

PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE PROCESOS  
FERMENTATIVOS UTILIZANDO MUCÍLAGO DE CAFÉ COMO FUENTE DE  
CARBONO

INGRITH CAROLINA FLÓREZ GARCÍA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA 2015

PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE PROCESOS  
FERMENTATIVOS UTILIZANDO MUCÍLAGO DE CAFÉ COMO FUENTE DE  
CARBONO

INGRITH CAROLINA FLÓREZ GARCÍA

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar el título de  
Magíster en Química ambiental.

Dirigido por:

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ  
Universidad Industrial de Santander

Codirigido por:

CRISTIAN BLANCO TIRADO  
Universidad Industrial de Santander

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindar el don de la sabiduría en el desarrollo de esta investigación.

A Edwin por ser el apoyo incondicional, su amor y comprensión.

A mis padres por formar principios fundamentales éticos, morales y espirituales.

A mis hermanos por ser una voz de aliento en mi vida.

A Profesora Yajaira Combariza por su formación académica y profesional, el interés y su sabiduría en el desarrollo de esta investigación. Gracias por permitir ser parte de su equipo de trabajo.

A Profesor Cristian por su orientación en el desarrollo de esta investigación.

A Elizabeth por su colaboración durante el desarrollo en esta etapa de mi vida.

A La profesora Ángela Montaña y María Mercedes por su ayuda y apoyo incondicional.

A Paalo, Mario, Victor, Cristian, Leslie, Gonzalo y Mauricio en el desarrollo de la investigación.

A Karen y Orlando por su amistad y todo su apoyo incondicional.

A Don Salvador y esposa: facilitar las muestras de MC

A compañeros de Ceiam por brindar todo el apoyo en análisis de las muestras.

A Carito por su análisis en SEM, por el Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander – Parque Tecnológico de Guatiguará y su personal, por el servicio de microscopía suministrado para la adquisición de datos.  
Universidad Industrial de Santander- UIS.

A UIS, institución educativa que me ha brindado mi formación académicas y profesional.

***Ingrith Carolina Flórez García***

## ABREVIATURAS

<b>CB</b>	Celulosa Bacteriana.
<b>MC</b>	Mucílago de café.
<b>HS</b>	Hestrin and Schramm.
<b>HS-MC</b>	Hestrin and Schramm- modificado Mucílago de café.
<b>CN</b>	Caldo Nutritivo.
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid chromatography, (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).
<b>IRD</b>	Infrared detector, (Detector de índice de refracción).
<b>TGA</b>	Balanza termogravimétrica/ modelo Discovery, marca TA INSTRUMENT.
<b>DRX</b>	Difractómetro de polvo modelo <i>D8 ADVANCE</i> , marca Bruker.
<b>Indust.</b>	Industria

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	16
1. ESTADO DEL ARTE.....	19
1.1 CELULOSA .....	19
1.2 CELULOSA BACTERIANA.....	20
1.2.1 Proceso de producción de CB por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> . .....	20
1.3 Medio De Cultivo – Residuos Agroindustriales. ....	21
1.4 MUCÍLAGO DE CAFÉ (MC) .....	22
1.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULOSA BACTERIANA.....	24
1.5.1 <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	25
1.6 FERMENTACIÓN .....	26
1.7 APLICACIONES DE LA CELULOSA BACTERIANA .....	27
1.7.1 La CB en el campo de medicina. ....	28
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.2 FUENTE DE CARBONO .....	31
2.2.1 Caracterización del mucilago de café .....	31
2.3 MICROORGANISMO.....	33
2.3.1 Criopreservación.....	33
2.4 PRODUCCION .....	34
2.4.1 Medio de cultivo.....	34
2.4.2 Fermentación.....	34
2.5 PURIFICACIÓN DE CELULOSA BACTERIANA.....	34
2.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE CB.....	34
2.6.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM-EDS). ....	34
2.6.2 Difracción de Rayos X (DRX).....	35
2.6.3 Espectroscopia Infrarrojo (FT IR).....	35
2.6.4 Termogravimetría (TGA).....	36

2.6.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). .....	36
2.6.5 Grosor de las películas .....	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
3.1 CARACTERIZACION DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ.....	37
3.2 PRODUCCIÓN DE CB .....	38
3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE CB.....	43
3.3.1 Caracterización mediante FESEM-EDS.....	43
3.3.2 Análisis elemental por EDS. ....	45
3.3.3 Caracterización mediante DRX.....	46
3.3.4Caracterización mediante IR.....	49
3.3.5 Analisis Termogravimétrico (TGA).....	51
3.3.6 Análisis calorimétrico diferencial- DSC .....	52
4. CONCLUSIONES .....	54
5. RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXOS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la celulosa. ....	19
Figura 2. Morfología de microfibrillas proveniente de diferentes fuentes (ancho)[9]. .....	20
Figura 3. Esquema general del metabolismo de <i>G. xylinus</i> .....	21
Figura 4. Fuentes de carbono utilizadas en procesos fermentativos con <i>G. xylinus</i> .....	22
Figura 5. Beneficio húmedo del café a) recolección, b) despulpado, c) remoción del MC, d) lavado y e) secado. ....	23
Figura 6. Composición química del mucílago de café- MC [1] .....	24
Figura 7. Tipos de cultivos para realizar fermentaciones oxidativas.....	27
Figura 8. Aplicación de la celulosa bacteriana- CB. ....	28
Figura 9. Algunos productos comerciales de CB. ....	28
Figura 10. Implantes microvasculares [51].....	29
Figura 11. Diseño metodológico desarrollado en la investigación. ....	30
Figura 12. Cromatógrafo líquido agilent 1100 series- lc systems and modules - detector de índice de refracción -rid (california,usa) .....	33
Figura 13. Celulosa producida por fermentación estática por <i>G. xylinus</i> ATCC 23768 a) película de celulosa húmeda extraída del medio HS y b) película de celulosa húmeda extraída del medio de cultivo HS-MC del día 7 de fermentación. ....	39
Figura 14. Ph durante el proceso fermentativo en medios HS y HSMC en los diferentes tiempos de incubación (7 días). ....	39
Figura 15. Producción de celulosa en los medios HS y HS-MC .....	41
Figura 16. Espesor de las películas de CB del medio HSMC, durante los 7 días de fermentación.....	43
<i>Figura 17. A) imagen de G. xylinus junto a nanofibrillas de CB y b) G. xylinus en película de celulosa bacteriana con nanocompositos de plásticos como soporte[44]. ....</i>	<i>44</i>
Figura 18. Imágenes sem de películas de CB producidas por <i>G. xylinus</i> ATCC 22768, día 4 de fermentación, (a)-(c) superficie externa de CB y (d)-(f) superficie laminal. ....	45
Figura 19. Análisis elemental EDS de las películas de CB.....	46
Figura 20. Planos difractogramas de rayos x, típicos de celulosa nativa.....	47

Figura 21. Difracción de rayos x de película s de celulosa obtenidas a) CB-HS y b) CB- MC , después de 7 días de fermentación, usando los respectivos medios de cultivo. ....	48
Figura 22. Espectros FT-IR (ATR) de celulosa producida por <i>G. xylinus</i> ATCC 23768 a) medio HS y b) medio HSMC.....	49
Figura 23. Análisis termogravimétrico para las película s obtenidas a partir de <i>G. xylinus</i> .....	51
Figura 24. Termogramas DSC para película s obtenidas a partir a) CB-HS y b) CB-MC.....	52

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación según (deinema, 1971) de las bacterias productoras de CB. .....	24
Tabla 2. Cepas de <i>G. xylinus</i> usadas para la producción de celulosa.....	25
Tabla 3. Métodos de caracterización del mucílago de café.....	31
Tabla 4. Composición química del mucílago de café en base seca y húmeda.....	37
Tabla 5. Comparación de porcentaje de cristalinidad (cr) y tamaño del cristalito (crt) de cb obtenida de medio HSMC y medio de referencia HS. ....	48
Tabla 6. Bandas de absorción y modos vibracionales de cb, reportadas en la literatura. ....	50
Tabla 7. Etapas de cristalización de película s de celulosa, obtenidas con el medio de HSMC y de referencia HS.....	53

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Reactivos y equipos .....	66
Anexo B. Protocolo de toma de muestra de mucílago de café fresco. ....	67
Anexo C. Resultados fisicoquímicos del mucílago de café. ....	68
Anexo D. Membranas de CB obtenidas durante 7 días de fermentación: a) (día 2, 3, 5 y 7 cb), b) y c) con y sin tratamiento de purificación y d) izquierda: sin tratamiento de purificación. Derecha: con tratamiento de purificación con nacro al 0,5 %. ....	69

## RESUMEN

**TÍTULO:** PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE PROCESOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO MUCILAGO DE CAFÉ COMO FUENTE DE CARBONO.

**Autor:** INGRITH CAROLINA FLÓREZ GARCÍA\*\*.

**Palabras claves:** Celulosa Bacteriana-CB; Mucílago de café-MC; Hestrin and Schramm-HS; *Gluconacetobacter xylinus*.

La Celulosa Bacteriana (CB) es un biopolímero que a diferencia de la celulosa proveniente de las plantas es altamente puro y cristalino, no posee lignina y hemicelulosa, y puede ser empleado como fuente alternativa de celulosa en la industria. La producción industrial de CB, está limitada por su viabilidad económica, siendo la fuente de carbono, uno de los factores. Los residuos agroindustriales, como el mucílago de café (MC), aparecen como una alternativa atractiva para el desarrollo de los biopolímeros, ya que de esta forma se ayuda a la viabilidad a escala industrial. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso de fermentación estática a escala de laboratorio para la producción de CB, utilizando una cepa de referencia *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23768 y MC como fuente de carbono. Para las fermentaciones se utilizó un medio de referencia Hestrin y Schramm (HS) y en medio Hestrin y Schramm con fuente de carbono MC (HS-MC), el pH del medio se ajustó a 6 con una solución de NaOH 1N. La producción de celulosa utilizando MC como fuente de carbono (4,8 g/L) fue 2.28 veces mayor que la celulosa obtenida con el medio de referencia HS utilizando sacarosa como fuente de carbono (2,1 g/L). En la película formada se observaron microfibrillas de celulosa en forma de cinta con anchos de 23-63 nm y longitudes variables ( $\mu\text{m}$ ). Resultados sugieren que MC tiene un alto potencial como fuente de carbono en la producción de CB por *G. xylinus* ATCC 23768. El MC, un residuo orgánico de la industria cafetera que genera impactos negativos sobre las fuentes hídricas, puede usarse como fuente de carbono económica y abundante en procesos fermentativos para producción de celulosa. Adicionalmente el estudio de usos alternativos de esta biomasa residual es importante porque permite proponer soluciones viables a problemáticas complejas que afectan el desarrollo del sector agroindustrial cafetero no solo del departamento de Santander sino del país.

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química, Director Marianny Yajaira Combariza Montañez, codirector Cristian Blanco Tirado.

## ABSTRACT

**TITLE:** PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE FROM FERMENTATIVE PROCESSES USING COFFEE MUCILAGE AS CARBON SOURCE.

**Author:** INGRITH CAROLINA FLOREZ GARCIA \*\*.

**Keywords:** Bacterial cellulose-CB; Mucilage of coffee-MC; Hestrin and Schramm- HS; *Gluconacetobacter xylinus*.

Bacterial cellulose (CB) is a highly pure and crystalline biopolymer, which is different from the kind found in plants, as it is not composed by lignin and hemicellulose. It can be used as an alternative source in the industrial sector. In response to the limited financial feasibility of the bacterial cellulose mass production, in terms of carbon source, agro-industrial waste, such as coffee mucilage (CM), appears as an attractive alternative for the production of the biopolymer. The aim of the present work was to develop a laboratory scale fermentative process for the production of BC, using a reference strain ATCC 23768 *Gluconacetobacter xylinus* and CM as carbon source. A reference Hestrin and Schramm (HS) culture medium and a test Hestrin and Schramm (HS-MC) culture medium modified by using CM as carbon source were tested for fermentative process. The media pH was adjusted to 6 with a 1 N NaOH aqueous solution. The production of cellulose using MC as a carbon source (4.8 g/L), was 2.28 times greater than the cellulose obtained from the reference HS culture medium operating sucrose as carbon source (2.1 g/L). The obtained films were found to be structured by 23-63 nm wide and variable length ribbon shaped micro-fibrils. Results suggest that MC has a promising potential as a carbon source in the production of CB by *G. xylinus* ATCC 23768. The MC, an organic waste found in the coffee industry that generates a negative impact on water sources, can be used as a source of profitable and abundant carbon source in fermentative processes for the production of cellulose. Additionally, the study of alternative uses to this residual biomass is essential due to the fact that it allows the generation of viable solutions to complex issues that affect the development of the agro-industrial coffee sector not only in Santander but also in the country.

\*Bachelor thesis

\*\*Science faculty, Chemistry school, Director Marianny Yajaira Combariza Montañez, Co-director Cristian Blanco Tirado.

## INTRODUCCIÓN

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza y uno de los materiales más utilizados por el hombre a lo largo de la historia. En la actualidad la celulosa es indispensable como materia prima en la industria textil, maderera, de pulpa y papel. Desde el punto de vista fisiológico la celulosa es un componente estructural intrínseco de la pared celular de las plantas donde forma una red con otros polímeros como la hemicelulosa y la lignina [2]. Aunque la celulosa comúnmente se asocia a las plantas, donde cumple funciones estructurales y fisiológicas, existen otros organismos que la producen. Por ejemplo, es bien conocido que la celulosa puede ser elaborada por diferentes organismos del reino Fungi (*Dictyostelium*), Procariota/Monera (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) y Animal (*Tunicidae*). [3]

La celulosa bacteriana (CB) se produce por algunas especies del reino Procariota, y se diferencia de la celulosa vegetal por su alta pureza y cristalinidad. En la actualidad esta sustancia ha revolucionado el área de los materiales, particularmente en aplicaciones biomédicas, por sus excepcionales propiedades fisicoquímicas y mecánicas, y constituye uno de los biopolímeros más estudiados en los últimos tiempos.[4] La CB se produce mediante procesos biotecnológicos (fermentaciones aerobias y/o oxidativas) a partir de microorganismos (bacterias) que utilizan azúcares simples y alcoholes como fuentes de carbono.

El café es un arbusto que pertenece a la familia de las rubiáceas, nativo de Asia y África que produce un fruto de tipo drupa, el cual se utiliza desde el siglo XII para la preparación de una bebida estimulante. En Colombia, cuarto productor mundial de café, se cultiva y exporta la especie *Coffea arabica*; nuestro café es reconocido por su suavidad y aroma. El proceso normal de producción de café comprende las

etapas de despulpado del fruto, clasificado, remoción del mucilago, lavado y secado. Uno de los subproductos de este proceso industrial - tradicional, y de interés para la presente investigación, es el mucílago. En Colombia el mucílago de café (MC) se ha convertido en un problema ambiental debido a que algunos pequeños productores lo eliminan directamente a cuerpos de agua, que eventualmente se contaminan por exceso de materia orgánica. Sin embargo, el MC es rico en azúcares, pectinas, proteínas, grasa y cenizas y consecuentemente su uso como fuente de carbono en procesos microbiológicos de transformación resulta muy atractivo.

