

**Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para producción de celulosa
bacteriana**

Daniel Ricardo Durán Riveros

Jessica Tatiana Cabezas Calderón

Proyecto de Grado para optar al título de Químico

Directora:

Marianny Yajaira Combariza Montañez

PhD en Química Analítica Ambiental

Co-Director:

Cristian Blanco Tirado

PhD en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A Dios por darme la oportunidad de permitirme culminar este proyecto.

A mi madre, por ser esa mujer constante, atenta, colaboradora, por brindarme todo su amor, apoyo y realizar sacrificios que han hecho que este sueño y etapa de mi vida hoy se cumplan.

A mi padre, por toda la ayuda que me ha brindado económicamente y espiritualmente, por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir los sueños y metas.

A mi hermana, porque ha sido un ejemplo para mí, me ha motivado cuando no tuve fuerzas para seguir y por acompañarme en todo momento.

A todos mis familiares por su cariño, palabras reconfortantes y hacerme sentir orgullosa de lo que hoy en día es una meta cumplida.

A todos mis amigos y compañeros, que también me dieron esa voz de aliento y de cariño, que me ayudaron cuando lo necesitaba y estuvieron presentes en todo este proceso.

A mi esposo y a mi hijo que han sido mi motor más grande para culminar este proyecto, porque me han hecho sentir orgullosa de este gran logro y por estar conmigo en todo momento.

A mi compañero de trabajo de grado, por la paciencia y compañía; pues fue una experiencia agradable, trabajar, aprender y saber desenvolvernos en nuestro proceso de investigación.

Jessica Tatiana Cabezas Calderón

A Dios, por todas las cosas que me ha brindado y la guía de encontrar la profesión que realmente me apasiona.

A mi madre, por ser esa mujer emprendedora, de carácter y estar siempre ahí conmigo acompañándome y corrigiéndome para ser mejor. Por todo su amor, apoyo y sacrificios que han hecho mi vida más dulce y amena y, sobre todo, por ser la mejor madre del mundo.

A mi padre, por todas sus enseñanzas, apoyo, por toda la ayuda que me ha brindado, por su voz y su ejemplo de hombre honrado y trabajador, por enseñarme que con empuje y dedicación es como se cumplen las metas.

A mis hermanos, por su compañía. El día de mañana recompensaré su apoyo incondicional con mis sobrinos.

A todos mis familiares por su afecto, cariño y recordarme que la familia es la base fundamental de la vida.

A todos mis amigos y compañeros, por la grata compañía que me brindaron en todo este proceso de formación. Por todos los buenos momentos que compartimos y aquellos no tan buenos de los que aprendimos.

A aquella inspiración que, a pesar de la distancia, estuvo presente y a la cual siempre le deseo lo mejor.

A mi compañera de trabajo de grado, por la paciencia y compañía; pues fue una experiencia agradable, trabajar, aprender y saber desenvolvernos en nuestro proceso de investigación.

Daniel Ricardo Durán Riveros.

Agradecimientos

A Dios por permitirnos empezar y culminar este proyecto con éxito.

A la profesora Marianny Yajaira Combariza por guiarnos durante todo el proceso, por estar pendiente, atenta y disponible ante todas las inquietudes y por permitirnos estar en el grupo de investigación.

Al profesor Cristian Blanco, por su guía durante el trabajo de grado, por sus correcciones y brindarnos la oportunidad de trabajar en su grupo de Investigación.

A la profesora Inés y a Lucía, por su guía en la temática de Microbiología y acompañarnos en esta etapa.

A la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander por el proceso de formación que recibimos.

A la Gobernación de Santander por la financiación a través del proyecto de Regalías.

A todos los integrantes de los grupos de Investigación GIFTEX por su colaboración.

Al Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales CEIAM por su colaboración.

Contenido

	Pág.
Introducción _____	18
1. Planteamiento del Problema _____	19
2. Justificación del Problema _____	21
3. Hipótesis _____	22
4. Objetivos _____	22
4.1 Objetivo general _____	22
4.2 Objetivos específicos _____	22
5. Antecedentes _____	23
6. Marco Teórico _____	27
6.1 Cultivo de cacao _____	27
6.2 Celulosa _____	29
6.3 Análisis fisicoquímicos para caracterización de MC y CB. _____	31
6.3.1 Caracterización de jugos azucarados de frutas.	31
6.3.2 Caracterización de películas de CB.	32
7. Metodología _____	34
7.1 Materiales y métodos _____	35
7.1.1 Mazorca de cacao.....	35
7.1.2 Fuente de carbono.....	35

7.1.3 Caracterización del jugo de MC.	35
7.1.4 Cuantificación de azúcares en el MC por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	36
7.1.5 Determinación de metales en el MC por Absorción atómica	37
7.1.6 Microorganismo	38
7.1.7 Pre-inóculo.....	38
7.2 Producción de CB	38
7.2.1 Medios de cultivo.....	38
7.2.2 Biosíntesis de la CB	39
7.2.3 Limpieza de las películas de CB.....	39
7.3 Caracterización de la celulosa bacteriana (CB).	40
7.3.1 Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)	41
7.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	41
7.3.3 Difracción de Rayos X (DRX).....	41
7.3.4 Análisis Termo gravimétrico (TGA)	42
8. Resultados	43
8.1 Caracterización del mucílago de cacao.	43
8.2 Variaciones en la composición del medio de cultivo durante la biosíntesis de CB.	46
8.3 Producción de CB vs consumo de azúcares.	47
8.4 Caracterización de celulosa bacteriana (CB).	57
8.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	57
8.4.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-AR).	59

8.4.3 Difracción de rayos X (DRX).....	60
8.4.4 Análisis Termogravimétrico del polímero (TGA).....	62
9. Conclusiones _____	64
10. Recomendaciones _____	65
Referencias bibliográficas_____	66
Apéndices _____	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Planta de Theobroma cacao, clon CCN-51 (vereda Pajonal Piedecuesta Santander). ..	27
Figura 2. Diagrama de flujo.....	34
Figura 3. Jugo de mucílago de cacao esterilizado y crudo.	43
Figura 4. Proceso de producción de CB por Gluconacetobacer Xylinum.	47
Figura 5. Películas de celulosa bacteriana con 15 días de incubación provenientes de diferentes medios de cultivo. a) MC-C, b) MC-S, c) MC-DS, (d) MC-DS limpia, (e) MC-S limpia y (f) MC-C limpia.....	48
Figura 6. Película obtenida del medio HS, luego de 15 días de incubación.	48
Figura 7. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo MC-C.....	52
Figura 8. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo de jugo de MC-S.	53
Figura 9. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo de jugo de MC-DS.....	53
Figura 10. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcar (glucosa) en el tiempo para el medio de cultivo HS.....	54
Figura 11. Imágenes ópticas y micrografías SEM de CB: a) tratada con NaClO y liofilizada; b) cara superior de la película; c) cara inferior.	58

Figura 12. Imágenes SEM de la celulosa bacteriana. A) CB limpiada con ácido peracético previamente liofilizada. B) Capa intermedia de una película de CB.....	59
Figura 13. Espectro FT-IR de dos películas de celulosa bacteriana, (A) CB purificada con NaClO, (B) CB sin proceso de limpieza.....	60
Figura 14. Difractograma de la CB limpiada con NaClO.....	61
Figura 15. Curva TG y DTG de Biocelulosa.....	63

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Cronología en la caracterización del mucílago de cacao (MC).....	25
Tabla 2. Parámetros utilizados para la caracterización del jugo del MC.....	35
Tabla 3. Curvas de calibración y modos de medición empleados para cada metal.	37
Tabla 4. Métodos de limpieza para las películas de CB según su aplicación final.....	40
Tabla 5. Composición del jugo de mucílago de cacao (Clon CCN51).....	44
Tabla 6. Composición de los cuatro medios de cultivo utilizados.....	46
Tabla 7. Resultados de los medios de cultivo utilizados en la producción de CB después de 15 días de incubación.....	49
Tabla 8. Rendimiento de la producción de CB con diferentes fuentes de carbono.	55
Tabla 9. Cristalinidad y tamaño del cristalito de la CB limpiada con NaClO.....	61
Tabla 10. Comparación del porcentaje de cristalinidad y tamaño del cristalino con diferentes fuentes de carbono implementadas en la producción de CB.	62

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Validación del método por HPLC-RID para la cuantificación de azúcares. _____	78

Abreviaturas

AA	Absorción atómica
CB	Celulosa bacteriana
DRX	Difracción de rayos-X.
HS	Medio de cultivo de referencia Hestrin and Schram.
HPLC-RID	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción.
MC	Mucílago de cacao
MC-C	Medio de cultivo crudo
MC-S	Medio de cultivo suplementado
MC- DS	Medio de cultivo diluido y suplementado.
GX	<i>Gluconacetobacter Xylinus</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Termogravimetría.

