



**Escalado de la producción de nanocelulosa bacteriana empleando la bacteria *K. medellinensis*
y como sustrato residuos agroindustriales procedentes del departamento del Magdalena-
Colombia**

Carlos Andrés Molina Ramírez

Universidad Pontificia Bolivariana

Escuela de Ingenierías

Medellín, Colombia

2018

**Escalado de la producción de nanocelulosa bacteriana empleando la bacteria *K. medellinensis*
y como sustrato residuos agroindustriales procedentes del departamento del Magdalena-
Colombia**

Carlos Andrés Molina Ramírez

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Doctor en Ingeniería

Directora:

Doctora, Piedad Gañán Rojo

Codirectores:

Doctora, Cristina Castro Herazo

Doctor, Robin Zuluaga Gallego

Universidad Pontificia Bolivariana

Escuela de Ingenierías

Medellín, Colombia

2018

Aprobado por:

Ph. D. Belkis Sulbarán Rangel

Ph. D. Catalina Gómez Hoyos

Ph. D. Úrsula Montoya Rojo

Declaración de originalidad

13 de marzo de 2019

Carlos Andrés Molina Ramírez

“Declaro que este trabajo de grado no ha sido presentado con anterioridad para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en ésta o en cualquiera otra universidad”. Art. 92, parágrafo, Régimen Estudiantil de Formación Avanzada.

Firma



Dedicatoria

No soy una persona de muchas palabras, y tampoco soy muy expresivo con mis emociones. Sin embargo, quiero dedicarle todo mi trabajo durante estos últimos cuatro años a la persona que más admiro y una de las que más amo, mi madre. Sin ella nada, de lo que hasta hoy he conseguido, sería realidad. Mi madre, Yolanda, es coautora de toda mi obra en la vida, ha sido mi soporte en los momentos de flaqueza y mi guía. También, dedico este trabajo a mis dos más grandes amores, mis hijos Antonella y Benjamín quienes han sido el mayor regalo que vida me ha podido dar, y que, además, han sido mi polo a tierra durante todo este proceso del doctorado haciéndome reír en los momentos cuando más lo he necesitado y olvidar los malos momentos. Por último, pero no menos importante, quiero dedicarle este trabajo a mi esposa, Marcela, porque sin su apoyo en todo momento y su fe en mí a toda prueba, hicieron viable que durante estos cuatro años nuestro hogar y nuestra relación resistiera todos los momentos que tuve que estar lejos por motivos del doctorado, por su infinita paciencia para soportar todos mis arrebatos y malos momentos, mil y mil gracias.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la profesora Piedad Gañán, por sus oportunos consejos, su guía, su amabilidad y sobre todo por ayudarme a sacar adelante este proyecto en mi vida que es el doctorado. Asimismo, le agradezco enormemente a la profesora Cristina Castro y el profesor Robin Zuluaga, por toda su dedicación para llevar a buen puerto este proceso.

A mis compañeros en esta camino, Ana, Diego, Jorge, Angélica, Diana, Catalina, Camila y Marlon, por todos sus consejos y ayuda en todo mi trabajo desarrollado en el laboratorio. A los técnicos, Leo, Humberto y Adalberto por su constante apoyo en el uso de los equipos y los espacios de los laboratorios.

Finalmente, quiero agradecer el apoyo económico otorgado por el Departamento del Magdalena, a través de la convocatoria 672 de 2014 de COLCIENCIAS, y a la Alianza del Pacífico con cuyos aportes económicos se financió mi estancia de investigación en la ciudad de Guadalajara, México.

Resumen

La nanocelulosa bacteriana es un material novedoso y versátil que permite su uso en diferentes áreas de investigación y en diferentes sectores industriales. Sin embargo, su utilización se ve limitada por los altos costos de producción de este que genera la implementación de medios de cultivo producidos a partir de reactivos comerciales (e.g el medio de cultivo Hestrin-Schramm (HS)). Por lo tanto, lograr una producción comercial de este material es sumamente importante para lograr una mayor difusión del mismo.

Es por lo anterior, que en este documento se presentan los resultados obtenidos de la optimización y el escalado de la producción de nanocelulosa bacteriana (NCB) empleando como materia prima para el sustrato de la fermentación alternativas de bajo costos, tales como residuos agroindustriales no aptos para el consumo. Dichas materias primas tienen dos tipos de procedencia: a) Son frutas de banano y mango descartados en las plazas de mercado minoristas, y 2) lactosueros no aprovechados por otras industrias como la de elaboración de quesos. Dichas sustancias fueron seleccionadas debido a que corresponde a los principales tipos de desechos agroindustriales que se generan en el Departamento del Magdalena-Colombia. La bacteria empleada en este trabajo fue *Komagataeibacter medellinensis*, la cual pertenece a un grupo de bacterias denominadas bacterias de ácido acético (BAA).

Estos tres tipos de residuos son altamente ricos en fuentes de carbono aprovechables, así como en macro y micronutrientes, que permitirán reducir los sobre costos originados en el uso de fuentes de sustrato comerciales como la glucosa, fructosa o sacarosa, usadas en la preparación de medios de cultivo comerciales, e.g. HS. Este trabajo se corresponde en el primero de su tipo pues abarca desde el análisis de las posibilidades que ofrecen los tipos de residuos para la producción de la nanocelulosa bacteriana, pasando por la optimización de la producción en condiciones estáticas y su consecuente escalado. En este trabajo se emplearon por primera vez banano y mango (descartados y no aptos para el consumo humano) como materia prima para elaborar los medios de cultivo que permitieron producir nanocelulosa bacteriana. Asimismo, se establecieron las condiciones óptimas para la obtención del inóculo en modo agitado, y las condiciones óptimas para producir nanocelulosa bacteriana a partir de residuos de banano. Finalmente, se logró, por primera

vez, la aplicación de una metodología de escalado usada tradicionalmente en procesos en agitación, para escalar la producción de nanocelulosa bacteriana en modo estático usando residuos agroalimentarios de la industria del banano.

Como resultado de esta labor investigativa, se pudo determinar que el banano fue el residuo con el que se obtuvo el rendimiento más alto de NCB, además de permitir producir membranas con propiedades mecánicas superiores a las obtenidas con medios de cultivo comerciales como el HS. Luego, se establecieron las condiciones óptimas del medio de cultivo en modo agitado para aumentar la concentración celular del inóculo que permitieron reducir la concentración de glucosa en el medio de cultivo, aumentar la velocidad de crecimiento, y reducir el tiempo de cultivo del inóculo. Posteriormente, se logró conducir el proceso de optimización de las condiciones de cultivo usando residuos de banano para producir NCB en modo estático, definiendo la concentración de glucosa y la relación área-volumen como los factores más significativos. Finalmente, una vez establecidas las condiciones óptimas para producir NCB a partir de residuos de banano se llevó a cabo el escalado del biorreactor de manera exitosa mediante la implementación de la metodología de tiempos característicos, con la cual se demostró que el mecanismo que tiene más influencia sobre la producción de NCB es la difusión de glucosa a través de la membrana de esta.

Objetivo general

Escalar la producción de NCB usando la bacteria *K. medellinensis* y residuos agroindustriales característicos del Departamento del Magdalena-Colombia como sustrato.

Objetivos específicos

- Seleccionar el tipo de residuo que permita producir NCB con mayor rendimiento respecto al medio de cultivo comercial HS.
- Caracterizar desde el punto de vista físico y químico las muestras de NCB obtenidas con los diferentes residuos agroindustriales característicos del Magdalena.
- Estandarizar una estrategia de fermentación de dos pasos, agitada para aumento de biomasa y estática para la producción de NCB, mediante la optimización de las condiciones de cultivo en la etapa agitada.
- Optimizar las condiciones del medio de cultivo que permitan obtener la mayor producción de NCB por la bacteria *Komagataeibater medellinensis*.
- Caracterizar física y químicamente la NCB obtenida en una escala 44 veces mayor a la usada en la etapa de optimización y bajo las mismas condiciones.

Estructura de la tesis

Esta tesis doctoral plantea el aprovechamiento de residuos agroindustriales alimentarios para producción de NCB con el objetivo de derribar el obstáculo económico que supone usar medios de cultivo comerciales, la optimización de las condiciones de cultivo y su posterior escalado, como el primer paso hacia la explotación comercial de la NCB.

A continuación, se describe brevemente su contenido.

Capítulo 1

Este capítulo presenta la recopilación de los resultados reportados hasta hoy por múltiples autores referentes a la producción de NCB a partir de residuos agroindustriales. Asimismo, se hace una relación de los diferentes factores que juegan un papel trascendental en la obtención de NCB. Finalmente, relaciona las diferentes metodologías de escalado existentes y los diferentes reportes de casos de escalado en la producción de NCB. Podemos decir aquí que esto está publicado, y poner la información. Si no está publicado, podemos decir que está por someter.

Artículo publicado en Materials: Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. 10.3390/ma10060639.

Artículo publicado en International Journal of Biological Macromolecules: Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis*. 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.195.

Capítulo 2

En este capítulo presenta la producción de nanocelulosa bacteriana (NCB), usando desechos de la cadena de suministro de alimentos, no aptos para el consumo humano y subvalorados, constituidos por frutas descartadas de banano y mango recolectadas en plazas minoristas, así como a partir de subproductos lácteos como el lactosuero. La NCB producida se analizó mediante ATR-FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier), pruebas mecánicas, espectroscopía de absorción atómica y termogravimetría. Las

propiedades de la NCB obtenida a partir de cada uno de los medios de cultivo usados fueron diferentes y condicionadas por la naturaleza de los medios de cultivo empleados, obteniéndose así desde materiales con alta resistencia y rigidez (280,6 MPa, 9,4 GPa) hasta un material menos resistente y rígido (17,7 MPa, 0,8 GPa) obtenido con el lactosuero. La mayor producción de NCB se logró con el medio de cultivo obtenido con banano no apto para el consumo humano, y esta NCB también tenía la mayor resistencia a la tracción. La NCB producida a partir de lactosuero medio tenía la máxima de temperatura de degradación (MRDT) en 368 °C. Finalmente, los resultados obtenidos permitieron determinar que el mejor tipo de residuo para la producción de NCB respecto al rendimiento fue la muestra empleando banano. Gracias a este hallazgo, este es el residuo que fue seleccionado para abordar las etapas de optimización y escalado.

Artículo publicado en Journal of Polymers and the Environment: Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks. 10.1007/s10924-017-0993-6.

Artículo en revisión en Revista Dyna: Producción de nanocelulosa bacteriana por *K. medellinensis* a partir de lactosuero con potenciales aplicaciones alimentarias.

Capítulo 3

Este capítulo resalta cómo se incrementó la densidad celular de *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288, aplicando la metodología de superficie de respuesta y su efecto en el rendimiento de NCB. Para este fin, se evaluaron pH inicial, y las concentraciones de glucosa, MgSO_4 y KH_2PO_4 . El mejor resultado en la etapa de cribado fue 1,09 DO_{600} , y en esta etapa se seleccionaron la concentración de glucosa, el pH inicial y la concentración de KH_2PO_4 como los factores con efecto significativo sobre la variable de respuesta DO_{600} importantes. A continuación, se utilizó un diseño Box-Behnken para la etapa de optimización. Los resultados obtenidos permitieron establecer la formulación de un nuevo medio de cultivo para el incremento de la densidad celular, que a su vez permite aumentar la velocidad de crecimiento y reducir el tiempo de cultivo.

Finalmente, el rendimiento de NCB se mejoró en 31,07% al modificar la concentración de inóculo inicial en el cultivo estático en medio de cultivo HS, lo que demuestra la importancia de obtener un inóculo altamente concentrado para el proceso de producción de NCB.

Artículo sometido en *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* : Statistical optimization of culture conditions to improve the cell density of *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288: a first step toward optimizing bacterial cellulose.

Capítulo 4

En esta parte de la tesis se presenta por primera vez la optimización y la producción a mayor escala de la nanocelulosa bacteriana utilizando un medio de cultivo de banano no apto para el consumo humano como una materia prima de bajo costo, pues generalmente se desecha. Inicialmente, se optimizaron las condiciones del medio de cultivo de nanocelulosa bacteriana (NCB) y se estableció que una concentración de glucosa de 26,4 g/L y una relación V/A de 2,2 cm eran las condiciones óptimas para la su producción, alcanzando un rendimiento de 5 g/L, el cual fue 42,4% más alto en comparación con el mejor resultado obtenido al principio. Finalmente, el proceso de escalado se realizó implementando la metodología de análisis de régimen mediante la comparación del tiempo característico de los mecanismos críticos implicados en su producción. El mecanismo que gobernó el proceso de producción de NCB fue la difusión de glucosa a través de la membrana (tiempo característico 675.47 h). Por lo tanto, la relación V/A se seleccionó como el criterio de escalado más adecuado para producir NCB en condiciones de cultivo estático, permitiendo producir 16 g después de 12 días de fermentación en un biorreactor de plástico, esta producción fue 3378% más alta que el obtenido en los recipientes de vidrio.

Artículo sometido en *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*: A novel approach of conventional methodologies to scale-up of BNC production by using rotten banana wastes as feedstock.

Capítulo 5

Con este capítulo se finaliza el análisis de los resultados obtenidos en esta tesis, y se buscaba determinar cómo cambian las propiedades de la NCB por efecto del escalado del proceso. La muestra de NCB obtenida en el biorreactor (BC-B44) conllevó consigo cambios morfológicos de las nanofibras que la componen, respecto a la membrana obtenida en una escala menor (BC-B1) bajo las mismas condiciones de cultivo, usando residuos agroalimentarios de banano. En esta parte de la investigación se detectó que a nivel de la estructura química y cristalina no hubo cambios en las membranas en ninguna de las escalas. Los espectros infrarrojos mostraron que no hay cambios significativos en la estructura química de las muestras analizadas, así como tampoco en la estructura (ambas muestras mostraron un valor de la fracción I_{α} igual a 0,81). Asimismo, los espectros de difracción de rayos X mostraron que las dos muestras tienen una estructura cristalina similar con valores de índice de cristalinidad (IC) de 83% y 81,9% para BC-B1 y BC-B44, respectivamente. Por otra parte, se evidenciaron cambios a nivel morfológico en las nanofibras que componen las membranas de NCB, donde las nanofibras de BC-B1 tuvieron un diámetro mayor que las de BC-B44. Estos cambios generaron, a su vez, variaciones en las propiedades mecánicas y térmicas de las muestras tratadas, donde BC-B1 tuvo el doble de módulo que BC-B44. Asimismo, BC-B1 tuvo una temperatura de máxima degradación ligeramente superior a la de BC-B44.

Artículo en construcción

Tabla de contenido

Introducción	1
Referencias	4
Capítulo 1 Estado del arte	11
Referencias	20
Capítulo 2 Producción y caracterización física de nanocelulosa bacteriana producida por <i>Komagataeibacter medellinensis</i> NBRC 3288 a partir de desechos de la cadena de suministro de alimentos del banano, mango y lactosuero	31
Introducción	31
Materiales y métodos	32
Resultados y discusión	35
Conclusiones.....	42
Referencias	43
Capítulo 3 Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar la densidad celular de <i>Komagataeibacter medellinensis</i> NBRC 3288: el primer paso para optimizar la producción de nanocelulosa bacteriana	53
Introducción	53
Materiales and métodos	54
Resultados y discusión	56
Conclusiones.....	65
Referencias	66
Capítulo 4 Escalado en la producción de NCB empleando residuos de banano no aptos para el consumo humano como materia prima	71
Introducción	71
Materiales y métodos	72
Resultados y discusión	79
Conclusiones.....	85
Referencias	86
Capítulo 5 Evaluación de los cambios en las características físico-químicas de muestras de NCB producidas en un reactor en una escala 1:44	91
Introducción	91
Materiales y métodos	92
Resultados y análisis	95
Conclusiones.....	104

Referencias	105
Conclusiones generales, trabajos futuros y productos relacionados.....	111
Conclusiones generales	111
Trabajos futuros	114
Productos relacionados	116

Lista de figuras

Figura 1. Rendimiento de la NCB producida en cada medio de cultivo evaluado ..	36
Figura 2. Espectrogramas infrarrojos de celulosa bacteriana producida en medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW). Notar que la banda Note 3350 cm^{-1} está reducida en BC-M y BC-B respecto a BC-HS	38
Figura 3. TGA-DTG de celulosa bacteriana obtenida a partir de los diferentes medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW)). Línea continua: TGA, línea punteada: DTG	41
Figura 4. Efecto de la concentración de glucosa, KH_2PO_4 , MgSO_4 , y el pH inicial en la cinética de crecimiento de <i>K. medellinensis</i> NBRC 3288. Línea continua: modelo Gompertz modificado ajustado.....	58
Figura 5. Diagrama de Pareto, donde se muestran los efectos principales de los factores evaluados sobre la densidad óptica. Notar que MgSO_4 fue el único factor que no tuvo un efecto significativo. EL signo menos (-) en la concentración de glucosa implica que DO_{600} aumenta en la medida que la concentración de glucosa se reduce.....	59
Figura 6. Perfil de los resultados de la metodología de ascenso pronunciado. Notar el pico en el paso 5, esto significa que alrededor de estas condiciones se ubica el centro de nuestra nueva región experimental.	60
Figura 7. Efecto de la concentración de glucosa y KH_2PO_4 sobre la densidad celular. a) pH5,18, b) pH 5,38 y c) pH 5,58.....	62
Figura 8. Efecto de la concentración de glucosa y el pH inicial sobre la densidad celular. a) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,053\text{ \% (p/v)}$, b) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,058\text{ \% (p/v)}$ y c) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,06\text{ \% (p/v)}$	63
Figura 9. Perfil del crecimiento celular en condiciones óptimas. Aquí son apreciadas más evidentes las fases de crecimiento. El modelo Gompertz se ajustó en 99,99%	65
Figura 10. Diagrama de Pareto que muestra los efectos de los factores evaluados. Tenga en cuenta que la concentración de glucosa y la relación volumen/área son los factores relevantes. El signo más de la concentración de glucosa significa que la NCB mejora cuando aumenta la concentración de glucosa y viceversa con la relación volumen/área	80
Figura 11. Diagrama de efectos principales. Tenga en cuenta el efecto insignificante de la edad del inóculo, la concentración del inóculo y la concentración de etanol en el rendimiento de NCB	81
Figura 12. a) Superficie de respuesta del efecto de la concentración de glucosa y de la relación V/A sobre el rendimiento de NCB. b) Diagrama de contorno para el efecto de la concentración de glucosa y relación V/A.....	82
Figura 13. Resultados de la comparación del efecto del espesor de la membrana NCB sobre la permeabilidad de la glucosa, medido por la cantidad de glucosa difundida a través de la membrana NCB en el tiempo.	84

Figura 14. NCB producida en diferentes escalas. a) BC-B1, aquí la membrana se muestra lavada. b) BC-B44, aquí la membrana se muestra sin lavar.	95
Figura 15. Imágenes SEM de las membranas liofilizadas obtenidas en ambas escalas. a) Imagen de la superficie de BC-B1. b) Imagen de zona transversal de la mebrana después de una fractura criogénica de BC-B1. c) Imagen de la superficie de BC-B44. d) Imagen de zona transversal de la mebrana después de una fractura criogénica de BC-B44.	97
Figura 16. a) Descripción gráfica de producción de NCB por K. medellinensis. b) Ilustración del efecto de confinamiento producido por las dimensiones del recipiente de vidrio. c) Ilustración de lo que ocurre con las nanofibras de NCB en el biorreactor de plástico donde no existe la limitación por el confinamiento.	98
Figura 17. a) Espectros infrarrojos de BC-B1 y BC-B44, con algunas bandas importantes señaladas. b) Acercamiento de las bandas 710 cm^{-1} y 750 cm^{-1} que denotan la presencia de los alomorfos I_{β} y I_{α}, respectivamente.	99
Figura 18. Espectros de difracción de rayos X de BC-B1 (izquierda) y BC-B44 (derecha). Se señalan los planos cristalográficos que representa cada pico de acuerdo a la indexación propuesta por Sugiyama et al. (1991).	100
Figura 19. a) Diagrama de esfuerzo contra deformación de las muestras BC-B1 y BC-B44. b) Imagen obtenida por microscopía de barrido de la zona de fractura de BC-B1. c) Imagen obtenida por microscopía de barrido de la zona de fractura de BC-B44.	103
Figura 20. Curvas de TGA (línea negra) y DTG (línea gris) de BC-B1 (izquierda) y BC-B44 (derecha).	104

Lista de tablas

Tabla 1. Características sobresalientes de los tres tipos de residuos que se proponen para el escalado de la producción de NCB	3
Tabla 2. Contenido de glucosa en cada uno de los medios de cultivo evaluados.....	35
Tabla 3. Relación de iones contenido en las membranas de NCB producidas en cada medio de cultivo	37
Tabla 4. f_a y el ICR de la NCB producida a partir de los diferentes medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW)	38
Tabla 5. Comparativo de las propiedades mecánicas de NCB obtenidas a partir de FSCW y subproductos agroindustriales.....	40
Tabla 6. Parámetros termogravimétricos de la degradación de NCB.....	42
Tabla 7. Factores y sus niveles para evaluar	55
Tabla 8. Niveles de los factores evaluados en diseño de cribado y los resultados ...	56
Tabla 9. Tratamientos del diseño Box-Behnken y los resultados	61
Tabla 10. Resumen del análisis de varianza del modelo obtenido a partir del diseño experimental Box-Behnken	64
Tabla 11. Rendimientos de NCB obtenidos usando un inóculo de 48 h de edad y dos diferentes concentraciones iniciales de inóculo	65
Tabla 12. Factores evaluados y sus niveles en el diseño de cribado.....	75
Tabla 13. Tratamientos del diseño de cribado y los resultados	75
Tabla 14. Tratamientos del diseño compuesto central y sus resultados	76
Tabla 15. Tiempo característico para la producción de NCB bajo condiciones de cultivo optimizadas.....	83
Tabla 16. Comparación del rendimiento de la NCB obtenida en el recipiente de vidrio y el biorreactor plástico. Tenga en cuenta la reducción en el rendimiento de NCB. Sin embargo, estos resultados fueron esperados ya que no es posible mantener los mismos resultados en ambas escalas.....	85
Tabla 17. Diámetro de las nanofibras que componen las membranas de NCB analizadas.	97
Tabla 18. Parámetros extraídos de los difractogramas de la figura 5. d representa la distancia entre los planos, ACS representa el tamaño de los cristales e IC es el índice de cristalinidad.	100
Tabla 19. Parámetros establecidos a partir de los ensayos de fisisorción de N ₂ en las membranas BC-B1 y BC-B44.	101
Tabla 20. Artículos en revistas indexadas	116
Tabla 21. Participación en eventos científicos	117
Tabla 22. Participación en proyecto	118

Lista de abreviaciones

BAA: Bacterias del ácido acético

BC-B: Nanocelulosa bacteriana producida a partir de banano no apto para el consumo humano

BC-M: Nanocelulosa bacteriana producida a partir de mango no apto para el consumo humano

BC-CW: Nanocelulosa bacteriana producida a partir de lactosuero

BC-HS: Nanocelulosa bacteriana producida usando medio de cultivo HS

CS: Celulosa sintasa

CSL: *Corn steep liquor* (licor de maíz)

DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística

DP: *Degree of polymerization* (grado de polimerización)

DNP: Departamento Nacional de Planeación

DRX: Difracción de rayos X

EPS: Exopolisacárido

FTIR-ATR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada

HoLiR: *Horizontal lift reactor*

HS: medio de cultivo Hestrin-Schramm

ICR: *Infrared crystallinity ratio* (índice infrarrojo de cristalinidad)

MTD: Máxima temperatura de degradación

NBRC: NITE *Biological Resource Center*

NCB: Nanocelulosa bacteriana

OLED: *organic light-emitting diode*

OUR: *Oxygen uptake rate* (tasa de captura de oxígeno)

SEM: *Scanning electronic microscopy* (microscopio electrónico de barrido)

TGA: *Thermogravimetric analysis* (Análisis termogravimétrico)

TDI: Temperatura inicial de degradación

Introducción

La celulosa, es un polímero lineal compuesto de unidades de D-anhidro glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos β -1,4. Ha sido usada desde tiempos prehistóricos por el hombre, y solo hasta 1837 fue químicamente identificada por el químico francés Anselme Payen (Hon 1994). Asimismo, tiene diversas fuentes, a saber: árboles, plantas, animales, algas y varias especies de bacterias, dentro de las que más se destacan un grupo denominado bacterias del ácido acético (BAA) (Hungund and Gupta 2010; Saichana et al. 2015; Pothakos et al. 2016; Ryngajlo and Jedrzejczak-Krzepkowska 2016), entre las cuales se encuentra una cepa recientemente clasificada como *Komagataeibacter medellinensis* (Castro et al. 2013). A este último tipo de celulosa, se denomina celulosa bacteriana o nanocelulosa bacteriana (NCB), gracias a su estructura nanométrica, que la convierten en un material emergente con características únicas (Gama, Gatenholm, and Klemm 2012).

Debido a lo anterior, la NCB puede ser empleada en diferentes áreas de interés como: materiales compuestos (Shah et al. 2013), alimentos (Shi et al. 2014), ingeniería de tejidos (Cherian et al. 2013), cosmética (Ullah, Santos, and Khan 2016) y desarrollo de textiles (Gayathry and Gopalaswamy 2014). Sin embargo, la producción a escala industrial, que permitiría tener mayor disponibilidad de este material, se ve limitada por el alto costo de las fuentes de carbono convencionales (Khosravi-Darani et al. 2013), lo cual se convierte en un gran problema para la explotación industrial de los mismos (Ates 2015; Freitas, Alves, and Reis 2011). Por lo tanto, el reemplazo por fuentes de carbono alternativas, como los residuos agroindustriales, permitirían producir NCB con características similares, y en algunos casos superiores (Tsouko et al. 2015), a las obtenidas cuando se emplean medios de cultivo comerciales como el HS, y a más bajo costo, con reducciones del 30 % (Çakar et al. 2014; Jozala et al. 2015). Además, los residuos agroindustriales, en especial los de alimentos, ofrecen una amplia cobertura de las necesidades nutricionales de los microorganismos como nitrógeno, minerales, aminoácidos y factores de crecimiento (Lin et al. 2013). Un antecedente importante es el trabajo elaborado por (Landucci, Goodman, and Wyman 1994), en el que habían previsto que la NCB era una

oportunidad a mediano plazo, dada la relación que había entre los costos del sustrato, y que podrían ser remplazados por fuentes alternativas como los residuos agroindustriales.

Como se señaló antes, usar residuos agroindustriales para la producción de NCB se ha convertido en una alternativa muy interesante desde el punto de vista no solo económico, sino ambiental, en particular para la producción de energía, productos químicos y materiales (Vandamme 2009; Carreira et al. 2011). Sin embargo, en su mayoría, estos residuos son lignocelulósicos (compuestos de lignina, celulosa y hemicelulosa), lo que implica la conversión de sus estructuras poliméricas en sus unidades monoméricas mediante sacarificación para que sean aprovechables en procesos de biotransformación por parte de microorganismos, conllevando el aumento en los costos de los procesos (Saini, Saini, and Tewari 2015). Por lo tanto, una alternativa novedosa es el uso de residuos agroindustriales alimenticios como una fuente de sustratos alternativos, los cuales agrupan a todo material orgánico producido para el consumo humano como alimento, que es descartado, perdido o degradado principalmente en las etapas de producción y venta, incluyendo los residuos producto de la degradación por plagas o deterioro de estos (Lin et al. 2013).

En esta perspectiva, en Colombia hay regiones que se caracterizan por su vocación de producción agropecuaria, tal como el Departamento del Magdalena. Sin embargo, existen pérdidas de alimentos destinados para el consumo humano del 34 % (DNP 2016), las cuales se dan a lo largo de la cadena de producción y consumo de los alimentos y son especialmente notorias en regiones como el Departamento del Magdalena (DNP 2016). El Magdalena tiene unas apuestas claves en el sector agropecuario, destacándose la producción de banano de exportación con 444.065 T/año (equivalente al 25 % de la producción nacional), mango con 25.489 T/año (correspondiente al 8,4 %) (Agronet 2017), y la producción de leche con 928.918 L (4,8 % de la producción nacional) en el 2014 (DANE 2016). De esta última, se estima que el 8 % se emplea para producir queso (Suárez 2010), es decir que el Departamento se usaron, en 2014, 74.313 L para producir queso, de la cual, resulta un residuo llamado lactosuero, cuya cantidad estuvo alrededor de 63.909 L si tomamos en cuenta el rendimiento que reportan (Fox et al. 2000) que es de

86 L de lactosuero por cada 100 L de leche. A continuación, se muestran algunas características importantes del banano, mango y lactosuero en la Tabla 1.

De la misma forma que la selección de un tipo de fuente de carbono de bajo costo, una cepa con características especiales también aporta para el mejoramiento de la producción de NCB. Por lo tanto, la selección de microorganismos con la capacidad de resistir condiciones de pH ácidos como *K. medellinensis*, brindan una ventaja importante porque permitiría evitar la contaminación por parte de otros microbios y mantener condiciones monosépticas (Walter et al. 2003), el cual es un aspecto muy importante para la productividad, sobre todo cuando se piensa escalar la producción, ya que el control de la esterilidad del medio se hace más difícil (Reisman 1993).

Tabla 1. Características sobresalientes de los tres tipos de residuos que se proponen para el escalado de la producción de NCB

Residuo para trabajar	Rasgos	Contenido	Referencias
Banano	Es la planta herbácea más grandes del mundo, considerada una de las fuentes de energía más importantes en la dieta humana altamente comercializada.	Azúcares solubles como glucosa (9,46-19,15 % p/p), fructosa (11,43-24,78 % p/p) y sacarosa (5,53-6,93 % p/p), vitaminas A, B1, B2 y C, minerales como Na, Fe, Ca, P y un alto contenido de K.	(Goswami and Borthakur 1996; Cano et al. 1997; Mustaffa et al. 1998; Emaga et al. 2007; Aurore, Parfait, and Fahrasmane 2009).
Mango	Es una fruta tropical originaria del sudeste asiático con gran comercialización mundial dado su sabor, fragancia y valor nutritivo.	Glucosa (0,26-1,5 % p/p), fructosa (4,1-9,4 % p/p), sacarosa (1,7-10,5 % p/p), entre 0,35 y 5,20 % p/p de proteínas, vitaminas A, B2-B12, C, K.	(Jha, Chopra, and Kingsly 2005; Jha, Kingsly, and Chopra 2006; Rathore et al. 2007; Rocha Ribeiro et al. 2007; Zafar and Sidhu 2017).
Lactosuero	Es un subproducto de la industria quesera de color verdoso resultado de la precipitación y remoción de la caseína de la leche	Contiene lactosa (4-5 % p/p), 0,6-0,8 % p/p de proteínas y 0,4-0,5 % p/p de grasas.	(Callejas et al. 2012; Prazeres, Carvalho, and Rivas 2012;

y que genera mayor contaminación.	Carvalho, Prazeres, and Rivas 2013).
-----------------------------------	--------------------------------------

Dicho esto, la producción de una biomolécula gana mucha importancia cuando se produce de manera satisfactoria en una escala mayor que permita comercializarla, si el proceso es simple y realizable en términos económicos. Por eso, y teniendo en mente que un biorreactor es un recipiente en el cual las células o parte de ellas transforman materias primas en productos bioquímicos (Erickson 2009), en esta propuesta se plantea usar residuos agroindustriales característicos del Departamento del Magdalena, como son: banano, mango y lactosuero, y un biorreactor plástico el cual es reutilizable, de bajo costo, de fácil consecución, autoclavable, resistente a los impactos, además permite hacer seguimiento de la fermentación por ser traslúcido, de fácil transporte y liviano. Todo lo anterior permitirá llevar a cabo el escalado de la producción de una biomolécula de gran interés comercial como la nanocelulosa bacteriana, que permita altos rendimientos de producción a bajos costos.

En la revisión bibliográfica realizada hasta ahora, este es el primer trabajo en su tipo, y por ende abre nuevas posibilidades científicas y técnicas que permiten una mayor valorización de los residuos agroindustriales alimentarios.