En la actualidad, se han reportado aplicaciones del MC en la producción de abonos y en otros casos para obtener bioetanol. Se estima que por cada millón de sacos de 60 Kg de café que se exporta de Colombia, se generan un total aproximado de 55.500 toneladas de MC fresco. Para noviembre de 2014, la producción de café alcanzó los 12 millones de sacos, es decir un total aproximado de 600.000 toneladas de MC se están generando sin que se haga un aprovechamiento eficiente a gran escala.

La Celulosa bacteriana- CB, es un nuevo material que se destaca por su alto grado de cristalinidad, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. Adicionalmente debido a sus características de baja reactividad y toxicidad, hidrofiliidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad es atractiva para la industria cosmética, biomédica y tecnológica. Existen diversos microorganismos que tienen la capacidad de producir este biopolímero, géneros como de *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina* y *Zoogloea* se han reportado como productores de CB [5], [6] ; sin embargo se destacan especialmente las cepas del género *Glucoacetobacter* que en la actualidad son las más utilizadas a nivel industrial. Esta familia de microorganismos, dentro de la que se destaca la especie *Gluconacetobacter xylinus*, tiene la capacidad de producir películas o películas de celulosa sobre la superficie de medios de cultivo líquidos [7]–[9].

En este documento se describen los resultados obtenidos durante el proceso de producción de CB utilizando un proceso microbiológico de fermentación en el cual se utiliza un residuo agroindustrial (MC) como única fuente de carbono.

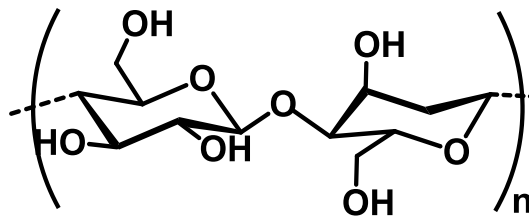
El proceso de investigación inició con una revisión bibliográfica, utilizando bases de datos electrónicas, para establecer el estado del arte sobre la producción de CB utilizando fuentes alternativas de carbono. Posteriormente, se desarrolló una fase de campo que comprendió visitas al sitio seleccionado para la toma de muestra de MC, que se caracterizó fisicoquímicamente. Finalmente, se establecieron las condiciones de fermentación adecuadas para la producción de CB en el laboratorio, utilizando la cepa de referencia (*Gluconacetobacter xylinus*). El biopolímero obtenido se caracterizó por métodos fisicoquímicos y espectroscópicos.

Adicionalmente, con la realización de este proyecto se fortalece la línea de investigación en materiales biopoliméricos a partir de fuentes de carbono no convencionales, del Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales – CEIAM.

## 1. ESTADO DEL ARTE

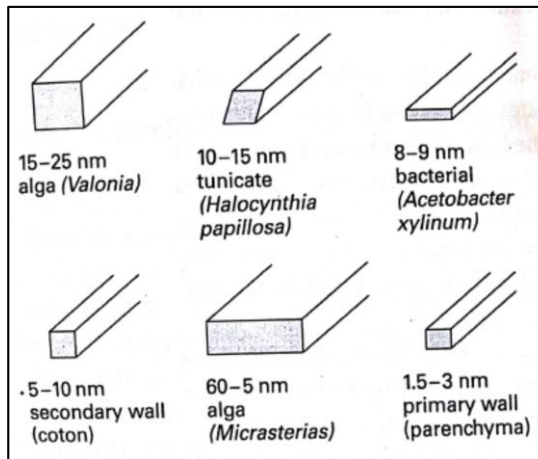
### 1.1 CELULOSA

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza y uno de los materiales más utilizados por el hombre a lo largo de la historia. En la actualidad es indispensable como materia prima en la industria textil, maderera, y de pulpa y papel. El polímero de celulosa se compone de unidades  $\beta$ -(1,4)D-glucopiranosas, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídico (**figura 1**). Desde el punto de vista fisiológico es el componente estructural intrínseco de la pared celular de las plantas, en forma de microfibrillas de 2 a 20 nm de diámetro y de 100 a 40,000 nm de largo, aproximadamente donde forma una red con otros polímeros como la hemicelulosa y la lignina[2].



**Figura 1.** Estructura química de la celulosa.

Aunque la celulosa comúnmente se asocia a las plantas, donde cumple funciones estructurales y fisiológicas, existen otros organismos que la producen. Por ejemplo es bien conocido que la celulosa puede ser elaborada por diferentes organismos del reino Fungi (*Dictyostelium*), Procariota/Monera (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*) y Animal (*Tunicidae*)[3]. En cuanto a su morfología y tamaño, las fibras pueden variar de acuerdo con la fuente y especie de individuo que la produce (figura 2).



**Figura 2.** Morfología de microfibrillas proveniente de diferentes fuentes (ancho)[10].

Aunque la mayor parte de la celulosa empleada en el mundo proviene de fuentes vegetales, en la actualidad también existen procesos biotecnológicos que permiten obtener este polímero a escala industrial.

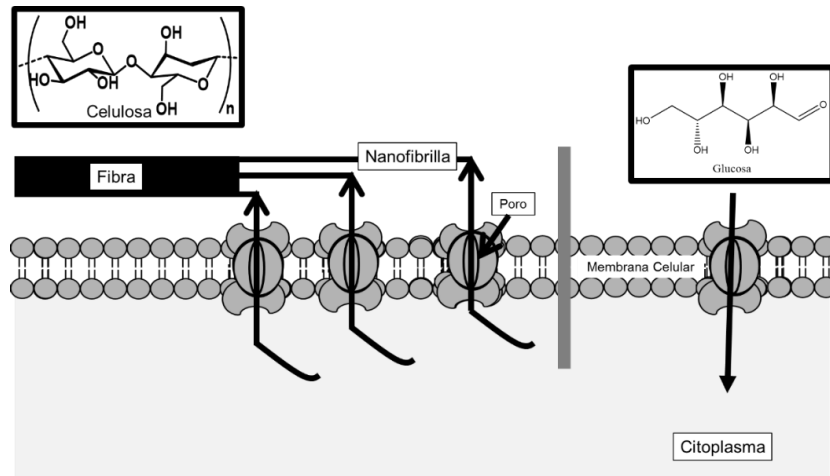
## 1.2 CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana (CB) se produce por algunas especies del reino Procariota, y se diferencia de la celulosa vegetal por su alta pureza y cristalinidad. En la actualidad esta sustancia ha revolucionado el área de los materiales, particularmente en aplicaciones biomédicas, por sus excepcionales propiedades fisicoquímicas y mecánicas. Además la CB constituye uno de los biopolímeros más estudiados en los últimos tiempos[4]. La CB se produce mediante procesos biotecnológicos (fermentaciones aerobias) a partir de microorganismos (bacterias) que utilizan azúcares simples y alcoholes como fuentes de carbono.

### 1.2.1 Proceso de producción de CB por *Gluconacetobacter xylinus*.

La ruta metabólica para la biosíntesis se puede resumir de la siguiente manera: La fuente de carbono se transporta a través de la película citoplasmática de la bacteria por la enzima glucosapermeasa y es fosforilada por la glucosacinasas para formar la glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es isomerizada por la fosfoglucomutasa a

glucosa-1-fosfato que se transforma en glucosa- uridina-5'-difosfato “UDP-Glucosa” por la UDPG pirofosforilasa. Este proceso metabólico finaliza cuando celulosasintasa polimeriza a la glucosa-6-fosfato “UDP-Glucosa” formándose así celulosa o comúnmente llamada CB ó celulosa bacteriana[2].

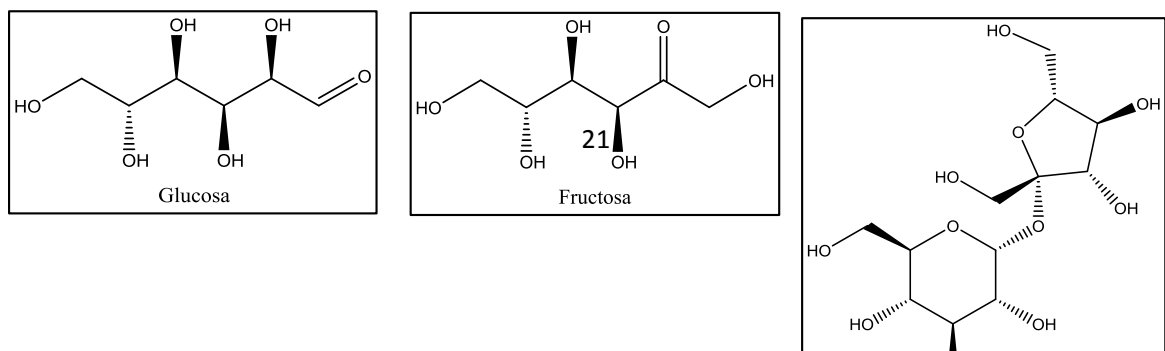


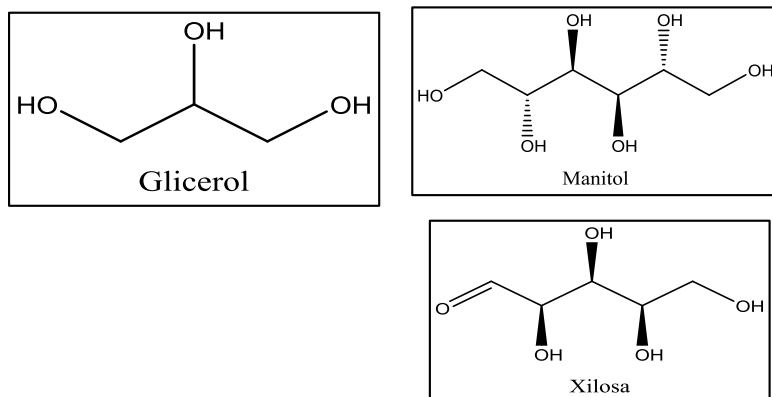
**Figura 3.** Esquema general del metabolismo de *G. xylinus*

Fuente: autor

### 1.3 MEDIO DE CULTIVO – RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

El medio más tradicional, y utilizado como referencia en fermentaciones, para la producción de CB es conocido como Hestrin and Schramm (HS) [11] donde se usan azúcares convencionales como fuentes de carbono (**figura 4**). Sin embargo, este medio solo se ha utilizado a escala laboratorio debido a su alto costo y bajo rendimiento de CB que se obtiene [12]. Es por esta razón, en los últimos años se han utilizado medios de cultivos para la producción de CB donde algunos productos y subproductos de la agroindustria se emplean como fuentes de carbono alternativas. Adicionalmente el uso de estas fuentes de carbono impacta favorablemente el medio ambiente ya que en otras circunstancias podrían convertirse en residuos contaminantes para las fuentes de agua natural [8].





**Figura 4.** Fuentes de carbono utilizadas en procesos fermentativos con *G. xylinus*.

Entre los subproductos y productos de la agroindustria, que se están utilizando como fuente de carbono se destacan: Pulpa de arándano[13]; licor de maíz[14], [15]; zumos de naranja, piña, manzana, pera y uva[12]; cascara de piña[16]–[18]; caña de azúcar[16], [17], [19]; cáscara de uva[20]; jarabe de arce[21]; tomate[22]; glicerol[23], [24]; vinaza de arroz[25], [26]; residuos de aceite de oliva[27]; agua de coco[18], [28] y residuos de levadura cerveza[29]. La búsqueda bibliográfica no arrojó ninguna información sobre el uso de mucílago de café para la producción de CB. Consecuentemente, hasta donde llega nuestro conocimiento, esta es la primera investigación que se realiza sobre el tema.

#### 1.4 MUCÍLAGO DE CAFÉ (MC)

La producción de café es fundamental en la economía de nuestro país. Se caracteriza en la transformación del fruto maduro (cereza) en semilla seca (pergamino), proceso que va acompañado de lavados continuos con agua. En la industria cafetera es conocido como beneficio húmedo del café (figura 5) [30]. Como en todo proceso agroindustrial en esa actividad se producen algunos residuos que generan graves problemas de contaminación ambiental, especialmente en los cuerpos de agua superficial.



**Figura 5.** Beneficio húmedo del café a) Recolección, b) Despulpado, c) Remoción del MC, d) Lavado y e) Secado.

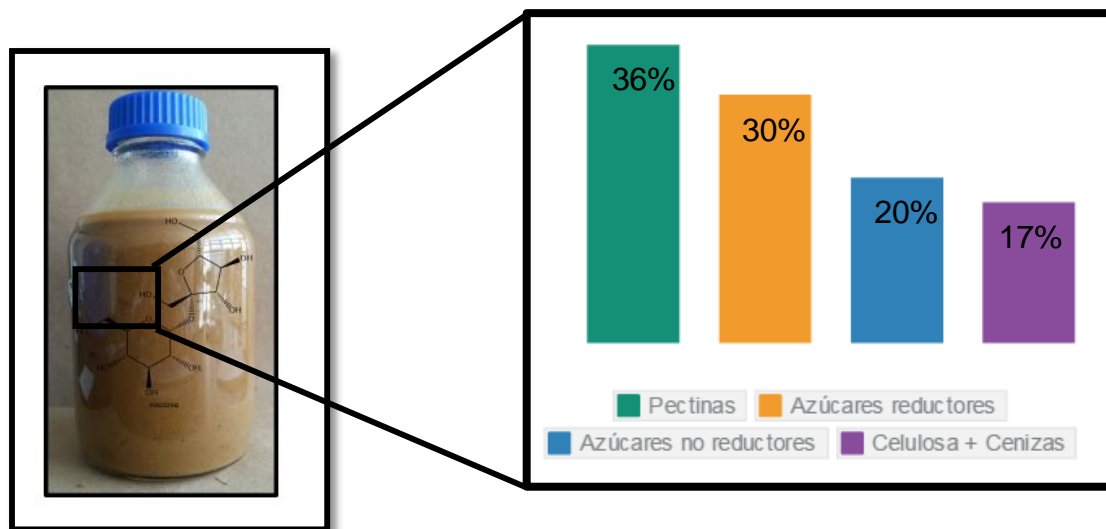
Fuente: autor.

El MC contiene gran cantidad de azúcares, que lo hacen un excelente sustrato para el crecimiento de microorganismos en procesos biotecnológicos de interés económico. En los últimos años, se utilizó el MC para la obtención de pectinas, miel, obtención de alcohol etílico y gas metano; también se usa como sustrato para lombricompost e inclusive como suplemento en alimentación porcina[31].

El fruto del café, en porcentaje en peso húmedo, se distribuye de la siguiente manera: Pulpa (residuos) 42%, mucílago y azúcares solubles 16%, cascarilla (residuos) 4%, semilla 18% y agua 20%. Adicionalmente, considerando que por cada kilogramo de cereza se obtienen 91 mL de MC, se estima que por cada millón de sacos de 60 kg en Colombia se producen 53.000 Toneladas de MC[32]. Si la producción de café en Colombia, según datos de noviembre de 2014, fue de 12 millones de sacos de café de 60 Kg, significa entonces que se produjeron

aproximadamente 640.000 toneladas de MC que en realidad no se aprovecha a gran escala.