Resumen

Titulo. Evaluación del mucílago de cacao como fuente de carbono para producción de celulosa bacteriana *

Autores: Daniel Ricardo Durán Riveros
Jessica Tatiana Cabezas Calderón **

Palabras claves: Fuente de carbono, mucilago de cacao y celulosa bacteriana.

La producción de celulosa bacteriana (CB) ha implementado el uso de diversas fuentes de carbono para microorganismos de género *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*. Uno de los intereses en su producción, es la búsqueda de nuevas fuentes de carbono que mejoren el rendimiento y sea un recurso renovable a bajo costo. Teniendo en cuenta que Colombia es el undécimo productor de cacao a nivel mundial, presenta un recurso renovable y subutilizado como el mucílago de cacao (MC), proveniente del aprovechamiento de la mazorca del árbol *Theobroma cacao*, y está principalmente compuesto por carbohidratos, nitrógeno total y oligoelementos como K, Na, Mg, Ca, Al, capaces de suplir los macro y micronutrientes que requieren los microorganismos en un medio de cultivo para producir este polímero. Los resultados muestran la viabilidad de usar MC (crudo y suplementado con una fuente de nitrógeno) como medio de cultivo para la producción de CB por *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC®23768TM) usando fermentaciones estáticas. La producción de CB utilizando MC varía de $0,43 \pm 0,16$ g / L hasta $14,06 \pm 0,69$ g / L, dependiendo de la composición de los medios de cultivo (crudos o suplementados). La productividad de CB obtenida con MC es similar, o superior, a los informes encontrados en la literatura que usan fuentes alternativas (residuos agroindustriales) o de carbono puro. La producción de CB, utilizando MC como medio de cultivo, es una aplicación interesante para este material que actualmente no utilizan los productores de cacao.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias Escuela de Química Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez PhD en Química Analítica Ambiental Co-Director: Cristian Blanco Tirado PhD en Química

Abstract

Title. Evaluation of cocoa mucilage as a carbon source for bacterial cellulose production *

Authors: Daniel Ricardo Durán Riveros
Jessica Tatiana Cabezas Calderón **

Keywords: Cacao mucilage exudate, carbon source and bacterial cellulose.

Bacterial cellulose (BC) is an exopolysaccharide synthesized by microorganisms of the genera *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* and *Sarcina*, using a wide variety of carbon sources. Nowadays industrial BC production is limited due to high costs, that's why one of the interests in its production, is looking for new carbon sources that improve the yield and production of CB being a renewable resource at low cost.. Taking into account that Colombia is the eleventh producer of cacao worldwide, it presents a renewable and underutilized resource such as cacao mucilage exudate (CME), a liquid material that seeps from the white pulp surrounding the cacao bean, and is mainly composed of carbohydrates, total nitrogen and trace elements such as K, Na, Mg, Ca, Al, capable of supplying the macro and micronutrients required by microorganisms in a culture medium to produce this polymer. Also, we show the feasibility of using CME (raw and supplemented with a nitrogen source) as culture media for BC production by *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC®23768™) using static fermentations. BC production using CME ranges from 0.43 ± 0.16 g/L up to 14.06 ± 0.69 g/L depending upon the composition of the culture media (raw or supplemented). The BC productivity observed with CME is similar, or superior, to reports found in literature using both: alternative (agroindustrial residues) or pure carbon sources. BC production, using CME as culture media, is an interesting application for this material that currently is not used by cacao farmers.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias Escuela de Química Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez PhD en Química Analítica Ambiental Co-Director: Cristian Blanco Tirado PhD en Química

Introducción

La celulosa, el biopolímero natural renovable más abundante en la tierra, es el componente estructural fundamental en la pared celular de las plantas. En la actualidad la celulosa es considerada como un recurso químico renovable clave para reemplazar los materiales poliméricos derivados del petróleo. Independientemente de su origen, la celulosa es un homopolisacárido lineal compuesto por unidades de β -d-glucopiranosas unidas por enlaces β -1-4. La unidad repetitiva es un dímero de glucosa, conocido como celobiosa (Khalil et al., 2019).

La producción de celulosa se ha considerado propia de organismos del reino vegetal, sin embargo, el análisis de los mecanismos y rutas biosintéticas para su producción se basa principalmente en estudios realizados con bacterias del tipo *Gluconacetobacter Xylinum* (anteriormente *Acetobacter xylinum*). Estas bacterias Gram negativas, que pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, son microorganismos aerobios estrictos que realizan oxidación incompleta de azúcares y alcoholes (proceso conocido como fermentación oxidativa) para producir “películas” o “natas” de celulosa bacteriana sobre la superficie de medios líquidos (Chavez-Pacheco et al., 2004). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición. En la actualidad su explotación industrial se ha visto frenada por los altos costos que implica su producción a gran escala, basada en el uso de azúcares derivados de la caña o la remolacha; sin embargo, es posible obtenerla a partir de residuos agroindustriales, lo que reduce sus costos de producción (Giraldo et al., 2012).

El cultivo del árbol de cacao, *Theobroma cacao*, requiere unas condiciones climáticas apropiadas que mayoritariamente se encuentran en el área comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio (20° al Norte y Sur del Ecuador) (Cala et al., 2001). Actualmente el cacao es producido por numerosos países en el mundo y Colombia es el cuarto país con mayor producción de cacao en América Latina y el undécimo a nivel mundial.

El proceso de beneficio del cacao genera una gran cantidad de residuos lignocelulósicos que son de gran interés por sus potenciales usos, sin embargo, en la actualidad estos materiales causan serios problemas ambientales pues son desechados en los cultivos o en los sitios de beneficio del fruto. Para la presente investigación el mucílago de cacao es de particular importancia por su alto contenido de azúcares. En la biosíntesis de celulosa bacteriana se han usado diversas fuentes de carbono, configuraciones de biorreactores y estrategias de cultivo. En esta propuesta, financiada por el Sistema General de Regalías de Colombia (SGR), se propone evaluar el uso del mucílago de cacao como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana, con el ánimo de valorizar los residuos del procesamiento del fruto de cacao

1. Planteamiento del Problema

El árbol de cacao, *Theobroma cacao L* es originario de América del sur (Cala et al., 2001), desde dónde su cultivo se expandió a países Europeos, Oeste Africano, Asia y Centro América. Existen alrededor de veintidós especies, de las cuales *T. cacao L.* es comercialmente la de mayor interés debido a la composición de sus semillas.