Referencias

- Agronet. 2017. “Estadísticas Agrícola: Área, Producción, Rendimiento y Participación.” <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
- Ates, Ozlem. 2015. “Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3 (December): 200. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>.
- Aurore, Guylène, Berthe Parfait, and Louis Fahrasmane. 2009. “Bananas, Raw Materials for Making Processed Food Products.” *Trends in Food Science & Technology* 20 (2): 78–91. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>.
- Çakar, Fatih, İnci Özer, A.Özhan Aytekin, and Fikrettin Sahin. 2014. “Improvement

- Production of Bacterial Cellulose by Semi-Continuous Process in Molasses Medium.” *Carbohydr. Polym.* 106: 7–13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.103>.
- Callejas, Judith, Francisco Prieto, Víctor Reyes, Yolanda Marmolejo, and María Méndez. 2012. “Caracterización Físicoquímica de Un Lactosuero: Potencialidad de Recuperación de Fósforo.” *Acta Universitaria* 22 (1): 11–18.
- Cano, M.Pilar, Begoña de Ancos, M.Cruz Matallana, Montaña Cámara, Guillermo Reglero, and Javier Tabera. 1997. “Differences among Spanish and Latin-American Banana Cultivars: Morphological, Chemical and Sensory Characteristics.” *Food Chemistry* 59 (3): 411–19. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00285-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00285-3).
- Carreira, Pedro, Joana A S Mendes, Eliane Trovatti, LuÃ-sa S Serafim, Carmen S R Freire, Armando J D Silvestre, and Carlos Pascoal Neto. 2011. “Utilization of Residues from Agro-Forest Industries in the Production of High Value Bacterial Cellulose.” *Bioresour. Technol.* 102 (15): 7354–60. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>.
- Carvalho, Fátima, Ana R Prazeres, and Javier Rivas. 2013. “Cheese Whey Wastewater: Characterization and Treatment.” *Science of The Total Environment* 445–446: 385–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>.
- Castro, C., I. Cleenwerck, J. Trcek, R. Zuluaga, P. De Vos, G. Caro, R. Aguirre, J.-L. Putaux, and P. Ganan. 2013. “Gluconacetobacter Medellinensis Sp. Nov., Cellulose- and Non-Cellulose-Producing Acetic Acid Bacteria Isolated from Vinegar.” *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 63 (Pt 3): 1119–25. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043414-0>.
- Cherian, Bibin Mathew, Alcides Lopes Leão, Sivoney Ferreira de Souza, Gabriel Molina de Olyveira, Ligia Maria Manzine Costa, Cláudia Valéria Seullner Brandão, and Suresh S. Narine. 2013. “Bacterial Nanocellulose for Medical Implants.” In , 337–59. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20940-6_10.
- DANE. 2016. “Encuesta Nacional Agropecuaria 2015.” *Encuesta Nacional*

Agropecuaria. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.

DNP. 2016. “Estudio de Pérdida y Desperdicio de Alimentos En Colombia.”

Emaga, Thomas Happi, Rado Herinavalona Andrianaivo, Bernard Wathelet, Jean Tchango Tchango, and Michel Paquot. 2007. “Effects of the Stage of Maturation and Varieties on the Chemical Composition of Banana and Plantain Peels.” *Food Chemistry* 103 (2): 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>.

Erickson, L.E. 2009. “Bioreactors.” *Encyclopedia of Microbiology*, January, 206–11. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00136-X>.

Fox, P F, P L H MaSweeney, Timothy Cogan, and Guinee Timothy. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. 1st ed. Springer US.

Freitas, Filomena, Vitor D. Alves, and Maria A.M. Reis. 2011. “Advances in Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Biotechnological Applications.” *Trends in Biotechnology* 29 (8): 388–98. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.

Gama, Miguel, Paul Gatenholm, and Dieter Klemm. 2012. *Bacterial Nanocellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*. CRC Press.

Gayathry, G, and G Gopalaswamy. 2014. “Production and Characterisation of Microbial Cellulosic Fibre from *Acetobacter Xylinum*.” *Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)* 39 (1): 93–96. <http://hdl.handle.net/123456789/27372>.

Goswami, Bhaskar, and Alip Borthakur. 1996. “Chemical and Biochemical Aspects of Developing Culinary Banana (*Musa ABB*) ‘Kachkal.’” *Food Chemistry* 55 (2): 169–72. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00072-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00072-0).

Hon, David N -S. 1994. “Cellulose: A Random Walk along Its Historical Path.” *Cellulose* 1 (1): 1–25. <https://doi.org/10.1007/BF00818796>.

Hungund, Basavaraj S, and S G Gupta. 2010. “Production of Bacterial Cellulose from *Enterobacter Amnigenus* GH-1 Isolated from Rotten Apple.” *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (10): 1823–28. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0363-1>.

Jha, S N, S Chopra, and A R P Kingsly. 2005. “Determination of Sweetness of Intact

- Mango Using Visual Spectral Analysis.” *Biosystems Engineering* 91 (2): 157–61.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2005.03.007>.
- Jha, S N, A R P Kingsly, and Sangeeta Chopra. 2006. “Physical and Mechanical Properties of Mango during Growth and Storage for Determination of Maturity.” *Journal of Food Engineering* 72 (1): 73–76.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.020>.
- Jozala, Angela Faustino, Renata Aparecida Nedel Pértile, Carolina Alves dos Santos, Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma, Marcelo Martins Seckler, Francisco Miguel Gama, and Adalberto Pessoa. 2015. “Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter Xylinus* by Employing Alternative Culture Media.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (3): 1181–90. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>.
- Khosravi-Darani, Kianoush, Zahra-Beigom Mokhtari, Tomohito Amai, and Kenji Tanaka. 2013. “Microbial Production of Poly(Hydroxybutyrate) from C1 Carbon Sources.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (4): 1407–24.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4649-0>.
- Landucci, Ronald, Barbara Goodman, and Charles Wyman. 1994. “Methodology for Evaluating the Economics of Biologically Producing Chemicals and Materials from Alternative Feedstocks.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45 (1): 677–96.
<https://doi.org/10.1007/BF02941840>.
- Lin, Carol Sze Ki, Lucie A Pfaltzgraff, Lorenzo Herrero-Davila, Egid B Mubofu, Solhy Abderrahim, James H Clark, Apostolis A Koutinas, et al. 2013. “Food Waste as a Valuable Resource for the Production of Chemicals{,} Materials and Fuels. Current Situation and Global Perspective.” *Energy Environ. Sci.* 6 (2): 426–64.
<https://doi.org/10.1039/C2EE23440H>.
- Mustaffa, Razali, Azizah Osman, Salmah Yusof, and Suhaila Mohamed. 1998. “Physico-Chemical Changes in Cavendish Banana (*Musa Cavendishii* L Var Montel) at Different Positions within a Bunch during Development and Maturation.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78 (2): 201–7.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199810\)78:2<201::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199810)78:2<201::AID-)

JSFA106>3.0.CO;2-K.

- Pothakos, Vasileios, Koen Illegheems, David Laureys, Freek Spitaels, Peter Vandamme, and Luc De Vuyst. 2016. "Acetic Acid Bacteria in Fermented Food and Beverage Ecosystems." In *Acetic Acid Bacteria*, 73–99. Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_3.
- Prazeres, Ana R, Fátima Carvalho, and Javier Rivas. 2012. "Cheese Whey Management: A Review." *Journal of Environmental Management* 110: 48–68. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.
- Rathore, Habib Ahmed, Tariq Masud, Shehla Sammi, and Aijaz Hussain Soomro. 2007. "Effect of Storage on Physico-Chemical Composition and Sensory Properties of Mango (*Mangifera Indica* L.) Variety Dosehari." *Pakistan Journal of Nutrition* 6 (2): 143–48.
- Reisman, Harold B. 1993. "Problems in Scale-Up of Biotechnology Production Processes." *Critical Reviews in Biotechnology* 13 (3): 195–253. <https://doi.org/10.3109/07388559309041319>.
- Rocha Ribeiro, Sônia Machado, José Humberto Queiroz, Maria Eliana de Queiroz, Flávia Milagres Campos, and Helena Maria Pinheiro Sant'Ana. 2007. "Antioxidant in Mango (*Mangifera Indica* L.) Pulp." *Plant Foods for Human Nutrition* 62 (1): 13–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0035-3>.
- Ryngajllo, Malgorzata, and Marzena Jedrzejczak-Krzepkowska. 2016. "Taxonomic Review and Microbial Ecology in Bacterial NanoCellulose Fermentation." In *Bacterial Nanocellulose*, 1–17. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63458-0.00001-9>.
- Saichana, Natsaran, Kazunobu Matsushita, Osao Adachi, Ivo Frébort, and Jitka Frebortova. 2015. "Acetic Acid Bacteria: A Group of Bacteria with Versatile Biotechnological Applications." *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2): 1260–71. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>.
- Saini, Jitendra Kumar, Reetu Saini, and Lakshmi Tewari. 2015. "Lignocellulosic

- Agriculture Wastes as Biomass Feedstocks for Second-Generation Bioethanol Production: Concepts and Recent Developments.” 3 *Biotech* 5 (4): 337–53. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>.
- Shah, Nasrullah, Mazhar Ul-Islam, Waleed Ahmad Khattak, and Joong Kon Park. 2013. “Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material.” *Carbohydrate Polymers* 98 (2): 1585–98. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>.
- Shi, Zhijun, Yue Zhang, Glyn O. Phillips, and Guang Yang. 2014. “Utilization of Bacterial Cellulose in Food.” *Food Hydrocolloids* 35 (March): 539–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>.
- Suárez, Magda. 2010. “Study of Ci (Competitive Intelligence) Colombian Dairy Chain in Two Specific Products: Fresh Cheese and Arequipe to the U.S. Market.” Universidad Nacional de Colombia.
- Tsouko, Erminda, Constantina Kourmentza, Dimitrios Ladakis, Nikolaos Kopsahelis, Ioanna Mandala, Seraphim Papanikolaou, Fotis Paloukis, Vitor Alves, and Apostolis Koutinas. 2015. “Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and By-Product Streams.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 14832–49. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.
- Ullah, Hanif, Hélder A Santos, and Taous Khan. 2016. “Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery.” *Cellulose* 23 (4): 2291–2314. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y>.
- Vandamme, Erick J. 2009. “Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products.” In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, 3–11. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_1.
- Walter, Christian, Torsten Steinau, Norbert Gerbsch, and Rainer Buchholz. 2003. “Monoseptic Cultivation of Phototrophic Microorganisms--Development and Scale-up of a Photobioreactor System with Thermal Sterilization.” *Biomolecular Engineering* 20 (4–6): 261–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919807>.

Zafar, Tasleem A., and Jiwan S. Sidhu. 2017. "Composition and Nutritional Properties of Mangoes." In *Handbook of Mango Fruit*, 217–36. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119014362.ch11>.

Capítulo 1 Estado del arte

La nanocelulosa de origen bacteriano (NCB) ha despertado gran interés en explotar su producción, debido a sus características, tales como: su cristalinidad (principalmente tipo I_{α} (VanderHart and Atalla 1984), pureza química (libre de lignina y hemicelulosa), su carácter hidrófilo, alta relación de aspecto, elevada resistencia a la tracción, porosidad, estructura nanofibrilar y biocompatibilidad (Pecoraro et al. 2007; Islam et al. 2017), por las cuales, la NCB tiene amplia aplicación en diversos sectores tales como: alimentos, en la que es empleada como espesante, estabilizante, reductor de calorías y fibra dietaria (celulosa edible) (Stephens, Westland, and Neogi 1990; El-Saied, Basta, and Gobran 2004; Shi et al. 2014); papel, usada para la restauración de documentos, es usada como papel de alta calidad y papel de seguridad (Budhiono et al. 1999; Pinto et al. 2007; Santos et al. 2016); minero, usada como material para la absorción de toxinas y aceites (Vandamme et al. 1998; Thompson and Hamilton 2001; Bielecki et al. 2005); textil, utilizada para la producción de pieles y textiles artificiales y como material de alta absorción acuosa (Bielecki et al. 2005; C. J. Luo et al. 2012; Gayathry and Gopalaswamy 2014); cosmético, empleada como estabilizador de emulsiones, acondicionadores y cremas (Jonas and Farah 1998; Hasan, Biak, and Kamarudin 2012; Ullah, Santos, and Khan 2016); ingeniería de tejidos, en el que se usa para la producción de piel artificial, tratamiento de heridas, regeneración de tejidos, implantes dentales, implantes de arterias (Cherian et al. 2013; Klemm et al. 2001; Svensson et al. 2005; Bäckdahl et al. 2008); electrónica, aplicada en la elaboración de sensores eléctricos y electrónicos y dispositivos OLED (Evans et al. 2003; J. Shah and Malcolm Brown 2005; Legnani et al. 2008; Ummartyotin et al. 2012); materiales, empleada como reforzante en materiales compuestos, propiedades de barrera, empaques para alimentos (N. Shah et al. 2013; Nogi et al. 2006; Chawla et al. 2009; Muller et al. 2013); tratamiento de aguas, usada en los procesos de purificación de aguas residuales y ultrafiltración de aguas (Bielecki et al. 2005; Dubey et al. 2002).

Es por eso, que se han investigado diferentes aproximaciones para mejorar la producción de NCB y reducir los costos de producción (Kralisch and Hessler 2016), entre las cuales está el uso de residuos agroindustriales (Islam et al. 2017; Velásquez-Riaño and Bojacá

2017), que permitirían migrar de los caldos de cultivo utilizados habitualmente para la producción de NCB que son de composición definida, como el medio Hestrin-Schramm (HS) (Hestrin and Schramm 1954), compuesto a base de glucosa, lo cual los hace muy costoso, con la ventaja adicional que son ricos en micro y macro nutrientes que promueven la producción de NCB, los cuales no son complementados en los caldos de cultivo definidos (Velásquez-Riaño and Bojacá 2017). Así pues, en los últimos 20 años, se ha explorado la opción del aprovechamiento de los residuos agroindustriales de diferente naturaleza para producir NCB, desde subproductos de la industria del maíz como el licor de maíz fermentado (Naritomi et al. 1998) hasta los residuos de levaduras productoras de aceites (M.-T. Luo et al. 2017).

Por ejemplo, Naritomi et al. (1998) usaron licor de maíz fermentado (CSL, por sus siglas en inglés) como fuente alternativa de nitrógeno en la formulación del medio de cultivo para producir NCB, con unos rendimientos de 19,6 g/L de NCB, sin embargo, no hacen ninguna comparación con la producción a través de medios de cultivo comerciales. De otro lado, Thompson y Hamilton (2001), usaron lactosuero con una reducción del rendimiento en 77 %, respecto al medio comercial HS, debido probablemente al bajo contenido de glucosa en el lactosuero. En cambio, obtuvieron una mejora en la producción de NCB del 17 %, respecto al medio comercial HS, cuando usaron aguas residuales de la industria de la patata, debido al alto contenido de azúcares fermentables que se puede alcanzar en los efluentes de patata, gracias a la presencia de microorganismos endógenos. Por su parte, Moon et al. (2006) usaron residuos alimenticios de una escuela, los cuales sometieron a un proceso de sacarificación para obtener azúcares aprovechables por el microorganismo empleado en su investigación y producir NCB, lo que les permitió obtener un rendimiento 55 % más alto comparado contra el obtenido con el medio de cultivo HS, y la vez se mejoraron las propiedades mecánicas de la NCB, pasando de un módulo de Young de 4,15 a 5 GPa. Asimismo, Kongruang (2008) usaron agua de coco descartada de un proceso industrial, durante 14 días de fermentación, obteniendo un rendimiento de 553 g/L (al parecer en base húmeda) con una velocidad de producción de 530 g/Lh, sin evidenciar ningún cambio en las propiedades del material. Simultáneamente, Ha et al. (2008) y Hong & Qiu (2008), usaron residuos de la industria cervecera y polvo hidrolizado de konjac, respectivamente. Simultáneamente, Ha et al. (2008) y Hong and

Qiu (2008), usaron residuos de la industria cervecera y polvo hidrolizado de konjac, respectivamente. Ha et al. (2008), lograron aumentar el rendimiento de NCB 1000 %, respecto al medio de cultivo HS, gracias al alto contenido de azúcares fermentables y la gran cantidad de macro y micronutrientes presentes en el medio. Por su parte, Hong & Qiu (2008), usaron hidrolizado de konjac, para lo cual debieron hacer un proceso de hidrólisis ácida y luego someter este producto a una desintoxicación alcalina, con el objetivo de retirar cualquiera sustancia inhibidora del crecimiento microbiano; obteniendo como resultado un aumento en la producción de NCB del 300 %. En la misma línea de Thompson y Hamilton (2001), Carreira et al. (2011), usaron lactosuero, pero con una producción nula, lo cual se atribuye a la carencia de genes que codifiquen para la síntesis de la enzima β -galactosidasa en las cepas productoras de NCB, de manera que puedan hidrolizar la lactosa presente en el lactosuero. Más tarde, Jozala et al. (2015) también emplearon lactosuero para producir NCB con una reducción en el rendimiento de 41 % respecto al medio comercial HS, aduciendo que el tipo de azúcares en el lactosuero (lactosa) provocaban la merma en la producción de NCB. De aquí se desprende, entonces, una necesidad de hacer una hidrólisis previa del lactosuero para que se puedan aprovechar el alto contenido de azúcares (principalmente lactosa, la cual se compone de galactosa y glucosa, esta última, la unidad básica en la estructura de la celulosa) (Molina-Ramírez et al. 2018).

Como se mencionó en apartados anteriores, el uso de residuos agroindustriales ha sido un factor muy importante para mejorar la producción de NCB y reducir sus costos. Sin embargo, se hace igualmente importante, la optimización del proceso productivo de NCB, de manera que se obtenga el mayor rendimiento posible y un escalado exitoso, que se traduzca en la viabilidad técnica y económica de la producción comercial de NCB (Schmidt 2005). Para tal fin, existen en la literatura, diferentes reportes sobre la manipulación de las condiciones de cultivo que se listan a continuación.

- El modo de fermentación (estático vs agitado): la producción de NCB se reduce en fermentaciones agitadas porque las bacterias sufren una mutación, provocada por la agitación del medio de cultivo (Krystynowicz et al. 2002). Asimismo, las propiedades mecánicas y estructurales se ven afectadas negativamente. Además,

las condiciones en una fermentación estática, obligan a la producción de NCB en la superficie del medio de cultivo para lograr tener acceso al oxígeno, debido a la característica de microorganismo aerobio estricto (Augimeri, Varley, and Strap 2015), en cambio en las fermentaciones agitadas se le facilita al mismo, tener una disponibilidad de oxígeno que no lo obliga a producir NCB, sino que se favorecen las condiciones del crecimiento celular, lo cual podría estar relacionado con los hallazgos sobre la mutación de bacterias productoras de NCB hacia no productoras. De esta manera, Krystynowicz et al. (2002) lograron aumentar la producción de NCB desde 2,8 hasta 3,1 g/L cuando pasaron de modo de producción agitado a estático, Czaja, Romanovicz, and Brown, (2004) aumentaron la producción en 16%, y Aydın and Aksoy (2014) un 84%.

- La densidad celular del inóculo: hasta ahora los reportes encontrados evalúan la concentración del inóculo como una relación de los volúmenes del inóculo y del medio de cultivo, sin conocerse a ciencia cierta la cantidad de células presentes. Sin embargo, se evidencia la importancia de controlar dicho parámetro en aras de mejorar la producción de NCB. En tal sentido Rangaswamy, Vanitha, and Hungund (2015) evaluaron diferentes relaciones de inóculos entre 1-10 %v/v, encontrado que una relación 5 %v/v dio el mejor rendimiento de NCB (2,5 g/L), por su parte Bilgi et al. (2016) evaluaron relaciones de inóculo entre 5-15, obteniendo el mejor rendimiento en 1,8 g/L con una relación de inóculo de 9,3 %v/v.
- La edad del inóculo: sobre este punto, hay algunos autores que establecieron que no tiene ningún efecto sobre la producción de NCB como Zeng, Small, and Wan (2011), quienes evaluaron la edad del inóculo de 3 y 6 días, las cuales corresponden ambas, a la etapa estacionaria del crecimiento (S. O. Bae et al. 2004). Esto explicaría, por qué no tuvo ningún efecto sobre la producción de NCB, a diferencia de Jahan (2013) (6,4 g/L con un inóculo de 7 días) y Mustafa et al. (2014) (21 g/L con inóculo de 3 días), quienes si evidenciaron efectos sobre la producción de NCB.
- La concentración de la fuente de carbono: es claro que la concentración de la fuente de carbono es importante para la producción de NCB, esto debido a que, en

la medida que se va formando la membrana, la difusión de los azúcares se va reduciendo (Hornung et al. 2006b), y establecer una concentración idónea, permite evitar dicho problema. Modificando las concentraciones de fructosa y sacarosa al mismo tiempo en el medio de cultivo, Embuscado, Marks, and BeMiller (1994) lograron obtener un rendimiento de 12,7 g/L de NCB (2,4 %p/v de fructosa y 7,7 %p/v sacarosa), por su parte S. Bae and Shoda (2005) lograron aumentar la producción de NCB hasta 14,3 g/L con una concentración de 5 %p/v de fructosa.

- El uso de inductores: debido a la naturaleza de este tipo de microorganismos de oxidar parcialmente azúcares y alcoholes (Deppenmeier and Ehrenreich 2009; Barja et al. 2016), el etanol se convierte en una fuente alternativa de energía cuando se adiciona a los medios de cultivo, que promueve la producción de ATP (molécula energética), la cual reprime la actividad de ciertas enzimas, como la glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH), lo cual, a su vez, provoca la desviación de la fuente de carbono (glucosa) para la producción de NCB. Es por eso que cuando Naritomi et al. (1998) usaron etanol al 1 %p/v, lograron un aumento en la productividad desde 0,6 hasta 0,9 g/Lh, Rani and Appaiah (2011) mejoraron el rendimiento desde 1,2 g/L hasta 4,5 usando etanol al 1,5 %p/v, y Li et al. (2012) incrementaron el rendimiento de 1,2 a 3 g/L empleando etanol al 2 %p/v.
- La relación volumen-área, al principio de la producción de NCB el oxígeno se vuelve el reactivo limitante, porque solo puede penetrar hasta 0,1 mm en el medio de cultivo, por lo tanto la producción de NCB se da en la interfase aire-líquido pero en la medida que se va produciendo la membrana, la fuente de carbono se va convirtiendo en el reactivo limitante porque su difusión desde el medio de cultivo hacia la zona donde hay oxígeno se va ralentizando (Verschuren et al. 2000; Hornung et al. 2006b). Lo anterior se debe a que en las fermentaciones estáticas no hay movimientos convectivos, solo se dan los fenómenos de transporte de materia por difusión, y la velocidad de difusión es directamente proporcional al gradiente de concentración del soluto de interés y al área disponible para la transferencia (Ebrahimi et al. 2017), por lo tanto, el área de contacto entre el aire y el medio de cultivo es de suma importancia. Además, con la variación de este parámetro, se pueden conseguir mejoras en las propiedades mecánicas del

material, como Ebrahimi et al. (2017) quienes lograron aumentar el módulo de Young de 1,69 GPa hasta 3,73 GPa, aumentando la relación V/A. Mediante cambios en la relación V/A, Krystynowicz et al. (2002) lograron cambios en el rendimiento de NCB entre 1,9-3,5 g/L cuando modificaron la relación V/A entre 3,7-1,4 cm, por su parte Ruka, Simon, and Dean (2012) varió el rendimiento desde 3,3 hasta 6,0 g/L cuando modificaron la relación V/A de 2,5 a 3,1 cm, y Ebrahimi et al. (2017) mejoró el rendimiento de NCB desde 9,5 hasta 14,6 g/L, mediante el cambio de la relación V/A entre 1,3-4 cm.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de producción de NCB, el escalado del mismo requiere una relación entre escalas típicamente de 1:10 (Garcia-Ochoa and Gomez 2009). Para alcanzar este objetivo, se hace muy importante identificar todos los subprocesos (procesos de transferencia de masa, calor y momento) adyacentes, para lo cual existen diferentes aproximaciones como: el método fundamental, método semi-fundamental, análisis dimensional, análisis de régimen, regla del pulgar, escalado hacia abajo, ensayo y error y multiplicación de elementos (Sweere, Luyben, and Kossen 1987; Xia et al. 2015; Oosterhuis 1984), siendo los 5 primeros los de más amplia difusión y uso (Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Mavituna 1996). A continuación, se muestra una breve descripción de estas metodologías de escalado.

- Métodos fundamental y semi-fundamental: requieren de la deducción de expresiones matemáticas complejas que describan el proceso tratado, sin embargo son aplicables a procesos muy simples donde se involucren flujos (Mavituna 1996).
- Análisis dimensional: requiere del valor de grupos adimensionales, que generalmente no se pueden mantener constantes entre las escalas de interés, y además supone mantener similitudes de tipo geométrico, química o mecánica entre las escalas, las cuales no siempre se pueden mantener (Oosterhuis 1984).
- Regla del pulgar: se basa en la experiencia de procesos existentes, cuyos criterios de escalado resultan, a veces, físicamente inaplicables cuando se trasladan de una escala a otra, e.g. relación Potencia/Volumen (Mavituna 1996).

- Análisis de régimen: la palabra régimen, se refiere a la dominancia de un mecanismo (proceso) particular dentro del sistema, que genera cambios en las condiciones del microorganismo, afectando el rendimiento del producto de interés (Sweere, Luyben, and Kossen 1987). El análisis de régimen, muestra cuál de los mecanismo determina el desempeño del sistema, y cómo cambia este con el cambio de escala, a través de la comparación de los tiempos característicos de cada mecanismo involucrado en el sistema (Sweere, Luyben, and Kossen 1987; Mavituna 1996).

El uso de las metodologías para el escalado de bioprocesos es muy común en procesos que involucran condiciones convencionales como agitación, burbujeo y fenómenos de transporte por convección (Garcia-Ochoa and Gomez 2009; Byun, Zeng, and Deckwer 1994; Maranga et al. 2004), pero en fermentaciones ejecutadas de manera estática, no existe ningún reporte sobre el uso de este tipo de metodologías para el escalado de las mismas.

Así pues, sobre el escalado de la producción de NCB hay varios reportes, enfocados en el diseño de nuevos dispositivos (Hornung, Ludwig, and Schmauder 2007; Kralisch et al. 2009), la implementación de reactores convencionales como reactores *airlift* (Chao et al. 2000) o *airlift* esférico (Song et al. 2009), y en modo estático (Kongruang 2008; Mustafa et al. 2014). Así, si tomamos los casos en el uso de nuevos dispositivos, Hornung et al. (2007) lograron construir un dispositivo bajo los requerimientos establecidos previamente por ellos mismos (Hornung et al. 2006b, 2006a), sin embargo el principal criterio de diseño, es la reducción de la limitación de la baja tasa de transferencia del sustrato (glucosa) que obtuvieron en fermentaciones estáticas, y esto lo lograron a través de un sistema de aspersión del medio de cultivo cada cierto período de tiempo, con unos resultados muy similares a los obtenidos en matraces Erlenmeyer, en cuanto al espesor de la membrana formada. Sin embargo, este dispositivo presentó problemas de contaminación, debido al taponamiento de los aspersores, a pesar de usar un medio de cultivo comercial (HS), que como ya se ha visto incrementa los costos del proceso. Por lo tanto, este dispositivo no sería muy conveniente para el uso de residuos agroindustriales como fuente para preparar el medio de cultivo. Por su parte, Kralisch et al. (2010),

desarrollaron el concepto HoLiR, acrónimo (en inglés) de Horizontal Lift Reactor, el cual permite producir NCB de manera continua en forma de láminas de diferentes dimensiones, a través de unas bandas. Este dispositivo, según Kralisch et al. (2010), ofrece la ventaja de producir NCB en forma de láminas, que se pueden ajustar en sus dimensiones a demanda, respecto a la producida de manera estática; aunque, no hacen ninguna mención sobre los rendimientos que ofrece usar este dispositivo en comparación con las fermentaciones en modo estático. Finalmente, los autores escalan un prototipo experimental de 20 L de capacidad hasta una de 180 L, a través del aumento en las dimensiones del aparato, sin embargo, no reportan criterios de escalados basados en el proceso, como si lo hizo Hornung et al. (2007), lo cual no es un escalado del proceso, sino un escalado del prototipo del reactor.

En cuanto al uso de reactores convencionales para el escalado de NCB, se enfocan en que el proceso sea agitado, pero sin generar tanto efecto de cizalla. Uno de ellos, fue el realizado por Chao et al. (2000), quienes emplearon un reactor airlift de 50 L, usando la cepa *Acetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans* BPR2001, con un volumen efectivo de 38 L y suplementación de aire enriquecido con oxígeno con el objetivo de mejorar la transferencia de oxígeno. Sin embargo, los autores no dan muestras, en su investigación, sobre el punto de partida de su escalado y tampoco sobre el uso de alguna metodología para realizar dicho escalado. Asimismo, el criterio para la operación idónea del reactor fue el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La), que si bien, se ha establecido que este factor tiene efecto sobre la producción de NCB (Verschuren et al. 2000; Watanabe and Yamanaka 1995), los autores descartaron de entrada que posiblemente hay otros criterios, como la velocidad de consumo de la fuente de carbono o la velocidad de crecimiento, los cuales podrían afectar en mayor medida la producción de NCB con este tipo de microorganismo que usaron, y además, no midieron la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, por su sigla en inglés), sobre la cual se establece la tasa de transferencia mínima de oxígeno que se debe suministrar para que el microorganismo pueda crecer. Posteriormente, Song et al. (2009), escaló la producción de NCB desde 5 L hasta 30 L (volumen efectivo), usando un airlift, modificado, y residuos de alimentos como sustrato, obteniendo rendimientos similares, 5,6-5,8 g/L, en ambas escalas. Tal como Chao et al. (2000), los autores, se basaron en mantener un coeficiente de transferencia de oxígeno

(k_{LA}) constante, entre ambas escalas, dejando de lado un proceso cuidadoso y meticuloso sobre otros posibles parámetros que podrían tener incidencia sobre el rendimiento de la producción de NCB. Además, es importante destacar, que la relación entre escalas es de 1:6, cuando se ha establecido que debe estar por lo menos en 1:10. Por último, los reportes del escalado de la producción de NCB en modo de fermentación estático, que se han podido hallar, se han realizado con éxito por Kongruang (2008), primero, y por Jahan (2013), después. Por su parte, Kongruang (2008) usó residuos de coco y piña para elaborar sus medios de cultivo, pasando de una escala de inicial de 500 mL hasta 5 L. Asimismo, es importante detallar que sobre dicho proceso los autores miden algunos parámetros, cinéticos principalmente, que son muy importantes en aras de obtener la mayor información sobre el comportamiento del sistema, pero esta información no es suficiente para generar los parámetros de escalado necesarios, y además no hay datos que permitan hacer una comparación entre ambas escalas y verificar el éxito o no de la misma. Por lo tanto, el proceso de escalado carece de una metodología idónea, y los autores se limitaron a pasar de un recipiente pequeño a uno grande, sin acopiar los criterios que les permitieran escalar la producción de NCB. Por su parte, Jahan (2013), en su tesis de doctorado, exploró desde la bioprospección (una búsqueda exhaustiva entre diferentes cepas) hasta el proceso de escalado de la producción de NCB. En su trabajo, usó un medio de cultivo preparado a partir de azúcares comerciales, sales y licor de maíz, y condiciones de operación optimizados previo al escalado, pero en el procedimiento para realizar el escalado no se conservaron los parámetros establecidos por el mismo autor, el cual consistió en establecer una relación volumen-área “óptima” entre el volumen del medio de cultivo y el área de la superficie del medio de cultivo en contacto con el aire. Así, los resultados obtenidos por Jahan (2013) entre las escalas usadas, 1 L y 5 L, no fueron los esperados, ya que el rendimiento de NCB en 1 L de medio fue de 16,21 g/L contra 14,10 g/L, obtenidos en 5 L de medio de cultivo, además de que estos datos se obtuvieron con tiempos de fermentación diferentes, siendo el primero de 8 días y el segundo de 18 días, lo cual nos permitiría obtener una reducción aún mayor en la productividad de NCB, pasando de 2,02 g/Ld a 0,78 g/Ld.

Tal como se describe en los párrafos anteriores, existen muchos reportes sobre el uso de residuos agroindustriales para la producción de NCB. Sin embargo, hasta la fecha, no

existen reportes sobre el escalado de este proceso de producción usando una herramienta metodológica como el análisis de régimen, en los que se emplee alguno de estos residuos: banano, mango y lactosuero. Los dos primeros, serían reportados por primer vez, como fuentes alternativas para la producción de NCB, a diferencia del lactosuero, el cual se desea usar debido a su abundancia, los problemas ambientales que genera y su contenido de nutrientes adicionales como proteínas y lípidos (Callejas et al. 2012).

Por lo tanto, este trabajo sería de gran relevancia porque permitiría la reducción de los costos de la producción de NCB, la valorización de los desechos de la cadena de suministro de banano, mango y lactosuero y, por ende, un menor impacto ambiental. Asimismo, este trabajo se constituiría en el primer reporte del escalado de la producción de NCB en modo estático de manera metodológica.