La composición química del MC puede variar entre especies; de forma aproximada se compone de 35% de pectinas, 17% de celulosa y cenizas, y 45,8% de azúcares totales [2].



**Figura 6.** Composición química del mucílago de café- MC [100]

### 1.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULOSA BACTERIANA

Las especies de microorganismos más utilizadas para la producción de CB son el *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea* (tabla 1) [33]. Entre estas especies se destaca el *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente conocido como *Acetobacter xylinum*), reportado por Brown en el año 1886 por primera vez.

**Tabla 1.** Clasificación según (Deinema, 1971) de las bacterias productoras de CB.

Genero	Estructura de celulosa
<i>Acetobacter</i>	Películas formada por cintas
<i>Achromobacter</i>	Fibras
<i>Aerobacter</i>	Fibras
<i>Agrobacterium</i>	Fibras cortas
<i>Alcaligenes</i>	Fibras
<i>Pseudomonas</i>	No se distingues fibras
<i>Rhizobium</i>	Fibras cortas.
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No está bien definido

Fuente: [33].

### 1.5.1 *Gluconacetobacter xylinus*

Esta bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Acetobacteraceae*, es un aerobio estricto que realiza la oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes en un proceso conocido como fermentación oxidativa. El *G. xylinus* tiene forma elipsoidal recta (0,6 a 0,8 por 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$ ) y se encuentran de forma aislada, en parejas o en grupo de cadenas. Las colonias de *G. xylinus* dan reacción positiva a la catalasa y negativa a la oxidasa[13].

Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición; el microorganismo se caracteriza por su capacidad de producir CB sobre medios líquidos y sólidos formando una “película” o “nata” sobre la superficie[3], existe una gran variedad de cepas de este género (**tabla 2**) que se están utilizando en procesos de producción de celulosa. Este microorganismo tiene la capacidad de polimerizar hasta 200.000 moléculas de glucosa por segundo en las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano, para luego ser excretadas en el medio de cultivo formando haces de forma de cinta de microfibrillas [7], [11].

**Tabla 2.** Cepas de *G. xylinus* usadas para la producción de Celulosa.

MICROORGANISMO	REFERENCIAS
----------------	-------------

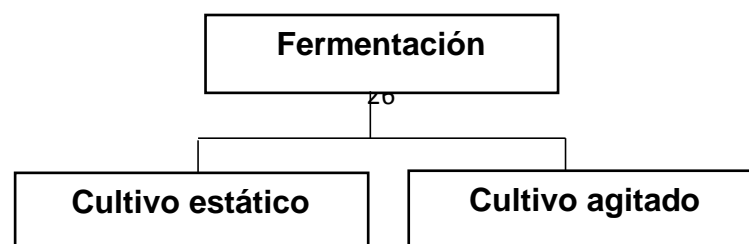
<i>Gluconacetobacter xylinum</i>	[6], [11], [23], [34], [35]
<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 700178	[15]
<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23768	[36]
<i>Gluconacetobacter hanseii</i> UAC09	[37]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> BCRC 12334	[26]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> CGMCC n°2955	[38]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> ATCC 700178	[9]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> I-2281	[39]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> PTCC 1734	[40]
<i>Gluconoacetobacter xylinum</i> ATCC 53524	[41]
<i>Gluconacetobacter sucrofermentans</i> CECT7291	[42]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> BPR 2004	[43]
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	[14]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> BCRC 12335	[44]
<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 700178	[45]
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> NCIM 2529	[46]
<i>Acetobacter xylinum</i> BCRC 17742	[47]
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> UAC09	[37]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> ATCC 23769	[48]
<i>Gluconacetobacter xylinum</i> IFO 13693	[27]

Fuente: [Autor]

## 1.6 FERMENTACIÓN

Existen dos tipos de fermentaciones oxidativas (figura 7) para la obtención de CB, la estática y la dinámica. La fermentación en cultivo estático es el método más tradicional para la producción de CB utilizando *G. xylinus*. En la producción estática el medio se inocula con el microorganismo en recipientes de poca profundidad que se cubren y se dejan reposar de 5 a 20 días, hasta que la película se forma y flota en la superficie del medio de cultivo.

Una vez formada la película se retira y se realiza un tratamiento de purificación para eliminar las células adheridas a la superficie. [49], [50]. Los tiempos de fermentación para la producción de CB pueden ser variables, se han reportado fermentaciones de 5 [14], 6 [11], 7 [9] [40] [26] [43] [51] [38], 8 [17], 9 [6], 13 [42], 14 [43], 16 [37], 21 [43], 28 [23] [37] y hasta 30 días[23].



**Figura 7.** Tipos de cultivos para realizar fermentaciones oxidativas.

### 1.7 APLICACIONES DE LA CELULOSA BACTERIANA.

Debido a su hidrofiliidad, potencial de moldeo, formación de estructuras, quiralidad, resistencia y biocompatibilidad la CB tiene múltiples usos en la actualidad (figura 8). Entre estos se destaca su utilización como fuente de fibra dietaría, material para fabricación película s y papel ultra resistente, en terapia de recuperación de piel e ingeniería de tejidos, en la fabricación de vasos sanguíneos sintéticos y en el recubrimiento de heridas, entre otras. En la siguiente sección se describen algunas de las aplicaciones más relevantes de la CB[49].

Indust.	Aplicaciones	Referencias
Alimentos	Postre, “Nata de coco”, “Nata de piña”.	[49]
	Agente de suspensión.	
Medicina	Vendajes de heridas.	[52]–[55]
	Andamios “ <i>scaffolds</i> ” para dirigir el crecimiento de nuevo tejido o hueso o incluso discos de las vértebras.	[52]
	Sustitución de tejidos blandos.	
	Piel artificial temporal y úlceras.	
	Tratamiento de las enfermedades periodontales.	
	Vasos sanguíneos artificiales.	[56]
	Filtración molecular, ultrafiltración, diálisis, permeación con vapor y pervaporación.	
	Inmovilización de enzimas y otras biomoléculas.	
Sustrato para cultivo de tejidos.	[25]	
Técnica	Diafragmas de los altavoces de audio.	[57]
	Diodo orgánico de emisión de luz- DOEL.	[58]
	Producción de papel de calidad.	[59]
	Aditivos para pinturas.	
	Aerogeles.	

	Transductores acústicos, dada la gran resistencia mecánica que adquiere la celulosa después de ser sometida a un tratamiento químico	[57]
--	--	------

**Figura 8.** Aplicación de la celulosa bacteriana- CB.

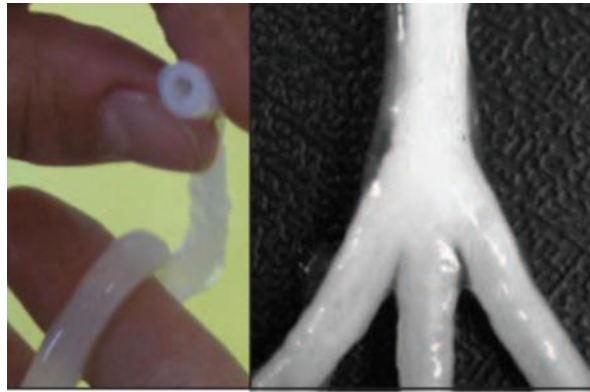
### 1.7.1 La CB en el campo de medicina.

En el área de la medicina se han evaluado las potenciales aplicaciones de la CB pura como sustituto temporal de piel para el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones [47],[48]. Adicionalmente, la CB modificada con nanopartículas de plata ha demostrado efectividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [62]. Sin embargo los productos de CB disponibles a nivel comercial son escasos. Por ejemplo, en Latinoamérica, la compañía brasilera de productos biotecnológicos (Biofill), ha creado nuevos sistemas de curación de heridas basados en la CB que se comercializan con los nombres: Bioprocess®, Biofill® y Gengiflex®, XCell®, Bionext® y Suprasorb® (figura 9) [63].



**Figura 9.** Algunos productos comerciales de CB.

Por otra parte, también se han desarrollado implantes vasculares para microcirugía a base de CB utilizando reactores que permiten obtenerla en forma tubular[64]. Estos materiales presentan propiedades mecánicas similares a las de los tejidos vasculares (figura 10).



**Figura 10.** Implantes microvasculares [52].

En el área de la ingeniería de tejidos, se ha utilizado la CB como soporte para reparar tejido cartilaginoso[52],[53]. Como soporte la CB presenta buena resistencia mecánica, además de permitir la proliferación de keratocitos humanos. . También se han planteado otras aplicaciones potenciales en el área de la medicina: como soporte para cultivo de células de mamíferos, inmovilización de enzimas y otras biomoléculas[67], sustrato para cultivo de tejidos[68] y en sistemas de liberación controlada de medicamentos[55], [69].

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para la realización de los objetivos de esta investigación se planteó la siguiente metodología (figura 11):

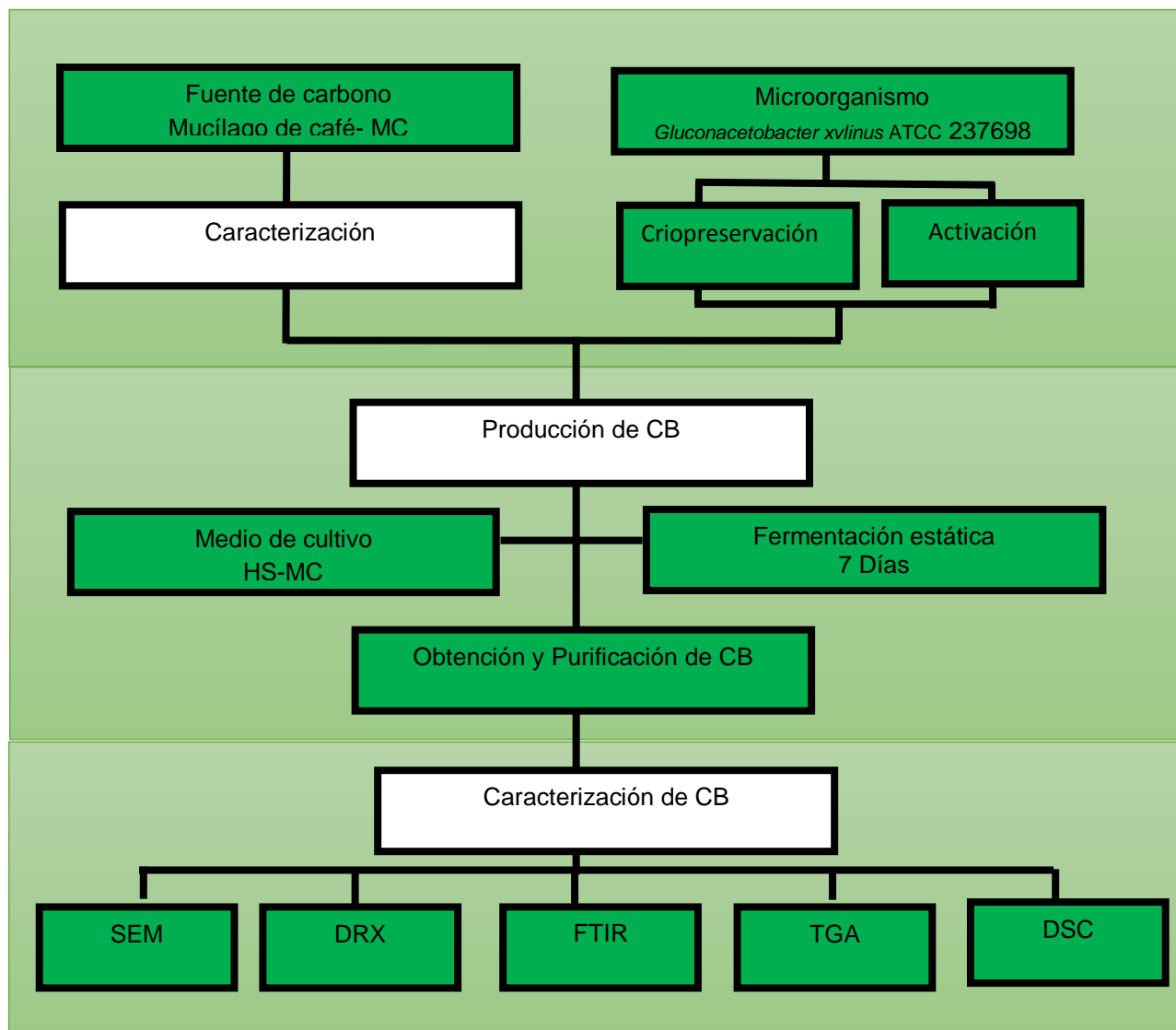


Figura 11. Diseño metodológico desarrollado en la investigación.

### 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

El MC utilizado como fuente de carbono alternativo, fue proporcionado por la finca “Villa Carolina” productora de café arábico, variedad Colombia, ubicada en la vereda

Calderas, municipio Confines, Departamento de Santander. Los reactivos y equipos utilizados en el desarrollo del proyecto están listados en el (Anexo A).

## 2.2 FUENTE DE CARBONO

Muestras de mucílago de café se colectaron en recipientes de vidrio, se filtraron, luego se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a 4 °C para su uso posterior. Antes de la caracterización, muestras de MC se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 121 °C y 103 kPa.

### 2.2.1 Caracterización del mucilago de café

El muestreo del MC se realizó teniendo en cuenta el protocolo de muestra de laboratorio y campo (Anexo B). La muestra se caracterizó en términos de contenido de sacarosa por HPLC, el contenido de humedad por Karl Fischer siguiendo el método de la norma ISO 662:1998, porcentaje de cenizas por análisis gravimétrico (tabla 3). Adicionalmente, se realizaron mediciones de pH. Las mediciones se realizaron por triplicado.

**Tabla 3.** Métodos de caracterización del mucílago de café.

Parámetros	Método/ equipo
pH.	pH-metro
Densidad.	Picnómetro
Sacarosa.	HPLC-RI
Nitrógeno total.	Standard Methods 4500 B
Fenoles totales.	Standard Methods 5530 B,D/ Destilación – Fotométrico Directo
Acidez total.	Standards methods 2310 B/ Volumétrico
Ceniza.	AOAC 972.15/ Gravimétrico
Grasa.	AOAC 963.15/ Soxhlet
Proteína.	AOCA 970.22 Kjendahl
Fibras.	AOCA 962.09 18th edition Hidrolisis ácida y básica
Carbohidratos Totales.	Resolución 333 del ministerio Protección social- Cálculo

Valor calórico.	Resolución 333 del ministerio Protección social- Cálculo
° Brix.	AOCA 962.09 18th edition/ Refractómetro

**2.2.1.1 Cuantificación de sacarosa en el mucílago de café.** La cuantificación de sacarosa se llevó a cabo empleando un cromatógrafo líquido Agilent Technologies serie 1100 CON inyector automático y detector de índice de refracción - RID Agilent Technologies 1200. Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna Supelcogel C610H (30 cm × 7.8 mm x 9 µm), (polystyrene divinylbenzene- PS/DVB). Las condiciones del análisis fueron: como fase móvil una solución de agua-ácido sulfúrico (0.005 M), a un flujo de 0.6 mL / min. El volumen de muestra fue 20 µL con un tiempo de corrida por muestra de 30 minutos. LA temperatura del detector Y la columna FUE 50 y 65 °C, respectivamente. Las muestras de MC se pasaron por filtros FilterBIO de polifloruro de vinilideno- PDVF, de un poro de 45 µm grado analítico para asegurar la eliminación de sólidos en suspensión y finalmente se almacenaron en viales de vidrio ámbar. Se elaboraron curvas de calibración de sacarosa (Sigma) para la cuantificación del analito de interés.



