}}{A_{893}} = \frac{96.9}{95.5} = 1.0147$$

- **Energía de puentes de hidrógeno**

$$E_H = \left(\frac{1}{K}\right) \left(\frac{v_0 - v}{v_0}\right)$$

$$E_H = \left(\frac{1}{0.016 \text{ Kcal}} \right) \left(\frac{95.37 - 95.23}{95.37} \right) \left(\frac{1 \text{ Kcal}}{4.184 \text{ kJ}} \right)$$

$$E_H = 0.39 \text{ kJ}$$

- **Porcentaje de error**

Se calculó el porcentaje de error entre la ubicación de cada pico en el espectro infrarrojo experimental y el teórico.

$$\%Error = \frac{|X_{Teorico} - X_{exp}|}{X_{Teorico}} \times 100$$

$$\%Error = \frac{|379 - 395.3|}{379} \times 100$$

$$\%Error = 4.3008\%$$

9.5.2 Calculo propagación de error

- **Peso de celulosa bacteriana húmeda**

$$\Delta W_{CB \text{ Húmeda}} = \pm \sqrt{(\Delta W_{Bolsa \text{ con } CB})^2 + (\Delta W_{Bolsa})^2}$$

$$\Delta W_{CB \text{ Húmeda}} = \pm \sqrt{(0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2}$$

$$\Delta W_{CB \text{ Húmeda}} = \pm 7.07 \times 10^{-5} \text{ g}$$

- **Peso promedio de celulosa bacteriana húmeda**

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = \pm \sqrt{(\Delta W_{CBH1})^2 + (\Delta W_{CBH2})^2 + (\Delta W_{CBH3})^2}$$

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = \pm \sqrt{(0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2}$$

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Húmeda}} = 8.66 \times 10^{-5} \text{ g}$$

- **Peso de celulosa bacteriana seca**

$$\Delta W_{CB \text{ Seca}} = \pm \sqrt{(\Delta W_{Bolsa \text{ con } CB})^2 + (\Delta W_{Bolsa})^2}$$

$$\Delta W_{CB \text{ Seca}} = \pm \sqrt{(0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2}$$

$$\Delta W_{CB \text{ Seca}} = \pm 7.07 \times 10^{-5} \text{ g}$$

- **Peso promedio de celulosa bacteriana húmeda**

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Seca}} = \pm \sqrt{(\Delta W_{CBS1})^2 + (\Delta W_{CBS2})^2 + (\Delta W_{CBS3})^2}$$

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Seca}} = \pm \sqrt{(0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2 + (0.00005 \text{ g})^2}$$

$$\Delta \bar{W}_{CB \text{ Seca}} = 8.66 \times 10^{-5} \text{ g}$$

- **Producción de celulosa bacteriana en gramos por litro**

$$\Delta \text{Producción CB} = \pm \frac{\bar{W}_{CB \text{ Seca}}}{V_{\text{Medio HS}}} \sqrt{\frac{\Delta \bar{W}_{CB \text{ Seca}}^2}{\bar{W}_{CB \text{ Seca}}} + \frac{\Delta V_{\text{Medio HS}}^2}{V_{\text{Medio HS}}}}$$

$$\Delta \text{Producción CB} = \pm \frac{0.0108 \text{ g}}{0.25 \text{ L}} \sqrt{\frac{(8.66 \times 10^{-5} \text{ g})^2}{0.0108 \text{ g}} + \frac{(0.0005 \text{ L})^2}{0.25 \text{ L}}}$$

$$\Delta \text{Producción CB} = \pm \frac{0.0108 \text{ g}}{0.25 \text{ L}} \sqrt{\frac{(8.66 \times 10^{-5} \text{ g})^2}{0.0108 \text{ g}} + \frac{(0.0005 \text{ L})^2}{0.25 \text{ L}}}$$