Entre el 2016 y el 2017 se registró una producción mundial de 4.59 millones de toneladas de grano de cacao (Kongor et al., 2016), los cuales se utilizaron como materia prima de productos alimenticios como licor de cacao, manteca de cacao y barras de chocolate. Estas últimas, son uno de los productos alimenticios más consumidos en el mundo y se producen principalmente por países europeos como Bélgica, Holanda y Suiza.

Actualmente, Colombia es el cuarto país con mayor producción de cacao en América Latina y el undécimo a nivel mundial (ICCO et al., 2015a). Para el año 2016, la producción de cacao en Colombia creció 3.6 % al pasar de 54.798 toneladas a 56.785, de las cuales el 40.9% de la producción corresponde al departamento de Santander, seguido por Arauca 10,3% y Huila con el 7% (Fedecacao - Federación Nacional de Cacaoteros, 2018). La producción de granos de cacao genera gran cantidad de biomasa residual, pues de la mazorca de cacao solo se aprovecha el 8% m/m mientras y el restante 92% m/m se convierte en desechos que no se aprovechan industrialmente. Esta biomasa residual, constituida principalmente por la cáscara y el mucílago, se utiliza artesanalmente para la producción de abonos o como complemento nutricional de cultivos por vertimiento directo (Crescente et al., 1975). Sin embargo, la disposición final de estos materiales en el terreno de cultivo, particularmente del mucílago, promueve eventualmente la propagación de microorganismos patógenos para el cultivo y la multiplicación de insectos (Thorold et al., 1975), ya que contiene azúcares libres como glucosa, fructosa y sacarosa (Lefeber et al., 2010), proteína entre el 0.4 y 0.6 % (Guehi et al., 2010), grasas y fenoles (Rodriguez et al., 2011).

Adicionalmente, también hay serios problemas ambientales relacionados con olores fétidos, deterioro del paisaje y cuerpos de agua cercanos a los cultivos de cacao (Rubini et al., 2005). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias tecnológicas que involucren el uso de estos residuos para

producir materiales avanzados, particularmente el mucilago de cacao, permitirá dar valor agregado a esta biomasa agroindustrial.

2. Justificación del Problema

La celulosa bacteriana (CB) es un material inocuo, biodegradable, biocompatible y apto para consumo humano. El uso de la CB en la industria biomédica va en aumento (Petersen et al., 2011; Czaja et al., 2007; Wan et al., 2007), así como su aplicación en la producción de alimentos (Okiyama et al., 1993), aerogeles y aditivos para pintura (Innerlohinger et al., 2006; Villanueva et al., 2006). Por otra parte, la producción de CB a partir de residuos agroindustriales es una tendencia creciente a nivel mundial debido al aumento de este tipo de residuos, como consecuencia de la expansión de la frontera agrícola y el crecimiento poblacional. Por esta razón, consideramos que el uso del jugo proveniente del mucílago de cacao, cultivo extendido en Santander, como medio de crecimiento de películas de CB usando *Gluconacetobacter xylinus*, es una estrategia potencial de uso de residuos agroindustriales que tendría impactos muy positivos en la cadena de valor del cacao (Carreño et al., 2012).

3. Hipótesis

¿Las características composicionales del jugo de mucílago de cacao lo hacen medio de cultivo adecuado para la producción de celulosa bacteriana?

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la viabilidad del uso del mucílago de cacao como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana.

4.2 Objetivos específicos

- Estudiar la composición del jugo de mucílago de cacao mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y análisis bromatológico y establecer su potencial como fuente de carbono para producción de celulosa bacteriana (CB).
- Estudiar el proceso de producción de celulosa bacteriana (CB) en términos del cambio composicional del mucílago de cacao.

- Caracterizar la celulosa bacteriana (CB) por métodos fisicoquímicos, microscópicos, termogravimétricos y espectroscópicos.

5. Antecedentes

La producción de celulosa bacteriana utilizando fuentes de carbono, alternativas a los azúcares puros, ha sido un tema de investigación muy amplio durante las últimas décadas. Desde 1963 se han realizado estudios morfológicos y rendimiento de la producción de CB; sin embargo, solo hasta mediados de los 80s se reconoce la gran aplicabilidad del material como resultado del estudio de sus propiedades fisicoquímicas (Nishi et al., 1990). Algunos estudios reportan que la CB puede ser usada para fortalecer las pulpas de celulosa en la producción de papel y en la fabricación de materiales acústicos como audífonos y altoparlantes (Iguchi et al., 2000). Típicamente, la CB se ha utilizado en la industria alimenticia, y más recientemente en la ingeniería y en la biomedicina. Por ejemplo, la ingeniería tisular que es la regeneración y remodelación de tejido in vivo con el propósito de reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función de órganos, está utilizando la CB en la regeneración de tejidos blandos debido a su biocompatibilidad, su alta resistencia, su moldeabilidad, su interacción con células musculares además de su bajo costo de producción, en comparación con otros biopolímeros (Freed et al., 1995). La CB también se emplea como piel artificial en quemaduras, implantación de vasos sanguíneos y enfermedades periodontales (Svensson et al., 2005; Klemm et al., 2001; Fontana et al., 1990; Backdahl et al., 2006).

En la industria alimenticia, la CB ha sido empleada para la producción de películas aditivadas con nisina, con el objetivo de inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos como la carne (Nguyen et al., 2008); también se ha usado como empaque, en películas modificadas con polilisina, para la protección antimicrobiana de salchichas; agente emulsificante (Zhu et al., 2010); y mejorador de textura en cremas batidas (Zhao et al., 2009).

También se ha reportado la síntesis de compositos de CB mediante métodos *in situ* o *ex situ* (Shah et al., 2013). En el primero se agregan materiales al medio de cultivo con el objetivo de fortalecer el polímero durante el proceso de síntesis; en el segundo las películas de CB se impregnan con materiales de refuerzo como óxidos metálicos, materiales sólidos y nanomateriales (Maneerung et al., 2008; Meng et al., 2009; Saibuatong et al., 2010).

Tradicionalmente, en el proceso de producción de CB se han utilizado fuentes de carbono puras como azúcares simples (glucosa, fructosa, galactosa o derivados del glicerol) y fuentes no convencionales (particularmente residuos agroindustriales) que aportan micro y macronutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo (Masaoka et al., 1993; Pecoraro et al., 2008). El uso de fuentes no convencionales, además de permitir la producción de CB con bajo costo, contribuye también con la reducción de los impactos de la agroindustria sobre el medio ambiente. Entre los residuos agrícolas más utilizados para la producción de CB están: jarabes glucosados obtenidos del té de Kombucha (Nguyen et al., 2008), árbol de maple (Zeng et al., 2011), café (Flórez et al., 2015), aloe vera (Goelzer et al., 2009), cáscara de arroz (Castro et al., 2011), cáscara de piña, caña de azúcar (Thompson et al., 2001), agua de coco, manzana (Gayathry et al., 2013), remolacha, suero de queso y efluentes de papa (Thompson et al., 2001), entre otros.

La revisión de la información científica, publicada hasta la fecha, demuestra que no existen estudios relacionados con el uso del jugo de mucílago de cacao como medio de cultivo -fuente de

carbono- para la producción de CB. Por otra parte, la información científica sobre la composición y el uso del jugo – o exudado- del mucílago de cacao es muy limitada. Los primeros reportes sobre la composición del jugo de mucílago de cacao datan de 1982, cuando se publica una caracterización muy somera de este residuo y se propone su uso en procesos fermentativos (Adams et al., 1982). En términos composicionales, existen algunos reportes sobre el contenido de azúcares, humedad, cenizas, metales, ácidos carboxílicos y sólidos disueltos, entre otros. Además, también se reporta el uso del jugo de mucílago de cacao para obtener etanol, y producir bebidas fermentadas y vinos; la Tabla 1 resume la información disponible en la literatura sobre el tema.