**Figura 12.** Cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series- LC Systems and Modules - detector de índice de refracción -RID (California,USA)

## 2.3 MICROORGANISMO

Para el presente trabajo de investigación se utilizó la cepa *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23768, del American Type Culture Collection- ATCC (Manassas, USA). La reactivación de la cepa se realizó añadiendo, de manera aséptica, el total del liofilizado a un tubo de ensayo que contenía 6 ml del medio de caldo nutritivo y manitol. La solución se incubó a 26 °C por 24 horas.

### 2.3.1 Criopreservación

Los aislamientos del cultivo se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante. El precipitado se adicionó en 100 mL de caldo Manitol y se homogenizó. Se marcaron unos 100 tubos eppendorf con el nombre de la cepa (*G. xylinus* ATCC 23678), a cada uno se agregó 900  $\mu$ L del cultivo y 100  $\mu$ L DMSO, se mezcló con vórtex y se almacenó en una caja plástica durante 15 minutos a 4 °C, transcurrido este tiempo se guardó de inmediato a -70 °C. Luego de 8 días,

se miró viabilidad y pureza de las cepas. Este proceso de criopreservación garantiza la viabilidad de la cepa bacteriana por un periodo de 5-10 años.

## **2.4 PRODUCCIÓN DE CB**

Para determinar el peso de cada película de CB, fue retirada de los vasos de fermentación a diferentes tiempos (días) de cultivos.

### **2.4.1 Medio de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados para inocular *G. xylinus* ATCC 23768, fueron Hestrim and Schramm (HS) / Mucílago de café (MC)- (HS-MC) y Hestrim and Schramm (HS). El primer medio constituido por 2 L de mucílago de café, 5 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 2.7 g/L Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.15 g/L de ácido cítrico.

### **2.4.2 Fermentación**

Los medios de (HS-MC) y (HS) fueron inoculados con 1% (v/v), en 50 mL de medio (HS-MC y HS) llevados a incubar a 30 °C por 7 días, cada día (24 horas) se tomaron muestras para sus respectivos análisis.

## **2.5 PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE CB**

La película de CB se trató con una solución de NaClO al 0,5 % por 30 min. Después de varios lavados con agua desionizada, hasta conseguir pH 7, se liofilizó el material por 24 horas. De esta forma se eliminaron residuos del medio de cultivo Y células que aún se encontraban sobre las películas de CB.

## **2.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE CB.**

**2.6.1 Microscopio electrónico de barrido (SEM-EDS).** La determinación de la morfología de la estructura cristalina de la celulosa bacteriana obtenida, se realizó por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy). Para los análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 650, marca FEI, las

micrografías se tomaron usando un detector LFD (Large Field Detector), a 10 kV en modo vacío. La superficie de las películas de CB se recubrió con una capa delgada de oro. El análisis elemental se realizó mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersa (EDS) a 20 kV, herramienta acoplada al microscopio.

**2.6.2 Difracción de Rayos X (DRX).** La toma de datos del patrón de difracción de rayos X de la celulosa bacteriana se realizó en un difractómetro de polvo marca *Bruker* modelo *D8 ADVANCE* con geometría DaVinci y radiación  $\text{CuK } \alpha_1$ .

Para calcular el % de Cristalinidad- Cr de celulosa a partir de los espectros de difracción de rayos X, se aplica la **Ecuación 1**.

$$\%Cr = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

En donde (I002) es la intensidad del pico cristalino en el máximo de  $2\theta$  entre ( $22^\circ$ - $23^\circ$ ) y (I<sub>am</sub>) es la intensidad en el mínimo de  $2\theta$  entre ( $18^\circ$ - $19^\circ$ ). El tamaño del cristal aparente (ACS) se puede determinar utilizando la fórmula de Scherrer, descrita en la **Ecuación 2**.

$$ACS = \frac{0,9 \lambda}{FWHM \cos \theta} \quad \text{Ecuación 2.}$$

En donde FWHM es la anchura del pico a la mitad de la anchura máxima,  $\theta$  es el ángulo de Bragg y  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X.

**2.6.3 Espectroscopia Infrarrojo (FT IR).** Antes de realizar la toma del espectro infrarrojo de la celulosa bacteriana, la muestra se sometió a un tratamiento de purificación. Posteriormente, la toma del espectro se realizó con un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier marca *Bruker*, modelo

Tensor 27 en modo de reflectancia total atenuada ATR (*Attenuated Total Reflectance*), usando una celda de diamante.

**2.6.4 Termogravimetría (TGA).** Las propiedades térmicas de la celulosa bacteriana fueron evaluadas por medio del análisis termogravimétrico (TGA) de la celulosa bacteriana. En una balanza termogravimétrica, marca TA INSTRUMENT, modelo Discovery. Rampa de temperatura de 10,00 °C/min a 600,00 °C, en atmosfera de nitrógeno con un flujo de 20 mL/min.

**2.6.5 Calorimetría Calorimétrico Diferencial (DSC).**

Esta prueba se realizó con el fin de evaluar la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) y la Temperatura de fusión u ordenamiento de la fase cristalina (T<sub>m</sub>). Se empleó el método reportado por George y colaboradores (2005b). Se utilizó un equipo Discovery DSC. La muestra fue pesada y colocada en una cápsula de aluminio que fue sellada. Posteriormente se calentó bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de 100 ml/min. El calentamiento se efectuó de -50 °C a 270 °C con una velocidad de calentamiento de 10.00 °C/min.

**2.6.5 Grosor de las películas.** El grosor de las películas de celulosa bacteriana se determinó con un calibrador de rosca (Omega, India), registrándose un valor de las tres medidas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CARACTERIZACION DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ.

En la tabla 4 se observan los resultados de los análisis fisicoquímicos del mucílago de café fresco, obtenido mecánicamente por el desmucilagador (**anexo C**).

**Tabla 4.** Composición química del mucílago de café en base seca y húmeda.

Parámetros	Unidad	Resultados	
		Base húmeda	Base seca
Humedad	g/100 g muestra	88,99	----
Ceniza	g/100 g muestra	0,57	5,19
Grasa	g/100 g muestra	0,06	0,58
Proteína	g/100 g muestra	1,15	10,46
Fibra	g/100 g muestra	0,61	5,59

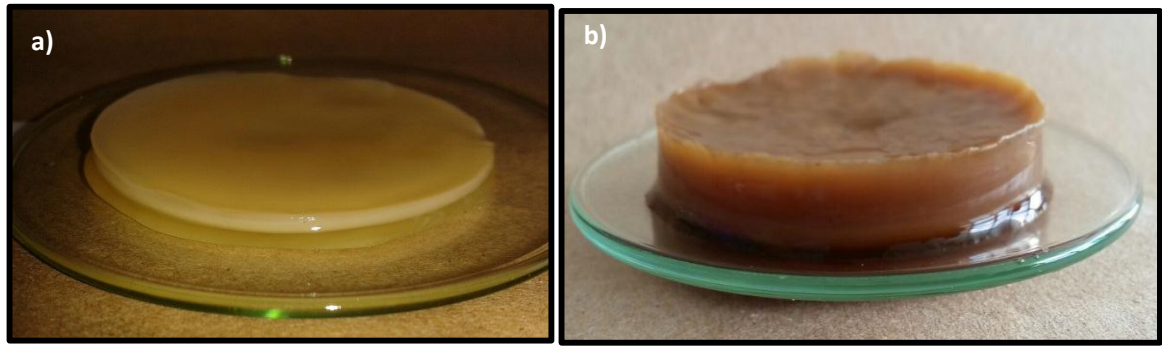
Carbohidratos Totales	g/100 g muestra	9,23	83,77
Valor calórico	Kcal/100 g muestra	42,06	382,14
° Brix	%	10,0	----
pH	-----	4,36	----
Sacarosa	g/L	27,7	----

Se puede observar que este residuo agroindustrial se caracteriza principalmente por la presencia de agua y carbohidratos. Valores altos de agua presente en la muestra se debe a que en el proceso tradicional de beneficio del café en Colombia se utiliza este recurso hídrico para el desmucilaginado de los granos de café. Adicionalmente, el alto contenido de carbohidratos demuestra que el MC contiene suficiente materia orgánica, en forma de azúcares simples, como para ser utilizado en el proceso de fermentación oxidativa.

Los bajos valores de cenizas muestran la presencia de sales, fundamentales en el metabolismo de los microorganismos. Así mismo, valores significativos de proteínas favorecen el crecimiento celular. Por tanto, el MC no se sometió a ningún pretratamiento químico, solamente se centrifugó para sedimentar los sólidos suspendidos.

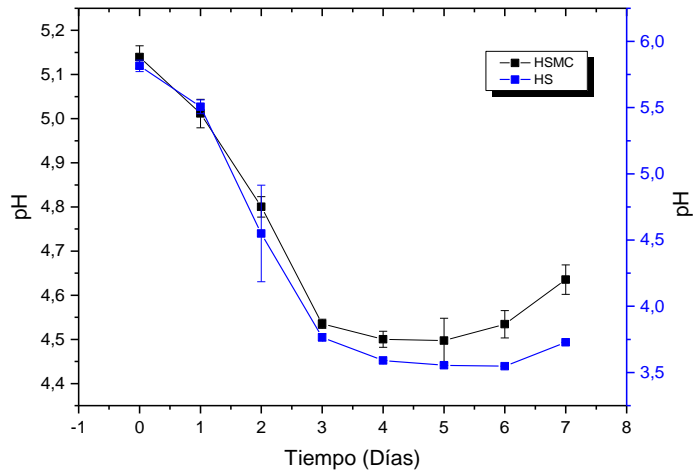
### **3.2 PRODUCCIÓN DE CB**

A continuación discuten los resultados relacionados con producción de celulosa utilizando dos medios HS (Glucosa) y Sacarosa del MC (HS-MC) como fuentes de carbono (figura 13). El análisis del proceso de fermentación se hace en términos de influencia del pH, concentración de glucosa y sacarosa y grosor de las películas obtenidas durante el proceso. Adicionalmente la CB obtenida se caracterizó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA) y análisis calorimétrico diferencial- DSC.



**Figura 13.** Celulosa producida por fermentación estática por *G. xylinus* ATCC 23768 a) película de celulosa húmeda extraída del medio HS y b) película de celulosa húmeda extraída del medio de cultivo HS-MC del día 7 de fermentación.

La **figura 14** muestra el gráfico de comportamiento del pH en la producción de CB a través del tiempo, se observa en el eje y, valores de pH y en el eje x, los días de fermentación.



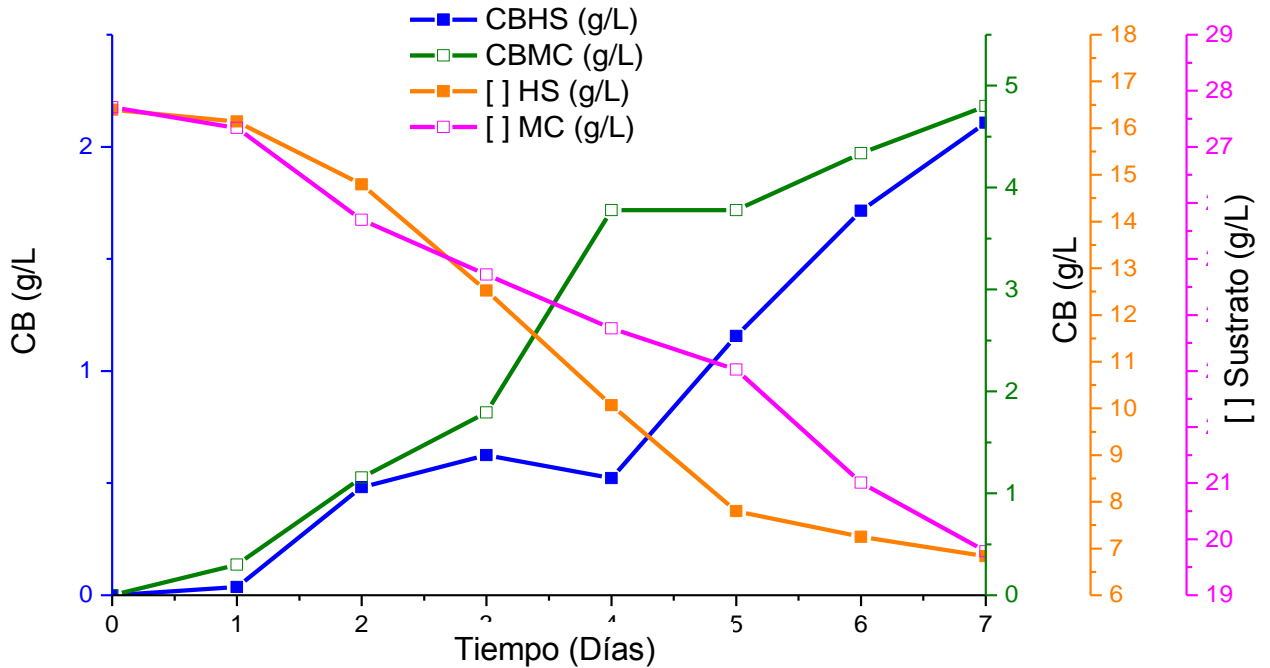
**Figura 14.** pH durante el proceso fermentativo en medios HS y HSMC en los diferentes tiempos de incubación (7 días).

Se observa que para el medio HS-MC el pH oscila entre 5,1 y 4,6 unidades, mientras para el medio HS está entre 5,8 y 3,7. Estos valores son muy similares a los reportados por otros autores para la producción de celulosa usando *G. xylinus*

donde en producción en condición estática y a 30°C por 7 días de fermentación observaron rangos de pH de (5,6 y 4,6) [70], (5,7 y 3,7) para medio HS y rangos de pH de (5,7 – 3,7) para el medio suplementado con residuos de licor de maíz[71]. Adicionalmente, se conoce que la síntesis de celulosa y el crecimiento de la bacteria se inhiben en medios con pH por encima de 6,0 y por debajo de 4,0 [3].

Se puede observar que durante los dos primeros días de fermentación ocurre un descenso significativo de pH, el cual se le atribuye a la producción de ácido glucónico y ácido acético, como subproducto formado en la etapa inicial del catabolismo de glucosa [72]. Este ácido hace disminuir el pH del cultivo y afecta regularmente la cantidad de biomasa en producción. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de compuestos polifenólicos inhibe la formación del ácido glucónico[19], [70], [72].

La **figura 15** muestra la curva de producción de Celulosa bacteriana (CB) por *G. xylinus* ATCC 23768 y la concentración del sustrato en función de los días de fermentación. En el eje X se señala los días de fermentación y en los ejes Y se representan la Celulosa obtenida y la concentración del sustrato en los medios HS-MC y de referencia HS.