Referencias

- Augimeri, Richard V., Andrew J. Varley, and Janice L. Strap. 2015. “Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions: Lessons Learned from Diverse Biofilm-Producing Proteobacteria.” *Frontiers in Microbiology* 6 (November): 1282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>.
- Aydın, Yasar Andelib, and Nuran Deveci Aksoy. 2014. “Isolation and Characterization of an Efficient Bacterial Cellulose Producer Strain in Agitated Culture: *Gluconacetobacter Hansenii* P2A.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (3): 1065–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5296-9>.
- Bäckdahl, Henrik, Maricris Esguerra, Dick Delbro, Bo Risberg, and Paul Gatenholm. 2008. “Engineering Microporosity in Bacterial Cellulose Scaffolds.” *Journal of Engineering and Regenerative Medicine* 2 (6): 320–30. <https://doi.org/10.1002/term.97>.
- Bae, S.O., Y. Sugano, K. Ohi, and M. Shoda. 2004. “Features of Bacterial Cellulose Synthesis in a Mutant Generated by Disruption of the Diguanylate Cyclase 1 Gene of *Acetobacter Xylinum* BPR 2001.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 65

- (3): 315–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1593-7>.
- Bae, Sangok, and Makoto Shoda. 2005. “Statistical Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production Using Box-Behnken Design.” *Biotechnology and Bioengineering* 90 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1002/bit.20325>.
- Barja, François, Cristina Andrés-Barrao, Ruben Ortega Pérez, Elena María Cabello, and Marie-Louise Chappuis. 2016. “Physiology of *Komagataeibacter* Spp. During Acetic Acid Fermentation.” In *Acetic Acid Bacteria*, 201–21. Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_9.
- Bielecki, Stanislaw, Alina Krystynowicz, Marianna Turkiewicz, and Halina Kalinowska. 2005. “Bacterial Cellulose.” In *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/3527600035.bpol5003>.
- Bilgi, Eyup, Ece Bayir, Aylin Sendemir-Urkmez, and E. Esin Hames. 2016. “Optimization of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter Xylinus* Using Carob and Haricot Bean.” *International Journal of Biological Macromolecules* 90 (September): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.052>.
- Budhiono, A, B Rosidi, H Taher, and M Iguchi. 1999. “Kinetic Aspects of Bacterial Cellulose Formation in Nata-de-Coco Culture System.” *Carbohydrate Polymers* 40 (2): 137–43. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00050-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00050-8).
- Byun, T. -G., A. -P. Zeng, and W. -D. Deckwer. 1994. “Reactor Comparison and Scale-up for the Microaerobic Production of 2,3-Butanediol by *Enterobacter Aerogenes* at Constant Oxygen Transfer Rate.” *Bioprocess Engineering* 11 (4): 167–75. <https://doi.org/10.1007/BF00518739>.
- Callejas, Judith, Francisco Prieto, Víctor Reyes, Yolanda Marmolejo, and María Méndez. 2012. “Caracterización Físicoquímica de Un Lactosuero: Potencialidad de Recuperación de Fósforo.” *Acta Universitaria* 22 (1): 11–18.
- Carreira, Pedro, Joana A S Mendes, Eliane Trovatti, LuÃ-sa S Serafim, Carmen S R Freire, Armando J D Silvestre, and Carlos Pascoal Neto. 2011. “Utilization of Residues from Agro-Forest Industries in the Production of High Value Bacterial

- Cellulose.” *Bioresour. Technol.* 102 (15): 7354–60.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>.
- Chao, Y, Y Ishida T Fau - Sugano, M Sugano Y Fau - Shoda, and M Shoda. 2000. “Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor.” *Biotechnol. Bioeng.* 68 (3): 345–58.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M).
- Chawla, P R, I B Bajaj, S A Survase, and R S Singhal. 2009. “Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications.” *Food Technology and Biotechnology* 47 (2): 107–24. %3CGo.
- Cherian, Bibin Mathew, Alcides Lopes Leão, Sivoney Ferreira de Souza, Gabriel Molina de Olyveira, Ligia Maria Manzine Costa, Cláudia Valéria Seullner Brandão, and Suresh S. Narine. 2013. “Bacterial Nanocellulose for Medical Implants.” In , 337–59. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20940-6_10.
- Czaja, Wojciech, Dwight Romanovicz, and R. malcolm Brown,. 2004. “Structural Investigations of Microbial Cellulose Produced in Stationary and Agitated Culture.” *Cellulose* 11 (3/4): 403–11. <https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046412.11983.61>.
- Deppenmeier, Uwe, and Armin Ehrenreich. 2009. “Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter Oxydans*.” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1–2): 69–80.
<https://doi.org/10.1159/000142895>.
- Dubey, Vinita, Chhaya Saxena, Lokendra Singh, K V Ramana, and R S Chauhan. 2002. “Pervaporation of Binary Water&Ethanol Mixtures through Bacterial Cellulose Membrane.” *Sep. Purif. Technol.* 27 (2): 163–71. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(01\)00210-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(01)00210-6).
- Ebrahimi, Ehsan, Valiollah Babaeipour, Amin Meftahi, and Somayeh Alibakhshi. 2017. “Effects of Bio-Production Process Parameters on Bacterial Cellulose Mechanical Properties.” *Journal of Chemical Engineering of Japan* 50 (11): 857–61.
<https://doi.org/10.1252/jcej.15we301>.

- El-Saied, Houssni, Altaf H. Basta, and Riad H. Gobran. 2004. "Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products (Bacterial Cellulose and Its Application)." *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 43 (3): 797–820. <https://doi.org/10.1081/PPT-120038065>.
- Embuscado, Milda E., Jay S. Marks, and James N. BeMiller. 1994. "Bacterial Cellulose. I. Factors Affecting the Production of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*." *Food Hydrocolloids* 8 (5): 407–18. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80084-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2).
- Evans, Barbara R, Hugh M O'Neill, Valerie P Malyvanh, Ida Lee, and Jonathan Woodward. 2003. "Palladium-Bacterial Cellulose Membranes for Fuel Cells." *Biosensors and Bioelectronics* 18 (7): 917–23. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00212-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00212-9).
- Garcia-Ochoa, Felix, and Emilio Gomez. 2009. "Bioreactor Scale-up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview." *Biotechnology Advances* 27 (2): 153–76. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>.
- Gayathry, G, and G Gopalaswamy. 2014. "Production and Characterisation of Microbial Cellulosic Fibre from *Acetobacter Xylinum*." *Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)* 39 (1): 93–96. <http://hdl.handle.net/123456789/27372>.
- Ha, Jung Hwan, Omer Shehzad, Salman Khan, Seung Yong Lee, Joon Won Park, Taous Khan, and Joong Kon Park. 2008. "Production of Bacterial Cellulose by a Static Cultivation Using the Waste from Beer Culture Broth." *Korean Journal of Chemical Engineering* 25 (4): 812–15. <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0134-y>.
- Hasan, Norhasliza, Dayang Radiah Awang Biak, and Suryani Kamarudin. 2012. "Application of Bacterial Cellulose (BC) in Natural Facial Scrub." *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 2 (4): 272–75. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.2.4.201>.
- Hestrin, S, and M Schramm. 1954. "Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 2. Preparation of Freeze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose." *Biochemical Journal* 58 (2): 345–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1269899/>.

- Hong, Feng, and Kaiyan Qiu. 2008. "An Alternative Carbon Source from Konjac Powder for Enhancing Production of Bacterial Cellulose in Static Cultures by a Model Strain *Acetobacter Aceti* Subsp. *Xylinus* ATCC 23770." *Carbohydr. Polym.* 72 (3): 545–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.09.015>.
- Hornung, M., M. Ludwig, and H. P. Schmauder. 2007. "Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle (Part 3)." *Engineering in Life Sciences* 7 (1): 35–41. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620164>.
- Hornung, M, M Ludwig, A M Gerrard, and H.-P. Schmauder. 2006a. "Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Product Movement Influences on the Bioreaction (Part 2)." *Engineering in Life Sciences* 6 (6): 546–51. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620163>.
- . 2006b. "Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1)." *Engineering in Life Sciences* 6 (6): 537–45. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>.
- Islam, Mazhar Ul, Muhammad Wajid Ullah, Shaukat Khan, Nasrullah Shah, and Joong Kon Park. 2017. "Strategies for Cost-Effective and Enhanced Production of Bacterial Cellulose." *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (September): 1166–73. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.110>.
- Jahan, F. 2013. "Bacterial Cellulose: Production, Properties, Scale up and Industrial Applications." University of Dheli.
- Jonas, Rainer, and Luiz F Farah. 1998. "Production and Application of Microbial Cellulose." *Biodegradable Polymers and Macromolecules* 59 (1–3): 101–6. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001973>.
- Jozala, Angela Faustino, Renata Aparecida Nedel Pértile, Carolina Alves dos Santos, Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma, Marcelo Martins Seckler, Francisco Miguel Gama, and Adalberto Pessoa. 2015. "Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter Xylinus* by Employing Alternative Culture Media." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (3): 1181–90. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>.

- Klemm, Dieter, Dieter Schumann, Ulrike Udhardt, and Silvia Marsch. 2001. "Bacterial Synthesized Cellulose — Artificial Blood Vessels for Microsurgery." *Prog. Polym. Sci.* 26 (9): 1561–1603. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670001000211>.
- Kongruang, Sasithorn. 2008. "Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* Strains from Agricultural Waste Products." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 148 (1–3): 245–56. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8119-6>.
- Kralisch, Dana, and Nadine Hessler. 2016. "Large-Scale Production of BNC: State and Challenges." In *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*, 76–105. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/B12936-7>.
- Kralisch, Dana, Nadine Hessler, Dieter Klemm, Rainer Erdmann, and Wolfgang Schmidt. 2009. "White Biotechnology for Cellulose Manufacturing — The HoLiR Concept." *Biotechnology and Bioengineering* 105 (4): n/a–n/a. <https://doi.org/10.1002/bit.22579>.
- Krystynowicz, A, W Czaja, A Wiktorowska-Jezierska, M Gonçalves-Miśkiewicz, M Turkiewicz, and S Bielecki. 2002. "Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29 (4): 189–95. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>.
- Legnani, C, C Vilani, V L Calil, H S Barud, W G Quirino, C A Achete, S J L Ribeiro, and M Cremona. 2008. "Bacterial Cellulose Membrane as Flexible Substrate for Organic Light Emitting Devices." *Thin Solid Films* 517 (3): 1016–20. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2008.06.011>.
- Li, Yuanjing, Chunjie Tian, Hua Tian, Jiliang Zhang, Xin He, Wenxiang Ping, and Hong Lei. 2012. "Improvement of Bacterial Cellulose Production by Manipulating the Metabolic Pathways in Which Ethanol and Sodium Citrate Involved." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (6): 1479–87. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4242-6>.
- Luo, C J, Simeon D Stoyanov, E Stride, E Pelan, and M Edirisinghe. 2012. "Electrospinning versus Fibre Production Methods: From Specifics to Technological Convergence." *Chem. Soc. Rev.* 41 (13): 4708–35.

<https://doi.org/10.1039/C2CS35083A>.

- Luo, Mu-Tan, Chao Huang, Xue-Fang Chen, Qian-Lin Huang, Gao-Xiang Qi, Lan-Lan Tian, Lian Xiong, Hai-Long Li, and Xin-De Chen. 2017. "Efficient Bioconversion from Acid Hydrolysate of Waste Oleaginous Yeast Biomass after Microbial Oil Extraction to Bacterial Cellulose by *Komagataeibacter Xylinus*." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 47 (10): 1025–31. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1373290>.
- Maranga, Luis, António Cunha, João Clemente, Pedro Cruz, and Manuel J.T. Carrondo. 2004. "Scale-up of Virus-like Particles Production: Effects of Sparging, Agitation and Bioreactor Scale on Cell Growth, Infection Kinetics and Productivity." *Journal of Biotechnology* 107 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2003.09.012>.
- Mavituna, F. 1996. "Strategies for Bioreactor Scale-Up." In *Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering*, 125–42. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0177-3_11.
- Molina-Ramírez, C., C. Castro, R. Zuluaga, and P. Gañán. 2018. "Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter Medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks." *Journal of Polymers and the Environment* 26 (2). <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0993-6>.
- Moon, Seung-Hyeon, Ji-Min Park, Hwa-Young Chun, and Seong-Jun Kim. 2006. "Comparisons of Physical Properties of Bacterial Celluloses Produced in Different Culture Conditions Using Saccharified Food Wastes." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11 (1): 26–31. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02931864>.
- Muller, Daliana, Carlos R Rambo, Luismar. M Porto, Wido H Schreiner, and Guilherme M O Barra. 2013. "Structure and Properties of Polypyrrole/Bacterial Cellulose Nanocomposites." *Carbohydrate Polymers* 94 (1): 655–62. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.041>.
- Mustafa, A, V Babaeipour, M Roochi, and S Kranchezar. 2014. "Enhancement of Bacterial Cellulose (BC) Production by Optimizing of Inoculation Condition: RSM

Approach.” *Iran Polymer and Petrochemical Institute*.

- Naritomi, Takaaki, Tohru Kouda, Hisato Yano, and Fumihiko Yoshinaga. 1998. “Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture.” *J. Ferment. Bioeng.* 85 (6): 598–603. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80012-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80012-3).
- Nogi, Masaya, Shinsuke Ifuku, Kentaro Abe, Keishin Handa, Antonio Norio Nakagaito, and Hiroyuki Yano. 2006. “Fiber-Content Dependency of the Optical Transparency and Thermal Expansion of Bacterial Nanofiber Reinforced Composites.” *Applied Physics Letters* 88 (13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1063/1.2191667>.
- Oosterhuis, N. M. G. 1984. “Scale-up of Bioreactors: A Scale-down Approach.” TU Delft.
- Pecoraro, Édison, Danilo Manzani, Younes Messaddeq, Sidney J L Ribeiro, Mohamed Naceur Belgacem, and Alessandro Gandini. 2007. “Chapter 17 - Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter Xylinus*: Preparation, Properties and Applications.” In , 369–83. Amsterdam: Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008045316300017X>.
- Pinto, Ricardo J B, Paula A A P Marques, Manuel A Martins, Carlos Pascoal Neto, and Tito Trindade. 2007. “Electrostatic Assembly and Growth of Gold Nanoparticles in Cellulosic Fibres.” *Journal of Colloid and Interface Science* 312 (2): 506–12. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.043>.
- Rangaswamy, B E, K P Vanitha, and Basavaraj S Hungund. 2015. “Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit.” *International Journal of Polymer Science* 2015: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/280784>.
- Rani, Mahadevaswamy Usha, and Anu Appaiah. 2011. “Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production from *Glucanacetobacter Hansenii* UAC09.” *Annals of Microbiology* 61 (4): 781–87. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0196-7>.
- Ruka, Dianne R, George P Simon, and Katherine M Dean. 2012. “Altering the Growth Conditions of *Glucanacetobacter Xylinus* to Maximize the Yield of Bacterial

- Cellulose.” *Carbohydrate Polymers* 89 (2): 613–22.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>.
- Santos, Sara M., José M. Carbajo, Nuria Gómez, Ester Quintana, Miguel Ladero, Arsenio Sánchez, Gary Chinga-Carrasco, and Juan C. Villar. 2016. “Use of Bacterial Cellulose in Degraded Paper Restoration. Part II: Application on Real Samples.” *Journal of Materials Science* 51 (3): 1553–61. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9477-z>.
- Schmidt, F. R. 2005. “Optimization and Scale up of Industrial Fermentation Processes.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (4): 425–35.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>.
- Shah, Jay, and R Malcolm Brown. 2005. “Towards Electronic Paper Displays Made from Microbial Cellulose.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (4): 352–55.
<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1756-6>.
- Shah, Nasrullah, Mazhar Ul-Islam, Waleed Ahmad Khattak, and Joong Kon Park. 2013. “Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material.” *Carbohydrate Polymers* 98 (2): 1585–98.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>.
- Shi, Zhijun, Yue Zhang, Glyn O. Phillips, and Guang Yang. 2014. “Utilization of Bacterial Cellulose in Food.” *Food Hydrocolloids* 35 (March): 539–45.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>.
- Song, Hyo-Jeong, Hongxian Li, Jin-Ho Seo, Myong-Jun Kim, and Seong-Jun Kim. 2009. “Pilot-Scale Production of Bacterial Cellulose by a Spherical Type Bubble Column Bioreactor Using Saccharified Food Wastes.” *Korean Journal of Chemical Engineering* 26 (1): 141–46. <https://doi.org/10.1007/s11814-009-0022-0>.
- Stephens, R Scott, John A Westland, and Amar N Neogi. 1990. “Method of Using Bacterial Cellulose as a Dietary Fiber Component.” Google Patents.
- Svensson, A, E Nicklasson, T Harrah, B Panilaitis, D L Kaplan, M Brittberg, and P Gatenholm. 2005. “Bacterial Cellulose as a Potential Scaffold for Tissue Engineering

- of Cartilage.” *Biomaterials* 26 (4): 419–31.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.049>.
- Sweere, A.P.J., K.Ch.A.M. Luyben, and N.W.F. Kossen. 1987. “Regime Analysis and Scale-down: Tools to Investigate the Performance of Bioreactors.” *Enzyme and Microbial Technology* 9 (7): 386–98. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90133-5).
- Thompson, David N, and Melinda A Hamilton. 2001. “Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91 (1): 503–13.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503>.
- Ullah, Hanif, Hélder A Santos, and Taous Khan. 2016. “Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery.” *Cellulose* 23 (4): 2291–2314.
<https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y>.
- Ummartyotin, S, J Juntaro, M Sain, and H Manuspiya. 2012. “Development of Transparent Bacterial Cellulose Nanocomposite Film as Substrate for Flexible Organic Light Emitting Diode (OLED) Display.” *Industrial Crops and Products* 35 (1): 92–97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.025>.
- Vandamme, E J, Sophie De Baets, A Vanbaelen, Koen Joris, and Peter De Wulf. 1998. “Improved Production of Bacterial Cellulose and Its Application Potential.” *Polymer Degradation and Stability* 59 (1–3): 93–99.
- VanderHart, David L., and R. H. Atalla. 1984. “Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-State Carbon-13 NMR.” *Macromolecules* 17 (8): 1465–72.
<https://doi.org/10.1021/ma00138a009>.
- Velásquez-Riaño, Möritz, and Vivian Bojacá. 2017. “Production of Bacterial Cellulose from Alternative Low-Cost Substrates.” *Cellulose* 24 (7): 2677–98.
<https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>.
- Verschuren, Peter G., Thomas D. Cardona, M.J.Robert Nout, Kees D. De Gooijer, and Johannes C. Van den Heuvel. 2000. “Location and Limitation of Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* Established from Oxygen Profiles.” *Journal of*

Bioscience and Bioengineering 89 (5): 414–19. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89089-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89089-1).

Watanabe, Kunihiro, and Shigeru Yamanaka. 1995. “Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (1): 65–68. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.65>.

Xia, Jianye, Guan Wang, Jihan Lin, Yonghong Wang, Ju Chu, Yingping Zhuang, and Siliang Zhang. 2015. “Advances and Practices of Bioprocess Scale-Up.” In , 137–51. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2014_293.

Zeng, Xiaobo, Darcy P. Small, and Wankei Wan. 2011. “Statistical Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* BPR 2001 from Maple Syrup.” *Carbohydrate Polymers* 85 (3): 506–13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.034>.

Capítulo 2 Producción y caracterización física de nanocelulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 a partir de desechos de la cadena de suministro de alimentos del banano, mango y lactosuero

Introducción

Tal como se ha planteado anteriormente en esta tesis, la NCB es un exopolisacárido (EPS), químicamente pura (libre de lignina y hemicelulosa) a diferencia de la celulosa vegetal, producido por bacterias del ácido acético (AAB) y algunas otras especies (Ude et al. 2006; Hungund and Gupta 2010; Saichana et al. 2015). Debido a sus múltiples propiedades, la NCB tiene muchos campos de aplicación diferentes, generando aumento en la demanda (Shi et al. 2014; Hioki et al. 1995; Santos et al. 2016; Klemm et al. 2001; Wan et al. 2007; Rajwade, Paknikar, and Kumbhar 2015; Wan et al. 2007; Lee et al. 2014; Chen et al. 2013; Shah and Malcolm Brown 2005). Estos dos hechos son muy importantes en el área de investigación de producción de NCB. Sin embargo, la producción de NCB en muchos casos es hecha a partir de medios de cultivo químicamente definidos y en algunos casos a partir de desechos de la cadena de suministro de alimentos (FSCW, por sus siglas en inglés) y subproductos agroindustriales (Cristina Castro et al. 2011; Rani and Appaiah 2013; Vazquez et al. 2013; Jozala et al. 2015). Estos tipos de materias primas son buenas alternativas para reemplazar los medios de cultivo definidos químicamente porque el costo del medio de cultivo en fermentaciones puede representar casi el 30% del costo total del proceso (Rivas et al. 2004) y porque estas materias primas pueden ofrecer una amplia gama de nutrientes para este tipo de proceso (Lin et al. 2013). Por lo tanto, estos tipos de FSCW y agrícola subproductos son una excelente opción para producir NCB debido a las ventajas económicas, medioambientales y de innovación en comparación con el uso tradicional de medios de cultivo químicamente definidos.

El objetivo principal de este capítulo fue seleccionar el residuo más adecuado para producir NCB con *Komagataeibacter medellinensis*, empleando la nueva cepa resistente a los pH ácidos, utilizando frutas de banano y mango no aptas para el consumo humano y que son rechazadas en los centros de acopio (no informados por ningún autor) y

lactosuero, que ha sido informado por Jozala et al. (2015) y Thompson and Hamilton (2001), como medios de cultivo económicos y amigables con el medio ambiente para producir celulosa bacteriana. En este capítulo se ha analizado el rendimiento de la producción NCB entendido como el peso seco de la membrana de NCB por unidad de volumen del medio de cultivo (g/L), composición química, propiedades de tracción y su degradación térmica de las muestras obtenidas con los residuos respecto a las exhibidas por las de control generadas empleando un medio comercial como el Hestrin-Schramm (HS).

Materiales y métodos

Microorganismo y medio de cultivo primario

Komagataeibacter medellinensis NBRC 3288 Yamada (2014) (Yamada 2014) comb. nov. fue aislado de vinagre casero en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Pontificia Bolivariana en Medellín, Colombia (C Castro et al. 2013). El microorganismo creció en medio de cultivo Hestrin-Schramm (HS) modificado que contiene glucosa (% p/v), 2; peptona, 0,5; extracto de levadura, 0,5; Na₂HPO₄, 0,267; y ácido cítrico para ajustar el pH a 3,5 en 200 mL de agua durante 3 d en condiciones estáticas y a temperatura ambiente.

Medios de cultivo a partir de los residuos

Los medios de cultivo se prepararon a partir de jugos de banano y mango de frutas no aptas para el consumo humano y consideradas como material de descarte adquiridas en un mercado en la ciudad de Santa Marta, Magdalena, Colombia. Para la preparación de dichos jugos se mezclaron 200 g de frutas con 200 ml de agua utilizando una licuadora monobloque Siemsem durante 2 minutos. Luego, los jugos obtenidos se filtraron para remover la mayor cantidad de sólidos, y fueron esterilizados durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi de presión. El lactosuero, se compró a la fábrica de queso San Joaquín en Plato-Magdalena, Colombia, y se esterilizó sin filtración. El proceso de esterilización en este

último caso fue similar al empleado para los jugos de frutas. Los niveles de pH en todos los medios de cultivo se ajustaron a 3,5.

Fermentación para la obtención de NCB

La fermentación se llevó a cabo durante 10 días en condiciones estáticas a temperatura ambiente en cajas de Petri con un área de 56 cm². Para esto, *K. medellinensis* fue transferido a 20 mL de los medios de banano, mango y suero de queso esterilizados con un tamaño de inóculo del 10% v/v. Después de la fermentación, las películas producidas de NCB se retiraron de la superficie y se agregaron a una solución de 5 % p/v KOH para eliminar la biomasa y los desechos. Finalmente, las películas se lavaron hasta que se alcanzó un pH neutro.

Cuantificación de glucosa

La glucosa se midió utilizando un método colorimétrico con un kit de glucosa (glucosa oxidasa/ peróxido) BioSystems por su alta confiabilidad, rapidez en el ensayo y sencillez. Las muestras, el blanco y el estándar se prepararon de acuerdo con el método descrito por BioSystems, y la absorbancia se midió a 500 nm. La concentración de glucosa se calculó usando la ecuación 1

$$\frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}} = C_{\text{Sample}} \quad (1)$$

donde A_{sample} es la absorbancia de la muestra considerada, A_{standard} es la absorbancia del estándar del kit, C_{standard} es la concentración del estándar del kit y es equivalente a 1 g/L, y C_{sample} es la concentración de glucosa en la muestra. Todos los valores tienen una desviación inferior a 5 %.

Rendimiento de NCB

La producción de NCB se midió dividiendo el peso seco de NCB obtenido por el volumen de cada medio de cultivo evaluado en esta investigación. La NCB en solución de KOH se enjuagó con agua destilada hasta alcanzar pH neutro. Posteriormente, las membranas se secaron en un horno de convección a una temperatura de 50 °C hasta que alcanzaron un peso constante.

Espectroscopía de absorción atómica

El contenido de metales en las películas de NCB se determinó usando un espectrómetro de absorción atómica ICE™ 3500 según los métodos EPA 7140, 7450, 7610 y 7770 para calcular los contenidos de Ca, Mg, K y Na, respectivamente. Todos los valores son con una desviación menor a 5 %.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Antes de la medición, las películas de celulosa se secaron durante 2 horas a 100 °C para eliminar la humedad. Los espectrogramas se grabaron en un espectrofotómetro Nicolet 6700 en el rango de 4000-400 cm^{-1} utilizando un cristal ATR de diamante. Los espectrogramas se grabaron con una resolución de 4 cm^{-1} y una acumulación de 256 barridos.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas de NCB-banano (BC-B), NCB-mango (BC-M) y NCB-lactosuero (BC-CW) se midieron usando un texturómetro de acuerdo con el procedimiento ASTM D882-12. Las muestras fueron cortadas en tiras con una longitud de 19 mm, ancho de 3 mm y espesor variable. Una velocidad de prueba de 1,9 mm/min y una celda de carga de 30 N fueron usados. Las pruebas de tracción se realizaron con al menos 5 muestras, y se tomaron los valores promedio.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas se obtuvieron usando un analizador termogravimétrico. Muestras de 10 mg se colocaron en una bandeja de alúmina en una atmósfera de nitrógeno y calentado desde 30 °C a 800 °C a una tasa de 10 °C/min.

Resultados y discusión

La concentración de glucosa es muy importante para la producción de NCB porque es el bloque de construcción de su estructura. El contenido de glucosa en cada medio de cultivo ensayado se muestra en la Tabla 2. El contenido de glucosa más alto está en el medio de banano, 36,9 g/L, seguido por el medio compuesto por lactosuero, 23,28 g/L. Las películas de NCB producidas por *K. medellinensis* en los diferentes medios de cultivo de frutas no aptas para el consumo y el lactosuero se acumularon en la superficie. Las películas que se formaron fueron recogidas, lavadas y secadas para ser pesadas y medir la producción de NCB.

Tabla 2. Contenido de glucosa en cada uno de los medios de cultivo evaluados

Muestra	Concentración glucosa (g/L)
Banano	36,90
Mango	1,89
Lactosuero	23,28
HS	20,00

La Figura 1 muestra la cantidad de NCB producida con cada medio de cultivo evaluado en esta investigación, medida como la relación entre el peso seco y el volumen de los medios de cultivo. Se obtuvo una producción de 4,81 g/L para BC-B, que fue la más alta, la producción de BC-M fue de 1,95 g/L, la producción de BC-CW fue 2,37 g/L, y la producción BC-HS fue 2,75 g/L. La mayor producción de BC-B, podría deberse a la alta concentración de glucosa (36,9 g/L) porque, como es sabido y se mencionó antes, la glucosa es el componente básico de la estructura de celulosa (Cocinero et al. 2009). A pesar de los contenidos de otros azúcares, cuando este tipo de microorganismo se cultiva en glucosa (como es nuestro caso), no es capaz de metabolizar otro tipo de fuente de carbono (Benziman and Rivetz 1972).

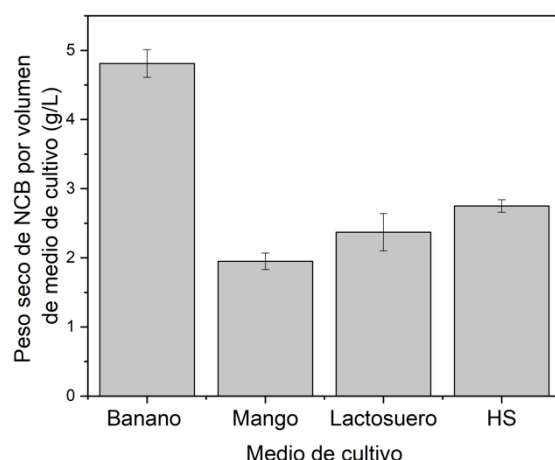


Figura 1. Rendimiento de la NCB producida en cada medio de cultivo evaluado

Además, la presencia de diferentes iones como K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} (Emaga et al. 2007), podría ser otra posible razón para la mayor producción de CB-B, que según a Ross et al. (Ross, Mayer, and Benziman 1991; Ross et al. 1987) y Weinhouse et al. (Weinhouse et al. 1997) participan en el proceso de síntesis NCB, pero en un equilibrio delicado como se muestra en la Tabla 3, que contiene las proporciones de iones en las membranas NCB producidas de cada medio de cultivo; lo cual ha sido demostrado por Mohite et al. (Mohite, Kamalja, and Patil 2012), quienes mejoraron la producción de NCB en un 44% usando un medio modificado con sales que contenían estos iones. Por otra parte, los componentes poliméricos contenidos en el banano como lignina, xiloglucanos y pectina pueden mejorar la producción de NCB, como demostraron Keshk, Razek, and Sameshima (2006), Gu and Catchmark (2012) y Jozala et al. (2015), debido a algunas de las propiedades de estos componentes, por ejemplo, la naturaleza antioxidante de la lignina (Kumbhar, Rajwade, and Paknikar 2015). Por lo tanto, es altamente probable que el aumento en la producción BC-B ha sido inducida por una combinación entre alto contenido de fuente de carbono, un ligero equilibrio en la relación de iones y estrés osmótico debido a componentes poliméricos, a diferencia de la situación con BC-M y BC-CW.

Tabla 3. Relación de iones contenido en las membranas de NCB producidas en cada medio de cultivo

Muestra	Ca/Mg	Ca/K	Ca/Na	K/Mg	Na/Mg	Na/K
BC-B	2,07	1,42	1,25	1,45	1,66	1,14
BC-M	6,76	3,78	2,70	1,79	2,51	1,40
BC-CW	28,02	4,11	2,77	6,80	10,11	1,48
BC-HS	5,70	1,71	1,28	3,34	4,44	1,33

Los espectrogramas infrarrojos (IR) de las películas de NCB obtenidas, se muestran en la Figura 2. Hay diferencias entre estos espectros, principalmente en BC-CW, pero los otros (BC-B y BC-M) muestran similitudes con BC-HS. Todos los espectros IR muestran las bandas características de celulosa en 893 cm^{-1} (enlace glicosídico), 1111 cm^{-1} (C-O), 1163 cm^{-1} (C-O-C), 1429 cm^{-1} (CH_2 movimiento de tijera) y 3350 cm^{-1} (enlaces de hidrógenos a grupos OH intracadena) (Nelson and O'Connor 1964b; Rozenberga et al. 2016), que sugieren que todas las muestras son celulosa bacteriana. En BC-CW, hay bandas que son características de grasa presente en la leche: 2921 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} (correspondiente a CH_2 de lípidos), 1743 cm^{-1} y 1163 cm^{-1} , correspondientes a vibración de éster C=O y éter CO-O-C, respectivamente, y algunas otras bandas correspondientes a aminos y amidas como 3400 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} y 1577 cm^{-1} (Stuart 2004). El espectro IR de BC-CW muestra tres componentes principales: grasa, proteína y monosacáridos, los primeros dos son del lactosuero, y el último es de trazas del lactosuero y la celulosa producida. Sin embargo, BC-B y BC-M no muestra ningún componente diferente a la celulosa bacteriana. Estos resultados muestran que la BC-CW producida es, de hecho, una combinación de celulosa con otras sustancias, como grasas y proteínas, que podrían mejorar la producción NCB, como la suma de todos los componentes descritos antes, BC-M y BC-B no muestran ninguna banda particular diferente; por lo tanto, solo se produjo NCB, sin modificaciones o adiciones, a partir de los jugos de frutas podridas. Debido a que la celulosa tiene diferentes polimorfos cristalinos con diferentes disposiciones de empaquetamiento, la NCB corresponde al polimorfo cristalino I, que, a su vez, tiene dos polimorfos, I_α y I_β , pero es en su mayoría I_α (Zugenmaier 2008); por lo tanto, la relación de cristalinidad infrarroja (ICR) se calculó de acuerdo con Nelson y O'Connor (Nelson and O'Connor 1964a), y la fracción I_α (f_α) se estimó utilizando el método de Imai y Sugiyama (Imai and Sugiyama 1998), estos resultados se muestran en la Tabla 4. La Tabla 4 muestra cómo el

ICR y f_α de la NCB producido son reducido cuando las frutas podridas y el lactosuero se utilizan para producirlo en lugar de medio HS. Este resultado podría estar relacionado con la presencia de otros polímeros, como se mencionó anteriormente (polisacáridos, proteínas y lípidos), porque la agregación de cintas de NCB se ve obstaculizada por (Cristina Castro et al. 2011; Gu and Catchmark 2012) y una posible relación entre cristalinidad y f_α . Las reducciones de f_α y cristalinidad por la presencia de polímeros fueron consistentes con los informes en la literatura por diferentes autores (Cristina Castro et al. 2011; Gu and Catchmark 2012; Keshk and Sameshima 2005; Yamamoto, Horii, and Hirai 1996; Park et al. 2014; Hackney, Atalla, and VanderHart 1994).