Tabla 1.

Cronología en la caracterización del mucílago de cacao (MC).

Objetivo	Año	Número de citaciones	Referencias
Caracterización básica del MC.			
Potencial uso en procesos de fermentación.	1982	7	(Adams et al., 1982)
Fermentación de MC con levadura pura.	1997	41	(Buamah et al., 1997)
Uso de MC como posible materia prima para preparación de be8 bidas suaves debido a su potencial de fermentación.	2001	2	(Gyedu et al., 2001)
Producción de vino frutal a partir de la fermentación de la pulpa de Cacao.	2007	72	(Dias et al., 2007)
Caracterización MC de especies africanas.	2009	27	(Anvoh et al., 2009)

Objetivo	Año	Número de citas	Referencias
Producción de etanol usando MC.	2010	4	(Anvoh et al., 2010)
Caracterización MC para la producción de bebida Kefir con pulpa de cacao a través de la fermentación.	2012	35	(Puerari et al., 2012)
Caracterización de MC para la producción de vino.	2016	–	(Balladares et al., 2016)
Caracterización de MC.	2016	40	(Nguyen et al., 2016)

6. Marco Teórico

6.1 Cultivo de cacao



Figura 1. Planta de *Theobroma cacao*, clon CCN-51 (vereda Pajonal Piedecuesta Santander).

El árbol de cacao, *Theobroma cacao* L, pertenece a la familia Esterculiaceae, y es originario de América del sur (Cala et al., 2001). La propagación de la especie se hace a partir de semillas que desarrollan una raíz pivotante que puede tener una profundidad de hasta 1.50 m dependiendo de las condiciones de siembra y del suelo. El tamaño de las hojas varía según la cantidad de luz solar que reciba el árbol, ya que a menor absorción de luz el tamaño de la hoja aumenta. Por esta razón los cacaos criollos tienen hojas más grandes y presentan coloraciones verdosas más intensas que las de los cultivos amazónicos. El árbol de cacao florece todo el año, pero las primeras flores

aparecen pasados tres años de su siembra; el tamaño de la flor es pequeño, alrededor de 1 a 2 cm de diámetro. El cacao no se autopoliniza fácilmente debido a la posición opuesta del pistilo y a que los estambres están aislados. La polinización del cacao la realizan en su mayoría insectos, muchos del género *forcipomyia*.

En Colombia se producen principalmente dos tipos de cacao, *Criollos* y *Forasteros* o *Pajarito*. Los *Criollos* son cultivados en áreas pequeñas y en valles cuya altitud se sitúa en los 600 a 1200 m.s.n.m.; por ejemplo, en las zonas del Valle del Cauca, Huila, Caldas y Antioquia. Los *Forasteros* se cultivan mayoritariamente en Santander, Antioquia, Caldas y el Huila; esta especie de cacao fue introducida en el siglo XX proveniente de algunas islas de las Antillas. El cruce entre *Forasteros* y *Criollos* originó la especie de los *Trinitarios* que también se cultiva en Santander. Aparte de estas especies en Colombia se produce una variedad conocida como *Amanavén*, en menor proporción con respecto a las otras, que se cultiva en el Vichada y en la llanura oriental amazónica (Enríquez et al., 1985).

El fruto del cacao se caracteriza por ser una baya elipsoidal, ovoide o esférica (según el tipo de cacao) que puede contener de 20 a 40 semillas. Porcentualmente el cotiledón se compone de un $55,2 \pm 0,10$ % de grasa, $21,6 \pm 0,10$ % de proteína, $4,2 \pm 0,02$ % de humedad, $3,5 \pm 0,11$ % de ceniza y $15,5 \pm 0,63$ % de fenoles; también contiene otros componentes de interés nutricional como fibra y algunos minerales esenciales en la dieta como el potasio, el magnesio, hierro y el fósforo (Afoakwa et al., 2013; Torres et al., 2015). El grano de cacao está rodeado de una capa de materia orgánica denominada mucílago. El mucílago de cacao se compone de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa), fenoles, nitrógeno, fibras, grasas y proteínas. En el proceso de beneficio del cacao el mucilago juega un papel fundamental durante la etapa de fermentación, pues sirve como sustrato para el crecimiento y proliferación de microorganismos responsables de la

generación de sabor y aroma en los granos. Sin embargo, también durante este proceso, el exceso de mucílago se lixivia y se convierte en un efluente contaminante con impactos negativos al medio ambiente.

6.2 Celulosa

La celulosa es el biopolímero estructural más abundante en las plantas. Históricamente ha sido utilizado como materia prima por el hombre en la producción de telas, madera, papel, aditivos, entre otros (Bellote et al., 1995). Químicamente la celulosa es una macromolécula polimérica cuyo monómero, la (β -1,4) D-glucopiranososa, se une con otras unidades mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico. En las plantas, este polímero se rodea de capas de hemicelulosa y lignina para formar compositos funcionales encargados de proveer estructura y sostén a estos organismos (Cheng et al., 2002).

La celulosa se produce naturalmente por plantas, microorganismos (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*), hongos (*Dictyostelium*) y animales (*Tunicidae*) (Brown et al., 2012). En cuanto a microorganismos que producen celulosa, las del género *Acetobacter* son los mayores productores (Richmond et al., 1991). Las bacterias de este género fabrican CB a partir de fuentes de carbono simples como glucosa, fucosa, xilosa (Ishihara et al., 2002), disacáridos como la sacarosa, agentes edulcorantes como el manitol, arabitol o compuestos como el glicerol (Mikkelsen et al., 2009). Se han reportado estudios en los cuales se usan otras fuentes de carbono que replacen el uso exclusivo de ciertos azúcares (glucosa, fructosa) con el fin de disminuir el costo de producción de CB. Dentro de las fuentes de carbono alternativas se encuentran residuos agroindustriales como la pulpa de arándano, licor fermentado a base de té llamado kombucha

(Nguyen et al 2008), el licor de maíz (Noro et al., 2004), zumos de naranja, piña, manzana, pera y uva (Kurosumi et al., 2009), vinaza de arroz (Goelzer et al., 2009), agua de coco (Kongruang et al., 2007), cáscara de frutas como uva, piña, desechos textiles de algodón (Hong et al., 2012), jarabe de maple y otros (Zeng et al., 2011).

Gluconacetobacter xylinus es un microorganismo aerobio Gram negativo que pertenece al género *Acetobacter* y a la familia de las *Acetobacteraceae*, anteriormente conocido como *Acetobacter Xylinus* y *Acetobacter Xylynum*. Se caracteriza por producir CB con un alto grado de cristalinidad mediante la fermentación oxidativa de diversos azúcares. Naturalmente este microorganismo habita en las frutas y vegetales en proceso de descomposición, formando películas en la superficie en los medios de cultivo de los que se alimenta (Hong et al., 2012). Las fuentes de carbono más usadas en la producción de CB con este tipo de microorganismo son mezclas de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa o galactosa), además del glicerol y el manitol. Algunos autores reportan encontrando que con sacarosa y glicerol se producen capas más gruesas de CB, en comparación con otras fuentes de carbono (Mikkelsen et al 2009).

En la producción de CB hay dos tipos de fermentación, la estática y la dinámica. El proceso estático es un método tradicional en el que se inocula el medio con el microorganismo en recipientes de baja profundidad, los cuales son recubiertos y se dejan reposar por periodos de 5 a 20 días hasta que la película se produzca y flote sobre la superficie del cultivo. El rango de temperatura óptima para estos cultivos es de 28-30° C, aunque la producción se lleva a cabo de 20 a 35° C, el pH del medio de cultivo puede variar de 4,0 a 6,0; sin embargo, el pH óptimo de producción depende del microorganismo (Chavez et al., 2004).