**Figura 15.** Producción de celulosa en los medios HS y HS-MC

Se observa una disminución de la concentración del sustrato (glucosa) del medio HS de referencia y (sacarosa) del medio HSMC, durante los 7 días de fermentación; esta disminución está acompañada de un aumento significativo de la biomasa durante el mismo periodo de tiempo. Durante los 7 días de fermentación el consumo de sustrato para cada medio fue de 9 g/L de (glucosa) (medio HS y 8 g/l de (sacarosa) (medio HSMC). Lo anterior afirma que el consumo del sustrato está relacionado con el aprovechamiento de los azúcares como fuente de carbono y energía y la biosíntesis celulosa microbiana.

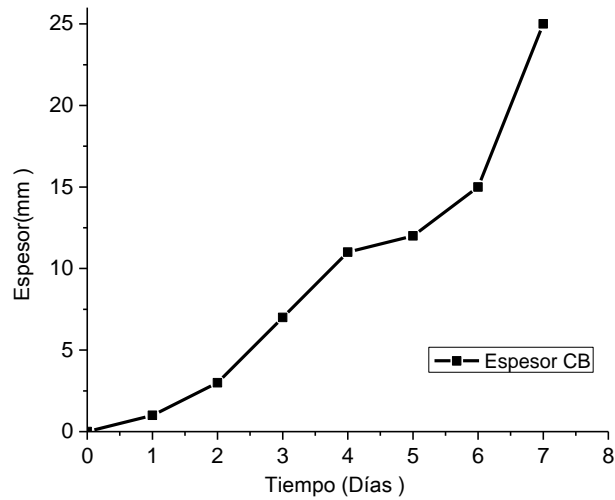
Adicionalmente, se observa que la producción de CB, después de siete días de fermentación, corresponde a 4,8 g/L; este valor supera en 2.28 veces a la cantidad de CB obtenida con el medio de referencia (2,1 g/L). La productividad del proceso fermentativo fue calculada a los 7 días. Para el medio HS la productividad es 0,3 g/L\*día y 0,6 g/L\*día para el medio donde se utiliza MC como única fuente de

carbono. Los valores de productividad son superiores a los reportados en la literatura donde utilizan fuentes de carbono analítico de glucosa (0,071 g/L\*día), Glicerol (0,057 g/L\*día) y Sacarosa (0,085 g/l\*día). Por tanto, valores superiores de productividad del medio HSMC resulta un sustrato apropiado para la producción de Celulosa por *G. xylinus* ATCC 23768.

Esta observación permite afirmar que el MC es un sustrato ideal para la producción de celulosa, por tanto una buena fuente de carbono para *G. xylinus* ATCC 23768. La diferencia de producción de CB puede ser atribuida a la presencia de micronutrientes adicionales presentes en MC, especialmente nitrógeno orgánico que favorece el crecimiento del microorganismo [73] y compuestos fenólicos. Varios reportes en la literatura mencionan que la adición de compuestos polifenólicos a los medio de cultivos mejoran dramáticamente la productividad de CB [19], [70], [72].

Los valores de producción CB obtenidos a partir de MC como única fuente de carbono, resultan interesantes ya que son superiores a los reportados en la literatura, cuando se usan subproductos de la industria agrícola en condiciones de fermentación similares (7 días a 30°C en condición estática). Por ejemplo, en cáscara de piña se reporta una producción de 2,8 g/L[17], residuos de papaya 1,15 g/L [74]. Así mismo, se han reportado valores de producción muy similares con residuos de levadura de cerveza 4,7 g/L [75] y glicerol 4,59 g/L de CB[76].

La figura 16 muestra los resultados relacionados con el grosor de las películas liofilizadas de CB del medio HSMC en función del tiempo. El grosor de las películas de CB para los días 0 a 3 se encuentra por debajo de los 10 mm de grosor, mientras para los días 4 a 7 se incrementa de 11 a 25 mm de grosor. Es importante mencionar que las películas del medio HS, no presentaron una superficie uniforme razón por la cual no se realizó medida de grosor.

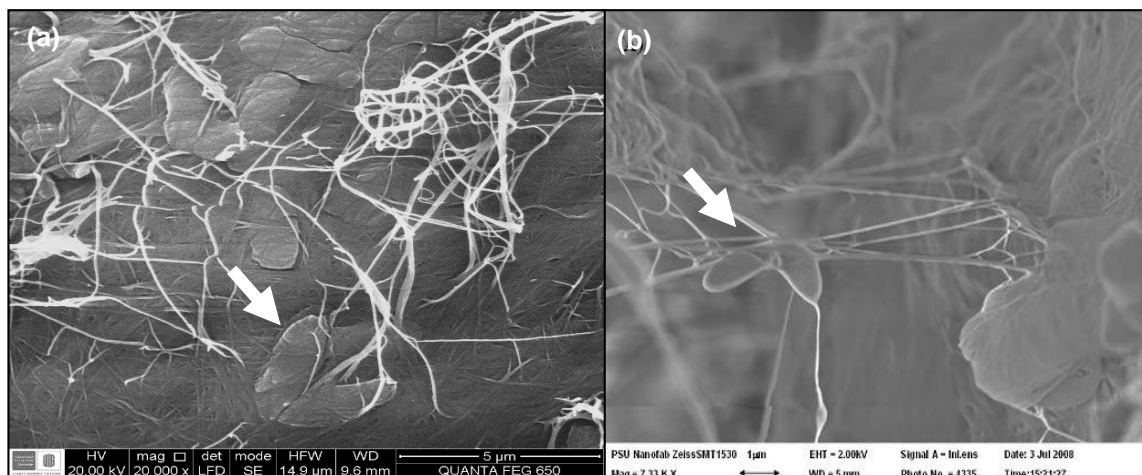


**Figura 16.** Espesor de las películas de CB del medio HSMC, durante los 7 días de fermentación.

### 3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE CB

#### 3.3.1 Caracterización mediante FESEM-EDS.

A continuación se presenta el análisis microscópico de las películas de CB liofilizadas sin tratamiento de purificación. La Figura 17 presenta dos imágenes del microorganismo gram negativo (*Gluconatebocater xylinus* ATCC 23768) durante el proceso de biosíntesis extracelular de nanofibras de celulosa bacteriana. En la figura 17a se observa la imagen del lado superficial luminal (interna al medio) de CB con células individuales de *G. xylinus*, exhibiendo nanofibrillas, adheridas a la membrana. En forma similar la figura 17b muestra una imagen reportada por Chen et al [45], [77], [78]. Desde el punto de vista morfológico las células de *G. xylinus* presentan forma elipsoidal y ligeramente curvada con tamaño aproximado de 1  $\mu\text{m}$  de ancho por 2.5  $\mu\text{m}$  de largo, tal y como se reporta por otros autores [17], [71], [79]–[81].

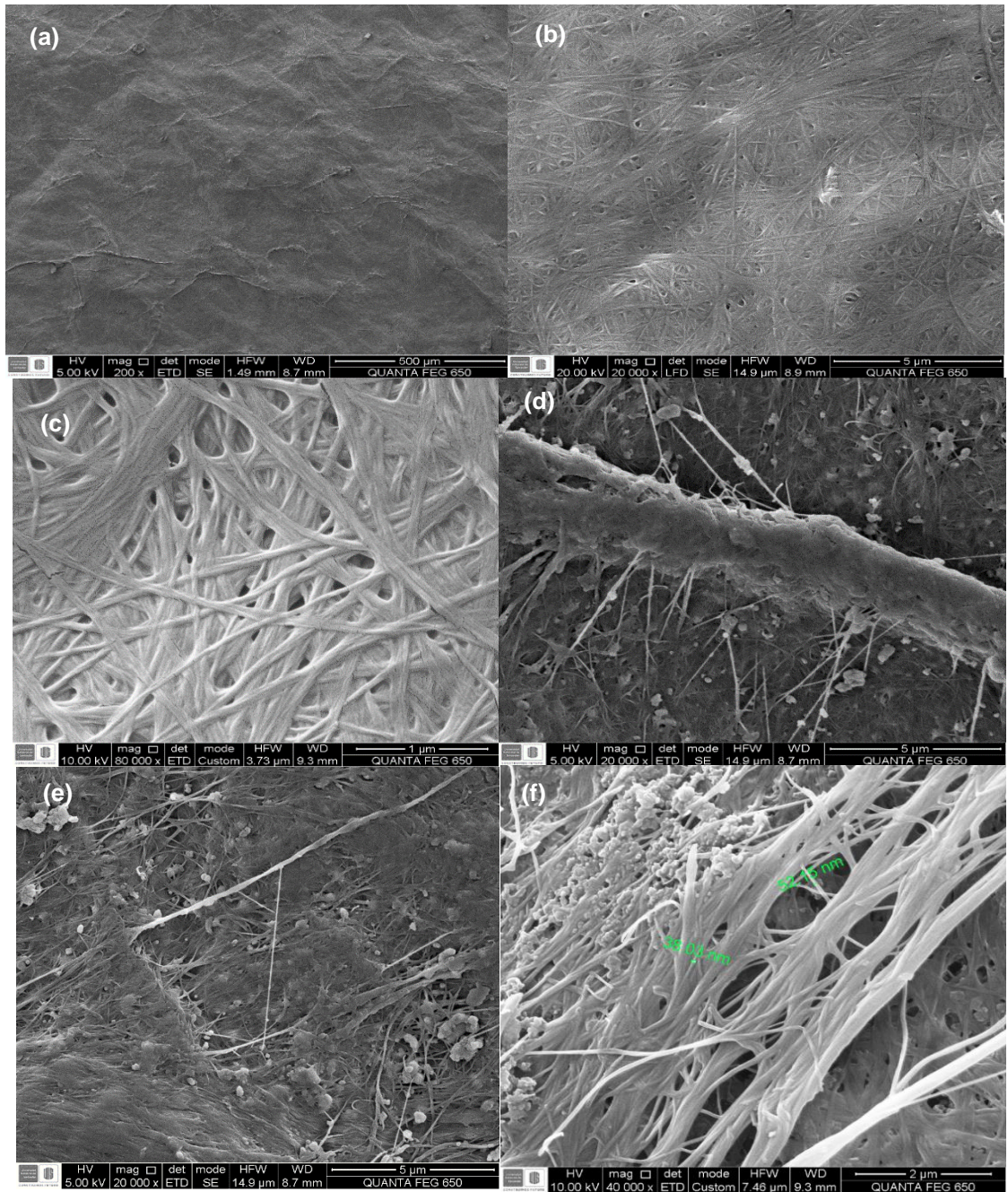


**Figura 17.** a) Imagen de *G. xylinus* junto a nanofibrillas de CB y b) *G. xylinus* en película de celulosa bacteriana con nanocompuestos de plásticos como soporte[45].

La figura 18 muestra la morfología superficial de las caras externa e interna de la película de CB obtenida a partir de MC como única fuente de carbono [82], [83]. Las micrografías permiten visualizar la típica red tridimensional, densa y homogénea de nano y microfibrillas de CB en forma de película; estas imágenes son similares a las reportadas en la literatura donde utilizan fuentes de carbonos convencionales y no convencionales[28], [51], [60], [61], [71], [81], [84]–[86]. En la superficie de la CB las nanofibrillas presentan una forma estructural en forma de cinta, con anchos que oscilan entre 23 y 63 nm de ancho; la literatura reporta grosores entre 8 y 100 nm [87], [17], [82], [45], [40]. Adicionalmente, se distinguen poros (espacios) de diversos tamaños, producto de la agregación al azar de las fibrillas de celulosa[28], [40], [88].

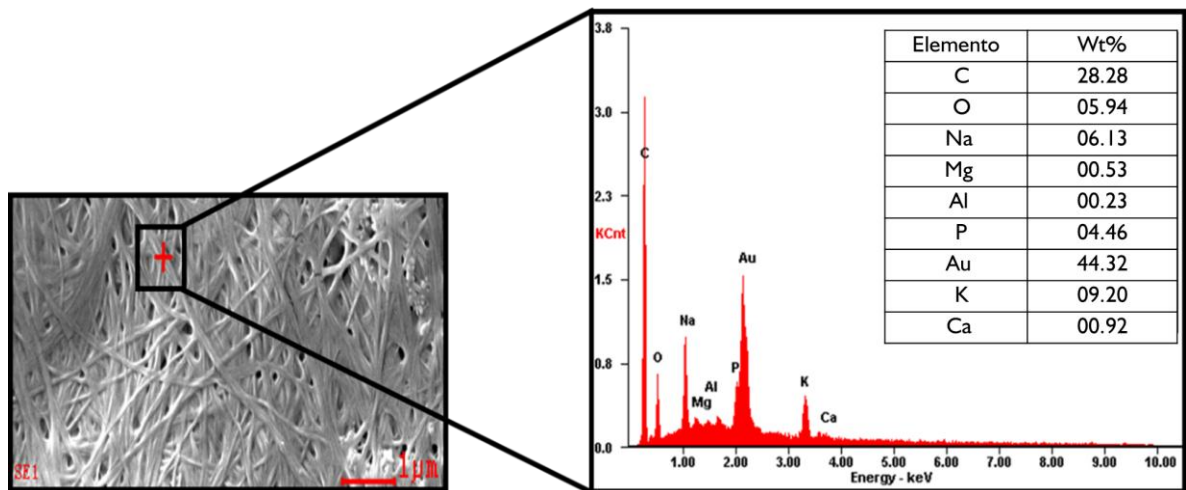
La naturaleza hidrofílica del polímero de celulosa hace que la película de CB tenga una alta capacidad de retención de agua, combinada con una estructura porosa y de gran área superficial, lo que la hace atractiva para aplicaciones médicas, particularmente en la fabricación de apósitos absorbentes y protectores [89]. Adicionalmente, el tamaño de los poros, la textura superficial y la biocompatibilidad de estas películas contribuyen a la proliferación celular, cuando el apósito se usa con el fin de regenerar tejidos, como en el caso de quemaduras y úlceras.

## Morfología de las películas de CB



**Figura 18.** Imágenes SEM de películas de CB producidas por *G. xylinus* ATCC 22768, día 4 de fermentación, (a)-(c) superficie externa de CB y (d)-(f) superficie laminal.

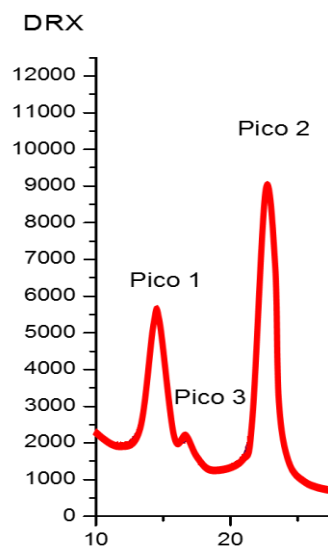
La figura 19 muestra el espectro EDS de la película de CB obtenida en el medio HS-MC. La distribución elemental de la película se caracteriza por la presencia de altas proporciones de carbono y de oxígeno, correspondientes a 28,28 y 44,32 wt% respectivamente, tal y como se esperaba considerando que son elementos constitutivos de la celulosa. Adicionalmente, se detectaron fósforo, potasio y sodio, este último se encuentra presente en el análisis ya que las películas de CB se sometieron a tratamiento de limpieza con NaClO al 0,5 %. El fósforo y el potasio pueden ser remanentes del medio de cultivo. Por otra parte, los niveles altos de oro son causados por el recubrimiento superficial que se realiza a las películas, con el objetivo de mejorar la conductividad de la superficie de la muestra y de mantener la integridad del polímero bajo las condiciones del análisis [17], [20], [25]–[27], [35], [37], [38], [40], [41], [46], [75], [90]–[92].