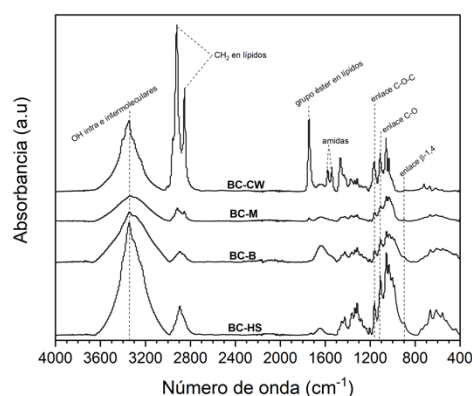


Figura 2. Espectrogramas infrarrojos de celulosa bacteriana producida en medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW). Notar que la banda Note 3350 cm^{-1} está reducida en BC-M y BC-B respecto a BC-HS

Tabla 4. f_α y el ICR de la NCB producida a partir de los diferentes medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW)

Muestra	f_α	ICR
BC-B	0,77	0,45
BC-M	0,71	0,38
BC-CW	0,79	0,15
BC-HS (ref)	0,86	0,69

Las propiedades de tracción de las NCB obtenidas de los tres medios evaluados se compararon con las del control (medio HS) para comprender el efecto de estos medios en las propiedades mecánicas. La Tabla 5 muestra las propiedades mecánicas de la NCB

producida de cada medio de cultivo. Los resultados indicaron que el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción y la deformación de la NCB producida, fueron diferentes entre todos los medios evaluados. BC-B tuvo el módulo de elasticidad más alto (9,4 GPa) y la mayor resistencia a la tracción (280 MPa); mientras tanto, BC-M, BC-CW y BC-HS tuvieron módulos de 1,6, 0,8 y 6,0 GPa y resistencias a la tracción de 20,8, 10,7 y 162,4 MPa, respectivamente. El módulo de elasticidad se calculó asumiendo una región lineal de elasticidad hasta 0.6- 0.7%. El módulo de elasticidad de una red de fibras depende de una serie de factores, tales como orientación de la fibra, rigidez de la fibra y compactación de la fibra (Rozenberga et al. 2016; Ul-Islam et al. 2013); por lo tanto, la razón del comportamiento de la NCB producida en esta investigación podría estar relacionado con la cantidad de la producción de la misma, lo que permitió que una red BC-B más gruesa y densa fuera producida en relación con las otras redes de NCB y además, permitió la compactación para producir fibras dispuestas adecuadamente, debido a que la NCB tiene una estructura en capas (Gu and Catchmark 2012), a pesar de la reducción de los puentes de hidrógeno intra e intercadenas de los grupos hidroxilos. Las propiedades de tracción de la NCB producidos en los medios de cultivo de lactosuero y mango (BC-CW y BC-M) fueron menores que los de BC-B y BC-HS (control). Para BC-M, este resultado fue debido a que la baja concentración de glucosa redujo la producción de NCB (1,89 g/L) y condujo a una menor compactación y menos puentes de hidrógeno intra e intercadena de los grupos hidroxilos (como se muestra en la Figura 2). Por otro lado, el lactosuero tiene una alta concentración de glucosa (23 g/L, muy cercana a la concentración de glucosa en el medio HS), y el rendimiento de BC-CW fue muy similar al de BC-HS, sin embargo, las propiedades mecánicas fueron muy bajas, y esto fue debido a la presencia de grasas y proteínas aglomeradas que posiblemente incluyan caseinato, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica bovina, inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa y enzimas (Onwulata and Huth 2009), que son insoluble en agua y actuarían para reducir la compactación de las fibras, tal como lo que ocurre cuando se agrega PHB al medio de cultivo (Ruka, Simon, and Dean 2013). En general, las propiedades mecánicas de la NCB producida pueden verse afectadas utilizando FSCW, pero las propiedades de tracción fueron comparables a los valores obtenidos por Retegi et al. (2009), Hsieh et al. (2008) y Henriksson et al. (2008).

Tabla 5. Comparativo de las propiedades mecánicas de NCB obtenidas a partir de FSCW y subproductos agroindustriales

Fuente de medio de cultivo	Módulo de elasticidad (GPa)	Resistencia máxima (MPa)	Deformación (%)	Referencias
Banano	9,4±1,2	280,6±31,3	4,9±0,6	Esta investigación
Mango	1,6±0,4	28,1±6,4	1,4±0,3	
Lactosuero	0,8±0,2	17,7±1,8	1,8±0,4	
HS (ref)	6,0±0,4	162,4±29,5	3,0±0,8	
Residuos ricos en harina	0,9	72,3	7,0	(Tsouko et al. 2015)
Cascarilla de café	N/A	28,5	0,2 mm	(Rani and Appaiah 2013)
Residuos hidrolizados industria algodón	N/A	0,07	N/A	(Hong et al. 2012)

La Figura 3 muestra las curvas de análisis termogravimétrico, y sus derivadas, de las NCB obtenidas de cada medio de cultivo evaluado, y la Tabla 6 presenta los parámetros térmicos. A partir de los termogramas obtenidos se pueden observar dos eventos que ocurren a 68 °C y entre 320 y 370 °C; el primer evento corresponde a la pérdida de humedad en la celulosa, y el segundo corresponde a la degradación de la celulosa. Sin embargo, BC-CW muestra un evento adicional a 400 °C y no muestra el fenómeno de pérdida de agua. En la literatura, la temperatura de degradación inicial (IDT) ha sido reportada entre 220 y 300 °C, y la temperatura de máxima velocidad de degradación (MRDT) se ha informado entre 348 y 361 °C (Roman† and and William T. Winter* 2004; Shimada, Kawamoto, and Saka 2008; Machado et al. 2016). En el caso de BC-HS, la temperatura de degradación inicial (IDT) fue de 287 °C, y la temperatura de máxima velocidad de degradación (MRDT) fue de 362 °C, que es la referencia. Estos valores están bastante cerca a los reportados en la literatura, pero se encuentran algunas diferencias con los otros, BC-B y BC-M, que se degradaron a 353 °C y 327 °C, respectivamente. Este resultado podría estar relacionado con la reducción de enlaces de hidrógeno en la estructura de NCB producida en cada medio de cultivo utilizado, como se muestra en la Figura 3.2, donde la banda correspondiente a OH, que se extiende a 3000-3500 cm⁻¹, disminuyó, provocando una disminución de la estabilidad térmica en BC-B y BC-M con

respecto a BC-HS (Song et al. 2015; Jiang et al. 2000; Shanshan, Jianqing, and Zhengwei 2012). Este hecho también podría estar relacionado con la presencia de catalizadores tales como iones metálicos, como se muestra en la Tabla 3, que puede alterar la descomposición térmica de la celulosa, haciendo que comience a una temperatura más baja, lo que resulta en una curva de DTG más amplia (Varhegyi et al. 1988). Otra explicación para este comportamiento podría estar relacionado con la disminución de ICR, como se muestra en la Tabla 4, el ICR y el TID están disminuyendo en el siguiente orden: BC-HS > BC-B > BC-M > BC-CW. Por lo tanto, la disminución de la cristalinidad podría ser la razón del comportamiento de degradación térmica en la NCB producido a partir de los diferentes medios de cultivo usados en esta investigación (Roman† and and William T. Winter* 2004). Además, BC-CW mostró un evento, además de la degradación de celulosa, a 400 °C, que corresponde a la fracción residual de grasa y proteína de la leche en el lactosuero (Sunooj et al. 2011) y un residual en 800 °C de 4,37 %, corroborando el resultado observado en el espectro de IR que no solo era NCB.

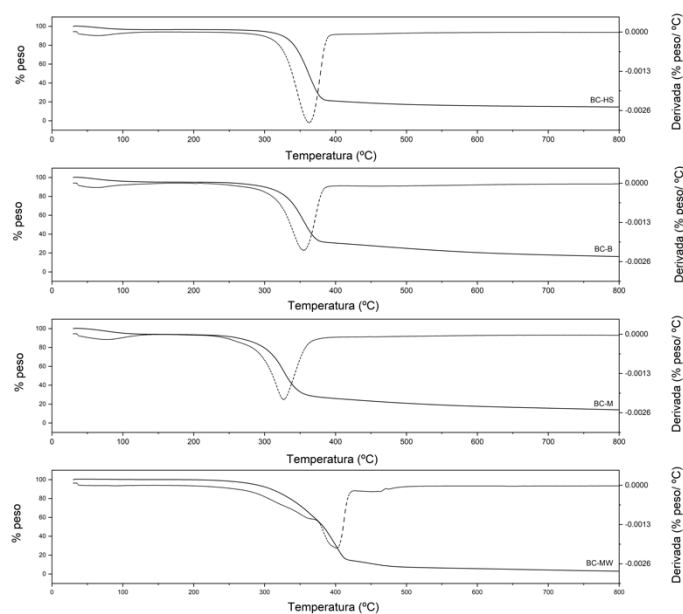


Figura 3. TGA-DTG de celulosa bacteriana obtenida a partir de los diferentes medios de cultivo obtenidos a partir de medio HS (BC-HS), banano (BC-B), mango (BC-M) y lactosuero (BC-CW)). Línea continua: TGA, línea punteada: DTG

Tabla 6. Parámetros termogravimétricos de la degradación de NCB

Muestra	TID (°C)	MRDT (°C)	Residual (%)
BC-CW	237	368	4,37
BC-M	240	327	14,07
BC-B	246	355	17,14
BC-HS	287	362	15,05

La NCB se ha utilizado para una amplia variedad de aplicaciones, que van desde dispositivos médicos, alimentos, nanomateriales compuestos, aerogeles, matrices de inmovilización e industrias de papel y fibra, y cada una de estas aplicaciones requiere celulosa con propiedades de físicas particulares (Kumbhar, Rajwade, and Paknikar 2015). Por esta razón, las diferentes celulosas bacterianas producidas en esta investigación pueden tener diferentes aplicaciones de acuerdo con sus propiedades mecánicas y térmicas, es decir, BC-B, debido a su resistencia a la tracción, podría usarse en el campo de materiales compuestos, tales como polímeros iónicos en materiales metálicos compuestos (Jeon et al. 2010) o materiales compuestos de alta resistencia (Nakagaito, Iwamoto, and Yano 2005). Por su parte, debido a su estabilidad térmica, BC-CW podría usarse como estabilizador en suspensión de bebidas calientes (bebidas de chocolate) (Okiyama, Motoki, and Yamanaka 1993), y BC-M podría ser utilizado en la industria alimentaria como películas comestibles para proteger frutas y verduras (George and Siddaramaiah 2012).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados de este capítulo, el lactosuero y frutas de mango y banano en un estado de descomposición tal que se consideran como no aptas para el consumo humano son buenas opciones como materias primas abundantes y de bajo costo, para producir NCB y agregando valor a estos residuos agroindustriales. Asimismo, se ayuda a evitar un daño ambiental porque se desvían estos residuos de la disposición en suelos y cuerpos de agua que pueden generar afectaciones en los ecosistemas.

Por otra parte, la NCB producida a partir de tales materias primas tienen diferentes propiedades físicas, que podrían tener diferentes aplicaciones en diferentes campos, y su producción es más alta que la obtenida del medio de cultivo comercial HS. Diferentes

factores, como un alto contenido de glucosa, proporción de iones metálicos y componentes poliméricos, afectaron la producción de NCB y sus propiedades; así, BC-B fue el de mayor rendimiento y con las propiedades mecánicas más altas. Por eso, a partir de este punto se usó banano como la fuente de carbono alternativa más eficiente y se establecieron las mejores condiciones para la obtención de NCB a partir de banano no apto para el consumo humano, empezando desde la optimización de las condiciones de cultivo para aumentar la densidad celular del inóculo, tal como se muestra en el siguiente capítulo.

Referencias

- Adhikari, Bijaya K, Suzelle Barrington, and José Martinez. 2006. “Predicted Growth of World Urban Food Waste and Methane Production.” *Waste Management & Research* 24 (5): 421–33. <https://doi.org/10.1177/0734242X06067767>.
- Agronet. 2017. “Estadísticas Agrícola: Área, Producción, Rendimiento y Participación.” <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
- Benziman, M, and B Rivetz. 1972. “Factors Affecting Hexose Phosphorylation in *Acetobacter Xylinum*.” *Journal of Bacteriology* 111 (2): 325–33. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=251285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Carvalho, Fátima, Ana R Prazeres, and Javier Rivas. 2013. “Cheese Whey Wastewater: Characterization and Treatment.” *Science of The Total Environment* 445–446: 385–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>.
- Castro, C, I Cleenwerck, J Trcek, R Zuluaga, P De Vos, G Caro, R Aguirre, J L Putaux, and P Ganán. 2013. “*Gluconacetobacter Medellinensis* Sp Nov., Cellulose- and Non-Cellulose-Producing Acetic Acid Bacteria Isolated from Vinegar.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 1119–25. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.043414-0>.
- Castro, Cristina, Robin Zuluaga, Jean-Luc Putaux, Gloria Caro, Iñaki Mondragon, and Piedad Gañán. 2011. “Structural Characterization of Bacterial Cellulose Produced by

- Gluconacetobacter Swingsii Sp. from Colombian Agroindustrial Wastes.” *Carbohydrate Polymers* 84 (1): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>.
- Chen, Lin, Feng Hong, Xue xia Yang, and Shi fen Han. 2013. “Biotransformation of Wheat Straw to Bacterial Cellulose and Its Mechanism.” *Bioresource Technology* 135: 464–68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029>.
- Cocinero, Emilio J., David P. Gamblin, Benjamin G. Davis, and John P. Simons. 2009. “The Building Blocks of Cellulose: The Intrinsic Conformational Structures of Cellobiose, Its Epimer, Lactose, and Their Singly Hydrated Complexes.” *Journal of the American Chemical Society* 131 (31): 11117–23. <https://doi.org/10.1021/ja903322w>.
- Dinero, Revista. 2015. “¿Cómo Está El Sector Lechero?: Un Llamado a Mejorar.” <http://www.dinero.com/economia/articulo/analisis-del-sector-lechero-colombia-2015/211145>.
- Emaga, Thomas Happi, Rado Herinaivalona Andrianaivo, Bernard Wathelet, Jean Tchango Tchango, and Michel Paquot. 2007. “Effects of the Stage of Maturation and Varieties on the Chemical Composition of Banana and Plantain Peels.” *Food Chemistry* 103 (2): 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>.
- FAO. 2011. “Global Food Losses And Food Waste-Extent, Causes and Prevention.”
- Fox, P F, P L H MaSweeney, Timothy Cogan, and Guinee Timothy. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. 1st ed. Springer US.
- Future Markets, Inc. 2015. “The Global Market for Nanocellulose to 2017.”
- George, Johnsy, and Siddaramaiah. 2012. “High Performance Edible Nanocomposite Films Containing Bacterial Cellulose Nanocrystals.” *Carbohydr. Polym.* 87 (3): 2031–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.019>.
- Gu, Jin, and Jeffrey M Catchmark. 2012. “Impact of Hemicelluloses and Pectin on Sphere-like Bacterial Cellulose Assembly.” *Carbohydr. Polym.* 88 (2): 547–57. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.040>.

- Hackney, J M, R H Atalla, and D L VanderHart. 1994. "Modification of Crystallinity and Crystalline Structure of *Acetobacter Xylinum* Cellulose in the Presence of Water-Soluble β -1,4-Linked Polysaccharides: ^{13}C -NMR Evidence." *Int. J. Biol. Macromol.* 16 (4): 215–18. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90053-1).
- Henriksson, Marielle, Lars A Berglund, Per Isaksson, Tom Lindström, and Takashi Nishino. 2008. "Cellulose Nanopaper Structures of High Toughness." *Biomacromolecules* 9 (6): 1579–85. <https://doi.org/10.1021/bm800038n>.
- Hioki, Nobuya, Yoshinori Hori, Kunihiro Watanabe, Yasushi Morinaga, Fumihiko Yoshinaga, Yoshihiko Hibino, and Toshimasa Ogura. 1995. "Bacterial Cellulose ; as a New Material for Papermaking." *JAPAN TAPPI JOURNAL* 49 (4): 718–23. <https://doi.org/10.2524/jtappij.49.718>.
- Hong, Feng, Xiang Guo, Shuo Zhang, Shi-fen Han, Guang Yang, and Leif J Jönsson. 2012. "Bacterial Cellulose Production from Cotton-Based Waste Textiles: Enzymatic Saccharification Enhanced by Ionic Liquid Pretreatment." *Bioresour. Technol.* 104: 503–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>.
- Hsieh, Y.-C., H Yano, M Nogi, and S J Eichhorn. 2008. "An Estimation of the Young's Modulus of Bacterial Cellulose Filaments." *Cellulose* 15 (4): 507–13. <https://doi.org/10.1007/s10570-008-9206-8>.
- Hungund, Basavaraj S, and S G Gupta. 2010. "Production of Bacterial Cellulose from *Enterobacter Amnigenus* GH-1 Isolated from Rotten Apple." *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (10): 1823–28. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0363-1>.
- Imai, Tomoya, and Junji Sugiyama. 1998. "Nanodomains of I α and I β Cellulose in Algal Microfibrils." *Macromolecules* 31 (18): 6275–79. <https://doi.org/10.1021/ma980664h>.
- Jeon, Jin-Han, Il-Kwon Oh, Chang-Doo Kee, and Seong-Jun Kim. 2010. "Bacterial Cellulose Actuator with Electrically Driven Bending Deformation in Hydrated Condition." *Sensors and Actuators B: Chemical* 146 (1): 307–13. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.02.046>.

- Jiang, Shimei, Weiqing Xu, Bing Zhao, Yanqing Tian, and Yingying Zhao. 2000. "The Thermal Stability and Molecular Structural Changes of a Intermolecular Hydrogen Bonded Liquid Crystal Compound." *Materials Science and Engineering: C* 11 (2): 85–88. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(00\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(00)00188-0).
- Jozala, Angela Faustino, Renata Aparecida Nedel Pértile, Carolina Alves dos Santos, Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma, Marcelo Martins Seckler, Francisco Miguel Gama, and Adalberto Pessoa. 2015. "Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter Xylinus* by Employing Alternative Culture Media." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (3): 1181–90. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>.
- Keshk, Sherif M A S, Taha M A Razek, and Kazuhiko Sameshima. 2006. "Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses." *African Journal of Biotechnology* 5 (17): 1519–23. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/43149/26692>.
- Keshk, Sherif M A S, and Kazuhiko Sameshima. 2005. "Evaluation of Different Carbon Sources for Bacterial Cellulose Production." *African Journal of Biotechnology. Academic Journals (Kenya)*. <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i6.15125>.
- Klemm, Dieter, Dieter Schumann, Ulrike Udhardt, and Silvia Marsch. 2001. "Bacterial Synthesized Cellulose — Artificial Blood Vessels for Microsurgery." *Prog. Polym. Sci.* 26 (9): 1561–1603. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670001000211>.
- Kumbhar, Jyoti Vasant, Jyutika Milind Rajwade, and Kishore Madhukar Paknikar. 2015. "Fruit Peels Support Higher Yield and Superior Quality Bacterial Cellulose Production." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (16): 6677–91. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6644-8>.
- Lee, Koon-Yang, Yvonne Aitomäki, Lars A Berglund, Kristiina Oksman, and Alexander Bismarck. 2014. "On the Use of Nanocellulose as Reinforcement in Polymer Matrix Composites." *Compos. Sci. Technol.* 105: 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2014.08.032>.
- Lin, Carol Sze Ki, Lucie A Pfaltzgraff, Lorenzo Herrero-Davila, Egid B Mubofu, Solhy Abderrahim, James H Clark, Apostolis A Koutinas, et al. 2013. "Food Waste as a

- Valuable Resource for the Production of Chemicals{,} Materials and Fuels. Current Situation and Global Perspective.” *Energy Environ. Sci.* 6 (2): 426–64. <https://doi.org/10.1039/C2EE23440H>.
- Machado, Rachel T A, Junkal Gutierrez, Agnieszka Tercjak, Eliane Trovatti, Fernanda G M Uahib, Andresa P Nascimento, Andresa A Berreta, Sidney J L Ribeiro, and Hernane S Barud. 2016. “Komagataeibacterrhaeticus as an Alternative Bacteria for Cellulose Production.” *Carbohydr. Polym.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.049>.
- Mohite, Bhavna V., Kirtee K. Kamalja, and Satish V. Patil. 2012. “Statistical Optimization of Culture Conditions for Enhanced Bacterial Cellulose Production by *Gluconoacetobacter Hansenii* NCIM 2529.” *Cellulose* 19 (5): 1655–66. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9760-y>.
- Nakagaito, A N, S Iwamoto, and H Yano. 2005. “Bacterial Cellulose: The Ultimate Nano-Scalar Cellulose Morphology for the Production of High-Strength Composites.” *Applied Physics A* 80 (1): 93–97. <https://doi.org/10.1007/s00339-004-2932-3>.
- Nelson, Mary L., and Robert T. O’Connor. 1964a. “Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Lattice Type. Part II. A New Infrared Ratio for Estimation of Crystallinity in Celluloses I and II.” *Journal of Applied Polymer Science* 8 (3): 1325–41. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080323>.
- . 1964b. “Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Latticed Type. Part I. Spectra of Lattice Types I, II, III and of Amorphous Cellulose.” *Journal of Applied Polymer Science* 8 (3): 1311–24. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080322>.
- Okiyama, Atsushi, Masao Motoki, and Shigeru Yamanaka. 1993. “Bacterial Cellulose IV. Application to Processed Foods.” *Food Hydrocolloids* 6 (6): 503–11. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80074-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80074-X).
- Onwulata, Charles, and Peter Huth. 2009. *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. John Wiley & Sons. https://books.google.com/books?id=wlhk_CmdZMAC&pgis=1.

- Park, Yong Bum, Christopher M Lee, Kabindra Kafle, Sunkyu Park, Daniel J Cosgrove, and Seong H Kim. 2014. "Effects of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharides on Bacterial Cellulose Structure Studied with Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy and X-Ray Diffraction." *Biomacromolecules* 15 (7): 2718–24. <https://doi.org/10.1021/bm500567v>.
- Rajwade, J M, K M Paknikar, and J V Kumbhar. 2015. "Applications of Bacterial Cellulose and Its Composites in Biomedicine." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (6): 2491–2511. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6426-3>.
- Rani, M Usha, and K A Anu Appaiah. 2013. "Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* UAC09 Using Coffee Cherry Husk." *J. Food Sci. Technol.* 50 (4): 755–62. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0401-5>.
- Retegi, A., N. Gabilondo, C. Peña, R. Zuluaga, C. Castro, P. Gañan, K. de la Caba, and I. Mondragon. 2009. "Bacterial Cellulose Films with Controlled Microstructure–mechanical Property Relationships." *Cellulose* 17 (3): 661–69. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9389-7>.
- Rivas, Beatriz, Ana B Moldes, José M Domínguez, and Juan C Parajó. 2004. "Development of Culture Media Containing Spent Yeast Cells of *Debaryomyces Hansenii* and Corn Steep Liquor for Lactic Acid Production with *Lactobacillus Rhamnosus*." *Int. J. Food Microbiol.* 97 (1): 93–98. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504002788>.
- Roman†, Maren, and ‡ and William T. Winter*. 2004. "Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose." *Biomacromolecules* 5 (5): 1671–77. <https://doi.org/10.1021/bm034519+>.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, et al. 1987. "Regulation of Cellulose Synthesis in *Acetobacter Xylinum* by Cyclic Diguanylic Acid." *Nature* 325 (6101): 279–81. <https://doi.org/10.1038/325279a0>.
- Ross, P, R Mayer, and M Benziman. 1991. "Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria." *Microbiological Reviews* 55 (1): 35–58.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030672>.

- Rozenberga, Linda, Marite Skute, Lubova Belkova, Inese Sable, Laura Vikele, Pavels Semjonovs, Madara Saka, Maija Ruklisha, and Longina Paegle. 2016. "Characterisation of Films and Nanopaper Obtained from Cellulose Synthesised by Acetic Acid Bacteria." *Carbohydrate Polymers* 144 (June): 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.025>.
- Ruka, Dianne R, George P Simon, and Katherine M Dean. 2013. "In Situ Modifications to Bacterial Cellulose with the Water Insoluble Polymer Poly-3-Hydroxybutyrate." *Carbohydrate Polymers* 92 (2): 1717–23. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>.
- Saichana, Natsaran, Kazunobu Matsushita, Osao Adachi, Ivo Frébort, and Jitka Frebortova. 2015. "Acetic Acid Bacteria: A Group of Bacteria with Versatile Biotechnological Applications." *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2): 1260–71. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>.
- Santos, Sara M, José M Carbajo, Nuria Gómez, Ester Quintana, Miguel Ladero, Arsenio Sánchez, Gary Chinga-Carrasco, and Juan C Villar. 2016. "Use of Bacterial Cellulose in Degraded Paper Restoration. Part II: Application on Real Samples." *J. Mater. Sci.* 51 (3): 1553–61. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9477-z>.
- Shah, Jay, and R Malcolm Brown. 2005. "Towards Electronic Paper Displays Made from Microbial Cellulose." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (4): 352–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1756-6>.
- Shanshan, Gao, Wang Jianqing, and Jin Zhengwei. 2012. "Preparation of Cellulose Films from Solution of Bacterial Cellulose in NMMO." *Carbohydrate Polymers* 87 (2): 1020–25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.040>.
- Shi, Zhijun, Yue Zhang, Glyn O Phillips, and Guang Yang. 2014. "Utilization of Bacterial Cellulose in Food." *Food Hydrocolloids* 35 (0): 539–45. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13002142>.
- Shimada, Naoki, H Kawamoto, and S Saka. 2008. "Different Action of Alkali/Alkaline

- Earth Metal Chlorides on Cellulose Pyrolysis.” *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 81 (1): 80–87. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2007.09.005>.
- Song, Ping'an, Zhiguang Xu, Yuan Lu, and Qipeng Guo. 2015. “Bioinspired Strategy for Tuning Thermal Stability of PVA via Hydrogen-Bond Crosslink.” *Composites Science and Technology* 118 (October): 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.08.006>.
- Stuart, Barbara H. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Analytical Techniques in the Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- Suárez, Magda. 2010. “Study of Ci (Competitive Intelligence) Colombian Dairy Chain in Two Specific Products: Fresh Cheese and Arequipe to the U.S. Market.” Universidad Nacional de Colombia.
- Sunooj, K. V., J. George, V. A. Sajeev Kumar, K. Radhakrishna, and A. S. Bawa. 2011. “Thermal Degradation and Decomposition Kinetics of Freeze Dried Cow and Camel Milk as Well as Their Constituents.” *Journal of Food Science & Engineering* 1 (2): 77–84. <http://connection.ebscohost.com/c/articles/72270914/thermal-degradation-decomposition-kinetics-freeze-dried-cow-camel-milk-as-well-as-their-constituents>.
- Thompson, David N, and Melinda A Hamilton. 2001. “Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks.” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91 (1): 503–13. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503>.
- Tsouko, Erminda, Constantina Kourmentza, Dimitrios Ladakis, Nikolaos Kopsahelis, Ioanna Mandala, Seraphim Papanikolaou, Fotis Paloukis, Vitor Alves, and Apostolis Koutinas. 2015. “Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and By-Product Streams.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 14832–49. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.
- Ude, Susanne, Dawn L Arnold, Christina D Moon, Tracey Timms-Wilson, and Andrew J Spiers. 2006. “Biofilm Formation and Cellulose Expression among Diverse Environmental Pseudomonas Isolates.” *Environ. Microbiol.* 8 (11): 1997–2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01080.x>.

- Ul-Islam, Mazhar, Jung Hwan Ha, Taous Khan, and Joong Kon Park. 2013. "Effects of Glucuronic Acid Oligomers on the Production, Structure and Properties of Bacterial Cellulose." *Carbohydrate Polymers* 92 (1): 360–66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.060>.
- Varhegyi, Gabor, Michael J Antal Jr., Tamas Szekely, Ferenc Till, and Emma Jakab. 1988. "Simultaneous Thermogravimetric-Mass Spectrometric Studies of the Thermal Decomposition of Biopolymers. 1. Avicel Cellulose in the Presence and Absence of Catalysts." *Energy & Fuels* 2 (3): 267–72. <https://doi.org/10.1021/ef00009a007>.
- Vazquez, Analía, María Laura Foresti, Patricia Cerrutti, and Miguel Galvagno. 2013. "Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter Xylinus*." *J. Polym. Environ.* 21 (2): 545–54. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>.
- Wan, Y Z, Y Huang, C D Yuan, S Raman, Y Zhu, H J Jiang, F He, and C Gao. 2007. "Biomimetic Synthesis of Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposites for Biomedical Applications." *Materials Science and Engineering: C* 27 (4): 855–64. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.10.002>.
- Weinhouse, H, S Sapir, D Amikam, Y Shilo, G Volman, P Ohana, and M Benziman. 1997. "C-Di-GMP-Binding Protein, a New Factor Regulating Cellulose Synthesis in *Acetobacter Xylinum*." *FEBS Letters* 416 (2): 207–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369216>.
- Yamada, Yuzo. 2014. "Transfer of *Gluconacetobacter Kakiaceti*, *Gluconacetobacter Medellinensis* and *Gluconacetobacter Maltaceti* to the Genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter Kakiaceti* Comb. Nov., *Komagataeibacter Medellinensis* Comb. Nov. and *Komagataeibacter Maltaceti* Comb." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 5): 1670–72. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054494-0>.
- Yamamoto, Hiroyuki, Fumitaka Horii, and Asako Hirai. 1996. "In Situ Crystallization of Bacterial Cellulose II. Influences of Different Polymeric Additives on the Formation of Celluloses Ia and Ib at the Early Stage of Incubation." *Cellulose* 3 (1): 229–42.

<https://doi.org/10.1007/BF02228804>.

Zugenmaier, Peter. 2008. *Crystalline Cellulose and Derivatives: Characterization and Structures*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-73934-0_5.

Capítulo 3 Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar la densidad celular de *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288: el primer paso para optimizar la producción de nanocelulosa bacteriana

Introducción

Tal como se señaló en el capítulo anterior, una vez determinado que el jugo del banano no apto para el consumo humano es el residuo agroindustrial que permitió obtener los rendimientos más altos de NCB por *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288, en este apartado se explora la alternativa de la producción de NCB a través de dos pasos: primero agitado y luego estático.

Como se mencionó previamente, el microorganismo *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 pertenece a un grupo de bacterias aeróbicas obligadas llamadas bacterias de ácido acético, que se caracterizan por su capacidad de convertir azúcares y alcoholes en sus ácidos orgánicos correspondientes a través de la fermentación oxidativa incompleta (Deppenmeier and Ehrenreich 2009; Barja et al. 2016). Sin embargo, otra característica de *K. medellinensis* NBRC 3288 es su capacidad de producir celulosa, concretamente nanocelulosa bacteriana (NCB), a un pH muy bajo respecto al que requieren otras de su tipo (Castro et al. 2012).

La biogénesis de la NCB es un proceso de cuatro pasos que comienza con la fosforilación de glucosa y termina con la síntesis de celulosa (Haigler and Benziman 1982; Ross, Mayer, and Benziman 1991; Zhang 2013). Este proceso de conversión de un sustrato de fosfato de hexosa a nucleótidos de azúcar representa la interfaz entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario (Ramos et al. 2001). Este hecho implicaría que la NCB podría ser un metabolito secundario.

Se ha demostrado que la densidad celular inicial es un factor clave para mejorar el rendimiento de la CB (Okiyama et al. 1992; Zeng, Small, and Wan 2011), ya que la producción de exopolisacáridos como es el caso de la NCB está relacionada con el proceso de detección *Quorum Sensing* (QS), que regula la expresión génica en respuesta a las

fluctuaciones en la densidad celular (Miller and Bassler 2001; Jayaraman and Wood 2008; Augimeri, Varley, and Strap 2015). Por lo tanto, aumentar el tamaño de inóculo inicial reduce el tiempo de fase de latencia, lo que le permite entrar rápidamente en la fase de crecimiento exponencial (Shuler and Kargı 2002). La reducción del tiempo necesario para llegar a esta etapa podría reducir notablemente los costos del proceso de producción de NCB.

A pesar de que la metodología de superficie de respuesta (RSM) es una herramienta versátil y poderosa ampliamente utilizada en muchos campos de investigación (F. Shi, Xu, and Cen 2006; Bezerra et al. 2008; Hajati, Ghaedi, and Yaghoubi 2015), su aplicación en el proceso de optimización de las condiciones de cultivo para obtener una alta densidad celular utilizando *K. medellinensis* NBRC 3288 no ha sido considerada hasta el momento. La revisión de la literatura sugiere que este es el primer estudio para optimizar.

Por lo tanto, este capítulo se centra en iniciar el proceso de optimización de la producción de NCB a través del aumento de la densidad celular del inóculo de *K. medellinensis* NBRC 3288 considerando una estrategia de dos pasos: 1) agitación, para la obtención del inóculo celular en condiciones altamente concentradas el cual servirá en la siguiente etapa 2) estático, durante la cual se producirá la NCB.