En comparación con la celulosa de origen vegetal, la bacteriana se destaca por presentar un alto grado de cristalinidad, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. Adicionalmente

no se encuentra rodeada de redes poliméricas como hemicelulosa y lignina. La CB posee propiedades interesantes para la industria textil, cosmética y biomédica debido a su baja toxicidad, reactividad, alta hidrofiliidad y biodegradabilidad. La CB ha sido usada en la fabricación de apósitos para heridas y úlceras, tratamientos para quemaduras y producción de vasos sanguíneos sintéticos (Andrade et al., 2010). Dentro de las propiedades más interesantes de la CB está su alta rigidez (la relación entre el esfuerzo para deformar el material por unidad de área) (Hsieh et al., 2008), en comparación con otros polímeros orgánicos. También presenta otras propiedades como potencial de moldeo y formación de estructuras, resistencia, lo que la convierte en un material funcional multifacético (Yoshinaga et al., 1997; Kaushik et al., 2011).

6.3 Análisis fisicoquímicos para caracterización de MC y CB.

Con el fin de caracterizar fisicoquímicamente el jugo de mucílago de cacao y la celulosa bacteriana, a continuación se describen las técnicas analíticas que permiten acceder a esta información.

6.3.1 Caracterización de jugos azucarados de frutas. Los jugos azucarados como el jugo de mucílago de cacao se componen de carbohidratos simples (sacarosa, glucosa y fructosa). Por esta razón, es necesario identificarlos y cuantificarlos utilizando cromatografía líquida de alta resolución, con detector de índice de refracción debido a las propiedades espectroscópicas de absorción de radiación de estos compuestos (HPLC-RID). Este análisis, permite la separación y cuantificación de los carbohidratos presentes en jugos azucarados de frutas como la naranja (Chinnici et al., 2005; Kelebek et al., 2009). Además de carbohidratos, los jugos de frutas también contienen metales esenciales (Ca, K, Na, Al, Mg), que se cuantifican mediante espectroscopia

atómica, como la de absorción. En cuanto a la preparación de muestras similares al jugo de MC para este análisis, diferentes autores extraen los metales de interés, realizando digestiones ácidas con ácidos (clorhídrico, nítrico, perclórico) o mezclas de estos (Musa et al., 2018; Sastre et al., 2002).

Por otra parte, los análisis bromatológicos de alimentos permiten conocer la información nutricional en términos de proteína, fibras, grasas, humedad, cenizas y otros parámetros. Por ejemplo, para el uso de jarabes o jugos azucarados en medios de cultivo, es importante conocer el contenido de proteínas y otros sustratos fundamentales para el crecimiento del microorganismo. Esta caracterización, aporta información que permite determinar si es necesario suplementar estos jarabes con otros sustratos, durante la optimización del proceso de producción de biopolímeros como la CB.

6.3.2 Caracterización de películas de CB. La caracterización de biopolímeros sintetizados por microorganismos, requiere de análisis fisicoquímicos, microscópicos, termogravimétricos y espectroscópicos. Para el análisis morfológico, la microscopía electrónica de barrido es una de las técnicas más versátiles (Zhou et al., 2007), permite observar la estructura tridimensional del material y obtener imágenes de alta resolución a escalas micro y nanométricas. Adicionalmente, en la caracterización de biopolímeros es indispensable acceder a información de estabilidad térmica; el análisis termogravimétrico TGA proporciona información sobre procesos de transición, degradación, descomposición, oxidación y pérdida de componentes volátiles en función de la temperaturas (Corazzari et al., 2015; Thermal Characterization of Polymers., 2018).

Las películas de CB, pueden ser analizadas en cuanto a su naturaleza y cristalinidad mediante difracción de rayos X (DRX) y/o resonancia magnética nuclear RMN de estado sólido. DRX se

aplica principalmente a materiales cristalinos y se ha usado extensamente tanto para la identificación como para el análisis cuantitativo de muestras policristalinas (Lee et al., 2016), la información estructural se obtiene a partir de patrones de difracción. La RMN se aplica al estudio de la morfología, composición y cristalinidad de polímeros, pues provee información sobre la organización de cadenas poliméricas en los estados vítreos y semicristalinos. Además, permite el estudio de las propiedades físicas y mecánicas de estos biomateriales (Axelson et al., 1985).

7. Metodología

Para cumplir con los objetivos propuestos se siguió la siguiente metodología.

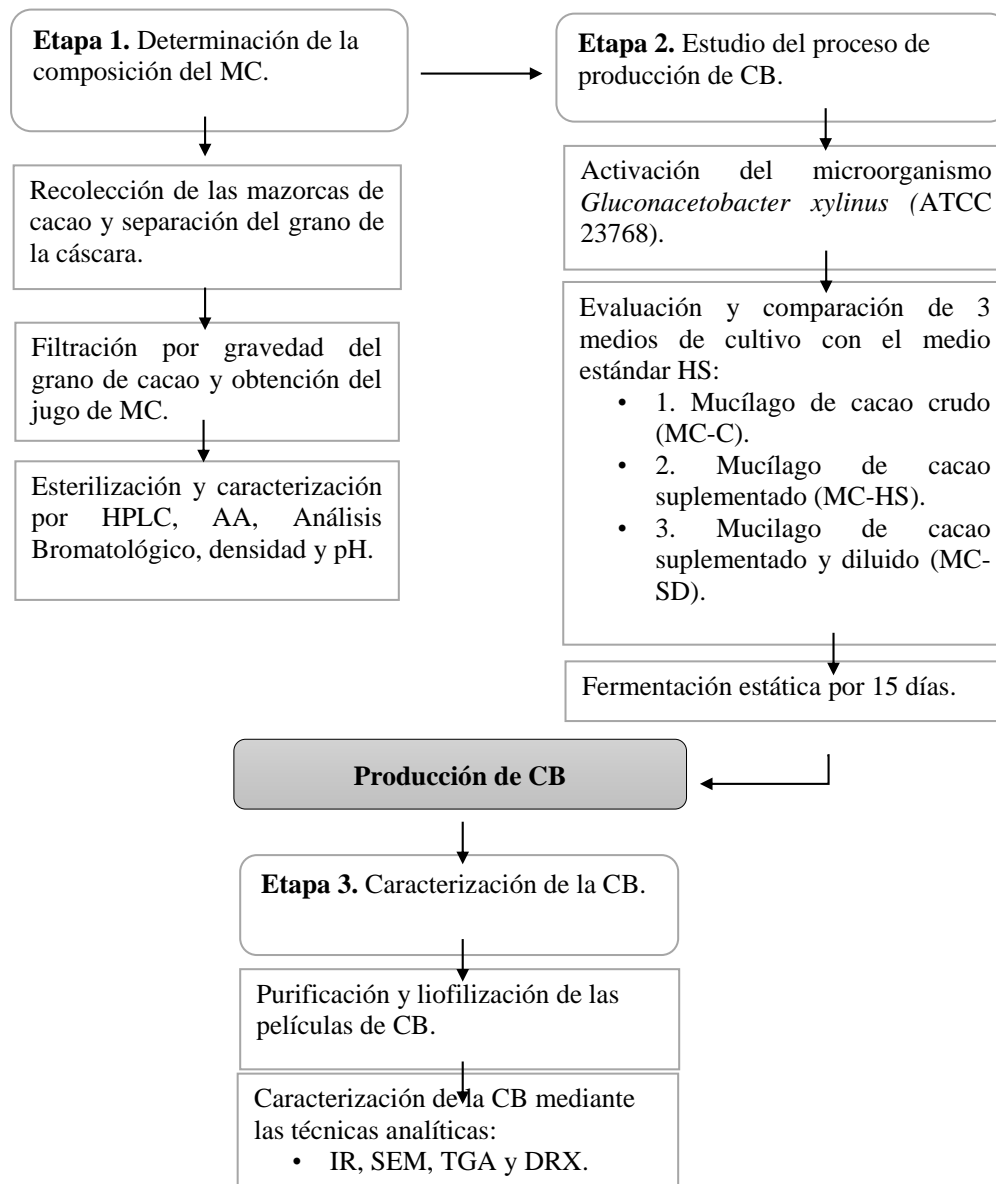


Figura 2. Diagrama de flujo.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Mazorca de cacao Las mazorcas de cacao (clon CCN-51) fueron colectadas en la finca San Ignacio, lote Rancho Quemado ubicado en San Vicente de Chucurí, municipio del Departamento de Santander, Colombia. El material vegetal fue llevado al laboratorio para su procesamiento.