**Figura 19.** Análisis elemental EDS de las películas de CB.

### 3.3.3 Caracterización mediante DRX

La figura 20 muestra el difractograma de rayos X típico de Celulosa Bacteriana-CB reportado en la literatura [17], [25], [34], [41], [45], [46], [93].

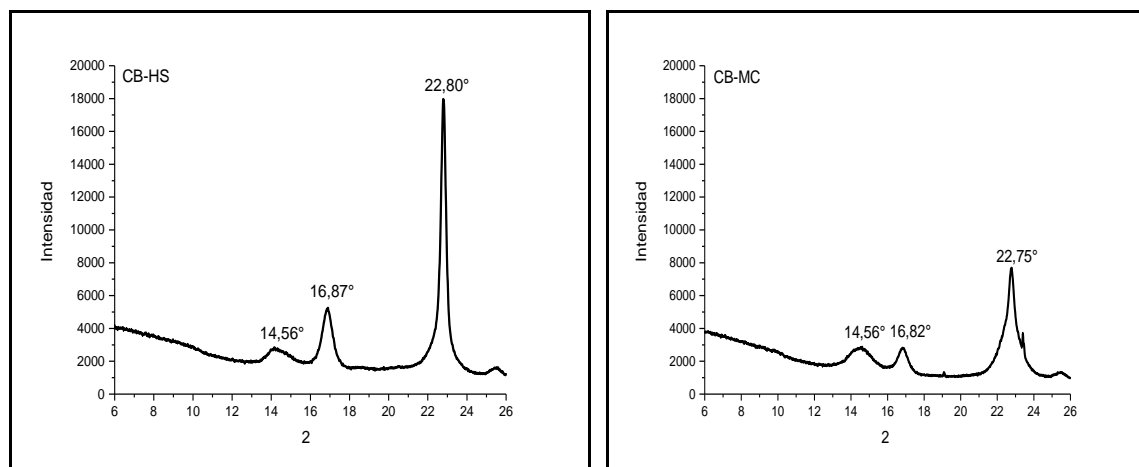


**Figura 20.** Planos difractogramas de rayos x, típicos de Celulosa nativa.

Se observa tres picos visibles asignados a planos cristalográficos de la siguiente manera: pico 1  $\langle 110 \rangle$ , pico 2  $\langle 010 \rangle$  y pico 3  $\langle 002 \rangle$ , correspondientes a ángulos de difracción de  $14,56^\circ$ ,  $16,87^\circ$  y  $22,74^\circ$  respectivamente [46]. Estos picos intensos aparecen en  $2\theta$  y son característicos de materiales microporosos, típicos de las fases cristalinas que están presentes en la estructura de la celulosa tipo I:  $I\alpha$  (sistema triclínico) y  $I\beta$  (sistema monoclínico).

Es importante mencionar, que este polímero está compuesta por dos alomorfos, una mezcla de la fase  $I\alpha$  y  $I\beta$ , cuya relación proporcional se le atribuye a dos factores, (especie y fuente) de origen. Adicionalmente, la estructura de celulosa  $I\alpha$  es dominante en la celulosa producida por algunas especies de algas y bacterias. Y la forma  $I\beta$  es predominante en celulosa de origen vegetal[46].

La figura 21 muestra los resultados de difracción de rayos X de las películas de CB obtenidas del medio de referencia a) HS y b) HSMC.



**Figura 21.** Difracción de rayos X de películas de celulosa obtenidas a) CB-HS y b) CB- MC , después de 7 días de fermentación, usando los respectivos medios de cultivo.

Se observa la presencia de los 3 picos reportados en la literatura. Adicionalmente, es de notar que persiste una mayor intensidad del pico 3 sobre los picos 1 y 2. Así mismo, se observa que la intensidad del pico 3 del medio HS, es ligeramente mayor. Razón por la cual autores sugieren que esa diferencia de intensidad está relacionada con los componentes de los residuos agroindustriales tales como, carbohidratos totales [23] presentes en el medio de cultivo.

La tabla 5 presenta los resultados de índice de cristalinidad y tamaño de cristalito en <002>. Se observa que el índice de cristalinidad es relativamente superior a lo reportado en la literatura y tamaño del cristalito es similares en las películas, tal y como se reporta por otros autores.

**Tabla 5.** Comparación de porcentaje de cristalinidad (Cr) y tamaño del cristalito (Crt) de CB obtenida de medio HSMC y medio de referencia HS.

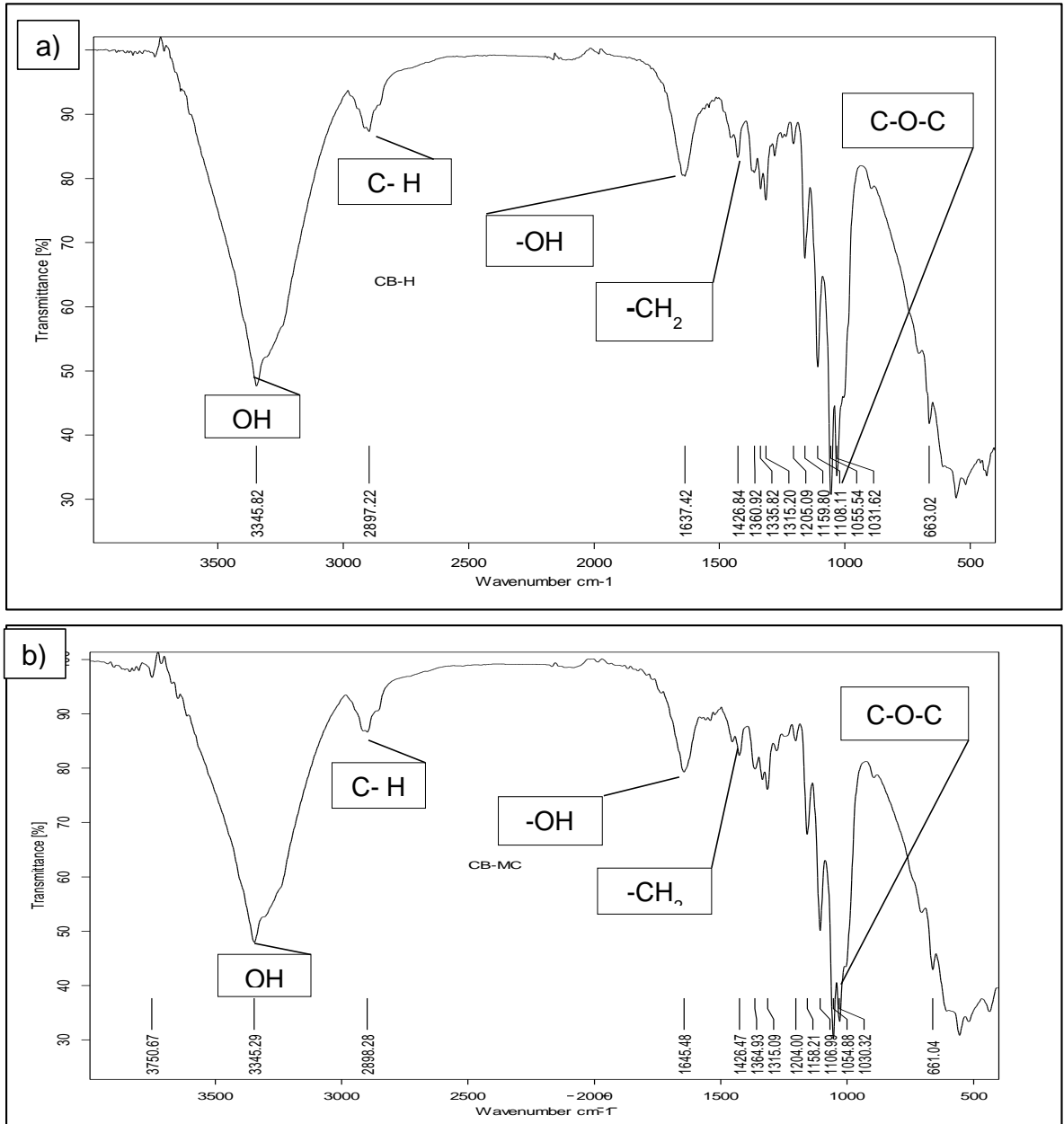
Muestra	Cr (%)	Crt <200> (nm)
CB-MC	85	4,6
CB-HS	91	5,8
HS <sub>a</sub>	79	7

a Análisis de DRX determinado por Ruka et al (2012) b Wu et al (2013)

### 3.3.4 Caracterización mediante IR

La figura 22 muestra los espectro IR de CB producida por *G. xylinus* ATCC 237698.

Las películas de CB fueron analizadas por la técnica de reflectancia difusa haciendo un barrido espectral desde 600 hasta 3600  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 22.** Espectros FT-IR (ATR) de Celulosa producida por *G. xylinus* ATCC 23768 a) medio HS y b) medio HSMC.

La tabla 6 presenta algunas bandas de absorción y modos vibracionales reportadas en la literatura para muestras de celulosa bacteriana-CB en procesos fermentativos de 7 días.

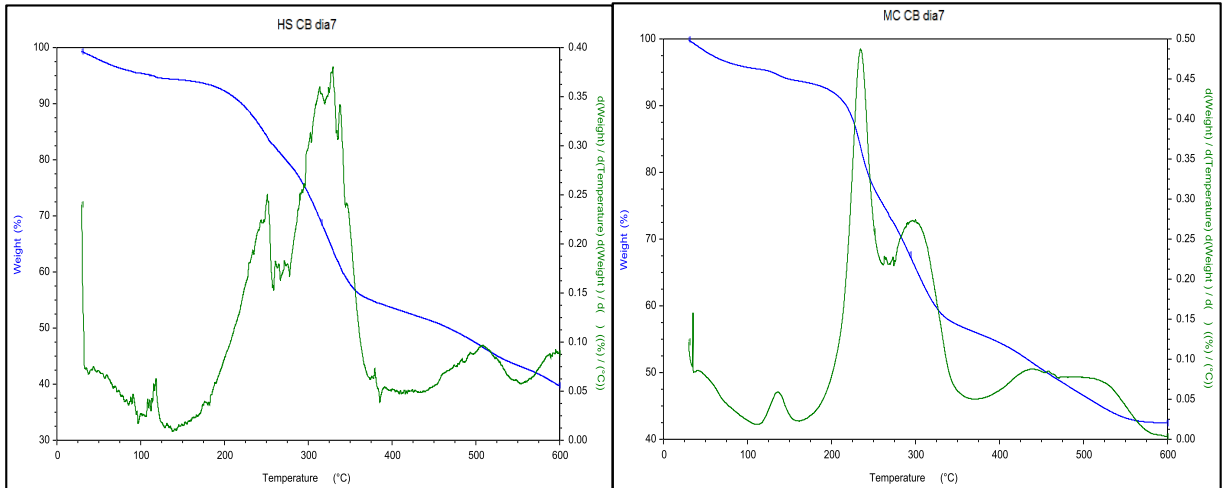
**Tabla 6.** Bandas de absorción y modos vibracionales de CB, reportadas en la literatura.

<b>Número de onda [cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Modo vibracional</b>	<b>Fuente</b>
<b>3350</b>	OH (Tensión). Celulosa Tipo I	[46], [93]–[95]
<b>1500-1235</b>	Alargamiento de los O-H de los grupos hidroxilos (Tensión)	[46]
<b>2960</b>	C- H de -CH <sub>2</sub> (Tensión)	
<b>1653.8</b>	OH (agua absorbida, Tensión)	
<b>1068</b>	C-O-C (Vibraciones esquelética)	
<b>1427</b>	-CH <sub>2</sub> (Flexión simétrica) “CB tipo I en condición estática y agitada”.	[96], [97]
<b>1650</b>	Alargamiento de los grupos C=O	[93]
<b>1372</b>	deformación angular del enlace C-H en el plano	[5]
<b>2900</b>	deformación de los enlaces C-H y CH <sub>2</sub>	
<b>1426</b>	-CH <sub>2</sub> (Flexión simétrica)	[98]
<b>1317</b>	CH <sub>2</sub> en el C <sub>1</sub> (Balanceo)	
<b>1115</b>	Estiramiento simétrico y balanceo CH <sub>2</sub> “orientación perpendicular”.	

Se puede observar que las bandas de absorción reportadas en la literatura están presentes en los espectros analizados de CB. La estructura química de las películas de CB obtenidas de las fuentes de carbono (HS y HSMC) no presenta diferencias apreciables. Adicionalmente, diversos autores afirman que la banda 1429 cm<sup>-1</sup> confirma la presencia de la estructura química de celulosa tipo I [5], las bandas 1372 cm<sup>-1</sup> y 2900 cm<sup>-1</sup> son usadas para determinar el grado de cristalinidad [5], siendo coherente con los análisis de DRX, donde los % Cr son muy similares. Por tanto, se puede afirmar que la celulosa obtenida en los medios, presentan el mismo comportamiento en los análisis de FT-IR, así mismo la presencia de bandas que permiten identificar los grupos funcionales característicos de la celulosa obtenida en los sustratos estudiados.

### 3.3.5 ANALISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

La figura 23 se muestran los análisis termogravimétricos, en términos de porcentaje de masa en función de la temperatura de películas secas de CB obtenidas utilizando medio de referencia (HS) y MC como fuentes de carbono. La rampa de temperatura utilizada en los análisis fue desde 10.00 °C/min hasta 600.00 °C.



**Figura 23.** Análisis Termogravimétrico para las películas obtenidas a partir de a) CB-HS y b) CB-MC.

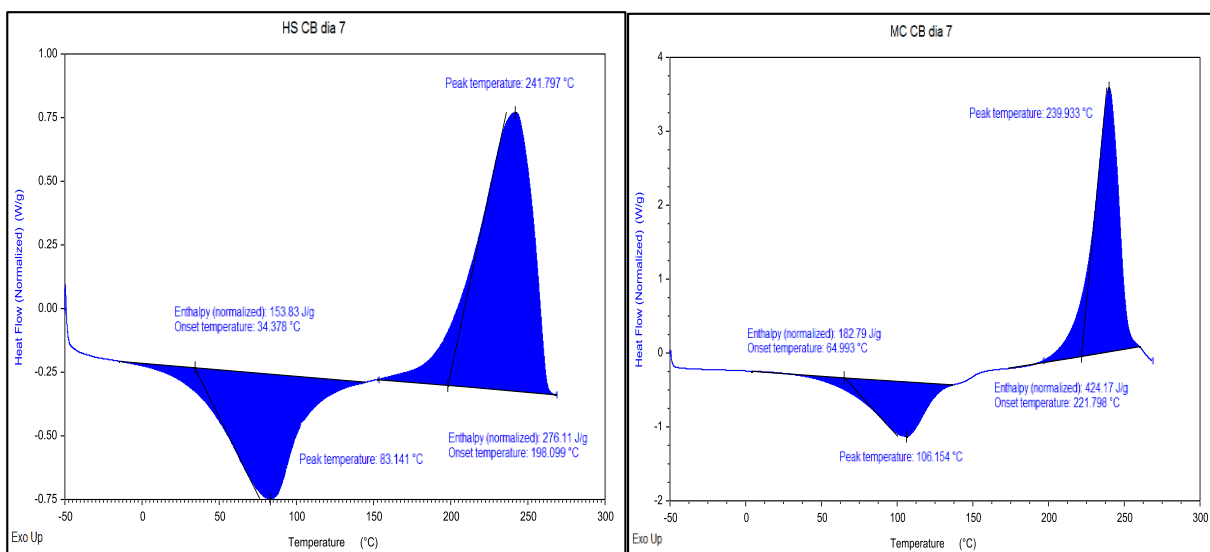
Como se puede observar en las curvas es muy común que durante el tratamiento térmico inicial, una pequeña pérdida de peso, aproximadamente de 25- 100 °C, debido a la evaporación de agua absorbida y material proteico, probablemente de algunas células que quedan adheridas en las películas de CB, autores reportan rangos de 50- 180 C°[82] . En esta región no se observaron diferencias significativas entre las muestras, indicando que no existe diferencia significativa en el contenido de humedad de las muestras CB-HS y CB-MC.