Materiales and métodos

Obtención del inóculo

K. medellinensis NBRC 3288 se obtuvo de vinagre casero en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Pontificia Bolivariana en Medellín, Colombia (Castro et al. 2013). La cepa se almacenó en viales de 1,5 mL en medio HS (Hestrin and Schramm 1954) a pH 3,5 y 20 % (v/v) de glicerol a -80 °C. El medio de cultivo de siembra contenía (p/v) 2 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,5 % de extracto de levadura, 0,267 % Na_2HPO_4 , 0,8 % de ácido cítrico y 3 % (v/v) Celluclast 1.5L, agregada después de la esterilización. Para obtener el inóculo, se añadió un vial a un Erlenmeyer que contenía 100 ml de medio de cultivo de siembra y se agitó en un agitador orbital a 120 rpm durante 2 días.

Fermentación en la etapa de cribado

Después de 2 días, el medio de cultivo que contenía el inóculo se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a 7-8 °C, se recogió el sedimento y se volvió a suspender en agua destilada esterilizada hasta que la densidad óptica (DO) se ajustó a 0,5 usando un espectrofotómetro UV a 600 nm (DO₆₀₀). Luego se transfirió un tamaño de inóculo del 10 %(v/v) a un Erlenmeyer con 90 ml de medio de cultivo a 28 °C durante 120 h.

Etapas de optimización de la fermentación

La fermentación se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente; solo el tiempo de fermentación se cambió a 72 h. En este momento, el crecimiento celular comenzó a disminuir y esta fue la etapa de crecimiento en la que se obtuvo el inóculo para la producción de NCB.

Optimización por la metodología de superficie de respuesta (RSM)

Se realizó un diseño factorial fraccional $2^{(4-1)}$ para seleccionar los factores con efecto significativo sobre la variable de respuesta DO₆₀₀. Para tal fin, se evaluaron cuatro factores: concentración de glucosa, pH inicial, concentración de KH₂PO₄ y concentración de MgSO₄ debido al impacto que tienen el K y el Mg sobre el metabolismo de estas cepas. Una vez que se definieron los factores significativos, se aplicó la metodología de ascenso más pronunciado para obtener una nueva región experimental más precisa que estuviera más cercana al óptimo. Los niveles de los factores se muestran en la Tabla 7 y los tratamientos utilizados en esta etapa se muestran en la tabla 8.

Tabla 7. Factores y sus niveles para evaluar

Factor para evaluar	Nombre codificado	Niveles	
		Bajo	Alto
Glucosa (g/L)	X ₁	20,0	40,0
pH inicial	X ₂	3,50	5,00
MgSO ₄ (g/L)	X ₃	0,00	0,05
KH ₂ PO ₄ (g/L)	X ₄	0,00	0,05

En la nueva región experimental próxima al óptimo, se aplicó un diseño experimental de Box-Behnken para obtener un modelo de segundo orden que describe los datos

experimentales, al menos un 70% expresado por el parámetro R^2 (Gutiérrez Pulido et al. 2004). El modelo matemático obtenido para los factores significativos se expresa en la forma:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Donde β_0 es el coeficiente de intercepción, β_i son los coeficientes lineales, β_{ii} son el coeficiente cuadrático y β_{ij} el coeficiente de interacción. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). El diseño experimental, el análisis estadístico y los procesos de optimización se evaluaron utilizando el paquete de software estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI, StatPoint Technologies, Inc, The Plains, Virginia, EE. UU.

Producción de NCB

La producción de NCB se realizó en cultivo estático durante 6 días utilizando 45 ml de medio de cultivo HS inoculado con 5 ml de inóculo obtenido a partir del uso de las condiciones óptimas para aumentar la densidad celular. El rendimiento se calculó como el peso seco de la película de NCB dividido por el volumen total utilizado.

Resultados y discusión

Selección de los factores significativos

El comportamiento del crecimiento de *K. medellinensis* NBRC 3288 se evaluó mediante el cambio de la concentración de glucosa, KH_2PO_4 , MgSO_4 y la variación del pH inicial. El efecto de los ocho tratamientos experimentales diferentes se muestra en la Tabla 8. La Figura 4 muestra el perfil de crecimiento de *K. medellinensis* NBRC 3288 y la curva de ajuste, utilizando el modelo modificado de Gompertz (Zwietering et al. 1990).

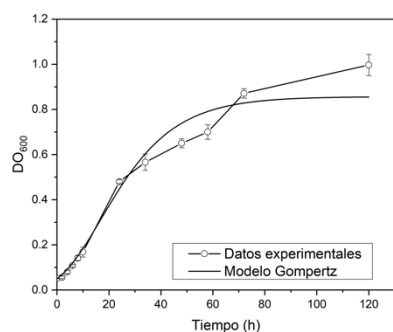
Tabla 8. Niveles de los factores evaluados en diseño de cribado y los resultados

Tratamiento	X_1	X_2	X_3	X_4	Densidad óptica (DO_{600})	Velocidad específica de crecimiento ($\mu\text{m}, \text{h}^{-1}$)
1	20	5,0	0,05	0	0,97	0,11
2	40	5,0	0,05	0,05	0,87	0,12
3	40	5,0	0,00	0,00	0,79	0,12

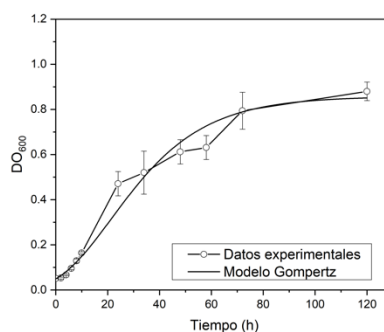
4	20	3,5	0,00	0,00	0,87	0,09
5	20	3,5	0,05	0,05	0,96	0,10
6	40	3,5	0,05	0,00	0,87	0,10
7	20	5,0	0,00	0,05	1,09	0,15
8	40	3,5	0,00	0,05	0,80	0,09

En la Figura 4 (tratamiento 1-tratamiento 8), la desaceleración del crecimiento celular comienza a las 72 h, lo que está en línea con los resultados obtenidos por Molina-Ramírez et al. (2017) en condiciones estáticas para la misma cepa, y en condiciones de agitación obtenidas por Yoshinaga, Tonouchi, and Watanabe (1997) y Okiyama et al. (1992) con una cepa perteneciente al género *Komagataeibacter*.

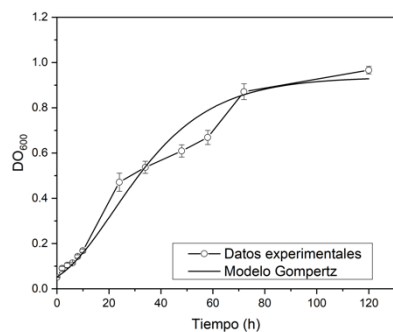
Estos resultados sugieren que el modo de fermentación (estático o agitado) no afectó el perfil de crecimiento de *Komagataeibacter spp.*, pero se obtuvo una mayor densidad celular con el modo agitado (biomasa medida de 1,09 DO₆₀₀) en comparación con el modo estático (biomasa medida de 0,69 DO₆₀₀), porque la transferencia de oxígeno es mayor en el modo agitado. Como la desaceleración del crecimiento de *K. medellinensis* NBRC 3288 comienza a las 72 h, esto sugiere que un inóculo en esta etapa, sería el más apropiado para usar en el proceso de producción de NCB (Chao et al. 2000; Bae and Shoda 2004).



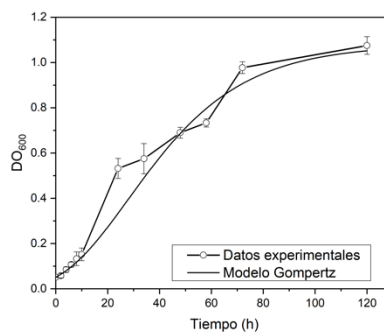
Tratamiento 1



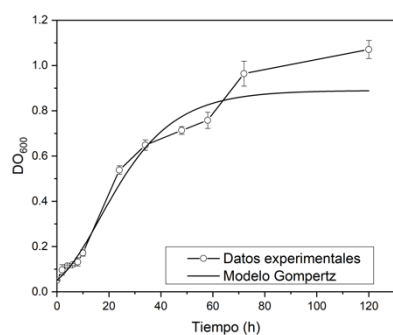
Tratamiento 2



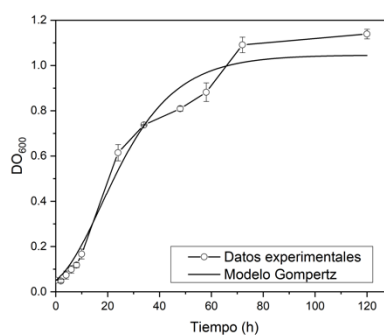
Tratamiento 3



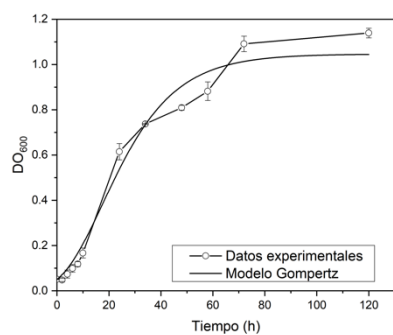
Tratamiento 4



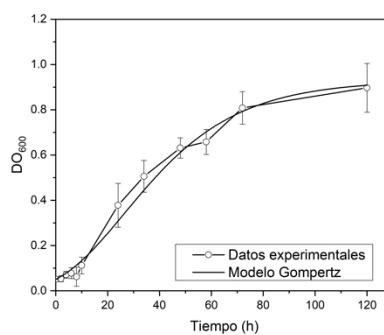
Tratamiento 5



Tratamiento 6



Tratamiento 7



Tratamiento 8

Figura 4. Efecto de la concentración de glucosa, KH_2PO_4 , MgSO_4 , y el pH inicial en la cinética de crecimiento de *K. medellinensis* NBRC 3288. Línea continua: modelo Gompertz modificado ajustado

Del mismo modo, la Tabla 8 muestra los resultados de la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m , h^{-1}) para cada tratamiento y, cuyo valor más alto se obtuvo con las condiciones usadas en el tratamiento con la densidad celular más alta de *K. medellinensis* NBRC 3288. Los resultados demostraron que la concentración de glucosa,

el pH inicial y la concentración de KH_2PO_4 tuvieron un efecto significativo sobre la densidad celular, mientras que la concentración de MgSO_4 no tuvo un efecto significativo. Esto podría explicarse por el hecho de que el extracto de levadura contiene trazas de Mg^{2+} (GRANT and PRAMER 1962) y el efecto de la adición de MgSO_4 al medio de cultivo se enmascaró. Por otro lado, KH_2PO_4 fue significativo porque es la única fuente de K^+ , que es muy importante para el metabolismo celular bacteriano (Nierhaus 2014).

Durante la etapa de optimización, la glucosa (en concentraciones más bajas) fue el único componente significativo que aumento la densidad celular. Sin embargo, no fue solo la densidad celular la que se incrementó; μ_m aumentó de $0,15 \text{ h}^{-1}$ a $0,23 \text{ h}^{-1}$ (34,78 % de mejora), probablemente porque el crecimiento exponencial es la suma de todas las reacciones en la célula y está controlado por la reacción de la enzima con la mayor afinidad por la glucosa, que es la única fuente de carbono y energía en el medio de cultivo (Monod 1949; Shehata and Marr 1971).

El diagrama de Pareto (Figura 5) muestra el efecto de los factores evaluados para la producción de biomasa (DO_{600}). El factor más significativo en el diagrama de Pareto, la glucosa en nuestro caso se aplicó a la metodología de ascenso más pronunciada para identificar un nuevo centro para una nueva región experimental para MSR (Saravanan et al. 2012).

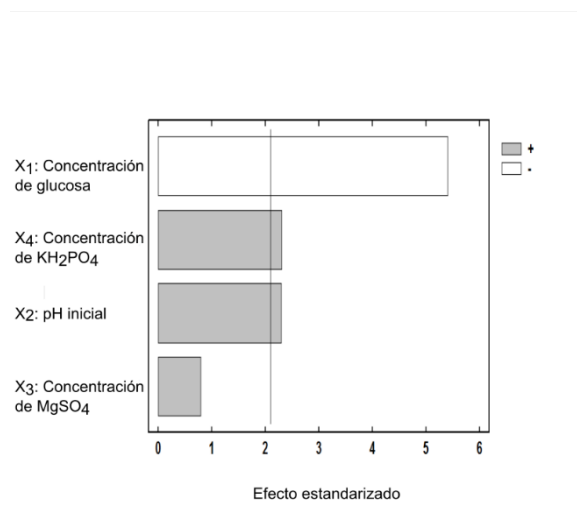


Figura 5. Diagrama de Pareto, donde se muestran los efectos principales de los factores evaluados sobre la densidad óptica. Notar que MgSO_4 fue el único factor

que no tuvo un efecto significativo. EL signo menos (-) en la concentración de glucosa implica que DO_{600} aumenta en la medida que la concentración de glucosa se reduce.

Los resultados de la metodología de ascenso más pronunciada se muestran en la Figura 6. El pico máximo ocurre en $X_1=0,5$ %(p/v) para la glucosa, $X_2=5,38$ para el pH inicial, y $X_4=0,058$ %(p/v), [X_3 se mantuvo en $0,025$ %(p/v)]. Estas condiciones serán el centro de la nueva región experimental para obtener un modelo de segundo orden para una densidad celular óptima.

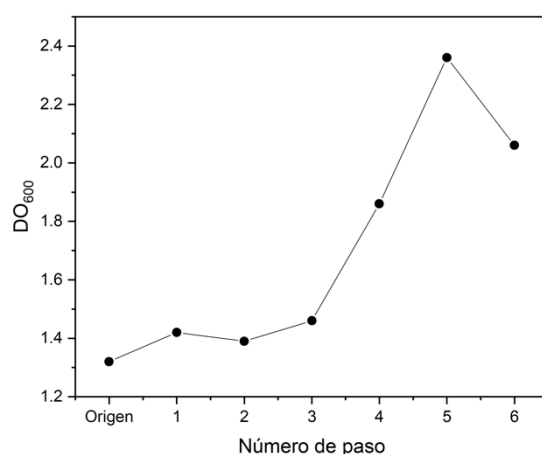


Figura 6. Perfil de los resultados de la metodología de ascenso pronunciado. Notar el pico en el paso 5, esto significa que alrededor de estas condiciones se ubica el centro de nuestra nueva región experimental.

Optimización usando la metodología de superficie de respuesta

Como se mencionó anteriormente, la nueva región experimental usará como punto central: concentración de glucosa [$X_1=0,5$ %(p/v)], pH inicial ($X_2=5,38$) y KH_2PO_4 [$X_4=0,058$ %(p/v)], seleccionado en el quinto paso de la metodología de ascenso más inclinado para optimizar la producción de biomasa con un diseño Box-Behnken. Los 15 tratamientos del diseño Box-Behnken se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Tratamientos del diseño Box-Behnken y los resultados

Tratamiento	X ₁	X ₂	X ₄	Densidad óptica (DO ₆₀₀)
1	0,50	5,58	0,063	2,85
2	0,25	5,38	0,053	2,70
3	0,75	5,58	0,058	2,77
4	0,50	5,18	0,053	2,81
5	0,25	5,58	0,058	2,69
6	0,50	5,18	0,063	2,84
7	0,50	5,58	0,053	2,83
8	0,25	5,38	0,063	2,68
9	0,75	5,38	0,053	2,76
10	0,50	5,38	0,058	2,82
11	0,25	5,18	0,058	2,73
12	0,50	5,38	0,058	2,85
13	0,75	5,38	0,063	2,77
14	0,50	5,38	0,058	2,85
15	0,75	5,18	0,058	2,80

Las Figuras 7 y 8 muestran las gráficas de superficie de respuesta para la producción de biomasa manteniendo al pH inicial y la concentración de KH₂PO₄ un nivel a la vez, respectivamente. Estos resultados muestran que una concentración de glucosa de ~ 0,5 %(p/v) fue la más adecuada para optimizar la producción de biomasa (2,80-2,88 DO₆₀₀).

La Tabla 10 proporciona un resumen ANOVA del modelo, y el modelo matemático de segundo orden se describe en la ecuación 3.

$$\begin{aligned} \text{Densidad celular (DO}_{600}\text{)} \\ = 4,06 + 1,01X_1 - 1,32X_2 + 71,5X_4 - 1,62X_1^2 + 0,05X_1X_2 \\ + 6,66X_1X_4 + 0,13X_2^2 - 3,33X_2X_4 \\ - 483,33X_4^2 \end{aligned} \quad (3)$$

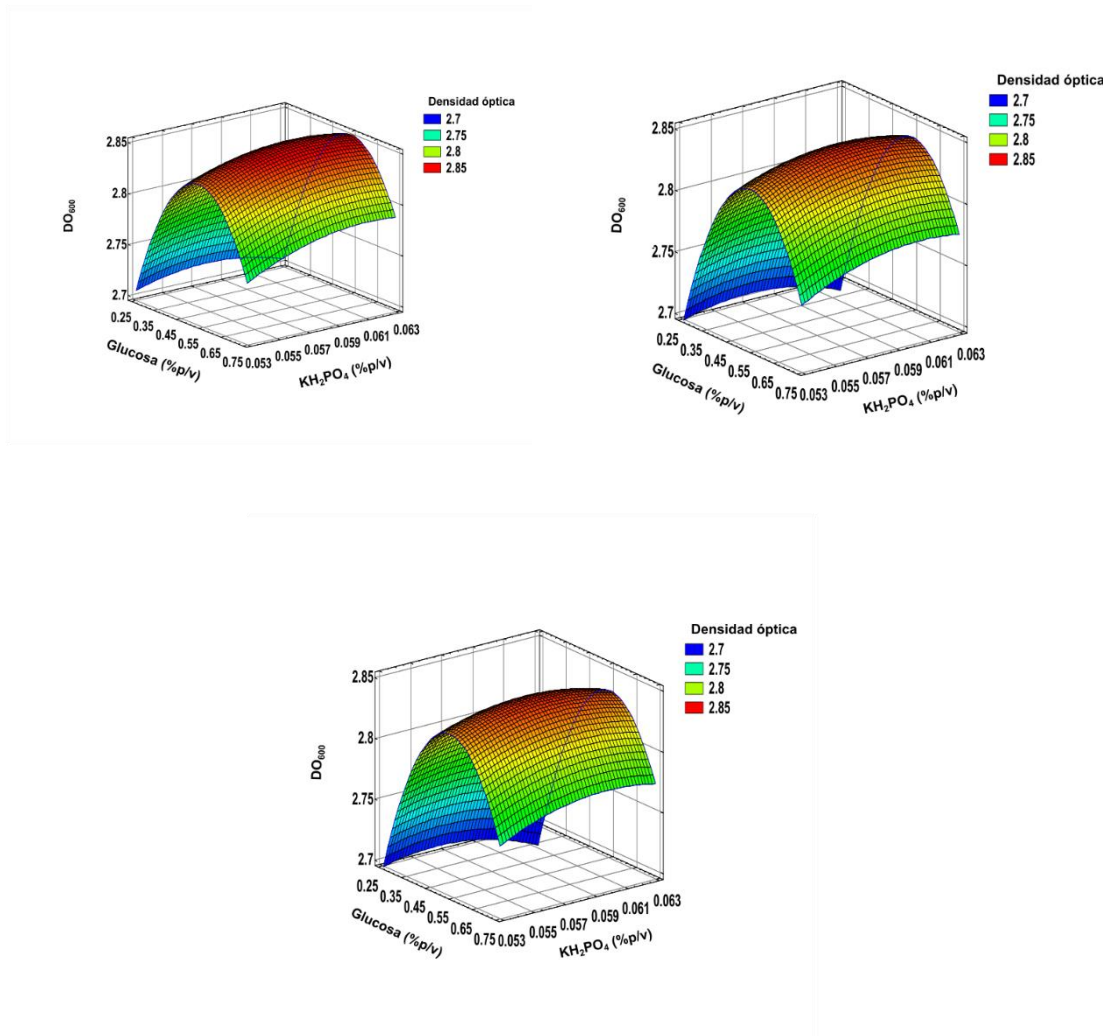


Figura 7. Efecto de la concentración de glucosa y KH_2PO_4 sobre la densidad celular. a) pH 5,18, b) pH 5,38 y c) pH 5,58

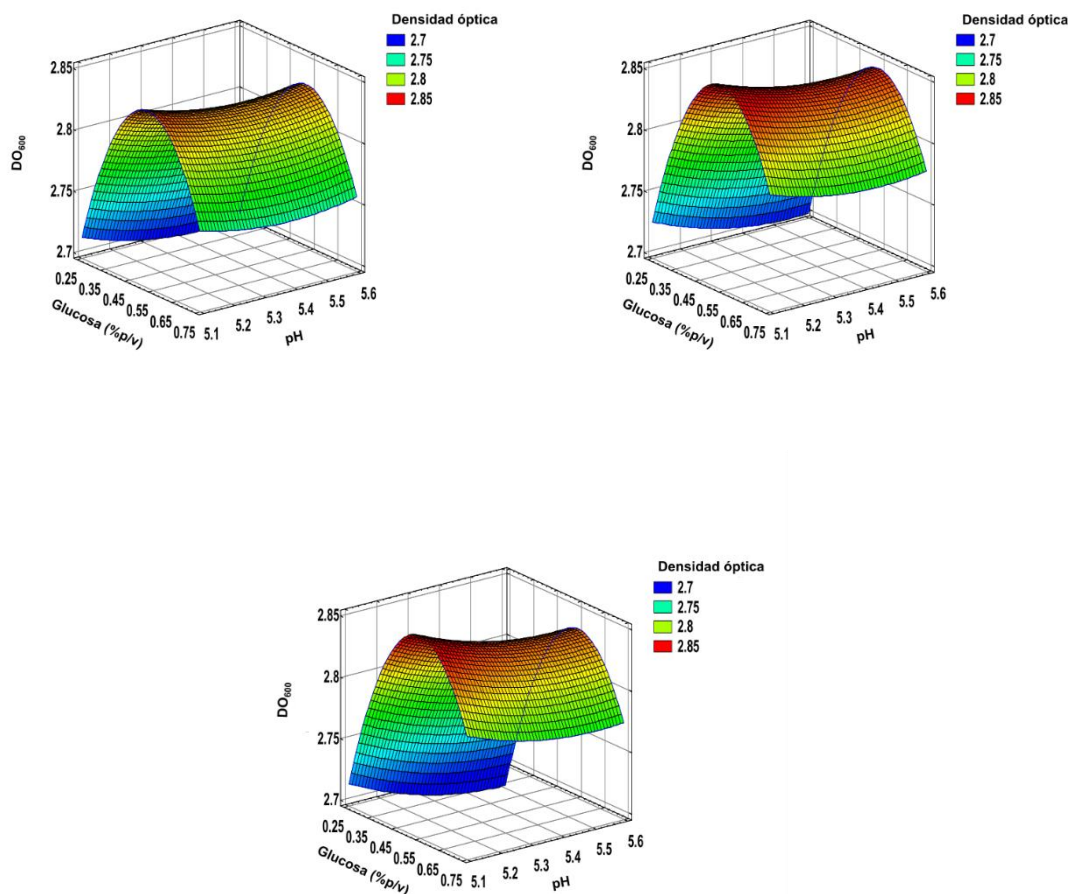


Figura 8. Efecto de la concentración de glucosa y el pH inicial sobre la densidad celular. a) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,053$ %p/v, b) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,058$ %p/v y c) $\text{KH}_2\text{PO}_4=0,06$ %p/v

Los resultados del ANOVA, en la Tabla 10, muestran que el modelo explica adecuadamente el 72.09% de los datos, y la función optimización de STATGRAPHICS® proporcionó los valores óptimos de factores significativos: concentración de glucosa, 0,54 %p/v; pH inicial, 5,18; y concentración de KH_2PO_4 , 0,059 %p/v. El valor óptimo predicho DO_{600} fue 2,85. Para verificar estos resultados, los experimentos se realizaron por triplicado, lo que arrojó una DO_{600} de $2,98 \pm 0,04$, muy cercano al predicho por el modelo (solo 4,26 % mayor); μ_m también aumentó, lo que significa que *K. medellinensis* NBRC 3288 creció más rápido en esta condición de cultivo y el inóculo para la producción de NCB no necesita esperar hasta 72 h, como se mencionó anteriormente, sino que puede

agregarse a las 48 h porque este es el punto en el que el crecimiento celular comenzó a desacelerarse.

Tabla 10. Resumen del análisis de varianza del modelo obtenido a partir del diseño experimental Box-Behnken

Fuente	R²	R²_{adj}	SEE	MAE	Falta de ajuste
Modelo	79,07	72,09	0,02	0,02	0,07

SEE: Error estandar estimado. MAE: Media del error absoluto.

El error estandar estimado (SEE), muestra la desviación estandar de los resiudales.

La media del error absoluto (MAE), es el promedio del valor de los residuales.

Finalmente, confirmamos nuestros resultados para verificar que la predicción del modelo fue precisa. La Figura 9 muestra el perfil de crecimiento y el valor de μ_m obtenido con el medio de cultivo óptimo fue de $0,23 \text{ h}^{-1}$. Se obtuvo un crecimiento celular más rápido; por lo tanto, la fase estacionaria se alcanzó más rápidamente (DO_{600} a las 48 h fue 2,91).

Para demostrar que la concentración de inóculo inicial afecta la producción de NCB en la fermentación de cultivo estático, se usaron dos valores diferentes de DO_{600} y los resultados se muestran en la Tabla 11. Estos resultados muestran que una mayor concentración inicial de inóculo mejoró el rendimiento de NCB en un 31 % bajo condiciones estáticas, lo que podría estar relacionado con el hecho de que una concentración celular más alta facilita que el proceso metabólico se desarrolle más rápido en las células debido al mecanismo de *Quorum Sensing*.

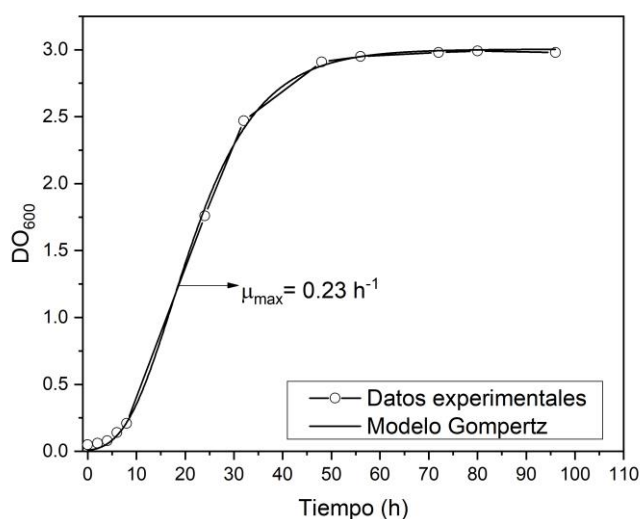


Figura 9. Perfil del crecimiento celular en condiciones óptimas. Aquí son apreciadas más evidentes las fases de crecimiento. El modelo Gompertz se ajustó en 99,99%

Tabla 11. Rendimientos de NCB obtenidos usando un inóculo de 48 h de edad y dos diferentes concentraciones iniciales de inóculo

Concentración inicial del inóculo (DO_{600})	Rendimiento NCB(g/L)	Desviación estandar (g/L)	Mejora en el rendimiento de CB (%)
0,08	1,77	0,08	31,07
0,16	2,32	0,06	

Conclusiones

La composición del nuevo medio de cultivo optimizado gracias a los resultados del presente capítulo corresponde a: 0,54 % de glucosa (p/v), 0,5 % de peptona (p/v), 0,5 % de extracto de levadura (p/v), 0,059 % KH_2PO_4 (p/v), 0,025 % $MgSO_4$ (p/v), 0,267 % NaH_2PO_4 (p/v), y un pH inicial de 5,18 [ajustado con ácido cítrico, 0,2% (p/v)]. Este resultado permitió mejorar la producción de biomasa de *K. medellinensis* NBRC 3288 en un 68,21 % respecto a los resultados obtenidos en el capítulo 2. Las condiciones de cultivo requeridas para obtener el inóculo, como una etapa previa del proceso de producción de NCB, se optimizaron permientiendo una densidad celular de *K. medellinensis* NBRC 3288 más alta, y un aumento de la velocidad específica de crecimiento (μ_m), reduciendo el

tiempo de proceso en esta etapa pasando de tres días de fermentación a dos días. Además, es posible indicar los costos de fermentación futuros podrían reducirse dada la menor concentración de glucosa necesaria. También se demostró que una mayor concentración inicial de inóculo puede mejorar el rendimiento de NCB.

Referencias

- Augimeri, Richard V., Andrew J. Varley, and Janice L. Strap. 2015. "Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions: Lessons Learned from Diverse Biofilm-Producing Proteobacteria." *Frontiers in Microbiology* 6 (November): 1282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>.
- Bae, Sangok, and Makoto Shoda. 2004. "Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium." *Biotechnol. Prog.* 20 (5): 1366–71. <https://doi.org/10.1021/bp0498490>.
- Barja, François, Cristina Andrés-Barrao, Ruben Ortega Pérez, Elena María Cabello, and Marie-Louise Chappuis. 2016. "Physiology of Komagataeibacter Spp. During Acetic Acid Fermentation." In *Acetic Acid Bacteria*, 201–21. Tokyo: Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_9.
- Bezerra, Marcos Almeida, Ricardo Erthal Santelli, Eliane Padua Oliveira, Leonardo Silveira Villar, and Luciane Amélia Escaleira. 2008. "Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry." *Talanta* 76 (5): 965–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- Castro, C., I. Cleenwerck, J. Trcek, R. Zuluaga, P. De Vos, G. Caro, R. Aguirre, J.-L. Putaux, and P. Ganan. 2013. "Gluconacetobacter Medellinensis Sp. Nov., Cellulose- and Non-Cellulose-Producing Acetic Acid Bacteria Isolated from Vinegar." *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 63 (Pt 3): 1119–25. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043414-0>.
- Castro, C, R Zuluaga, C Alvarez, J L Putaux, G Caro, O J Rojas, I Mondragon, and P Ganan. 2012. "Bacterial Cellulose Produced by a New Acid-Resistant Strain of Gluconacetobacter Genus." *Carbohydrate Polymers* 89 (4): 1033–37.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.045>.

Chao, Y, Y Ishida T Fau - Sugano, M Sugano Y Fau - Shoda, and M Shoda. 2000. “Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor.” *Biotechnol. Bioeng.* 68 (3): 345–58. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M).

Deppenmeier, Uwe, and Armin Ehrenreich. 2009. “Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter Oxydans*,” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1–2): 69–80. <https://doi.org/10.1159/000142895>.

GRANT, C L, and D PRAMER. 1962. “Minor Element Composition of Yeast Extract.” *Journal of Bacteriology* 84 (4): 869–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13949853>.

Gutiérrez Pulido, Humberto., Román de la Vara Salazar, Porfirio Gutiérrez González, Carlos Téllez Martínez, and María del Carmen Temblador Pérez. 2004. *Análisis y Diseño de Experimentos*. McGraw-Hill. https://books.google.com.co/books/about/Análisis_y_diseño_de_experimentos.html?id=1zqtAAAACAAJ&redir_esc=y&hl=es-419.

Haigler, Candace H., and Moshe Benziman. 1982. “Biogenesis of Cellulose I Microfibrils Occurs by Cell-Directed Self-Assembly in *Acetobacter Xylinum*.” In *Cellulose and Other Natural Polymer Systems*, 273–97. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1116-4_14.

Hajati, S., M. Ghaedi, and S. Yaghoubi. 2015. “Local, Cheap and Nontoxic Activated Carbon as Efficient Adsorbent for the Simultaneous Removal of Cadmium Ions and Malachite Green: Optimization by Surface Response Methodology.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21 (January): 760–67. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.009>.

Hestrin, S, and M Schramm. 1954. “Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 2. Preparation of Freeze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose.”