$$\Delta \text{Producción CB} = \pm 5.64 \times 10^{-5} \text{ g/L}$$

- **Rendimiento de celulosa bacteriana**

$\Delta \text{Rendimiento } \%$

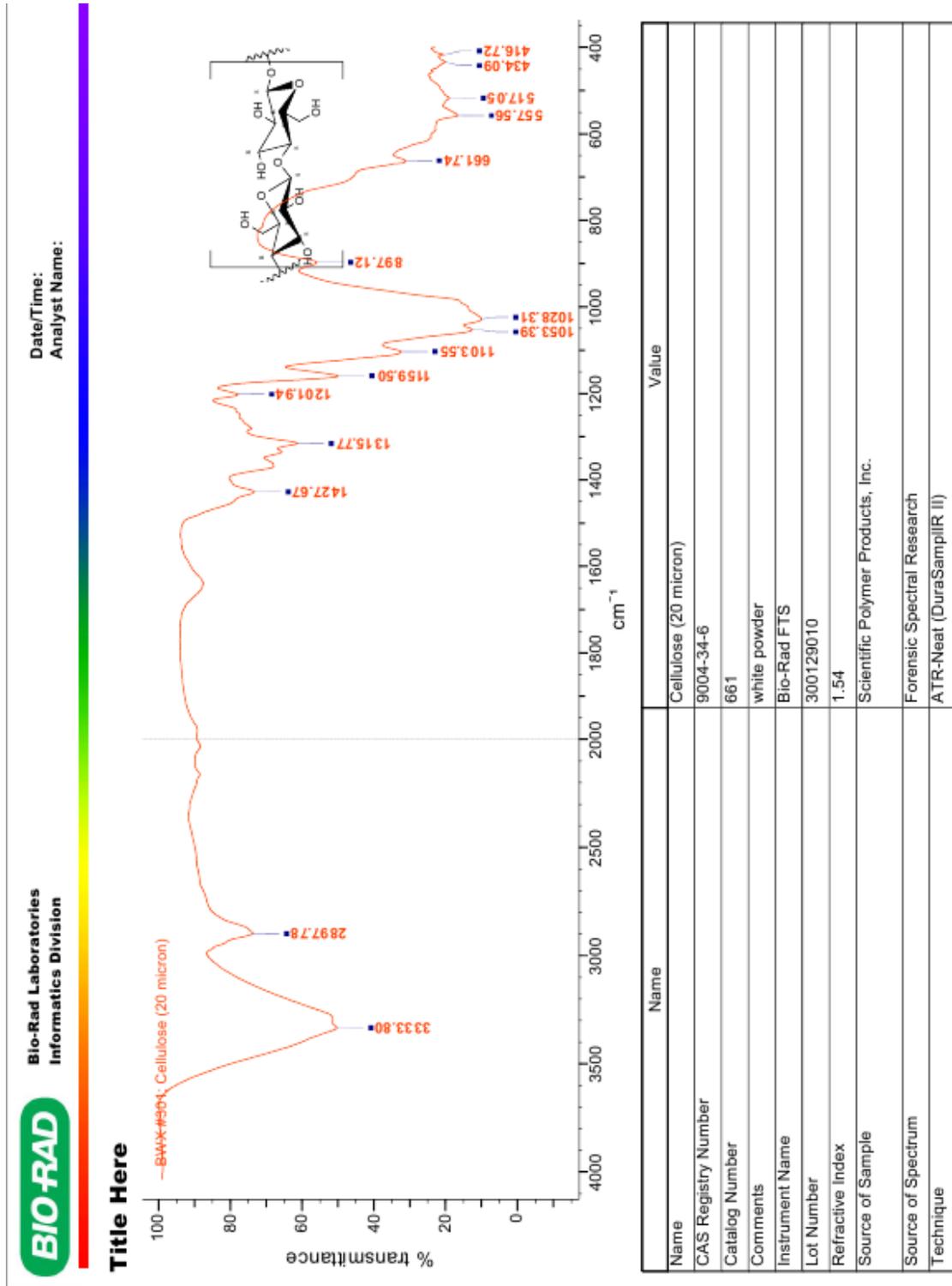
$$= \pm \frac{\text{Producción CB}}{[\text{Fuente de Carbono}]} \sqrt{\frac{\Delta \text{Producción CB}^2}{\text{Producción CB}} + \frac{\Delta [\text{Fuente de Carbono}]^2}{[\text{Fuente de Carbono}]}}$$

$$\Delta \text{Rendimiento } \% = \pm \frac{0.0433 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{20 \frac{\text{g}}{\text{L}}} \sqrt{\frac{(5.64 \times 10^{-5} \frac{\text{g}}{\text{L}})^2}{0.0433 \frac{\text{g}}{\text{L}}} + \frac{(0.00005 \frac{\text{g}}{\text{L}})^2}{20 \frac{\text{g}}{\text{L}}}} * 100$$

$$\Delta \text{Rendimiento } \% = \pm 5.87 \times 10^{-5} \%$$

9.6 ESPECTRO DE CELULOSA 20 MICRONES

GRÁFICA 7. Espectro teórico de celulosa 20 micrones.





Bio-Rad Laboratories
Informatics Division

Date/Time:
Analyst Name:



Title Here

HQI	Tag	DB	ID	Name	Spectrum	CAS Registry Number
100.00		BWX	301	Cellulose (20 micron)		9004-34-6