En la curva de TGA de la película obtenida del medio HSMC se observa, alrededor de 240-300°C, una descomposición significativa de la muestra representada por pérdida de 75 al 98% del material polimérico. Por otra parte en la película de CB-HS se presenta una dramática pérdida de peso alrededor de 250-330°C. En el

proceso de Degradación térmica de celulosa ocurren reacciones de depolimerización, deshidratación y descomposición de unidades de glucósidos, seguido por la formación de residuo carbonizado [82]. Por tanto, resultados confirman que CB es un polímero estable desde el punto de vista térmico en comparación a otros polímeros.

### 3.3.6 Análisis calorimétrico diferencial- DSC

La grafica 24 muestra los termogramas de las películas de CBHS y CBMC, donde se relaciona el flujo del calor en las muestras en función de la temperatura.



**Figura 24.** Termogramas DSC para películas obtenidas a partir a) CB-HS y b) CB-MC.

En los termogramas se observan máximos endotérmicos a 106.154 °C para CB-MC y 83.141 °C para CB-HS correspondientes a la pérdida de agua absorbida en la película de CB, la literatura reporta pérdidas de agua en rangos de temperatura de 80-140 °C [46], [95]

El análisis calorimétrico diferencial- DSC, tuvo como finalidad conocer los valores de (absorción y liberación) de calor en el biopolímero en función de la temperatura. Así mismo, el punto de cristalización de la muestra, conocido como la temperatura

a la cual se alcanza la suficiente energía para adoptar una disposición ordenada o arreglo cristalino. Esta técnica busco determinar el cambio físico que conlleva una liberación de calor (transición exotérmica)[99].

La cristalización se da en dos etapas nucleación y crecimiento. En la (tabla 7) se muestran los resultados de estas etapas para películas de CB-MC y CB-HS. El máximo pico de transformación (exotérmica), se produce aproximadamente a 239.933° C para CB-MC y en el medio de referencia a 241.797 °C, valores que muestran el punto que conduce al inicio de descomposición de la fase cristalina de la muestra. Estos valores confirman lo observado en los resultados de las curvas DTG para ambos casos.

**Tabla 7.** Etapas de cristalización de películas de celulosa, obtenidas con el medio de HSMC y de referencia HS.

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura inicial de cristalización</b>	<b>Temperatura máxima de cristalización</b>	<b>Calor de cristalización</b>
CB-MC	221.798 °C	239.933°C	424.17 J/g
CB-HS	198.099 °C	241.797 °C	276.11 J/g

Los altos niveles de estabilidad térmica de Celulosa bacteriana, se atribuye a dos factores principales del biopolímero: la orientación de las cadenas de fibrillas y la forma pura de la celulosa [45], es decir, que no está conformada por ningún otro componente como el caso de la celulosa vegetal (lignina y hemicelulosa).

## **4. CONCLUSIONES**

-Es posible obtener Celulosa bacteriana-CB, utilizando Mucílago de Café-MC como fuente de carbono no convencional.

-Esta investigación muestra que es viable la producción de celulosa a partir de mucilago de café- MC, como única fuente de carbono, siendo una forma de aprovechamiento agroindustrial.

-La mayor producción de celulosa en 7 días de fermentación se logró con el medio HSMC, donde se utiliza MC como única fuente de carbono, a 30°C.

-Las membranas de CB para ambos medios presentan alta cristalinidad, con valores de 85% y 91%, similares a los reportados en la literatura.

-Análisis de TGA y DSC pudieron demostrar que las propiedades térmicas de descomposición y transición vítrea, pueden variar de acuerdo al porcentaje (%) de cristalinidad del biopolímero.

Resultados preliminares de esta investigación fueron presentados:

-1er Simposio Internacional en Biotecnología & Agroindustria- 12 de Noviembre, 2014. Título: Producción de celulosa bacteriana utilizando residuos agroindustriales.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Realizar fermentaciones más largas (21 hasta 35 días), como reportan en la literatura para esta cepa de referencia.
- Realizar un estudio comparativo entre otras fuentes de carbono convencional y no y su patrón respectivo.
- Aislar del mucilago de café, la especie de *Gluconacetobacter xylinus*.
- Realizar pruebas de producción de CB con otras fuentes de carbono como por ejemplo, mucílago de cacao e higo, glicerol (extracción de aceite de palma africana) e inclusive del bagazo del fique y la caña, subproductos que se generan en la agroindustria de la región.
- Realizar un diseño de experimentos donde se pueden evaluar variables (temperatura, pH, concentración de la fuente de carbono).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. E. Braham y R. Bressani, *Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Colombia Colombia, 1978.

- [2] O. M. M. Méndez y H. J. Membrillo, «Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias», *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 7, n.º 1, pp. 26-34, 2004.
- [3] J. L. Chávez-Pacheco, S. M. Yee, M. C. Zentella, y E. E. Marván, «Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones», *Tip Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 7, n.º 1, pp. 18-25, 2004.
- [4] L. A. Caicedo, F. P. de França, L. M. Lopes, y M. Caicedo, «Permeabilidad hidráulica e hinchamiento de membranas de celulosa bacteriana», *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 37, n.º 3, pp. 199-202.
- [5] L. Carreño, «Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana», Tesis para la obtención del grado Dr. en Ing. Dep. Ing. Química. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, 2011.
- [6] L. A. Caicedo, F. P. Da França, y L. Lopez, «Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa por fermentación estática», *Revista Colombiana de Química; Vol. 30, núm. 2 (2001); 155-162 0120-2804*. Universidad Nacional de Colombia, 07-mar-2011.
- [7] P. Ross, R. Mayer, y M. Benziman, «Cellulose biosynthesis and function in bacteria.», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 55, n.º 1, pp. 35-58, mar. 1991.
- [8] F. Esa, S. M. Tasirin, y N. A. Rahman, «Overview of Bacterial Cellulose Production and Application», *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 2, pp. 113-119, 2014.
- [9] Y. Dahman, K. E. Jayasuriya, y M. Kalis, «Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study.», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 162, n.º 6, pp. 1647-1659, nov. 2010.
- [10] N. Lin y A. Dufresne, «Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect», *Eur. Polym. J.*, vol. 59, pp. 302-325, 2014.
- [11] S. Hestrin y M. Schramm, «Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose», *Biochem. J.*, vol. 58, n.º 2, pp. 345-352, oct. 1954.
- [12] A. Kurosumi, C. Sasaki, Y. Yamashita, y Y. Nakamura, «Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693», *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, n.º 2, pp. 333-335, 2009.

- [13] N. Parant Rodewald, «Elaboración de Gel Celulósico (nata) Producido por *Acetobacter xylinum* Sobre Jugo de Arándano (*Vaccinium corymbosum*)», Universidad Austral De Chile, 2005.
- [14] L. L. Zhou, D. P. Sun, L. Y. Hu, Y. W. Li, y J. Z. Yang, «Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*.», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, n.º 7, pp. 483-489, jul. 2007.
- [15] W. Hu, S. Chen, X. Li, S. Shi, W. Shen, X. Zhang, y H. Wang, «In situ synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, n.º 4, pp. 1216-1219, 2009.
- [16] I. Algar, S. Fernandes, G. Mondragon, C. Castro, C. Garcia-Astrain, N. Gabilondo, A. Retegi, y A. Eceiza, «Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, n.º 1, 2015.
- [17] C. Castro, R. Zuluaga, J.-L. Putaux, G. Caro, I. Mondragon, y P. Gañán, «Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes», *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, n.º 1, pp. 96-102, feb. 2011.
- [18] P. Lestari, N. Elfrida, A. Suryani, y Y. Suryadi, «Study on the Production of Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-Waste», *Jordan J. Biol. Sci.*, vol. 7, n.º 1, pp. 75-80, 2014.
- [19] S. Keshk y K. Sameshima, «The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, n.º 2, pp. 291-296, 2006.
- [20] P. Carreira, J. A. S. Mendes, E. Trovatti, L. S. Serafim, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, y C. P. Neto, «Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose», *Bioresour. Technol.*, vol. 102, n.º 15, pp. 7354-7360, 2011.
- [21] X. Zeng, D. P. Small, y W. Wan, «Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup», *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, n.º 3, pp. 506-513, 2011.
- [22] R. Jaramillo, W. Tobio, y J. Escamilla, «Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático», *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 17, n.º 2, pp. 3004-3013, 2012.

- [23] L. D. Carreño Pineda, «Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana.» 20-sep-2011.
- [24] C. Zhong, G.-C. Zhang, M. Liu, X.-T. Zheng, P.-P. Han, y S.-R. Jia, «Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production.», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, n.º 14, pp. 6189-6199, jul. 2013.
- [25] J.-M. Wu y R.-H. Liu, «Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*», *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, n.º 1, pp. 116-121, sep. 2012.
- [26] J.-M. Wu y R.-H. Liu, «Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater.», *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 115, n.º 3, pp. 284-290, mar. 2013.
- [27] J. L. Chavez-Pacheco, S. Martinez-Yee, M. L. Contreras, S. Gomez-Manzo, J. Membrillo-Hernandez, y J. E. Escamilla, «Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology.», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, n.º 5, pp. 1130-1140, 2005.
- [28] N. PA, N. I. A. Hamid, N. Khairuddin, y K. A. Zahan, «Effect of Different Drying Methods on the Morphology, Crystallinity, Swelling Ability and Tensile Properties of Nata De Coco», *Sains Malaysiana*, vol. 43, n.º 5, pp. 767-773, 2014.
- [29] D. Lin, P. Lopez-Sanchez, R. Li, y Z. Li, «Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source», *Bioresour. Technol.*, vol. 151, pp. 113-119, 2014.
- [30] N. R. Valencia, «Manejo de Residuos en la Agroindustria Cafetera», *CENICAFE*, 1999.
- [31] G. I. PUERTA, «Factores procesos y controles en la fermentación del café», 2013.
- [32] N. R. Valencia y D. A. Zambrano-Franco, «Los subproductos del café: fuente de energía renovable», *Chinchiná, Colomb. Cenicafé*, 2010.
- [33] M. H. Deinema y L. P. Zevenhuizen, «Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation.», *Arch. Mikrobiol.*, vol. 78, n.º 1, pp. 42-51, 1971.

- [34] W. Borzani y S. J. D. Souza, «A simple method to control the bacterial production of cellulosic films in order to obtain dried pellicles presenting a desired average thickness», *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 14, n.º 1, pp. 59-61, 1997.
- [35] J. Guo y J. M. Catchmark, «Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*», *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, n.º 2, pp. 1026-1037, ene. 2012.
- [36] S. Daneshmandi, M. Hajimoradi, N. Soleimani, y M. Sattari, «Modulatory effect of *Acetobacter xylinum* cellulose on peritoneal macrophages.», *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 33, n.º 1, pp. 164-168, mar. 2011.
- [37] M. U. Rani y K. A. A. Appaiah, «Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk», *J. Food Sci. Technol.*, vol. 50, n.º 4, pp. 755-762, 2013.
- [38] C. Zhong, G.-C. Zhang, M. Liu, X.-T. Zheng, P.-P. Han, y S.-R. Jia, «Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, n.º 14, pp. 6189-6199, 2013.
- [39] K. Róna, G. Klausz, E. Keller, M. Szakay, P. Laczay, M. Shem-Tov, y P. Székely-Körmöczy, «Determination of paromomycin residues in turkey tissues by liquid chromatography/mass spectrometry», *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, n.º 30, p. 3792—3798, 2009.
- [40] F. Mohammadkazemi, M. Azin, y A. Ashori, «Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media», *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, n.º 0, pp. 518-523, mar. 2015.
- [41] D. R. Ruka, G. P. Simon, y K. M. Dean, «Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose», *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, n.º 2, pp. 613-622, jun. 2012.
- [42] S. M. Santos, J. M. Carbajo, y J. C. Villar, «The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Bacterial Cellulose Production and Properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 Focused on its use in Degraded Paper Restoration», *Bioresour. Vol 8, No 3*, may 2013.
- [43] S. Sheykhnazari, T. Tabarsa, A. Ashori, A. Shakeri, y M. Golalipour, «Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics», *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, n.º 3, pp. 1187-1191, ago. 2011.

- [44] S.-T. Chang, L.-C. Chen, S.-B. Lin, y H.-H. Chen, «Nano-biomaterials application: Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking», *Food Hydrocoll.*, vol. 27, n.º 1, pp. 137-144, may 2012.
- [45] K.-C. Cheng, J. M. Catchmark, y A. Demirci, «Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis.», *J. Biol. Eng.*, vol. 3, p. 12, 2009.
- [46] B. V Mohite y S. V Patil, «Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529.», *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, pp. 132-141, jun. 2014.
- [47] J.-T. Yeh, C.-C. Tsai, C.-K. Wang, J.-W. Shao, M.-Z. Xiao, y S.-C. Chen, «Ultradrawing novel ultra-high molecular weight polyethylene fibers filled with bacterial cellulose nanofibers.», *Carbohydr. Polym.*, vol. 101, pp. 1-10, ene. 2014.
- [48] R. M. Brown, J. H. Willison, y C. L. Richardson, «Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, n.º 12, pp. 4565-4569, dic. 1976.
- [49] T. Chiciudean, «Production Methods and Characteristics of Bacterial-Cellulose Composites.», «POLITEHNICA» University of Bucharest, 2011.
- [50] T. G. Chiciudean, A. Stoica-Guzun, T. Dobre, y M. Van Tooren, «High-strength epoxy bacterial cellulose based composites», *Mater. Plast.*, vol. 48, n.º 2, pp. 159-163, 2011.
- [51] B. Wei, G. Yang, y F. Hong, «Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties», *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, n.º 1, pp. 533-538, 2011.
- [52] L. E. Millon, C. J. Oates, y W. Wan, «Compression properties of polyvinyl alcohol-bacterial cellulose nanocomposite», *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 90, pp. 922-929, 2009.
- [53] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, y R. M. Brown, «Microbial cellulose—the natural power to heal wounds», *Biomaterials*, vol. 27, n.º 2, pp. 145-151, 2006.