- Biochemical Journal* 58 (2): 345–52.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1269899/>.
- Jayaraman, Arul, and Thomas K. Wood. 2008. “Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease.” *Annual Review of Biomedical Engineering* 10 (1): 145–67.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>.
- Miller, Melissa B., and Bonnie L. Bassler. 2001. “Quorum Sensing in Bacteria.” *Annual Review of Microbiology* 55 (1): 165–99.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- Molina-Ramírez, Carlos, Margarita Castro, Marlon Osorio, Mabel Torres-Taborda, Beatriz Gómez, Robin Zuluaga, Catalina Gómez, Piedad Gañán, Orlando Rojas, and Cristina Castro. 2017. “Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low PH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*.” *Materials* 10 (6): 639.
<https://doi.org/10.3390/ma10060639>.
- Monod, J. 1949. “The Growth of Bacterial Cultures.” *Annual Review of Microbiology* 3 (1): 371–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Nierhaus, Knud H. 2014. “Mg²⁺, K⁺, and the Ribosome.” *Journal of Bacteriology* 196 (22): 3817–19. <https://doi.org/10.1128/JB.02297-14>.
- Okiyama, Atsushi, Hideyuki Shirae, Hideo Kano, and Shigeru Yamanaka. 1992. “Bacterial Cellulose I. Two-Stage Fermentation Process for Cellulose Production by *Acetobacter Aceti*.” *Food Hydrocolloids* 6 (5): 471–77.
[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80032-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80032-5).
- Ramos, A, I C Boels, W M de Vos, and H Santos. 2001. “Relationship between Glycolysis and Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus Lactis*.” *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1): 33–41. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.33-41.2001>.
- Ross, P, R Mayer, and M Benziman. 1991. “Cellulose Biosynthesis and Function in

- Bacteria.” *Microbiological Reviews* 55 (1): 35–58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030672>.
- Saravanan, P., R. Muthuvelayudham, R. Rajesh Kannan, and T. Viruthagiri. 2012. “Optimization of Cellulase Production Using *Trichoderma Reesei* by RSM and Comparison with Genetic Algorithm.” *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 6 (4): 443–52. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1225-1>.
- Shehata, T E, and A G Marr. 1971. “Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia Coli*.” *Journal of Bacteriology* 107 (1): 210–16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4935320>.
- Shi, Feng, Zhinan Xu, and Peilin Cen. 2006. “Optimization of γ -Polyglutamic Acid Production By *Bacillus Subtilis* ZJU-7 Using a Surface-Response Methodology.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11 (3): 251–57.
<https://doi.org/10.1007/BF02932039>.
- Shuler, M L, and F Kargl. 2002. *Bioprocess Engineering*. Prentice-Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. Prentice Hall.
<https://books.google.com.co/books?id=9P3gPAAACAAJ>.
- Yoshinaga, Fumihiko, Naoto Tonouchi, and Kunihiko Watanabe. 1997. “Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61 (2): 219–24. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.219>.
- Zeng, Xiaobo, Darcy P Small, and Wankei Wan. 2011. “Statistical Optimization of Culture Conditions for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* BPR 2001 from Maple Syrup.” *Carbohydrate Polymers* 85 (3): 506–13.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.034>.
- Zhang, Kai. 2013. “Illustration of the Development of Bacterial Cellulose Bundles/Ribbons by *Gluconacetobacter Xylinus* via Atomic Force Microscopy.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10): 4353–59.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-4752-x>.

Zwietering, M H, I Jongenburger, F M Rombouts, and K van 't Riet. 1990. "Modeling of the Bacterial Growth Curve." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1875–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348228>.

Capítulo 4 Escalado en la producción de NCB empleando residuos de banano no aptos para el consumo humano como materia prima

Introducción

En los últimos 20 años, la opción de utilizar residuos agroindustriales de diferente naturaleza para producir NCB se ha explorado considerando diferentes alternativas entre las que se encuentran los subproductos de la industria del maíz como el licor de maíz (CSL) (Naritomi et al. 1998) o residuos de banano (C. Molina-Ramírez et al. 2018). Como se ha mencionado en otras partes de este documento, estos medios se emplean buscando fundamentalmente reducir los costos de producción (Kralisch and Hessler 2016), lo que permitiría reemplazar los caldos de cultivo comerciales comúnmente utilizados para producir BNC, como el medio Hestrin-Schramm (HS) (HESTRIN and SCHRAMM 1954).

El banano se produce en 135 países con una producción anual de 145 millones de toneladas (Ploetz and Evans 2015), lo que supone que se podrían desperdiciar o perder 48 millones de toneladas de este cultivo en todo el mundo. Los bananos tienen componentes nutricionales valiosos que van desde tener vitaminas A, B1, B2 y C, minerales como Na, Fe, Ca, P y un alto contenido de K (Goswami and Borthakur 1996; Cano et al. 1997; Mustaffa et al. 1998; Emaga et al. 2007; Aurore, Parfait, and Fahrasmane 2009), que apoyan la mayor parte de la demanda nutricional de los cultivos microbianos para producir NCB con propiedades mecánicas mejoradas como se demostró en capítulo 2 de esta tesis.

La fermentación del cultivo estático es favorable en la producción de NCB porque de esta manera se evita la transformación de cepas productivas a no productivas (Krystynowicz et al. 2002), lo que podría ser más notorio en *K. medellinensis* NBRC 3288 debido a su mutación adaptativa relacionada con la producción de NCB, como fue demostrado por Matsutani et al. (2015) (Matsutani et al. 2015). Sin embargo, las estrategias convencionales de escalado se centran en procesos que se realizan en agitación, las cuales no son aplicable al proceso de cultivo estático (Ju and Chase 1992; Villadsen, Nielsen,

and Lidén 2011). Por lo tanto, la implementación de los métodos de escalado como la regla de oro, el análisis dimensional, el ensayo/error o el análisis de régimen, es una novedad en el proceso, como la producción de NCB.

Por lo tanto, en esta parte de estudio se busca conocer las condiciones de cultivo óptimas para producir NCB a partir de banano no apto para el consumo humano como materia prima novedosa y ecológica que suministra todos los macro y micronutrientes como se demostró en el capítulo 2, para posteriormente desarrollar el escalado de la producción de NCB en cultivos estáticos de manera económica y técnica tomando como punto de partida los resultados obtenidos en el capítulo 3. De esta manera, se espera dejar las bases para llevar a cabo la producción comercial de NCB hacia el futuro.

Materiales y métodos

Microorganismo y cultivo de semillas

K. medellinensis NBRC 3288 se obtuvo de vinagre casero en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Pontificia Bolivariana en Medellín, Colombia en un trabajo previo de bioprospección realizado por Castro et al. (2013). Para esta investigación, se utilizaron las cepas almacenadas en viales en medio HS (HESTRIN and SCHRAMM 1954) a pH 3,5 y 20 % de glicerol (v/v) a -80 °C. El medio de cultivo de siembra contenía (% p/v) 0,54 de glucosa; 0,5 de peptona; 0,5 de extracto de levadura; 0,059 de KH_2PO_4 ; 0,025 de MgSO_4 ; 0,267 de NaH_2PO_4 y un pH de 5,18 [ajustado con ácido cítrico, 0,2] y 3 % (v/v) de la enzima Celluclast 1.5L, agregada después de la esterilización. Para obtener el inóculo, se añadió un vial con 1 mL de contenido a 100 ml de medio de cultivo de siembra y se agitó en un agitador orbital a 120 rpm durante 24, 36 y 48 h.

Medio de cultivo de banano no apto para el consumo humano y producción de NCB

Los residuos de frutas de banano no aptas para el consumo humano fueron adquiridos en el mercado municipal de Santa Marta-Magdalena, Colombia. El medio de cultivo a base de la fruta de banano como materia prima se obtuvo mezclando 200 g de los sólidos en

200 ml de agua. La concentración de glucosa requerida, que corresponde a 20 g/L, se alcanzó por dilución del medio de cultivo, el pH se ajustó a 3,6 con ácido cítrico y finalmente el medio de cultivo se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Posteriormente *K. medellinensis* se transfirió al medio esterilizado con un tamaño de inóculo del 10 %(v/v), en diferentes concentraciones, durante 7 días en condiciones estáticas a temperatura ambiente en recipientes de vidrio con diferente relación volumen/área, como se mostrará más adelante. Una vez finalizada la fermentación, las membranas de NCB se retiraron de la superficie y se llevaron a una solución de KOH al 5% (p/v) para eliminar las células y restos del medio de cultivo. Finalmente, las películas se enjuagaron múltiples veces con agua destilada hasta que se alcanzó un pH neutro. Posteriormente, las membranas de NCB se secaron a 50 °C en un horno de convección hasta que se midió un peso constante usando una balanza analítica. El proceso de secado tardó cerca de 48 horas poner horas.

Diseño de experimento

En el diseño de experimento (DoE) se evaluaron cinco factores que tienen una influencia significativa en el rendimiento de NCB, sobre la base de los resultados previos (Krystynowicz et al. 2002; Ruka, Simon, and Dean 2012; Mohite, Kamalja, and Patil 2012). Los factores evaluados son: concentración de glucosa (g/L), edad del inóculo (h), concentración de inóculo (g/L), concentración de etanol (g/L) y relación volumen/área (cm). A continuación se describen los métodos para medir cada uno de los factores evaluados:

- La concentración de glucosa se midió utilizando un método colorimétrico con un kit de glucosa (glucosa oxidasa/peróxido) BioSystems. Las muestras, el blanco y el estándar se prepararon usando el método descrito por BioSystems®. La absorbancia se midió a 500 nm usando el espectrofotómetro UV-VIS Evolution 600, Thermo®. La concentración de glucosa se calculó usando la ecuación 1.

$$\frac{A_{Sample}}{A_{standard}} \times C_{Standard} = C_{Sample} \quad (1)$$

donde A_{Sample} es la absorbancia de la muestra del estudio, $A_{standard}$ es la absorbancia del estándar del kit, $C_{standard}$ es la concentración del estándar del kit y es equivalente

a 1 g/L, y C_{sample} es la concentración de glucosa en la muestra considerada. Todos los valores tienen una desviación inferior al 5%.

- La edad del inóculo se midió de acuerdo con la curva de crecimiento obtenida en el capítulo 3. Para evaluar la significancia de este factor, se seleccionaron tres tiempos diferentes: 24 h (fase exponencial), 36 h (final de la fase exponencial) y 48 h (inicio de fase estacionaria) como los niveles a evaluar.
- Concentración de inóculo: en este caso, el cultivo de siembra se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min a 25-26 °C, y el sedimento se recogió y volvió a suspender en solución salina esterilizada para medir la densidad óptica (DO) usando un espectrofotómetro UV-VIS Evolution 600, Thermo® a 600 nm (DO_{600}). Luego, con una curva de calibración, la concentración del inóculo se ajustó a 0,1, 0,2 y 0,3 g de peso seco/L, y se transfirió medio a base del jugo de banano al 10% (v/v) para la fermentación de NCB.
- Concentración de etanol: en este caso, se añadió etanol absoluto (Merck) al medio de cultivo a base de la fruta considerando concentraciones de 0% v/v y 0,1% v/v. La concentración de etanol se midió usando un método de etanol UV para la determinación en alimentos y otros materiales a través de una combinación de prueba Boehringer Mannheim/r-biopharm (Roche, Darmstadt, Alemania). Todas las muestras se prepararon de acuerdo con el método descrito por Boehringer Mannheim/r-biopharm test-combination. El etanol se añadió al medio de cultivo después del proceso de esterilización para evitar la evaporación.
- La relación volumen/área corresponde a la altura del medio de cultivo en el reactor. Inicialmente, en el cribado del diseño experimental, esta relación se evaluó en recipientes con estas áreas de superficie: 22 cm², 30 cm² y 45 cm². El volumen del medio de cultivo fue de 90 cm³. Para la etapa de optimización, la relación volumen/área se varió mediante la modificación del volumen del medio de cultivo en el recipiente con un área superficial de 45 cm².

Diseño factorial fraccional

Inicialmente, el diseño experimental se llevó a cabo un diseño factorial fraccional $2^{(5-1)}$ más cuatro puntos centrales por duplicado como el diseño experimental de cribado, para identificar los factores que tuvieron una influencia significativa en el rendimiento de NCB. Los niveles de cada factor se muestran en la Tabla 12. Los 20 tratamientos del diseño factorial fraccional $2^{(5-1)}$ más los puntos centrales y los resultados del rendimiento de NCB se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12. Factores evaluados y sus niveles en el diseño de cribado

Factor	Nombre codificado	Niveles	
		Bajo	Alto
Concentración de glucosa (g/L)	X ₁	10,0	30,00
Edad del inóculo (h)	X ₂	24,0	48,00
Concentración del inóculo (g/L)	X ₃	0,14	0,42
Concentración de etanol (g/L)	X ₄	0,0	1,00
Relación volume/área (cm)	X ₅	2,0	4,00

Tabla 13. Tratamientos del diseño de cribado y los resultados

Tratamiento	Factores en nombres codificados					Rendimiento NCB (g/L)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	30,0	0,0	0,14	24,0	2,0	2,34
2	30,0	0,0	0,42	48,0	2,0	2,29
3	30,0	1,0	0,14	24,0	4,0	1,89
4	30,0	1,0	0,14	48,0	2,0	1,75
5	30,0	1,0	0,42	48,0	4,0	2,03
6	20,0	0,5	0,28	36,0	3,0	1,94
7	30,0	1,0	0,42	24,0	2,0	2,88
8	10,0	0,0	0,14	24,0	4,0	0,71
9	10,0	1,0	0,14	24,0	2,0	1,35
10	10,0	1,0	0,42	48,0	2,0	1,04
11	30,0	0,0	0,42	24,0	4,0	1,81

12	30,0	0,0	0,14	48,0	4,0	1,92
13	10,0	0,0	0,42	24,0	2,0	1,12
14	20,0	0,5	0,28	36,0	3,0	1,92
15	10,0	1,0	0,42	24,0	4,0	0,82
16	10,0	0,0	0,42	48,0	4,0	0,76
17	20,0	0,5	0,28	36,0	3,0	1,88
18	20,0	0,5	0,28	36,0	3,0	1,81
19	10,0	1,0	0,14	48,0	4,0	1,01
20	10,0	0,0	0,14	48,0	2,0	0,48

Diseño compuesto central

Una vez que se definieron los factores significativos (concentración de glucosa, X_1 y relación volumen/área, X_5), se muestra un diseño experimental compuesto central con 16 tratamientos y resultados en la Tabla 14.

Tabla 14. Tratamientos del diseño compuesto central y sus resultados

Tratamiento	Factores		Rendimiento NCB (g/L)
	X1	X5	
1	30,0	2,0	3,04
2	25,0	1,50	3,08
3	30,0	2,0	3,44
4	30,0	2,0	3,63
5	23,0	2,0	3,45
6	30,0	2,0	3,44
7	30,0	2,70	3,09
8	37,0	2,0	2,12
9	35,0	2,50	2,68
10	30,0	1,30	2,53
11	30,0	2,0	3,29

12	35,0	1,50	1,97
13	30,0	2,0	3,48
14	30,0	2,0	3,49
15	25,0	2,50	3,53
16	30,0	2,0	3,23

Se aplicó el modelo de segundo orden que describe los datos experimentales para obtener se expresa en la forma matemática en la ecuación 4:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_5 X_5 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{55} X_5^2 + \beta_{15} X_1 X_5 \quad (4)$$

Donde Y es la respuesta (rendimiento de NCB), β_0 es el coeficiente de intersección, β_1 y β_5 son los coeficientes lineales, β_{11} y β_{55} son el coeficiente cuadrático y β_{15} es el coeficiente de interacción.

El diseño experimental, el análisis estadístico y los procesos de optimización se evaluaron utilizando el paquete de software estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI, StatPoint Technologies, Inc, The Plains, Virginia, EE. UU.

Escalado del biorreactor

Para llevar a cabo el escalado de la fermentación, se utilizó el método de análisis de régimen mediante la comparación del tiempo característico. El tiempo característico corresponde a la magnitud de la duración de los procesos involucrados en la producción de NCB. La cinética de los diferentes parámetros y los tiempos característicos se calcularon en condiciones optimizadas del medio de cultivo, de la siguiente manera:

- Consumo de glucosa: se tomaron muestras del medio de cultivo desde 0 hasta 408 h (este fue el punto donde el consumo de glucosa era cero). Estas mediciones se realizaron cada 48 h. El contenido de glucosa se cuantificó como se menciona anteriormente. La tasa de consumo específica μ_{Glu} (h^{-1}) se calculó mediante el ajuste del modelo logístico. El tiempo característico de consumo de glucosa se registró como el inverso de μ_{Glu} .

- Crecimiento microbiano: Se tomaron muestras de membranas NCB de la superficie cada 48 h, hasta el proceso de fermentación final a las 408 h. Para eliminar las células viables, las membranas NCB se lavaron en solución salina estéril durante 3 h en condiciones de agitación vigorosa. Después de 3 h, se tomaron muestras de 1 ml de solución salina para medir UFC en medio de agar HS. La tasa de crecimiento específica μ_m (h^{-1}), se calculó mediante el ajuste del modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al. 1990). El tiempo característico del crecimiento microbiano se registró como el inverso de μ_m .
- Producción de NCB: una vez que se extrajeron las células viables, se añadieron las membranas de NCB a la solución de KOH al 5% en p/v para eliminar la biomasa y los desechos, y finalmente se lavaron hasta alcanzar un pH neutro. Finalmente, las membranas BNC se secaron en un horno de convección a una temperatura de 50 °C hasta que se midió el peso constante. La tasa de producción específica μ_p (h^{-1}), se calculó mediante el ajuste del modelo logístico. El tiempo característico de la producción de NCB se registró como el inverso de μ_p .
- Difusión de glucosa a través de la membrana NCB: se usaron celdas Franz verticales para realizar el ensayo de penetración de glucosa a través de la membrana NCB. La cámara receptora se llenó con solución salina, y la cámara del donante se llenó con jugo de fruta de banano no apto para el consumo humano. Se tomaron muestras de 1 ml de la cámara receptora y se reemplazaron con el mismo volumen de solución salina. La concentración de glucosa en el jugo de banano se ajustó a 20 g/L y se reemplazó cada 15 minutos durante el ensayo con el fin de mantener la condición de estado estable (Díez-Sales et al. 1991). La ecuación 5 (Crooks 1980) fue útil para calcular el coeficiente de difusividad.

$$\frac{M_T}{M_0} = 2\left(\frac{Dt}{\pi L^2}\right)^2 \quad (5)$$

Donde, M_T es la cantidad de glucosa en la cámara receptora, M_0 es la cantidad de glucosa en la cámara donante, D es el coeficiente de difusividad y L es el espesor de la membrana NCB.

El escalado se llevó a cabo en un contenedor de polipropileno con dimensiones de 62,5 cm; 39 cm; 18,5 cm. Éste fue seleccionado porque es reutilizable, fácil de transportar,

liviano, de bajo costo, fácil de lograr, esterilizable en autoclave, resistente a los impactos y permite el monitoreo de la fermentación al ser translúcido.

Resultados y discusión

Diseño de experimento y optimización del rendimiento de NCB

El rendimiento de NCB alcanzado con *K. medellinensis* NBRC 3288 a partir del medio de cultivo obtenido de las frutas de banano no aptas para el consumo humano se evaluó mediante los cambios en la concentración de glucosa (X_1), edad del inóculo (X_2), concentración de inóculo (X_3), concentración de etanol (X_4) y relación volumen/área (X_5). Los rendimientos de NCB obtenidos con cada tratamiento evaluado se muestran en la Tabla 13. La Figura 10 muestra el efecto de cada factor en un diagrama de Pareto que permite determinar los más relevantes sobre el rendimiento en la producción de NCB. De la Figura 10, se puede extraer que la concentración de glucosa y la relación volumen/área presentaron un efecto significativo sobre el rendimiento de NCB. La glucosa es el componente básico de la celulosa (Cocinero et al. 2009); por lo tanto, no es sorprendente que la concentración de glucosa fuera un factor significativo. Sin embargo, de acuerdo con informes anteriores que utilizan *K. medellinensis*, el nivel deseable de la concentración de glucosa fue de 20 g/L (Carlos Molina-Ramírez et al. 2017). En este capítulo, la Figura 10, señala que una mayor concentración de glucosa permite una más alta producción de NCB, pero no por la presencia de glucosa *per se*, sino por la de otros componentes de la fruta de banano como vitaminas (A, B1, B2 y C), sales (de potasio, magnesio, etc.) y aminoácidos (como histidina, leucina, etc.) (Goswami and Borthakur 1996; Cano et al. 1997; Mustaffa et al. 1998; Emaga et al. 2007; Aurore, Parfait, and Fahrasmane 2009; Ito, Ueno, and Kikuzaki 2017).

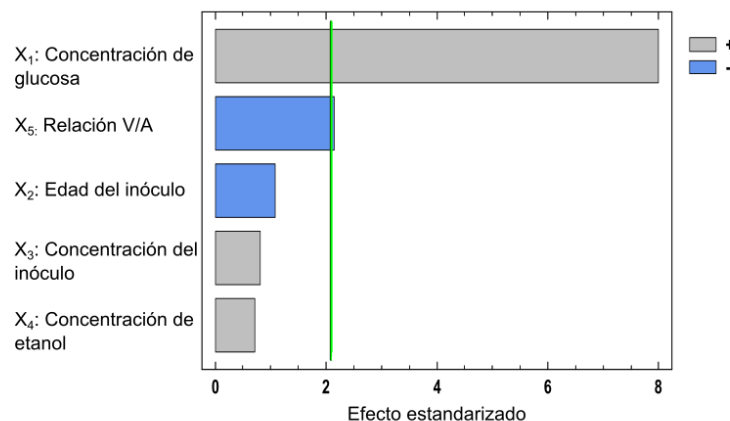


Figura 10. Diagrama de Pareto que muestra los efectos de los factores evaluados. Tenga en cuenta que la concentración de glucosa y la relación volumen/área son los factores relevantes. El signo más de la concentración de glucosa significa que la NCB mejora cuando aumenta la concentración de glucosa y viceversa con la relación volumen/área

Estas sustancias podrían mejorar el rendimiento de NCB, como se ha demostrado en el caso de la vitamina C (Keshk 2014), ciertas sales como MgSO_4 o CaCl_2 (Mohite, Kamalja, and Patil 2012), vitaminas del complejo B (Kouda, Yano, and Yoshinaga 1997), y aminoácidos (Matsuoka et al. 1996). Además, la producción de NCB ocurre en la superficie en contacto con el aire y el espesor de ésta aumenta con el paso del tiempo durante la fermentación. Por lo tanto, todos los nutrientes deben transferirse a la zona en contacto con el aire a través del mecanismo de difusión, que depende del gradiente de concentración (Laidler and Shuler 1949), por lo que la concentración de glucosa tiene un impacto sobre el rendimiento de NCB como lo demostraron Molina-Ramírez et al. (2017).

Por otro lado, la relación volumen/área fue importante porque el rendimiento depende del volumen de medio de cultivo utilizado (como una relación de la celulosa seca y el volumen del medio, g/L), y debido a que la NCB se produce en la interfase medio de cultivo-aire, el área superficial es una variable muy importante porque se incrementa la transferencia de oxígeno si aumenta la superficie (Krystynowicz et al. 2002).

Asimismo, la difusión de compuestos, como la glucosa desde medio de cultivo líquido a la interface NCB-aire a través de la membrana NCB, es proporcional al área superficial del recipiente debido a la Ley de Fick, como se demostró por Hornung et al. (2006). Esto, explicaría los resultados de este estudio, donde se obtuvo un mayor rendimiento de NCB debido al aumento del área de la superficie del recipiente (reducción de la relación V/A) como se muestra en la Figura 10 y también por Ruka, Simon, and Dean (2012).

Los otros factores como la edad del inóculo, la concentración de inóculo y la concentración de etanol no mostraron efecto significativo sobre el rendimiento de NCB. Por lo tanto, de acuerdo con el diagrama de efectos principales que se muestra en la Figura 11, se decidió utilizar un inóculo de 24 h de edad, una concentración de inóculo de 0,42 g/L y ninguna adición de etanol en los medios de cultivo en la siguiente etapa del proceso de optimización.

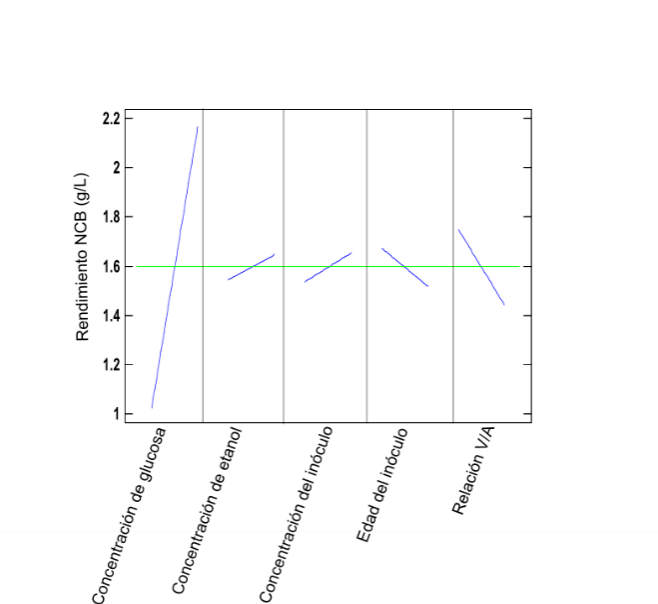
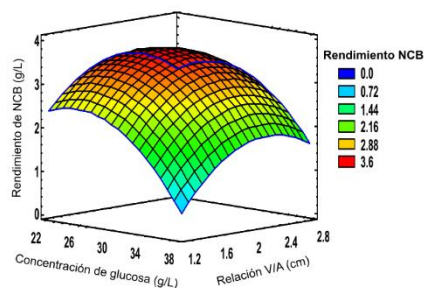


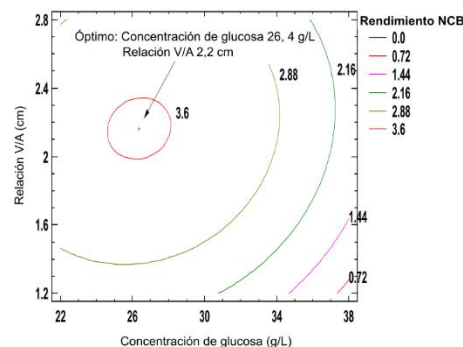
Figura 11. Diagrama de efectos principales. Tenga en cuenta el efecto insignificante de la edad del inóculo, la concentración del inóculo y la concentración de etanol en el rendimiento de NCB

Los resultados de las condiciones optimizadas se muestran en la Figura 12 y la ecuación de segundo orden que describe el comportamiento de producción de NCB en función de la concentración de glucosa y la relación V/A es la ecuación 6.

$$NCB\left(\frac{g}{L}\right) = -8,32 + 0,54X_1 + 4,39X_5 - 0,01X_1^2 + 0,02X_1X_5 - 1,15X_5^2 \quad (6)$$



a)



b)

Figura 12. a) Superficie de respuesta del efecto de la concentración de glucosa y de la relación V/A sobre el rendimiento de NCB. b) Diagrama de contorno para el efecto de la concentración de glucosa y relación V/A

Finalmente, para verificar los resultados del valor óptimo predicho, un experimento en condiciones optimizadas (concentración de glucosa 26,4 g/L y relación V/A 2,2 cm), se obtuvo un rendimiento de NCB de $5 \pm 0,01$ g/L, lo que significa que el rendimiento aumentó en un 42,4% en comparación con el mejor resultado obtenido en la etapa de cribado de este estudio. El experimento se realizó por triplicado.

Escalado de la producción de BNC en estado estático

Se propone por primera vez un criterio técnico para la ampliación exitosa de la producción de NCB en el modo de fermentación de cultivo estático. Una vez establecidas las condiciones de cultivo óptimas para producir NCB a partir del medio de frutas de banano no aptas para el consumo humano, el siguiente paso fue usar la estrategia para establecer el mecanismo que rige el proceso de producción de NCB a través de la metodología de análisis de régimen. La palabra "régimen" se refiere al predominio de un mecanismo (proceso) particular dentro del sistema, que genera cambios en las condiciones del microorganismo, afectando el rendimiento del producto de interés. El análisis del régimen muestra cuál de los mecanismos determina el rendimiento de los sistemas y cómo esto cambia con la modificación de la escala, comparando los tiempos característicos de cada mecanismo involucrado en el sistema (Sweere, Luyben, and Kossen 1987; Mavituna

1996). Los parámetros cinéticos para calcular los tiempos de característicos de cada mecanismo se expresan en la Tabla 15.

Tabla 15. Tiempo característico para la producción de NCB bajo condiciones de cultivo optimizadas.

Mecanismo	Parámetro	Tiempo característico (h)
Fenómenos de transporte		
Difusión de glucosa	$D_{\text{Glu}}=1,22 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$	675,47
Fenómenos de conversión		
Crecimiento microbiano	$\mu_m=0,06 \text{ h}^{-1}$	15,62
Producción de NCB	$\mu_p=0,02 \text{ h}^{-1}$	44,92
Consumo de glucosa	$\mu_{\text{Glu}}=0,22 \text{ h}^{-1}$	4,51

El valor del coeficiente de difusión de glucosa a través de la membrana NCB medido en esta investigación fue de $1,22 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, que es comparable al obtenido por Hornung et al. (2006) quienes emplearon medio de cultivo HS. De la Tabla 15, se infiere que todos los mecanismos relacionados con los procesos microbianos son más rápidos que la difusión de la glucosa a través de la membrana NCB. Entonces, el mecanismo que gobierna su proceso de producción es la difusión de glucosa. Este hecho se esperaba ya que el espesor de la membrana aumenta con el avance del tiempo de fermentación, lo que provoca que la fuente de carbono se convierta en el sustrato limitante en el proceso de producción de NCB (Hornung et al. 2006; Verschuren et al. 2000). Los resultados de la difusión de glucosa a través de membranas NCB con diferentes espesores se muestran en la Figura 13. Como se mencionó anteriormente, la difusión de la cantidad de un soluto es una función del área a través de la cual ocurre este fenómeno, por lo que al aumentar la superficie de la interfaz gas-líquido aumenta la tasa de transferencia de glucosa a través de la NCB como se describe en la ecuación 7 (Doran 2013).

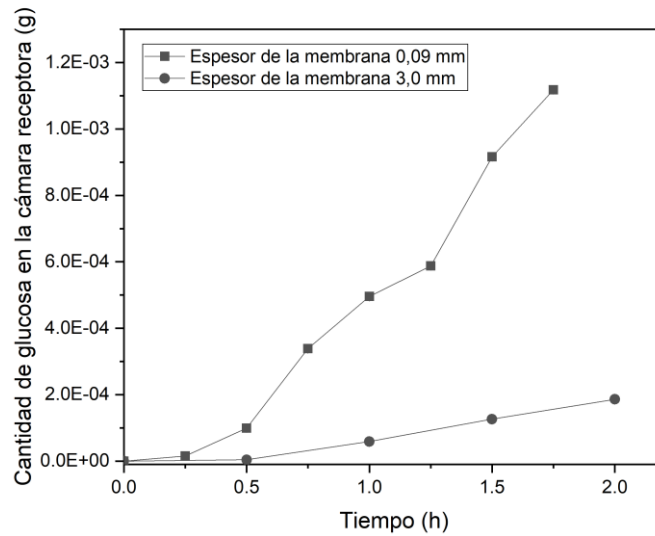


Figura 13. Resultados de la comparación del efecto del espesor de la membrana NCB sobre la permeabilidad de la glucosa, medido por la cantidad de glucosa difundida a través de la membrana NCB en el tiempo.

$$N_{Glu} = AD \frac{dC_{Glu}}{dy} \quad (7)$$

Donde N_{Glu} es la tasa de transferencia de masa de glucosa, A es el área a través de la cual ocurre la transferencia de masa y dC_{Glu}/dy es el gradiente de concentración de glucosa a través de la membrana de NCB. A partir de la ecuación 7, se puede suponer que el uso de un área infinita mejoraría el rendimiento de producción de NCB, pero técnicamente no es viable. Por lo tanto, desde la etapa de optimización se seleccionó la relación V/A como criterio para realizar el escalado del proceso de producción de NCB por primera vez. La razón para escoger la relación V/A como criterio de escalado se soporta sobre la base que permite aumentar el área de la interfaz aire-líquido y, al mismo tiempo, aumentar la velocidad de transferencia de glucosa sin afectar la producción de NCB. En ese orden de ideas, el escalado de la producción de NCB se realizó de acuerdo con las condiciones optimizadas establecidas previamente. La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos en el proceso de producción de NCB cuando fue escalada desde el recipiente de vidrio al biorreactor de plástico. A partir de la Tabla 16 parece que el rendimiento de NCB en el biorreactor de plástico fue ligeramente inferior al obtenido en el recipiente de vidrio de menor tamaño. Sin embargo, esa ligera reducción se debe a que no es posible mantener

las mismas condiciones en ambas escalas (Ju and Chase 1992). Por otro lado, estos resultados están en línea con los obtenidos por Chen et al. (2018), que escalaron el proceso de producción de NCB con una reducción en el rendimiento en un 23 % (Chen et al. 2018).

Tabla 16. Comparación del rendimiento de la NCB obtenida en el recipiente de vidrio y el biorreactor plástico. Tenga en cuenta la reducción en el rendimiento de NCB. Sin embargo, estos resultados fueron esperados ya que no es posible mantener los mismos resultados en ambas escalas.

	Peso seco (g)	Rendimiento (en el volumen total, g/L)	Rendimiento (en función del área superficial, g/m²)
Recipiente de vidrio	0,46	5	109
Biorreactor plástico	16	4	89

Conclusiones

En este capítulo se ha demostrado la primera aproximación para la escalado de la producción de NCB a partir de frutas de banano no aptas para el consumo humano como una materia prima más barata en comparación con medios de cultivo convencionales como el HS. Mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR) se estableció que la concentración de glucosa y la relación V/A eran los factores importantes implicados en el proceso de optimización de NCB, mientras que el empleado a partir de banano sea utilizado como materia prima. Los niveles óptimos de concentración de glucosa 26,4 g/L y una relación V/A 2,2 cm permitieron aumentar el rendimiento de NCB en un 42,4 %, respecto al obtenido en la etapa inicial de cribado. Finalmente, se escogió la relación V/A como el criterio técnico para el escalado. El rendimiento de NCB en el biorreactor plástico fue un 20% menor que el obtenido en el recipiente de vidrio, pero la cantidad de NCB obtenida en el escalado fue de 16 g, es decir en un 3378 % más que la cantidad obtenida en los recipientes de vidrio bajo las condiciones óptimas. Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que era posible escalar la producción de NCB en condiciones estáticas de una manera técnica que otros investigadores pueden replicar, utilizando otros tipos de materias primas, de tal forma que el obstáculo económico de

producir NCB a bajo costo se pueda superar y por tanto aproximarse más a su producción a escala industrial.