7.1.2 Fuente de carbono Muestras de jugo de MC se colectaron mediante filtración por gravedad de los granos de cacao y se esterilizaron en autoclave por 20 min a una temperatura de 121 °C y 200 libras de presión, para su posterior almacenamiento a una temperatura de 3°C.

7.1.3 Caracterización del jugo de MC. La caracterización del jugo del mucílago para determinar su potencial como medio de cultivo - fuente de carbono - para la producción de CB, incluyó la medición de los siguientes parámetros: pH, densidad, ° Brix, contenido de azúcares simples y complejos, nitrógeno total, fenoles, cenizas, grasas, proteína y humedad. Estas mediciones se realizaron mediante los métodos descritos en la tabla 2.

Tabla 2.

Parámetros utilizados para la caracterización del jugo del MC.

Parámetros	Método/Equipo
Humedad	NTC 529
Nitrógeno Total	Standard Methods 4500-Norg-4500 NH ₃ B,C
° Brix	Refractómetro
pH	pH-metro
Densidad	Picnómetro

Parámetros	Método/Equipo
Azúcares, Sacarosa, Fructosa y Glucosa	HPLC-RID
Cenizas base húmeda	AOAC 7,009/84-94205/90
Potasio, Calcio, Sodio, Aluminio, Plomo y Cadmio.	Espectroscopia de Absorción Atómica (AA)

7.1.4 Cuantificación de azúcares en el MC por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la cuantificación de Azúcares totales (sacarosa, fructosa y glucosa), se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC (Agilent, serie 1100) con inyección automática acoplado al detector de índice de refracción RID Agilent Technologies serie 1200. Para el análisis se empleó una columna analítica (SUPELCOGEL C-610H, 30 cm L x 7.8 mm ID) con fase estacionaria de poliestireno- divenilbenceno (PS/DVB). Las condiciones del análisis fueron: fase móvil ácido fosfórico 0.1 % a un flujo de 0,6 mL/min, volumen de inyección de 20 µL con un tiempo de corrida de 18 min por muestra, la temperatura del horno fue de 30°C y la del detector RID de 35°C. La cuantificación se hizo con una curva de calibración externa, con patrones de (glucosa, fructosa y sacarosa) en concentraciones 1, 5, 10, 15, 20 g/L. Para identificar cualitativamente los componentes de la muestra, mediante sus tiempos de retención, se preparó una solución stock de 15 g/L de cada azúcar. Las muestras de jugo de mucílago se diluyeron en un factor 1/5 y se filtraron mediante microfiltros (FilterBIO, PDVF) con tamaño de poro de 0,45 µm, la fase móvil se preparó con agua desionizada y se filtró al vacío utilizando un filtro de membrana porosa de 0,45 µm. En el Anexo 1 se reportan los resultados del proceso de validación del método de cuantificación de azúcares mediante la técnica HPLC-RID.

7.1.5 Determinación de metales en el MC por Absorción atómica Para la determinación de metales esenciales como Na, K y Ca se utilizó un espectrómetro de Absorción Atómica (Thermo Electron, modelo S4). Para la determinación de Al se realizó una medición en el mismo equipo en modo emisión atómica y para el Cd, metal pesado, el análisis se hizo por lámpara de cátodo hueco. Las muestras en estado líquido fueron introducidas mediante capilar, para cuantificación se realizaron curvas de calibración de acuerdo con la información de la Tabla 3.

Tabla 3.

Curvas de calibración y modos de medición empleados para cada metal.

Elemento	Número de estándar	Concentraciones ppm	Modo	Lámpara
Ca	6	0-0,4-0,8- 1,2,-1,6 y 2,0	Absorción	Ca
K	5	0-0,3- 0,9- 1,2 y 1,5	Absorción	K
Pb	5	0- 5- 10-15- 20 y 25	Absorción	Pb
Na	6	0-0,2- 0,4- 0,6- 0,8- 1,0	Absorción	Na
Al	6	0- 10- 20-30- 40- 50	Emisión	Al
Cd	6	0- 0,5- 1,0- 1,5- 2,0 y 2,5	Absorción	Cátodo hueco

Las muestras de mucílago de cacao esterilizado y sin esterilizar, fueron liofilizadas previamente para la posterior digestión utilizando las metodologías reportadas para los análisis multielemental (Ca, Na, K y Al) y de los metales pesados (Cd y Pb) descritos en la literatura.⁸⁴ En

el proceso de preparación de las muestras se empleó agua doblemente desionizada, tratada con un purificador Milli-Q® Integra de MERCK y los filtros usados en la preparación de cada solución fueron de celulosa, con diámetro de poro de 125 mm, BOECO Germany.

7.1.6 Microorganismo Para el presente trabajo se utilizó la cepa *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23768), adquirida del *American Type Culture Collection*.

7.1.7 Pre-inóculo La reactivación de la cepa se realizó adicionando el microorganismo en 150 mL de medio de cultivo HS (Hestrin & Schramm: 20 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 1,159 g/L de ácido cítrico y 2,7 g/L Na₂HPO₄) en un Erlenmeyer de 250 mL usando un agitador orbital a 200 rpm por 4 días a 30 °C.

7.2 Producción de CB

7.2.1 Medios de cultivo Los medios de cultivo para inocular *G. xylinus*, fueron:

1. Medio de cultivo: Jugo de mucilago de cacao crudo (MC-C) jugo de MC esterilizado sin adición de otras sustancias.
2. Medio de cultivo: Jugo de mucilago de cacao suplementado (MC-S)
Este medio contiene MC-C con los siguientes suplementos: 5.00 g/L de peptona, 5.00 g/L de extracto de levadura, 1.16 g/L de ácido cítrico y 2.70 g de fosfato de sodio (Na₂HPO₄).
Adicionalmente, se ajustó el pH a 5.5 con solución de NaOH 3 N.
3. Medio de cultivo: Jugo de mucilago de cacao diluido y suplementado (MC-DS)

Este medio contiene MC-C diluido 1:1 con agua más los siguientes suplementos 5.00 g/L de peptona, 5.00 g/L de extracto de levadura, y 5.00 g/L de citrato de sodio $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$.

De igual forma, el pH se ajustó a 5.5 con solución de NaOH 3 N.

4. Medio de cultivo estándar HS.

Este medio estándar se utilizó como referencia para comparar la producción y el rendimiento de la CB con MC como medio de cultivo. Está compuesto por 20 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 1,159 g/L de ácido cítrico y 2,7 g/L Na_2HPO_4 .

La optimización del proceso de producción de CB, a nivel microbiológico, es realizado por la microbióloga Olga Lucía Sanabria, quién es estudiante de maestría en microbiología. La estudiante Sanabria suministró las películas crudas de CB (extraídas del proceso de fermentación aerobia de los medios mencionados anteriormente por el *Gluconacetobacter xylinus* -ATCC 23768).