- [54] E. B. Ricci, R. Cassino, y C. Di Campli, «Microcrystalline cellulose membrane for re-epithelisation of chronic leg wounds: A prospective open study», *Int. Wound J.*, vol. 7, n.º 6, pp. 438-447, 2010.
- [55] I. F. Almeida, T. Pereira, N. H. C. S. Silva, F. P. Gomes, a. J. D. Silvestre, C. S. R. Freire, J. M. Sousa Lobo, y P. C. Costa, «Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study», *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 86, n.º 3, pp. 332-336, 2014.
- [56] H. Shibazaki, S. Kuga, F. Onabe, y M. Usuda, «Bacterial cellulose membrane as separation medium», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 50, n.º 6, pp. 965-969, nov. 1993.
- [57] S. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsuhashi, Y. Nishi, y M. Uryu, «The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose», *J. Mater. Sci.*, vol. 24, n.º 9, pp. 3141-3145, 1989.
- [58] H. Yano, J. Sugiyama, A. N. Nakagaito, M. Nogi, T. Matsuura, M. Hikita, y K. Handa, «Optically Transparent Composites Reinforced with Networks of Bacterial Nanofibers», *Adv. Mater.*, vol. 17, n.º 2, pp. 153-155, ene. 2005.
- [59] F. Liebner, E. Haimer, M. Wendland, M.-A. Neouze, K. Schluffer, P. Mieth, T. Heinze, A. Potthast, y T. Rosenau, «Aerogels from unaltered bacterial cellulose: application of scCO<sub>2</sub> drying for the preparation of shaped, ultra-lightweight cellulosic aerogels.», *Macromol. Biosci.*, vol. 10, n.º 4, pp. 349-352, abr. 2010.
- [60] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, y R. M. Brown, «Microbial cellulose - The natural power to heal wounds», *Biomaterials*, vol. 27, pp. 145-151, 2006.
- [61] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, y R. M. J. Brown, «The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications.», *Biomacromolecules*, vol. 8, n.º 1, pp. 1-12, ene. 2007.
- [62] T. Maneerung, S. Tokura, y R. Rujiravanit, «Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing», *Carbohydr. Polym.*, vol. 72, n.º 1, pp. 43-51, 2008.
- [63] A. B. Novaes Júnior, N. de Moraes, y A. B. Novaes, «BioFill: membrana biológica nacional para regeneração tecidual guiada», *Rev. bras. odontol*, vol. 47, n.º 3, pp. 25-28, 1990.

- [64] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, y S. Marsch, «Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 26, n.º 9, pp. 1561-1603, 2001.
- [65] A. Bodin, S. Concaro, M. Brittberg, y P. Gatenholm, «Bacterial cellulose as a potential meniscus implant», *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, n.º 5, pp. 406-408, 2007.
- [66] N. Sanchavanakit, W. Sangrungraungroj, R. Kaomongkolgit, T. Banaprasert, P. Pavasant, y M. Phisalaphong, «Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film», *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, n.º 4, pp. 1194-1199, 2006.
- [67] S.-C. Wu y Y.-K. Lia, «Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization», *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 54, n.º 3, pp. 103-108, 2008.
- [68] J. Li, Y. Wan, L. Li, H. Liang, y J. Wang, «Preparation and characterization of 2, 3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, n.º 5, pp. 1635-1642, 2009.
- [69] A. Stoica-Guzun, M. Stroescu, F. Tache, T. Zaharescu, y E. Grosu, «Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems», *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 265, n.º 1, pp. 434-438, 2007.
- [70] O. Perna Manrique, «Evaluación de la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* ifo en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente», UNIVERSIDAD DE LA SABANA, 2013.
- [71] A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Gonçalves-Miśkiewicz, M. Turkiewicz, y S. Bielecki, «Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose», *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, n.º 4, pp. 189-195, 2002.
- [72] S. Kongruang, «Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 148, n.º 1-3, pp. 245-256, 2008.
- [73] S. Keshk y K. Sameshima, «Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, n.º 1, pp. 4-8, 2006.

- [74] A. Suwanposri, P. Yukphan, Y. Yamada, y D. Ochaikul, «Identification and biocellulose production of Gluconacetobacter strains isolated from tropical fruits in Thailand», *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, vol. 7, n.º 1, pp. 70-82, 2013.
- [75] L. Fang y J. M. Catchmark, «Characterization of water-soluble exopolysaccharides from Gluconacetobacter xylinus and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly», *Cellulose*, vol. 21, n.º 6, pp. 3965-3978, 2014.
- [76] C. Zhijiang, Y. Guang, y J. Kim, «Biocompatible nanocomposites prepared by impregnating bacterial cellulose nanofibrils into poly (3-hydroxybutyrate)», *Curr. Appl. Phys.*, vol. 11, n.º 2, pp. 247-249, 2011.
- [77] H. Bäckdahl, B. Risberg, y P. Gatenholm, «Observations on bacterial cellulose tube formation for application as vascular graft», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, n.º 1, pp. 14-21, ene. 2011.
- [78] L. C. Sowden y J. R. Colvin, «Morphology, microstructure, and development of colonies of Acetobacter xylinum», *Can. J. Microbiol.*, vol. 24, n.º 7, pp. 772-779, 1978.
- [79] J. L. A. Covarrubias, A. P. G. Macabeo, O. B. Villaflores, M. Knorn, P. Kohls, y A. V Bayquen, «Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.»
- [80] Y. YAMADA, E. NAKAZAWA, A. NOZAKI, y K. KONDO, «Characterization of acetobacter xylinum by ubiquinone system», *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 22, n.º 6, pp. 285-292, 1976.
- [81] P. R. Chawla, I. B. Bajaj, S. a. Survase, y R. S. Singhal, «Microbial cellulose: Fermentative production and applications ( Review )», *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 47, n.º 2, pp. 107-124, 2009.
- [82] M. C. I. M. Amin, A. G. Abadi, y H. Katas, «Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles.», *Carbohydr. Polym.*, vol. 99, pp. 180-189, ene. 2014.
- [83] C. F. de Souza, N. Lucyszyn, M. A. Woehl, I. C. Riegel-Vidotti, R. Borsali, y M. R. Sierakowski, «Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites.», *Carbohydr. Polym.*, vol. 93, n.º 1, pp. 144-153, mar. 2013.

- [84] J. P. Silva, F. K. Andrade, y F. M. Gama, «Bacterial Cellulose Surface Modifications», *Bact. NanoCellulose A Sophistic. Multifunct. Mater.*, pp. 91-112, 2012.
- [85] W. Hu, S. Chen, X. Li, S. Shi, W. Shen, X. Zhang, y H. Wang, «In situ synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes», *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, n.º 4, pp. 1216-1219, 2009.
- [86] E. B. Ricci, R. Cassino, y C. Di Campli, «Microcrystalline cellulose membrane for re-epithelisation of chronic leg wounds: a prospective open study», *Int. Wound J.*, vol. 7, n.º 6, pp. 438-447, 2010.
- [87] G. Yang, J. Xie, F. Hong, Z. Cao, y X. Yang, «Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose», *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, n.º 1, pp. 839-845, 2012.
- [88] M. Ul-Islam, T. Khan, y J. K. Park, «Nanoreinforced bacterial cellulose–montmorillonite composites for biomedical applications», *Carbohydr. Polym.*, vol. 89, n.º 4, pp. 1189-1197, 2012.
- [89] J. Wang, X. Lu, P. F. Ng, K. I. Lee, B. Fei, J. H. Xin, y J. Wu, «Polyethylenimine coated bacterial cellulose nanofiber membrane and application as adsorbent and catalyst», *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 440, pp. 32-38, 2015.
- [90] A. Ashori, S. Sheykhnazari, T. Tabarsa, A. Shakeri, y M. Golalipour, «Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization», *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, n.º 1, pp. 413-418, sep. 2012.
- [91] J. Y. Jung, J. K. Park, y H. N. Chang, «Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 37, n.º 3, pp. 347-354, 2005.
- [92] W. Borzani y S. J. De Souza, «Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media», *Biotechnol. Lett.*, vol. 17, n.º 11, pp. 1271-1272, 1995.
- [93] V. León-Fernández, J. Rieumont-Briones, E. Bordallo-López, D. Dopico-Ramírez, E. Peña-Sacerio, y I. Menéndez-Cuesta-Mirabal, «Obtención y caracterización de la celulosa hidrofólicamente modificada», *ICIDCA. Sobre los Deriv. la Caña Azúcar*, vol. 47, n.º 1, pp. 51-56, 2013.
- [94] T. D. Lopes, I. C. Riegel-Vidotti, A. Grein, C. A. Tischer, y P. C. de Sousa Faria-Tischer, «Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes:

Production and characterization», *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 67, pp. 401-408, 2014.

- [95] B. Surma-Slusarska, S. Presler, y D. Danielewicz, «Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter xylinum* culture for application in papermaking», *Fibres Text. East Eur*, vol. 16, pp. 108-111, 2008.
- [96] Y. B. Park, C. M. Lee, K. Ka, S. Park, D. J. Cosgrove, y S. H. Kim, «Effects of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharides on Bacterial Cellulose Structure Studied with Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy and X-ray Diffraction», 2014.
- [97] W. Park, M. Kang, H. Kim, y H. Jin, «Electrospinning of poly (ethylene oxide) with bacterial cellulose whiskers», en *Macromolecular Symposia*, 2007, vol. 249, n.º 1, pp. 289-294.
- [98] M. Kačuráková, A. C. Smith, M. J. Gidley, y R. H. Wilson, «Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy», *Carbohydr. Res.*, vol. 337, n.º 12, pp. 1145-1153, 2002.
- [99] J. A. Ospina Jiménez y A. J. Rondón Arciniegas, «GUÍA METODOLÓGICA PARA REALIZAR ANÁLISIS MEDIANTE EL CALORÍMETRO DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC Q10), COMO SERVICIO DE EXTENSIÓN A LA INDUSTRIA NACIONAL POR PARTE DE LA ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA, UIS.», UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, 2006.
- [100] L. G. Elias, J. E. Braham, y R. Bressani, «Composición química de la pulpa de café y otros subproductos», *Pulpa Café Compos. Tecnol. y Util. J Brahan e R Bressani (ed.)*, INCAP, Panama, 1978.

## ANEXOS

### ANEXO A. Reactivos y equipos

OBJETO	INFORMACIÓN
<b>Reactivos</b>	
DMSO	Merck
Agar HS	Carlos Erba
Agar nutritivo	Carlos Erba
Agar Manitol	Carlos Erba
Sacarosa	Merck
Peptona	Oxoid
Extracto de levadura	Oxoid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carlos Erba
Ácido cítrico	Carlos Erba
NaClO	15%, Carlos Erba
Ácido Sulfúrico	95-97%, Merck
<b>Equipo</b>	
Horno	marca Memmert
Incubador	marca Binder
Centrifuga	Universal 320R, marca Hettich
pHmetro	Instruments Lab850, marca Schott
Balanza analítica	Marca Sartorius
HPLC	Cromatógrafo líquido Serie 110, marca Agilent.
FR-IR	Espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier modelo Tensor 27, marca Bruker.
SEM	Microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 650, marca FEI.
DRX	Difractómetro de polvo modelo D8 ADVANCE, marca Bruker.
TGA	Balanza termogravimétrica/ modelo Discovery, marca TA INSTRUMENT.

## **Anexo B. Protocolo de toma de muestra de mucílago de café fresco.**

### **OBJETIVOS.**

- Realizar la toma de muestra del mucílago de café fresco.
- Garantizar la poca variación de los componentes presentes en el mucílago de café fresco.

### **MATERIALES.**

- 10 Frascos Schott (1L).
- Termómetro (Sonda).
- Colador de nylon rústico.
- Etiquetas.
- Material de bioseguridad (Guantes, gorro tapabocas).
- Cava de icopor.
- 2 mecheros de alcohol.
- Hielo seco – bolsa de hielo.

### **Equipos.**

- Sonda para pH.
- Centrifugadora.
- Autoclave.

### **Procedimiento.**

#### **En el laboratorio**

1. Lavar y autoclavar el material a usar.
2. Etiquetar cada frasco a usar en la recolección.

#### **En la finca**

3. Filtrar en la bocatomá del desmucilagador con el colador rústico.
4. Medir el pH y la temperatura del mucílago.
5. Cerrar fuerte el envase.
10. Homogenizar la muestra de mucílago, en vaso de Biorreactor por 5 min con agitación.
11. Envasar el mucílago en los frascos Schott.
12. Autoclavar la muestra a 121 °C, por 21 minutos.

6. Disponer del mucílago debidamente envasado en la cava con suficiente hielo seco o hielo, para mantener una temperatura cercana a los -20 °C.

7. Embalar la cava.

8. Transportar muestras al laboratorio.

#### **En el laboratorio**

9. Centrifugar la muestra a 4000 rpm durante 30 minutos.
13. Disponer la muestra en cuarto frío de la facultad de salud,
14. Tomar 1 L de muestra y llevar a nevera.
15. Abrir frascos Schott en cabina de seguridad.
16. Tomar muestra para analizar azúcares por HPLC.

## Anexo C. Resultados fisicoquímicos del mucílago de café.



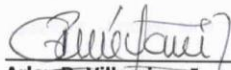
 	<b>LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-</b>	<b>INFORME DE ENSAYO</b>	<b>FOITIE.01</b>
			Versión: 02
			Página 2 de 3

TABLA 1. RESULTADOS ANÁLISIS FISICOQUÍMICO M242-14

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADOS		MÉTODO DE ANÁLISIS
		BASE HUMEDA	BASE SECA	
Humedad	g/100 g mtra	88,99	----	AOAC 931.04 - Gravimétrico
Ceniza	g/100 g mtra	0,57	5,19	AOAC 972.15 – Gravimétrico
Grasa	g/100 g mtra	0,06	0,58	AOAC 963.15 – Soxhlet
Proteína	g/100 g mtra	1,15	10,46	AOAC 970.22 – Kjeldahl
Fibra	g/100 g mtra	0,61	5,59	AOAC 962.09 18th Edición – Hidrólisis ácida y básica
Carbohidratos totales	g/100 g mtra	9,23	83,77	Resolución 333 del Ministerio Protección social – Cálculo
Valor calórico	Kcal/100 g mtra	42,06	382,14	Resolución 333 del Ministerio Protección social – Cálculo
° Brix	%	10,0	----	AOAC 932.14 18th Edición – Refractómetro
pH	---	4,36	----	AOAC 970.21

REVISÓ Y AUTORIZÓ



**Arley R. Villamizar J.**  
**Químico PQ2839**  
 Coordinador de Calidad.

**NOTA:** ESTE INFORME DE RESULTADOS CORRESPONDE ÚNICAMENTE A LA MUESTRA ANALIZADA, NO PUEDE SER NI PARCIAL NI TOTALMENTE REPRODUCIDO SIN LA APROBACIÓN DEL LABORATORIO

**Anexo D.** Membranas de CB obtenidas durante 7 días de fermentación: a) (Día 2, 3, 5 y 7 CB), b) y c) con y sin tratamiento de purificación y d) Izquierda: sin tratamiento de purificación. Derecha: con tratamiento de purificación con NaClO al 0,5 %.