Referencias

- Aurore, Guylène, Berthe Parfait, and Louis Fahrasmane. 2009. “Bananas, Raw Materials for Making Processed Food Products.” *Trends in Food Science & Technology* 20 (2): 78–91. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>.
- Cano, M.Pilar, Begoña de Ancos, M.Cruz Matallana, Montaña Cámara, Guillermo Reglero, and Javier Tabera. 1997. “Differences among Spanish and Latin-American Banana Cultivars: Morphological, Chemical and Sensory Characteristics.” *Food Chemistry* 59 (3): 411–19. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00285-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00285-3).
- Castro, C., I. Cleenwerck, J. Trcek, R. Zuluaga, P. De Vos, G. Caro, R. Aguirre, J.-L. Putaux, and P. Ganan. 2013. “Gluconacetobacter Medellinensis Sp. Nov., Cellulose- and Non-Cellulose-Producing Acetic Acid Bacteria Isolated from Vinegar.” *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 63 (Pt 3): 1119–25. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.043414-0>.
- Chen, Genqiang, Guochao Wu, Björn Alriksson, Lin Chen, Wei Wang, Leif J Jönsson, and Feng F Hong. 2018. “Scale-up of Production of Bacterial Nanocellulose Using Submerged Cultivation.” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, June. <https://doi.org/10.1002/jctb.5699>.
- Cocinero, Emilio J., David P. Gamblin, Benjamin G. Davis, and John P. Simons. 2009. “The Building Blocks of Cellulose: The Intrinsic Conformational Structures of Cellobiose, Its Epimer, Lactose, and Their Singly Hydrated Complexes.” *Journal of the American Chemical Society* 131 (31): 11117–23. <https://doi.org/10.1021/ja903322w>.
- Crooks, John E. 1980. “Measurement of Diffusion Coefficients.” *Ochial, E. I. J. Chem. Educ.* Vol. 57. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Díez-Sales, O., A. Copoví, V.G. Casabó, and M. Herráez. 1991. “A Modelistic Approach

- Showing the Importance of the Stagnant Aqueous Layers in in Vitro Diffusion Studies, and in Vitro-in Vivo Correlations.” *International Journal of Pharmaceutics* 77 (1): 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90295-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90295-Y).
- Doran, Pauline M. 2013. “Mass Transfer.” In *Bioprocess Engineering Principles*, 379–444. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00010-1>.
- Emaga, Thomas Happi, Rado Herinaivalona Andrianaivo, Bernard Wathelet, Jean Tchango Tchango, and Michel Paquot. 2007. “Effects of the Stage of Maturation and Varieties on the Chemical Composition of Banana and Plantain Peels.” *Food Chemistry* 103 (2): 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>.
- Goswami, Bhaskar, and Alip Borthakur. 1996. “Chemical and Biochemical Aspects of Developing Culinary Banana (Musa ABB) ‘Kachkal.’” *Food Chemistry* 55 (2): 169–72. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00072-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00072-0).
- HESTRIN, S, and M SCHRAMM. 1954. “Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. II. Preparation of Freeze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose.” *The Biochemical Journal* 58 (2): 345–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13208601>.
- Hornung, M, M Ludwig, A M Gerrard, and H.-P. Schmauder. 2006. “Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1).” *Engineering in Life Sciences* 6 (6): 537–45. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>.
- Ito, Hinako, Hiroshi Ueno, and Hiroe Kikuzaki. 2017. “Free Amino Acid Compositions for Fruits.” *Journal of Nutrition and Dietetic Practice* 1 (1).
- Ju, L. -K., and G. G. Chase. 1992. “Improved Scale-up Strategies of Bioreactors.” *Bioprocess Engineering* 8 (1–2): 49–53. <https://doi.org/10.1007/BF00369263>.
- Keshk, Sherif M.A.S. 2014. “Vitamin C Enhances Bacterial Cellulose Production in *Gluconacetobacter Xylinus*.” *Carbohydrate Polymers* 99 (January): 98–100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.060>.
- Kouda, Tohru, Hisato Yano, and Fumihiro Yoshinaga. 1997. “Effect of Agitator

- Configuration on Bacterial Cellulose Productivity in Aerated and Agitated Culture.” *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83 (4): 371–76. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)80144-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)80144-4).
- Kralisch, Dana, and Nadine Hessler. 2016. “- Large-Scale Production of BNC: State and Challenges.” In *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*, 76–105. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/B12936-7>.
- Krystynowicz, A, W Czaja, A Wiktorowska-Jezierska, M Gonçalves-Miśkiewicz, M Turkiewicz, and S Bielecki. 2002. “Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29 (4): 189–95. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>.
- Laidler, K. J., and K. E. Shuler. 1949. “The Kinetics of Membrane Processes. I. The Mechanism and the Kinetic Laws for Diffusion through Membranes.” *The Journal of Chemical Physics* 17 (10): 851–55. <https://doi.org/10.1063/1.1747076>.
- Matsuoka, Masanobu, Takayasu Tsuchida, Kazunobu Matsushita, Osao Adachi, and Fumihiro Yoshinaga. 1996. “A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* Subsp. *Sucrofermentans*.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (4): 575–79. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.575>.
- Matsutani, Minenosuke, Kohei Ito, Yoshinao Azuma, Hidetaka Ogino, Mutsunori Shirai, Toshiharu Yakushi, and Kazunobu Matsushita. 2015. “Adaptive Mutation Related to Cellulose Producibility in *Komagataeibacter Medellinensis* (*Gluconacetobacter Xylinus*) NBRC 3288.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (17): 7229–40. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6598-x>.
- Mavituna, F. 1996. “Strategies for Bioreactor Scale-Up.” In *Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering*, 125–42. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0177-3_11.
- Mohite, Bhavna V., Kirtee K. Kamalja, and Satish V. Patil. 2012. “Statistical Optimization of Culture Conditions for Enhanced Bacterial Cellulose Production by *Gluconoacetobacter Hansenii* NCIM 2529.” *Cellulose* 19 (5): 1655–66. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9760-y>.

- Molina-Ramírez, C., C. Castro, R. Zuluaga, and P. Gañán. 2018. “Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter Medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks.” *Journal of Polymers and the Environment* 26 (2). <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0993-6>.
- Molina-Ramírez, Carlos, Margarita Castro, Marlon Osorio, Mabel Torres-Taborda, Beatriz Gómez, Robin Zuluaga, Catalina Gómez, Piedad Gañán, Orlando Rojas, and Cristina Castro. 2017. “Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low PH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*.” *Materials* 10 (6): 639. <https://doi.org/10.3390/ma10060639>.
- Mustaffa, Razali, Azizah Osman, Salmah Yusof, and Suhaila Mohamed. 1998. “Physico-Chemical Changes in Cavendish Banana (*Musa Cavendishii* L. Var Montel) at Different Positions within a Bunch during Development and Maturation.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78 (2): 201–7. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199810\)78:2<201::AID-JSFA106>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199810)78:2<201::AID-JSFA106>3.0.CO;2-K).
- Naritomi, Takaaki, Tohru Kouda, Hisato Yano, and Fumihiko Yoshinaga. 1998. “Effect of Ethanol on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture.” *J. Ferment. Bioeng.* 85 (6): 598–603. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80012-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80012-3).
- Ploetz, Randy C., and Edward A. Evans. 2015. “The Future of Global Banana Production.” In *Horticultural Reviews*, 43:311–52. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119107781.ch06>.
- Ruka, Dianne R, George P Simon, and Katherine M Dean. 2012. “Altering the Growth Conditions of *Gluconacetobacter Xylinus* to Maximize the Yield of Bacterial Cellulose.” *Carbohydrate Polymers* 89 (2): 613–22. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>.
- Sweere, A.P.J., K.Ch.A.M. Luyben, and N.W.F. Kossen. 1987. “Regime Analysis and

Scale-down: Tools to Investigate the Performance of Bioreactors.” *Enzyme and Microbial Technology* 9 (7): 386–98. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90133-5).

Verschuren, Peter G., Thomas D. Cardona, M.J.Robert Nout, Kees D. De Gooijer, and Johannes C. Van den Heuvel. 2000. “Location and Limitation of Cellulose Production by *Acetobacter Xylinum* Established from Oxygen Profiles.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (5): 414–19. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89089-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89089-1).

Villadsen, John, Jens Nielsen, and Gunnar Lidén. 2011. “Scale-Up of Bioprocesses.” In *Bioreaction Engineering Principles*, 497–546. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6_11.

Zwietering, M H, I Jongenburger, F M Rombouts, and K van 't Riet. 1990. “Modeling of the Bacterial Growth Curve.” *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6): 1875–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/>.

Capítulo 5 Evaluación de los cambios en las características físico-químicas de muestras de NCB producidas en un reactor en una escala 1:44

Introducción

Como ya se ha mencionado en otros apartados de este texto, el proceso de producción de nanocelulosa bacteriana (NCB) se da por medio de la extrusión del polímero a través de la membrana y pared celular de microorganismo pertenecientes al grupo del ácido acético principalmente (Hirai, Tsuji, and Horii 2002; Saichana et al. 2015). Las NCB se caracteriza por: su cristalinidad (principalmente tipo I_{α} (VanderHart and Atalla 1984)), pureza química (libre de lignina y hemicelulosa), su carácter hidrófilo, alta relación de aspecto, elevada resistencia a la tracción, porosidad, estructura nanofibrilar y biocompatibilidad (Pecoraro et al. 2007; Islam et al. 2017), por las cuales, la NCB tiene amplia aplicación en diversos sectores. En las muestras producidas en este trabajo, tal como se indica en el capítulo 2 en la sección de resultados y discusión, la cristalinidad alcanzada para muestras obtenidas a partir de residuos agroalimentarios de banano son del orden de 0,45, medidas a partir de índice de relación de cristalinidad infrarroja (ICR) (Nelson and O'Connor 1964), y una fracción I_{α} de 0,77.

Los factores que afectan la producción de NCB se han estudiado ampliamente, desde la fuente de carbono (Embuscado, Marks, and BeMiller 1994; C. Molina-Ramírez et al. 2017), el uso de dispositivos alternativos (Cheng, Catchmark, and Demirci 2009), hasta la adición de algunas sustancias como polímeros (Cheng, Catchmark, and Demirci 2011) y otros agentes o coadyudantes como el etanol y el ácido acético (Carlos Molina-Ramírez et al. 2018). Por otra parte, también se ha investigado cómo las propiedades y característica de la NCB se ven afectadas por diferentes factores tales como, la composición del medio de cultivo (Keshk 2006; C. Molina-Ramírez et al. 2018) o las condiciones de cultivo tales como el modo de fermentación (agitado o estático) o la relación área-volumen (Krystynowicz et al. 2002). Asimismo, se han explorado cambios en la porosidad a través de aplicar diferentes niveles de presión de las membranas, y cómo esto repercute en las propiedades mecánicas (Retegi et al. 2009). Sin embargo, son pocos los reportes que hay

sobre el escalado de la NCB en modo estático, y no se ha detectado, hasta el momento, ningún ensayo en el que se haya evaluado cómo se ven afectadas las propiedades mecánicas y térmicas, así como aspectos estructurales como la cristalización de las NCB debido al escalado.

Por eso en este capítulo, se indagó por los cambios en las características y propiedades de la NCB cuando hay un proceso de escalado usando residuos agroalimentarios de banano, en el que se pasa de un recipiente con un área de 41 cm² hasta un reactor con un área de 1800 cm², siendo este el único criterio diferenciador entre las muestras. Asimismo, proponer algunas estrategias e.g el aumento de la concentración celular inicial, que permitan corregir algunos cambios negativos como la reducción de las propiedades mecánicas, y de esta manera lograr que el proceso de escalado sea llevado a cabo de la mejor manera posible sin afectar las propiedades y características de la NCB como materia prima para muchas industrias.

Materiales y métodos

Fermentación y producción de NCB

La producción de NCB se obtuvo a partir de un medio de cultivo producido con residuos agroalimentarios de banano. *K. medellinensis* se inoculó en el medio de cultivo en una relación de volumen 10 % v/v, con una concentración inicial de 0,42 g/L y 24 h de edad. La fermentación para la producción de NCB se llevó a cabo durante 12 días en condiciones de cultivo estático, bajo las condiciones optimizadas previamente descritas en el capítulo 3. Para la producción de NCB se usaron dos tipos de recipientes con dimensiones diferentes, el primero corresponde a recipientes de vidrio con un volumen de operación de 90 mL y área transversal de 41 cm² (BC-B1), y el segundo corresponde a un biorreactor plástico con un volumen de operación de 4 L y un área transversal de 1800 cm² (BC-B44), el cual equivale a una escala 44 veces mayor que cumple con el criterio de escalado para procesos biotecnológicos de al menos 1:10, tal como se describió en el capítulo 3.

Finalmente, las muestras obtenidas se lavaron tal como se describe en los capítulos anteriores.

Caracterización de NCB obtenidas en diferentes escalas

Las propiedades y características de la NCB producida a partir de banano en diferentes escalas se determinó a través del uso de las siguientes técnicas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las membranas se cortaron, se liofilizaron y se recubrieron con oro/paladio usando pulverización iónica. Las muestras se observaron con un microscopio Jeol® JSM 5910 LV operado a 20 kV y las imágenes se analizaron mediante el software Image-J para determinar el ancho de las nanofibras.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Los espectrogramas se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet S50 de Thermo® en el rango de 4000-400 cm⁻¹ utilizando un cristal ATR de diamante. Los espectros se grabaron con una resolución de 4 cm⁻¹ y una acumulación de 256 escaneos. La fracción de celulosa I_α se midió de acuerdo con el método de Imai y Sugiyama (1998):

$$f_{\alpha} = A_{750} / (A_{750} + kA_{710}) \quad (8)$$

Donde, A₇₁₀ y A₇₅₀ son las intensidades de las bandas 710 y 750 cm⁻¹, respectivamente, y k es la relación del coeficiente de adsorción entre los dos picos (0,16) (Imai and Sugiyama 1998).

Difracción de rayos X (DRX)

Se analizaron membranas de celulosa secas con diferentes espesores mediante difracción de rayos X en un equipo Rigaku® Miniflex que operaba en la longitud de onda de radiación CuK_{α1} filtrada con Ni (λ = 0.15406 nm), generada a un voltaje de 45 kV y una emisión de filamento de 40 mA. Los datos se recolectaron en modo de reflexión en el rango de 10-35° 2θ con un paso de 0,013°. Los escaneos procedieron a 56,58 s por paso. Los espacios d entre los planos cristalinos se determinaron usando la ley de Bragg expresada por la ecuación 9

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (9)$$

donde θ es el ángulo entre el plano y el haz difractado o incidente y λ es la longitud de onda de los rayos X. Una aproximación de tamaño de cristal aparente (ACS) se calculó usando la fórmula de Scherrer, ecuación (10)

$$ACS = \frac{0,9\lambda}{FWHM \cos \theta} \quad (10)$$

donde FWHM es el ancho del pico a la mitad de la altura máxima, θ es el ángulo de Bragg, y λ es la longitud de onda de los rayos X.

El índice de cristalinidad (IC) se calculó según el segundo método descrito por Park et al. (2010), como la relación entre el área de todos los picos cristalinos y el área total (Park et al. 2010).

Isotermas de adsorción de N₂

Las muestras de NCB fueron recortadas en pequeños cuadros. Posteriormente, se pesaron alrededor de 150 mg de cada una de las muestras y se sometieron a un proceso de purga con He. Finalmente, los ensayos se realizaron en un sistema de para detección de área superficial ASAP 2020 PLUS de Micromeritics®, durante 6 horas cada muestra. Los cálculos de las áreas superficiales, los tamaños de poro y los volúmenes de los poros fueron realizados por el software ASAP 2020 Plus versión 1.03, usando la ecuación de Brunauer–Emmett–Teller (BET) (Brunauer, Emmett, and Teller 1938), y el método Barrett–Joyner–Halenda (BJH) (Barrett, Joyner, and Halenda 1951).

Ensayos de tracción

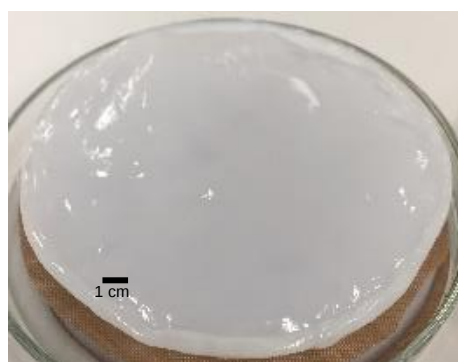
Las propiedades se midieron de acuerdo con el procedimiento ASTM 882-12 con un texturómetro TA.XT Plus de Stable Micro Systems®. Las muestras fueron cortadas en tiras con una longitud de 19 mm, ancho de 5 mm y espesor variable. Una velocidad de prueba de 1,9 mm / min y una celda de carga de 30 N fueron usadas. Las pruebas de tracción se realizaron con al menos 5 muestras, y se tomaron los valores promedio.

Análisis termogravimétrico

Los termogramas se obtuvieron usando un analizador termogravimétrico Mettler-Toledo®. Las muestras fueron cortadas en pequeños círculos homogéneos hasta alcanzar 10 mg, posteriormente se colocaron en una bandeja de alúmina en una atmósfera de nitrógeno y se generó una rampa de calentamiento desde 30 °C a 800 °C a una tasa de 10 °C/min.

Resultados y análisis

La NCB producida en ambas escalas se muestran en la Figura 14. En la Figura 14a se aprecian las NCB obtenidas en el recipiente de vidrio con área transversal de 41 cm² (BC-B1) mientras que en la Figura 14b se observan las membranas de NCB obtenidas en el biorreactor plástico con un área de 1800 cm² (BC-B44). El peso seco que se alcanzó de NCB para la muestra BC-B1 fue de 0,46 g respecto de los 16 g que se lograron conseguir en el caso de la muestra BC-B44, lo que indica un aumento de 3378 %. Este incremento era de esperarse, debido a que la producción de NCB, cuando la fermentación se hace de manera estática, es proporcional al área transversal tal como lo hemos demostrado en el capítulo anterior y por otros autores como Ruka, Simon, and Dean (2012).



a)



b)

Figura 14. NCB producida en diferentes escalas. a) BC-B1, aquí la membrana se muestra lavada. b) BC-B44, aquí la membrana se muestra sin lavar.

Las imágenes SEM de las muestras obtenidas en esta parte de la investigación, se pueden observar en la Figura 15a-d. Las Figuras 15a y 15b corresponden a la membrana BC-B1, y la 15c y 15d a BC-B44. Por su parte, 15a y 15c son imágenes de la superficie de las

membranas, y 15b y 15d corresponden a la superficie transversal de la fractura criogénica de las mismas. En las imágenes se observa que las nanofibras en BC-B1 son más anchas, en comparación con las de BC-B44 (Figuras 15a y 15c), alrededor de 2 veces, tal como se demuestra en la Tabla 17. Dada la naturaleza de la biosíntesis de la NCB, la cual es extruida perpendicularmente en forma de filamentos que se aglomeran y forman las nanofibras de acuerdo a Hirai et al. (2002) (Hirai, Tsuji, and Horii 2002), al existir menos espacio para el acomodamiento de las nanofibras que se van generando en el recipiente de vidrio, comparado con el biorreactor, se provoca un efecto de aglomeramiento por el efecto del confinamiento de unas nanofibras sobre otras tal como ocurre con cuando se somete a un campo ultrasónico (Tischer et al. 2010).

El fenómeno descrito anteriormente se muestra en la Figura 16. En la Figura 16a se ilustra la manera como se extruyen las cadenas de NCB y como se generan las nanofibras, la Figura 16b ilustra lo que sucede en el recipiente de vidrio, la proximidad entre las células debido a las limitaciones de espacio provoca que se empiecen a formar nanofibras con mayores diámetros, así como el efecto que generan las paredes que las direccionan unas contra otras y contribuye en el engrosamiento de estas. Por su parte la Figura 16c, muestra lo que ocurre en el biorreactor plástico donde gracias al mayor espacio disponible las células no se encuentran tan próximas y por lo tanto no se presenta el fenómeno de engrosamiento de las nanofibras, también se puede suponer que la mayor disponibilidad de espacio permitiría obtener fibras más largas porque el efecto de las paredes se presentaría hasta que las cadenas de NCB alcancen estas y eso se cree que ocurre mucho tiempo después de lo que ocurre en el recipiente de vidrio.

Por otra parte, la superficie de la fractura criogénica se ve una mayor densidad de fibras en BC-B1, respecto a la obtenida en el en BC-B44. Todo esto, puede tener efectos sobre las propiedades mecánicas como veremos más adelante.

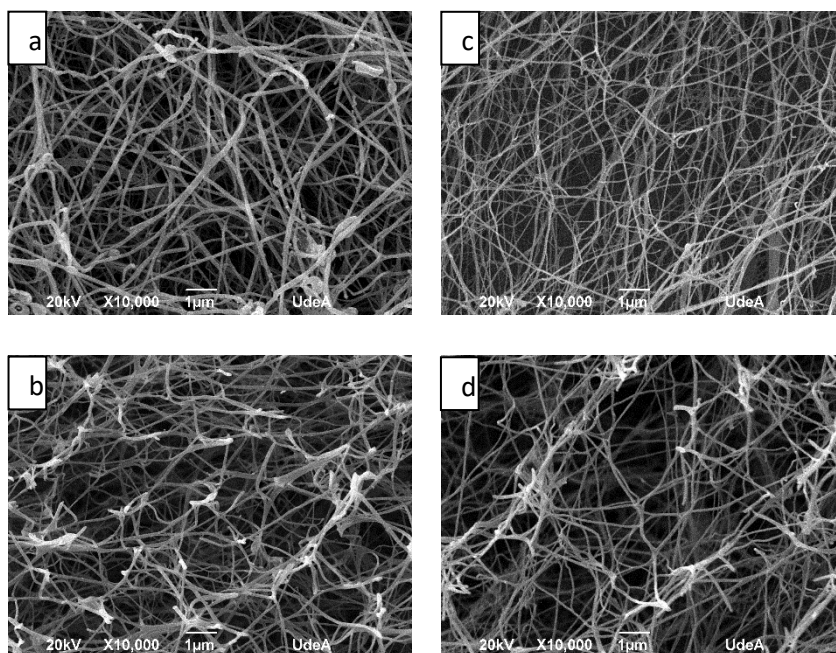


Figura 15. Imágenes SEM de las membranas liofilizadas obtenidas en ambas escalas. a) Imagen de la superficie de BC-B1. b) Imagen de zona transversal de la mebrana después de una fractura criogénica de BC-B1. c) Imagen de la superficie de BC-B44. d) Imagen de zona transversal de la mebrana después de una fractura criogénica de BC-B44.

Tabla 17. Diámetro de las nanofibras que componen las membranas de NCB analizadas.

Muestra	Diámetro nanofibra (nm)
BC-B1	$43,37 \pm 7,70$
BC-B44	$20,39 \pm 5,08$

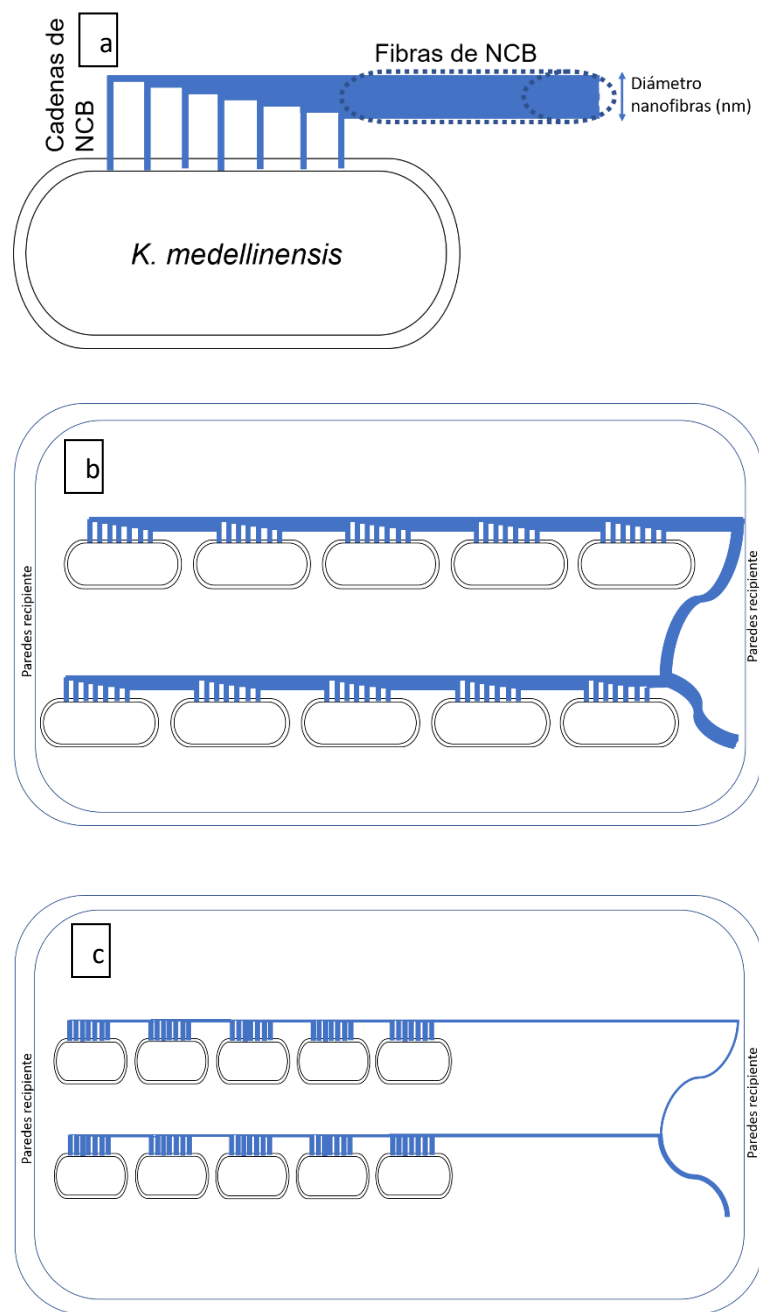


Figura 16. a) Descripción gráfica de producción de NCB por *K. medellinensis*. b) Ilustración del efecto de confinamiento producido por las dimensiones del recipiente de vidrio. c) Ilustración de lo que ocurre con las nanofibras de NCB en el biorreactor de plástico donde no existe la limitación por el confinamiento.

Los espectros infrarrojos obtenidos a partir de las muestras producidas en escalas diferentes se muestran en la Figura 17a y las bandas correspondientes a las estructuras alotrópicas tipo I_{α} y I_{β} en la Figura 17b. En la Figura 17a se observan las bandas más

sobresalientes de la NCB, la banda 900 cm^{-1} (C-O-C, enlace β -glucosídico) (Wong, Kasapis, and Tan 2009), 1111 cm^{-1} (vibración no simétrica del anillo de glucopiranososa (Tsalagakas, 2015)), 1163 (vibración asimétrica del enlace C-O-C) (Fan, Dai, and Huang 2012). Asimismo en la Figura 17b, se observan las bandas 750 cm^{-1} y 710 cm^{-1} características para los alomorfos I_{α} y I_{β} , respectivamente (Sugiyama, Persson, and Chanzy 1991). Dicho esto, es claro que el material obtenido es NCB, sin embargo se notó una banda en la región 1745 cm^{-1} que se podría adjudicar a la presencia de grupos carbonilos (Ung-Jin Kim et al. 2000) debido, posiblemente, a la naturaleza del medio de cultivo utilizado, el cual tiene una composición muy heterogénea. Por otra parte, no hay cambios en la estructura cristalina de la NCB ya que en ambas muestras evaluadas la fracción de celulosa I_{α} fue de 0,81.

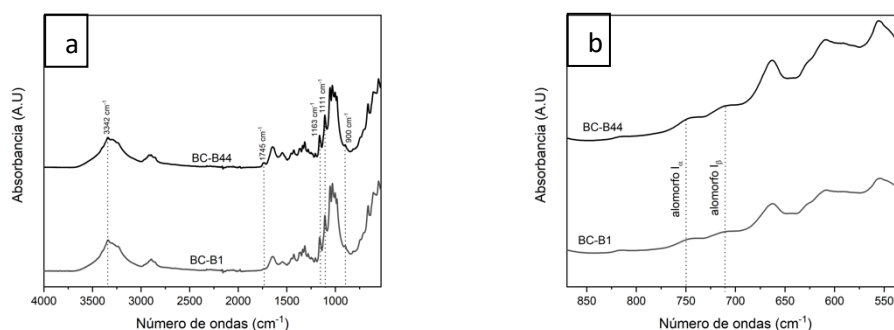


Figura 17. a) Espectros infrarrojos de BC-B1 y BC-B44, con algunas bandas importantes señaladas. b) Acercamiento de las bandas 710 cm^{-1} y 750 cm^{-1} que denotan la presencia de los alomorfos I_{β} y I_{α} , respectivamente.

Luego de verificar algunos cambios a nivel morfológico con las imágenes de SEM, y ningún cambio importante en la estructura química de las muestras, continuaremos con el análisis de la difracción de rayos X para verificar algún cambio a nivel de la estructura cristalina. En la Figura 18 se muestran las difractogramas de rayos X de BC-B1 (18a) y BC-B44 (18b). Los datos de la distancia de los espacios intercristalinos (d), el tamaño aparente de los cristales de cada plano (ACS) y el índice de cristalinidad (I_C) se muestran en la Tabla 18. Los planos cristalográficos señalados corresponden a la indexación propuesta por Sugiyama et al. (1991) (Sugiyama, Persson, and Chanzy 1991). Los valores de d son muy similares a los obtenidos en NCB producida a partir del medio de cultivo HS por Castro et al. (2011) (Castro et al. 2011), sin embargo el tamaño de los cristales es

mayor a los obtenidos por los mismos autores, lo que implicaría un empaquetamiento de un número más alto de cadenas de celulosa en comparación a cuando se implementa el medio de cultivo HS. Por otro lado, entre las muestras evaluadas en este capítulo no se observan diferencias significativas. Este hecho reafirmaría lo explicado anteriormente, donde el recipiente más pequeño genera un efecto de confinamiento que provoca un cambio a nivel de las nanofibras y no de los nanocristales, a diferencia de resultados obtenidos por Shezad et al. (2010) quienes si hallaron cambios en la cristalinidad y en fracción de celulosa tipo I_α, relacionados a los cambios en el diámetro de las nanofibras. Este hallazgo sería la primera comprobación realizada sobre el efecto de las dimensiones del biorreactor sobre las características morfológicas de la NCB.

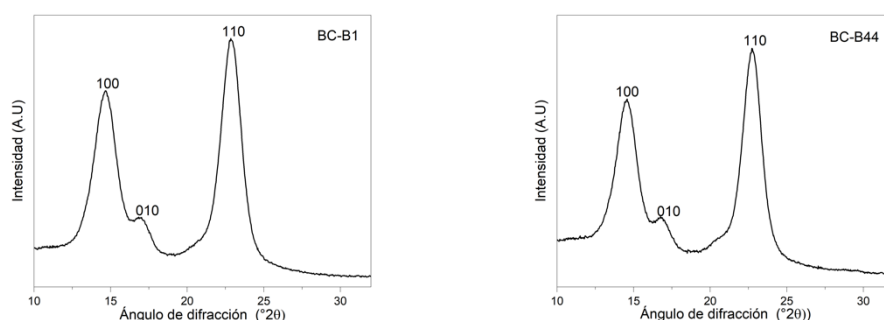


Figura 18. Espectros de difracción de rayos X de BC-B1 (izquierda) y BC-B44 (derecha). Se señalan los planos cristalográficos que representa cada pico de acuerdo a la indexación propuesta por Sugiyama et al. (1991).

Tabla 18. Parámetros extraídos de los difractogramas de la figura 5. d representa la distancia entre los planos, ACS representa el tamaño de los cristales e IC es el índice de cristalinidad.