7.2.2 Biosíntesis de la CB La biosíntesis de CB se llevó a cabo inoculando 30 mL de los diferentes medios de cultivo en biorreactores de 150 mL. Estos contenían una concentración del 10% (v/v) de pre-inóculo. Posteriormente se incubó a 30 °C durante 15 días sin agitación, en una incubadora (Mettler, IN750). Las películas fueron extraídas cada 24 h para su posterior proceso de limpieza. El medio sobrenadante fue monitoreado HPLC y se tomaron los respectivos valores del pH, las mediciones se realizaron por triplicado.

7.2.3 Limpieza de las películas de CB. Considerando que el microorganismo *Gluconacetobacter xylinus* produce y utiliza la película de celulosa como medio de soporte y protección, es necesario (una vez se termina la fermentación) realizar un proceso de limpieza de

la película con el fin de eliminar microorganismos adheridos y compuestos presentes en el medio de cultivo (azúcares remanentes, pigmentos, etc.). Con este fin se trataron las películas de CB con cuatro medios de limpieza tal y como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4.

Métodos de limpieza para las películas de CB según su aplicación final.

Método	Composición del agente de limpieza	Aplicaciones
Peróxido	Solución de peróxido de hidrógeno al 2% por 6 días.	Activación superficial de celulosa (oxidación) para producción de materiales funcionales.
Hipoclorito de sodio	Solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 4 días.	Activación superficial de celulosa (oxidación) para producción de materiales funcionales.
Ácido peracético	Solución de ácido peracético al 2% por 1 días	Esterilización para uso en alimentos.
Agua destilada	Agua destilada por 5 días	Esterilización para uso en alimentos y productos cosméticos.

7.3 Caracterización de la celulosa bacteriana (CB).

Antes de realizar los procesos de caracterización de la CB, las muestras se secaron en un liofilizador LABCONCO operado a 0,080 mbar y -87°C por 72 h.

7.3.1 Espectroscopía Infrarroja (FT-IR) Con el fin de determinar las vibraciones características de los grupos funcionales de la celulosa presentes en CB cruda, y los posibles cambios estructurales producto de los diferentes tratamientos de limpieza, se realizó análisis FT-IR con un espectrómetro infrarrojo (Bruker, tensor 27) en modo reflectancia total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*).

7.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) Para analizar la morfología de las películas de CB se realizaron análisis por microscopía electrónica de barrido. Para esto, se empleó un microscopio electrónico QUANTA FEG (Field Emission Gun) 650 (FEI) en modo de alto vacío con un voltaje de aceleración de 15 kV, acoplado con un detector de electrones secundarios, Everhart Thornley Detector (ETD) y retro dispersados, Back Scattered Electron Detector (BSED). Debido a que la celulosa bacteriana no es un material conductor, se realizó un recubrimiento con oro utilizando el equipo Quorum 150ES. La composición elemental, semicuantitativa, de las películas de CB se realizó mediante EDS (spectroscopía de energía dispersa) utilizando un aditamento EDAX APOLO X con una resolución de 126.1 eV (en. Mn $K\alpha$).

7.3.3 Difracción de Rayos X (DRX). La cristalinidad de la CB, tamaño del cristalito y determinación del grupo cristalino se realizó por DRX con un difractómetro de polvo marca BRUKER modelo D8 DISCOVER con geometría DaVinci, fuente de radiación $CuK\alpha_1$ (40 kV and 40 mA) y un detector de área VANTEC-500. Las muestras se depositaron directamente sobre la plataforma de la cuna Euleriana para medición. Las condiciones de las mediciones fueron las siguientes: voltaje 40 kV, corriente 40 mA, micro rendija de divergencia 1 mm, colimador 1 mm,

rango de medición 15-35° 2 Theta en dos intervalos, incremento de intervalo 20° 2Theta, tipo de barrido a pasos y tiempo de medición 720 segundos.

Usando la ecuación de Scherrer, se calculó el tamaño aparente del cristalito (ACS) con el valor obtenido del respectivo FWHM a 2θ. Adicionalmente se realizaron cálculos para determinar el porcentaje de cristalinidad de la película utilizando la ecuación 1.

$$\% \text{ Cristalinidad} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

I_{110} : es la intensidad del pico cristalino en el máximo 2Theta entre 22° y 23° para celulosa I.

I_{am} : Intensidad de la línea base a 2θ aproximadamente a 17.7 °.

7.3.4 Análisis Termo gravimétrico (TGA) Las propiedades térmicas de la CB fueron estudiadas utilizando una balanza termogravimétrica marca STA 449 F5 JUPITER, modelo NETZCH. Las condiciones de análisis incluyen: rampa de temperatura de 10 °C/min hasta 500°C en atmósfera de Nitrógeno, con un flujo de gas de 20mL/min. Las muestras fueron pesadas en un crisol de Rh-Pt y fueron liofilizadas previamente al análisis.

8. Resultados

8.1 Caracterización del mucílago de cacao.

Todos los resultados reportados en esta sección son en base húmeda. En la Figura 2 se muestra la apariencia del jugo de mucílago de cacao crudo y esterilizado. El cambio de color se debe a la producción de especies como furfurales y caramelinias, resultados de descomposición de azúcares a alta temperatura.



Figura 3. Jugo de mucílago de cacao esterilizado y crudo.

En la Tabla 5 se describe en detalle la composición del jugo de mucílago de cacao. Los valores reportados corresponden al promedio de los resultados obtenidos para seis muestras de jugos de

mucílago de cacao provenientes de diferentes lotes de CCN51 colectados mensualmente durante el periodo de marzo a agosto de 2018. El jugo de mucílago de cacao es un jarabe glucosado, compuesto por agua (84%) y azúcares totales (glucosa, fructosa y sacarosa) en concentraciones cercanas a 18 y 15 ° Brix para el material esterilizado y sin esterilizar, respectivamente. El jugo de mucílago contiene 0.4 % de cenizas, asociadas a la materia inorgánica remanente (minerales); además, el nitrógeno total está presente en 500 mg/L, mientras el porcentaje de proteína es cercano al 0.3%.

Tabla 5.

Composición del jugo de mucílago de cacao (Clon CCN51).

Parámetros	Jugo de Mucílago	
	Crudo	Esterilizado
Humedad (%)	84,71 ± 0,76	83,83 ± 0,78
Sólidos totales (° Brix)	15,32 ± 1,33	17,55 ± 0,49
Nitrógeno total (mg/L)	518,47 ± 56,18	513,8 ± 76,13
Fenoles totales (mg/L)	0,20 ± 0,15	0,21 ± 0,13
pH 24,2 (°C)	3,78 ± 0,09	3,77 ± 0,01
Densidad (g/mL)	1,05 ± 0,02	1,07 ± 0,01
Proteína (% p/p)	0,29 ± 0,06	0,3 ± 0,02
Ceniza(% p/p)	0,37 ± 0,10	0,40 ± 0,16
Azúcares totales (g/L)	151,99± 8,87	178,08± 5,86
Glucosa (g/L)	60,60 ± 8,87	86,95 ± 5,86
Fructosa (g/L)	80,68 ± 3,35	90,86 ± 5,46
Sacarosa (g/L)	10,71 ± 4,13	0,27 ± 0,12
Calcio (mg/ kg)	59,88 ± 10,31	57,41 ± 8,58
Potasio (mg/ kg)	2679 ± 457,5	2698 ± 331,4
Sodio (mg/ kg)	1,25 ± 0,55	1,83 ± 1,08
Aluminio (mg/ kg)	4,41 ± 2,72	6,65 ± 1,18

Parámetros	Jugo de Mucílago	
	Crudo	Esterilizado
Cadmio (mg/ kg)	No detectado	No detectado
Plomo (mg/ kg)	No detectado	No detectado

Entre los micronutrientes metálicos (Ca, K, Na) se destaca el K (2,6 g/kg); en comparación con el zumo de otras frutas el jugo de mucílago de cacao presenta un alto contenido de potasio mucho más que en la manzana, la naranja y el mango (Musa et al., 2018). El jugo de mucílago de cacao es bajo en sodio, lo que indica que el consumo de este jugo no es nocivo para la salud, pues según la Organización Mundial de la Salud (WHO) es necesario que los alimentos tengan bajos contenidos de sodio para evitar impactos en el sistema cardiovascular (Steffensen et al., 2018).