Planos cristalográficos	BC-B1			BC-B44		
	100	010	110	100	010	110
d (nm)	0,606	0,517	0,388	0,611	0,521	0,391
ACS (nm)	7,331	11,559	10,754	7,253	12,204	11,444
I _c (%)	83,0			81,9		

Continuando con la secuencia de la caracterización, la Tabla 19 muestra los resultados obtenidos del análisis del área BET, el tamaño de poro, y volumen de poro para las dos muestras analizadas. Los valores de los parámetros señalados en la Tabla 19 para las muestras analizadas, muestran que ambas son materiales altamente mesoporosos (Kresge et al. 1992; Dubinin 1979). Los valores de las áreas superficiales son muy inferiores a los obtenidos por otros investigadores, como por ejemplo Kim et al. (2002) quienes establecieron un área superficial para NCB, obtenida a partir de medio de cultivo comercial, de $2,7 \text{ m}^2/\text{g}$ (Kim, Nishiyama, and Kuga 2002). De esta información, se desprende que al haber menor área superficial en BC-B1 implica que hay menos nanofibras disponibles para interactuar con el N_2 , esto reforzaría el hecho de que las nanofibras se aglomeraron por acción del confinamiento en el menor espacio físico disponible haciendo que éstas alcancen un mayor diámetro tal como se observó en las imágenes de SEM en la Figura 15a y 15c. Esto supondría que debido a que BC-B1 tiene menos vacíos (por el volumen del poro, es la mitad de BC-B44) las propiedades mecánicas puedan variar. Asimismo, se esperaría una estabilidad térmica un poco mayor debido al menor área superficial disponible, la cual limitaría el proceso de propagación de la degradación térmica.

Tabla 19. Parámetros establecidos a partir de los ensayos de fisisorción de N_2 en las membranas BC-B1 y BC-B44.

	Área superficial (m^2/g)	Volumen de poro (cm^3/g)	Tamaño de poro (nm)
BC-B1	0,384	0,001	20,699
BC-B44	0,686	0,002	16,881

Después de analizar los cambios a nivel superficial, procedemos a verificar los efectos del escalado de la producción de NCB en las propiedades mecánicas. Los resultados están reflejados en la Figura 19. La Figura 19a, muestra el diagrama de esfuerzo vs deformación obtenido en ambas muestras. Es evidente que la muestra BC-B1 mostró un módulo de elasticidad $1149,84 \pm 222 \text{ MPa}$, respecto a BC-B44 cuyo módulo fue de $569,04 \pm 64,38 \text{ MPa}$. Estos valores son menores a los obtenidos en capítulos anteriores debido a que, para esta parte de la investigación, se decidió secar las muestras al aire y no en hornos de

convección forzada para evitar la orientación de las fibras, asimismo no se secaron usando ningún peso sobre ellas, sin embargo fueron muy similares a los obtenidos por Tsouko et al. (2015) quienes usaron residuos ricos en almidones (Tsouko et al. 2015). Este resultado era esperado, desde que se sabe que hay una relación entre la porosidad y las propiedades mecánicas de un material (Lu, (Max) Lu, and Xiao 1999; X. Chen, Xiang, and Vlassak 2006) y ya había sido comprobado para la NCB por Retegi et al. (2009) cuando sometieron las películas de NCB a diferentes presiones (Retegi et al. 2009). Por su parte, las Figuras 19b y 19c muestran las imágenes de microscopía electrónica de las superficies de fractura, después de someterse al ensayo de tracción, de BC-B1 y BC-B44, respectivamente. En ambas figuras se aprecia el fenómeno de *pull-out*, propio de este material (Meng et al. 2017), sin embargo se nota un mayor número de fibras rotas lo que supondría una mayor cantidad de puentes de hidrógeno intra e interfibrilar en la muestra BC-B1, que le confieren resistencia y módulo superiores a las de BC-B44 (Yamanaka et al. 1989; Nge 2010), estos resultados son similares a los obtenidos por Chen et al. (2018), quienes asocian con estas diferencias con cambios morfológicos en la NCB (G. Chen et al. 2018). La mayor deformación en BC-B44, podría estar relacionada con el hecho de la mayor porosidad obtenida en estas muestras, por lo tanto se provocaría no sólo una menor resistencia y módulo, como ya mencionó, sino que estaría involucrada en el aumento de la deformación, tal como lo demostraron Sehaqui et al. (2011), cuando elaboraron nanopapeles de celulosa. También, en apariencia, las nanofibras en BC-B44 muestran un menor diámetro de estas respecto a las de BC-B1. Esto supondría una ventaja importante para las aplicaciones donde se requiera una relación de aspecto alta como la producción de materiales compuestos porque dicha relación es inversamente proporcional al diámetro (Zimmermann, Pöhler, and Geiger 2004; Shinoda et al. 2012).

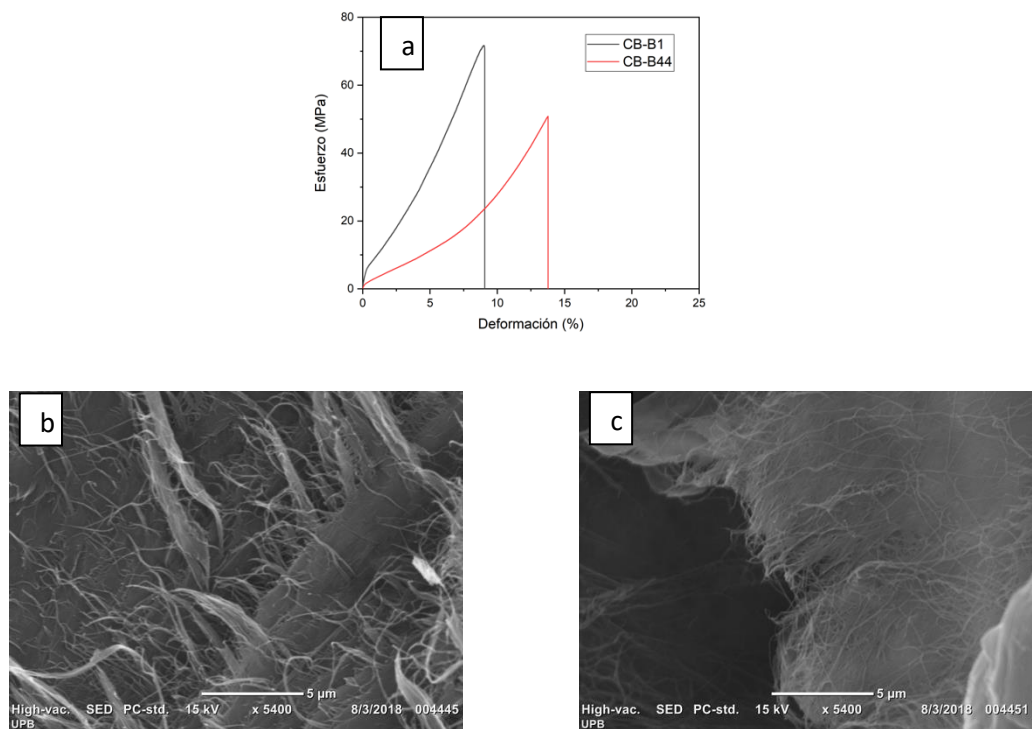


Figura 19. a) Diagrama de esfuerzo contra deformación de las muestras BC-B1 y BC-B44. b) Imagen obtenida por microscopía de barrido de la zona de fractura de BC-B1. c) Imagen obtenida por microscopía de barrido de la zona de fractura de BC-B44.

Finalmente, la respuesta de las muestras evaluadas a la prueba de análisis termogravimétrico es mostrada en la Figura 20. De los diagramas se puede extraer una ligera diferencia entre la máxima tasa de degradación (MTD) entre BC-B1 (357,5 °C) y BC-B44 (353,3 °C), en ambos casos hay una reducción de la MDT respecto a la NCB producida a partir de medios de cultivo comerciales como es el caso del medio de cultivo HS, tal como lo hemos demostrado anteriormente (C. Molina-Ramírez et al. 2018). Asimismo, ocurre con los valores de la temperatura inicial de degradación (TID), la cual fue de 281 °C para BC-B1 y de 275 °C para BC-B44. Esto puede estar relacionado con el hecho que BC-B44 tiene un área superficial mayor, lo cual le confiere al material una más alta área de contacto, provocando una estabilidad térmica menor a la de la de BC-B1 dada la naturaleza de la degradación térmica de los polímeros que sigue una ruta de descomposición compuesta por i) iniciación, ii) prolongación y iii) terminación (Ray and Cooney 2012). Los resultados obtenidos en el TGA reafirman los anteriormente tratados, desde los que se marca una diferencia en las propiedades mecánicas en ambas muestras

de NCB, y que el tamaño del recipiente donde se lleva a cabo la fermentación ejerce un efecto sobre la morfología de las nanofibras de la NCB, que a su vez repercute sobre las propiedades mecánicas y térmicas. Los cambios que se generan a nivel mecánico y térmico en las membranas producto del escalado podrían manipularse a través de cambios en las condiciones del medio de cultivo, como por ejemplo el aumento de la densidad celular inicial. Dicho cambio, podría inducir una configuración en la red de nanofibras similar a la obtenida con BC-B1, a través de la imitación de las condiciones de confinamiento.

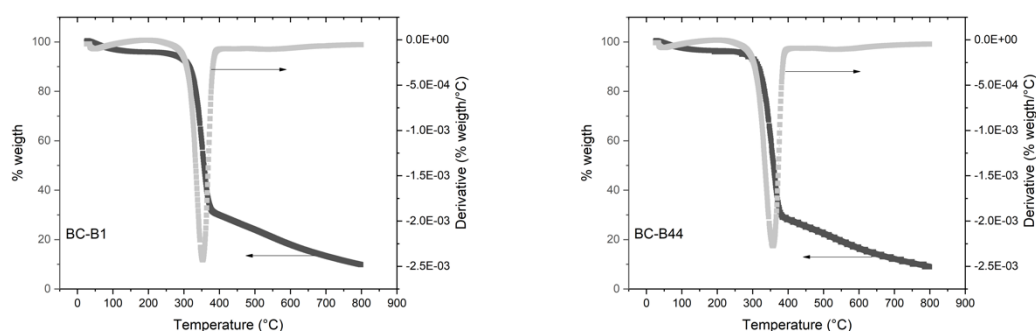


Figura 20. Curvas de TGA (línea negra) y DTG (línea gris) de BC-B1 (izquierda) y BC-B44 (derecha).

Conclusiones

El efecto del escalado sobre las características de NCB producida a partir de banano ha sido verificada. El efecto de cambiar la escala del recipiente donde se ejecuta el proceso de fermentación para producir NCB se notó sobre las características morfológicas al reducirse el diámetro de las nanofibras, el cual se redujo a la mitad en BC-B44. Lo anterior, degeneró en una reducción del módulo de elasticidad, de la resistencia y de la temperatura máxima de degradación en BC-B44. Sin embargo, se cree que se produjeron membranas compuesta por nanofibras con diámetros menores con perspectivas mejoradas para su aplicación en el campo de los materiales compuestos. Este cambio, podría evitarse a través de la modificación de las condiciones de cultivo de *K. medellinensis* mediante un

aumento en la concentración inicial del microorganismo, de manera que se evite que la red de NCB tenga las fibras más delgadas, promoviendo así el engrosamiento de estas, tal como ocurre en el recipiente pequeño como se explicó anteriormente.

Referencias

Barrett, Elliott P., Leslie G. Joyner, and Paul P. Halenda. 1951. "The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms." *Journal of the American Chemical Society* 73 (1): 373–80. <https://doi.org/10.1021/ja01145a126>.

Brunauer, Stephen, P. H. Emmett, and Edward Teller. 1938. "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers." *Journal of the American Chemical Society* 60 (2): 309–19. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>.

Castro, Cristina, Robin Zuluaga, Jean-Luc Putaux, Gloria Caro, Iñaki Mondragon, and Piedad Gañán. 2011. "Structural Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter Swingsii* Sp. from Colombian Agroindustrial Wastes." *Carbohydrate Polymers* 84 (1): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>.

Chen, Genqiang, Guochao Wu, Björn Alriksson, Lin Chen, Wei Wang, Leif J Jönsson, and Feng F Hong. 2018. "Scale-up of Production of Bacterial Nanocellulose Using Submerged Cultivation." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, June. <https://doi.org/10.1002/jctb.5699>.

Chen, Xi, Yong Xiang, and Joost J. Vlassak. 2006. "Novel Technique for Measuring the Mechanical Properties of Porous Materials by Nanoindentation." *Journal of Materials Research* 21 (03): 715–24. <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0088>.

Cheng, Kuan-Chen, Jeff M Catchmark, and Ali Demirci. 2009. "Enhanced Production of Bacterial Cellulose by Using a Biofilm Reactor and Its Material Property Analysis." *Journal of Biological Engineering* 3 (January): 12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-12>.

- Cheng, Kuan-Chen, Jeffrey M. Catchmark, and Ali Demirci. 2011. "Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis." *Biomacromolecules* 12 (3): 730–36. <https://doi.org/10.1021/bm101363t>.
- Dubinin, M. M. 1979. "Micropore Structures of Charcoal Adsorbents. 1. A General Characterization of Micro- and Supermicropores in the Fissure Model." *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* 28 (8): 1560–64. <https://doi.org/10.1007/BF00950967>.
- Embuscado, Milda E., Jay S. Marks, and James N. BeMiller. 1994. "Bacterial Cellulose. I. Factors Affecting the Production of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*." *Food Hydrocolloids* 8 (5): 407–18. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80084-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80084-2).
- Fan, Mizi, Dasong Dai, and Biao Huang. 2012. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres." In *Fourier Transform - Materials Analysis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/35482>.
- Henriksson, Marielle, Lars A Berglund, Per Isaksson, Tom Lindström, and Takashi Nishino. 2008. "Cellulose Nanopaper Structures of High Toughness." *Biomacromolecules* 9 (6): 1579–85. <https://doi.org/10.1021/bm800038n>.
- Hirai, Asako, Masaki Tsuji, and Fumitaka Horii. 2002. "TEM Study of Band-like Cellulose Assemblies Produced by *Acetobacter Xylinum* at 4 °C." *Cellulose* 9 (2): 105–13. <https://doi.org/10.1023/A:1020195205030>.
- Imai, Tomoya, and Junji Sugiyama. 1998. "Nanodomains of I α and I β Cellulose in Algal Microfibrils." *Macromolecules* 31 (18): 6275–79. <https://doi.org/10.1021/ma980664h>.
- Islam, Mazhar Ul, Muhammad Wajid Ullah, Shaukat Khan, Nasrullah Shah, and Joong Kon Park. 2017. "Strategies for Cost-Effective and Enhanced Production of Bacterial Cellulose." *International Journal of Biological Macromolecules* 102 (September): 1166–73. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.110>.
- Keshk, S. 2006. "Physical Properties of Bacterial Cellulose Sheets Produced in Presence of Lignosulfonate." *Enzyme Microb. Technol.* 40 (1): 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.038>.

Kim, Dae-Young, Yoshiharu Nishiyama, and Shigenori Kuga. 2002. “Surface Acetylation of Bacterial Cellulose N.” <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1021140726936.pdf>.

Kresge, C. T., M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck. 1992. “Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism.” *Nature* 359 (6397): 710–12. <https://doi.org/10.1038/359710a0>.

Krystynowicz, A, W Czaja, A Wiktorowska-Jezierska, M Gonçalves-Miśkiewicz, M Turkiewicz, and S Bielecki. 2002. “Factors Affecting the Yield and Properties of Bacterial Cellulose.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29 (4): 189–95. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>.

Lu, G., G.Q. (Max) Lu, and Z.M. Xiao. 1999. “Mechanical Properties of Porous Materials.” *Journal of Porous Materials* 6 (4): 359–68. <https://doi.org/10.1023/A:1009669730778>.

Meng, Qinghua, Bo Li, Teng Li, and Xi-Qiao Feng. 2017. “A Multiscale Crack-Bridging Model of Cellulose Nanopaper.” *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 103 (June): 22–39. <https://doi.org/10.1016/J.JMPS.2017.03.004>.

Molina-Ramírez, C., C. Castro, R. Zuluaga, and P. Gañán. 2018. “Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter Medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks.” *Journal of Polymers and the Environment* 26 (2). <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0993-6>.

Molina-Ramírez, C., M. Castro, M. Osorio, M. Torres-Taborda, B. Gómez, R. Zuluaga, C. Gómez, P. Gañán, O.J. Rojas, and C. Castro. 2017. “Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low PH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*.” *Materials* 10 (6). <https://doi.org/10.3390/ma10060639>.

Molina-Ramírez, Carlos, Carla Enciso, Mabel Torres-Taborda, Robin Zuluaga, Piedad Gañán, Orlando J. Rojas, and Cristina Castro. 2018. “Effects of Alternative Energy Sources on Bacterial Cellulose Characteristics Produced by *Komagataeibacter*

Medellinensis.” *International Journal of Biological Macromolecules* 117 (October): 735–41. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.195>.

Nelson, Mary L., and Robert T. O’Connor. 1964. “Relation of Certain Infrared Bands to Cellulose Crystallinity and Crystal Lattice Type. Part II. A New Infrared Ratio for Estimation of Crystallinity in Celluloses I and II.” *Journal of Applied Polymer Science* 8 (3): 1325–41. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080323>.

Nge, Thi Thi. 2010. “Bacterial Cellulose-Based Biomimetic Composites.” In *Biopolymers*, edited by Junji Sugiyama, Ch. 18. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/10269>.

Park, Sunkyu, John O Baker, Michael E Himmel, Philip A Parilla, and David K Johnson. 2010. “Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and Their Impact on Interpreting Cellulase Performance.” *Biotechnology for Biofuels* 3 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>.

Pecoraro, Édison, Danilo Manzani, Younes Messaddeq, Sidney J L Ribeiro, Mohamed Naceur Belgacem, and Alessandro Gandini. 2007. “Chapter 17 - Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter Xylinus*: Preparation, Properties and Applications.” In , 369–83. Amsterdam: Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008045316300017X>.

Ray, Sudip, and Ralph P. Cooney. 2012. “Thermal Degradation of Polymer and Polymer Composites.” *Handbook of Environmental Degradation of Materials*, January, 213–42. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3455-3.00007-9>.

Retegi, A., N. Gabilondo, C. Peña, R. Zuluaga, C. Castro, P. Gañan, K. de la Caba, and I. Mondragon. 2009. “Bacterial Cellulose Films with Controlled Microstructure–mechanical Property Relationships.” *Cellulose* 17 (3): 661–69. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9389-7>.

Ruka, Dianne R, George P Simon, and Katherine M Dean. 2012. “Altering the Growth Conditions of *Glucanacetobacter Xylinus* to Maximize the Yield of Bacterial Cellulose.” *Carbohydrate Polymers* 89 (2): 613–22. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>.

Saichana, Natsaran, Kazunobu Matsushita, Osao Adachi, Ivo Frébort, and Jitka Frebortova. 2015. “Acetic Acid Bacteria: A Group of Bacteria with Versatile Biotechnological Applications.” *Biotechnology Advances* 33 (6 Pt 2): 1260–71. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>.

Sehaqui, Houssine, Qi Zhou, Olli Ikkala, and Lars A. Berglund. 2011. “Strong and Tough Cellulose Nanopaper with High Specific Surface Area and Porosity.” *Biomacromolecules* 12 (10): 3638–44. <https://doi.org/10.1021/bm2008907>.

Shezad, Omer, Salman Khan, Taous Khan, and Joong Kon Park. 2010. “Physicochemical and Mechanical Characterization of Bacterial Cellulose Produced with an Excellent Productivity in Static Conditions Using a Simple Fed-Batch Cultivation Strategy.” *Carbohydr. Polym.* 82 (1): 173–80. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.052>.

Shinoda, Ryuji, Tsuguyuki Saito, Yusuke Okita, and Akira Isogai. 2012. “Relationship between Length and Degree of Polymerization of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibrils.” *Biomacromolecules* 13 (3): 842–49. <https://doi.org/10.1021/bm2017542>.

Sugiyama, Junji, Jan Persson, and Henri Chanzy. 1991. “Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses.” *Macromolecules* 24 (9): 2461–66. <https://doi.org/10.1021/ma00009a050>.

Tischer, Paula C. S. Faria, Maria Rita Sierakowski, Harry Westfahl, and Cesar Augusto Tischer. 2010. “Nanostructural Reorganization of Bacterial Cellulose by Ultrasonic Treatment.” *Biomacromolecules* 11 (5): 1217–24. <https://doi.org/10.1021/bm901383a>.

Tsouko, Erminda, Constantina Kourmentza, Dimitrios Ladakis, Nikolaos Kopsahelis, Ioanna Mandala, Seraphim Papanikolaou, Fotis Paloukis, Vitor Alves, and Apostolis Koutinas. 2015. “Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and By-Product Streams.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7): 14832–49. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>.

Ung-Jin Kim, *,†, † Shigenori Kuga, † Masahisa Wada, † and Takeshi Okano, and Tetsuo Kondo‡. 2000. “Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose.” <https://doi.org/10.1021/BM0000337>.

VanderHart, David L., and R. H. Atalla. 1984. "Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-State Carbon-13 NMR." *Macromolecules* 17 (8): 1465–72. <https://doi.org/10.1021/ma00138a009>.

Wong, Shen-Siung, Stefan Kasapis, and Yanfang Mabelyn Tan. 2009. "Bacterial and Plant Cellulose Modification Using Ultrasound Irradiation." *Carbohydrate Polymers* 77 (2): 280–87. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2008.12.038>.

Yamanaka, S., K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsuhashi, Y. Nishi, and M. Uryu. 1989. "The Structure and Mechanical Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose." *Journal of Materials Science* 24 (9): 3141–45. <https://doi.org/10.1007/BF01139032>.

Zimmermann, T., E. Pöhler, and T. Geiger. 2004. "Cellulose Fibrils for Polymer Reinforcement." *Advanced Engineering Materials* 6 (9): 754–61. <https://doi.org/10.1002/adem.200400097>.

Conclusiones generales, trabajos futuros y productos relacionados

Conclusiones generales

A lo largo de esta tesis se exploraron diferentes fuentes alternativas de carbono de bajo costo para la producción de NCB de la manera más eficiente posible con miras a superar las limitantes en la producción comercial de esta, a través de la implementación de metodologías tradicionales de procesos en agitación para el escalado de un biorreactor en condiciones de fermentación estática.

La investigación se inició con la utilización de tres residuos agroalimentarios diferentes: banano, mango y lactosuero, a partir de los cuales se produjo NCB y se evaluaron tanto el su rendimiento como sus propiedades y características. Los tres medios de cultivo que se obtuvieron eran ricos en glucosa, principalmente el obtenido a partir de banano. En ese orden de ideas, el medio de cultivo a partir de los residuos de banano permitió obtener el rendimiento más alto, además de la NCB con las propiedades mecánicas más altas en comparación con los otros dos tipos de residuos y el medio de cultivo control (HS), por un delicado equilibrio en la relación de la concentración de sales de calcio, potasio, magnesio y sodio; así como por la presencia de componentes poliméricos propios de este tipo de sustancias. Por otra parte, el rendimiento de la NCB obtenida a partir de lactosuero fue similar al obtenido con el medio de cultivo HS y también mostró un aumento de la temperatura de degradación, abriendo la puerta a aplicaciones que requieran este tipo de propiedades.

Como primer paso en el proceso de optimización en la producción NCB, se establecieron las condiciones óptimas para la obtención del inóculo de *K. medellinensis* NBRC 3288. En este punto se logró reducir el tiempo de crecimiento de 3 días a 2, y la densidad celular, así como aumentar la velocidad de éste en un 35 % al pasar de $0,15 \text{ h}^{-1}$ hasta $0,23 \text{ h}^{-1}$. Se consiguió la formulación de un nuevo medio de cultivo en la que se redujo el contenido de glucosa en un 73 %, lo cual representa un ahorro importante desde el punto de vista económico. Asimismo, se comprobó la importancia que tiene la concentración celular del

inóculo en la producción de NCB cuando se emplea un medio de cultivo comercial como el HS.

Hoy en día, las nanoestructuras de celulosa son una de las más prometedoras, y un amplio trabajo en el área de materiales y biotecnología busca identificar un proceso eficiente para su producción. Incluso cuando las escalas de laboratorio son exitosas, los aspectos cruciales de las aplicaciones más comerciales de las nanoestructuras de celulosa están vinculadas a la producción a gran escala. Este último aspecto es más relevante cuando se produce nanocelulosa bacteriana, porque se requiere un equilibrio entre el costo de los medios de cultivo y el valor del producto. Por lo tanto, una vez establecido que el banano fue el que mejores resultados ofreció en rendimiento, y las condiciones para obtener el inóculo, se establecieron las condiciones óptimas para la producción de NCB y su consecuente escalado. En este paso se estableció que la concentración de glucosa en el medio de cultivo y la relación volumen-área fueron los factores que tuvieron efecto significativo sobre el rendimiento de NCB. Los niveles óptimos de dichos factores fueron una concentración de 26,4 g/L de glucosa y 2,2 cm en la relación V/A. Llevar a cabo la fermentación bajo estas condiciones permitió aumentar el rendimiento de NCB en un 42,4 %. Luego, se establecieron los tiempos característicos de los subprocesos más relevantes en la producción de NCB y se determinó que el subproceso limitante es la difusión de la glucosa a través de la membrana de NCB que se va formando en la interfase aire-medio de cultivo. Por lo tanto, la relación V/A se seleccionó como el criterio de escalado idóneo para procesos de fermentación en modo estático, a través de la aplicación de la metodología de análisis de régimen por primera vez. Cuando se escaló este proceso, se obtuvo un aumento de 3378 % en la masa seca de NCB y una reducción del 20 % en el rendimiento, lo cual está dentro de los rangos que manejan en otros procesos de escalado.

Sin embargo, es muy importante evaluar cómo se ven afectadas las propiedades y características de la NCB producida por el escalado. Por eso se evaluaron a través de diferentes técnicas dicho efecto y se logró determinar que las membranas de NCB producidas en un biorreactor plástico con unas dimensiones 44 veces superiores fueron ligeramente menos resistentes a la tracción y también presentaron un módulo de elasticidad menor, así como una temperatura de degradación ligeramente menor. A pesar

de lo anteriormente dicho, estas membranas del biorreactor plástico presentaron un área superficial ligeramente mayor, también mostraron un diámetro de las nanofibras ligeramente menor respecto a las obtenidas en el recipiente de vidrio más pequeño. Esto, podría implicar una ventaja importante para aplicaciones en el sector de materiales compuestos, en el que tener un área superficial mayor, así como un menor diámetro podría impactar en la obtención de nanofibras con relación de aspecto en órdenes de magnitud superiores dada la relación entre esta propiedad y el diámetro de las fibras (L/D), permitirían un mayor margen de maniobra en la elaboración de materiales compuestos.

La suma de todos los logros alcanzados en esta tesis permitirá abrir el camino hacia la explotación a nivel comercial de la NCB, mediante la reducción de costos gracias a la implementación de un residuo agroalimentario con gran producción, no solo en Colombia sino a nivel mundial, su forma de obtención de manera simple, económica y fácilmente replicable.

Trabajos futuros

Con miras a darle continuidad a esta tesis, se plantean las siguientes sugerencias:

- Es importante evaluar el contenido de los sólidos retenidos en el proceso de filtración del medio de cultivo producido con banano, para verificar si es posible su aprovechamiento como sustrato de segunda generación en la producción de NCB o el encadenamiento en la producción de alguna otra biomolécula de gran importancia comercial.
- Asimismo, evaluar las características del remanente del medio de cultivo que queda en el biorreactor una vez finalizada la fermentación, con el objetivo de verificar la presencia de algunas sustancias como ácidos orgánicos, propias del metabolismo de estos microorganismos, que pudieran representar una oportunidad de explotación comercial.
- Dada las características metabólicas de *K. medellinensis* NBRC 3288, se propone diseñar un proceso co-cultivo con microorganismos de naturalezas diferentes pero complementarios, para aprovechar los residuos agroalimentarios no solo en la producción de NCB sino vincular otras sustancias de importancia comercial, e.g. etanol.
- A través de una estrategia de biorrefinería, diseñar un proceso en el que se aprovechen todas las corrientes efluentes como el remanente del medio de cultivo y los retenidos de la filtración del mismo.
- Diseñar una planta piloto para la producción de NCB a partir de residuos de la cadena de suministro de banano, de manera que se integre en dicha cadena como un eslabón que permita un aprovechamiento mayor a través de la proximidad geográfica de dicha planta a las zonas donde se da la producción de esta fruta.
- Plantear la viabilidad económica de una planta industrial en una zona próxima a las plantaciones de banano de manera que se impacte económica y socialmente en toda el área de influencia de dichas zonas.
- Explorar diferentes tipos de residuos agroalimentarios con alta producción en Colombia para la producción de NCB con miras a producir algunas modificaciones

de las propiedades, tal como se demostró en esta tesis, para generar diferentes líneas de NCB dependiendo de las aplicaciones deseadas.

- En el mismo sentido de la propuesta justamente anterior, se plantea explorar modificaciones de las condiciones de cultivo para manipular las propiedades de las NCB.

Productos relacionados

A lo largo de esta tesis se obtuvieron los productos que se presentan en las tablas 20, 21 y 22.

Tabla 20. Artículos en revistas indexadas

Revista	Journal of Polymers and the Environment
Título	Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by <i>Komagataeibacter medellinensis</i> Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Piedad Gañán
Fecha de publicación	Marzo, 2017
DOI	10.1007/s10924-017-0993-6
Revista	Materials
Título	Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low pH Resistant Strain <i>Komagataeibacter medellinensis</i>
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Piedad Gañán, Orlando Rojas, Robin Zuluaga, Marlon Osorio, Mabel Torres-Taborda, Beatriz Gómez, Catalina Gómez, Margarita Castro, Cristina Castro
Fecha de publicación	Junio, 2017
DOI	10.3390/ma10060639
Revista	International Journal of Biological Macromolecules
Título	Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose characteristics produced by <i>Komagataeibacter medellinensis</i>
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Carla Enciso, Piedad Gañán, Orlando Rojas, Robin Zuluaga, Mabel Torres-Taborda, Cristina Castro
Fecha de publicación	Octubre, 2018
DOI	10.1016/j.ijbiomac.2018.05.195
Revista	Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management
Título	A novel approach of conventional methodologies to scale-up of BNC production by using rotten banana wastes as feedstock

Autores	Carlos Molina-Ramírez, Angélica Serpa, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Piedad Gañán
Fecha de publicación DOI	En revisión
Revista	Dyna
Título	Producción de nanocelulosa bacteriana por <i>K. medellinensis</i> a partir de lactosuero con potenciales aplicaciones alimentarias
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Piedad Gañán
Fecha de publicación DOI	En revisión
Revista	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
Título	Statistical optimization of culture conditions to improve the cell density of <i>Komagataeibacter medellinensis</i> NBRC 3288: a first step toward optimizing bacterial cellulose
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Piedad Gañán
Fecha de publicación DOI	Sometido
Revista	Cellulose
Título	Effect of scale-up on BNC produced from rotten banana properties ads characteristics
Autores	Carlos Molina-Ramírez, Ana Cañas, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Piedad Gañán
Fecha de publicación DOI	En construcción

Tabla 21. Participación en eventos científicos

Evento	Simposio Nacional de Biopolímeros
Título Ponencia	Celulosa: Un Polímero de Siempre con Mucho Futuro
Autores	Piedad Gañán, Robin Zuluaga, Cristina Castro, Adriana Restrepo Osorio, Jorge Velásquez Cock, Úrsula Montoya, Lina Vélez, Catalina Álvarez, Carlos Correa y Carlos Molina Ramírez
Lugar y fecha	Medellín, Colombia - 8 y 9 de junio de 2017
Evento	Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos - IICTA 2018

Título Ponencia	Producción de nanocelulosa bacteriana por <i>K. medellinensis</i> a partir de lactosuero con potenciales aplicaciones alimentarias
Autores	Carlos Molina Ramírez, Cristina Castro, Robin Zuluaga y Piedad Gañán
Lugar y fecha	Cali, Colombia - 16, 17 y 18 de mayo de 2018.
Evento	XXVII International Materials Research Congress
Título Ponencia	Improvement of Physical Properties of Bacterial Cellulose Using a Cheaper and More Ecofriendly Culture Medium, by a Two-Stage Strategy Fermentation
Autores	Carlos Molina Ramírez, Cristina Castro, Robin Zuluaga y Piedad Gañán
Fecha y lugar	Cancún, México - 19-24 de agosto de 2018
Evento	X Ibero American on Pulp and Paper Research 2018
Título Ponencia	Production and Characterization of Bacterial Nanocellulose From Rotten Banana Fruit Rejected in Marketplaces
Autores	Carlos Molina Ramírez, Cristina Castro, Robin Zuluaga y Piedad Gañán
Fecha y lugar	Sao Paulo, Brasil – 23-25 de octubre de 2018

Tabla 22. Participación en proyecto

Título	Fortalecimiento a los productores en el encadenamiento productivo de fruta pequeña mediante la adecuada transferencia de resultados de investigación e innovación-MII-12-14-MII-06-14. REGALÍAS
Fecha inicio	14/11/2013
Fecha terminación	14/11/2016
Función	Auxiliar de investigación
Título	Desarrollo de materiales nanoestructurados basados en celulosa regenerada para la producción fibras textiles
Fecha inicio	18/07/2016
Fecha terminación	18/01/2018
Función	Auxiliar de investigación

Título	Evaluación del uso de nanofibras de celulosa y fibras naturales en la remoción de mercurio en aguas residuales de minería
Fecha inicio	18/07/2017
Fecha terminación	18/07/2018
Función	Auxiliar de investigación
Título	Transferencia tecnológica sobre aplicaciones de nanocelulosa en iberoamérica - Red Nanocelia del Cyted
Fecha inicio	10/02/2018
Fecha terminación	10/02/2019
Función	Investigador asistente