El contenido de azúcares totales en el jugo de mucílago es de 152,0 y 178,1 g/L para el crudo y el esterilizado. En este último la fructosa y glucosa son los componentes mayoritarios (90,9 y 87,0 g/L, respectivamente) y la sacarosa es minoritaria (0,27 g/L). En el Anexo 1 se reportan los resultados del proceso de validación del método de cuantificación de azúcares mediante la técnica HPLC-RID. El pH ácido del jugo (3,77) promueve la hidrólisis de disacáridos (sacarosa) y oligosacáridos durante el proceso de esterilización (120° C). Esto explica el aumento en el porcentaje de glucosa y fructosa y la disminución de la sacarosa cuando se compara el contenido de estos azúcares en el jugo crudo y el esterilizado. Finalmente, el jugo de mucílago de cacao no contiene metales pesados (Cd y Pb).

La composición fisicoquímica del jugo de mucílago proveniente del clon CCN-51, estudiado en este trabajo, es similar a los pocos reportes encontrados en la literatura, particularmente en términos de humedad y sólidos totales. Por ejemplo, Balladores et al, reportan en el jarabe glucosado del cacao valores de ° Brix superiores a 19, porcentaje de azúcares totales de 12,33%,

con fructosa en mayor proporción (4,42%), seguida por la glucosa (2,15%) y finalmente sacarosa (2,13%)⁸⁷. Por otra parte, Anvoh et al, reportan 16 ° Brix, humedad de 85, cenizas de 3,76%, y contenidos de glucosa del 21,4% y sacarosa del 2,13%; estos mismos autores reportan contenidos de 171,5 mg/L de calcio, 30,5 mg de sodio y 950 mg/L de potasio⁸⁸. Finalmente, (Gyedu et al 2001), reportan un porcentaje de azúcares totales del 7,5% mientras (Adams et. al 1982) encuentran 7,38% de azúcares totales.

8.2 Variaciones en la composición del medio de cultivo durante la biosíntesis de CB.

La biosíntesis de CB se realizó utilizando tres medios de cultivo. El jugo de mucílago de cacao crudo (MC), el jugo de mucílago de cacao suplementado (MC-S) y el jugo de mucilago de cacao diluido (1:1) y suplementado (MC-DS) como se describió en el apartado 8.3.1. Estos tres medios de cultivo fueron comparados con el medio estándar HS, descrito en el apartado 8.3.1. Las variables que se monitorearon durante el proceso de biosíntesis de CB fueron la concentración de azúcares, nitrógeno total y el pH. La temperatura y el tiempo de incubación fueron constantes, 30 °C y 15 días respectivamente. La Tabla 6 describe la composición de los medios de cultivos utilizados.

Tabla 6.

Composición de los cuatro medios de cultivo utilizados.

Componentes	Medios de cultivo (% p/p)			
	MC-C	MC-S	MC-DS	HS
Mucílago de cacao	100	98,61	48,61	-
Glucosa	*	*	*	2
Peptona	-	0,5	0,5	0,5

Componentes	Medios de cultivo (% p/p)			
	MC-C	MC-S	MC-DS	HS
Extracto de levadura	-	0,5	0,5	0,5
NaH ₂ PO ₄	-	0,27	0,27	0,27
C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	-	0,12	0,12	0,12

*La glucosa para los medios MC-C, MC-S y MC-DS es la que se encuentra en la composición del jugo de mucílago de cacao (Tabla 5) y corresponde aproximadamente a $86,95 \pm 5,86$ g/L.

8.3 Producción de CB vs consumo de azúcares.

La producción de CB incluye las etapas de activación y siembra del inóculo en el medio de cultivo, incubación, limpieza y esterilización. La Figura 3, resume el proceso que se aplicó a todos los medios descritos en la sección experimental.



Figura 4. Proceso de producción de CB por *Gluconacetobacter Xylinum*.

En la Figura 4, se observa la apariencia de las películas de CB obtenidas después de quince días de fermentación estática a 30 °C.

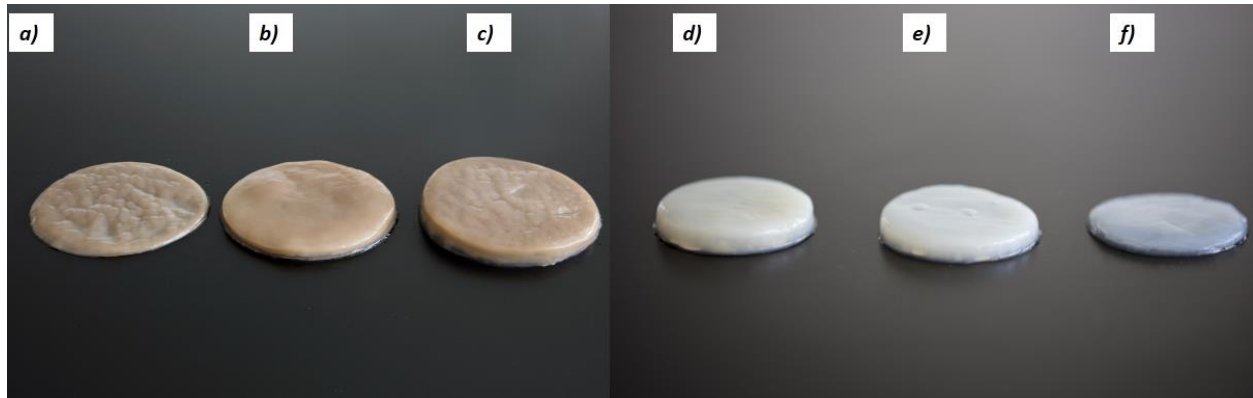


Figura 5. Películas de celulosa bacteriana con 15 días de incubación provenientes de diferentes medios de cultivo. a) MC-C, b) MC-S, c) MC-DS, (d) MC-DS limpia, (e) MC-S limpia y (f) MC-C limpia.

Debido a que las películas producidas con el medio estándar HS fueron muy delgadas, no fue posible extraerlas para su posterior comparación visual con las demás obtenidas del MC.



Figura 6. Película obtenida del medio HS, luego de 15 días de incubación.

Es evidente que el uso del jugo de MC como medio de cultivo permite obtener películas de CB de mayor grosor que las obtenidas con el medio estándar (HS). No obstante, el grosor de las películas no se relaciona con la producción de CB, como veremos más adelante. En la Tabla 7 se muestra información relacionada con el proceso de biosíntesis de CB después de 15 días de incubación de la cepa *Gluconacetobacter Xylinum* utilizando cuatro medios de cultivo.

Tabla 7.

Resultados de los medios de cultivo utilizados en la producción de CB después de 15 días de incubación.

Parámetros/Medio de cultivo	HS	MC-C	MC-S	MC-DS
Humedad de películas de CB (%)	95,66±0,95	97,21±0,49	90,95±0,96	99,03±0,31
Concentración inicial de azúcares totales (g/L)	19,90 ± 0, 10	158,26 ± 7,20	143,11 ± 8,03	59,39 ± 8,72
Concentración final de azúcares totales (g/L)	0,45± 0, 02	78,46± 3,41	53,43 ± 1,92	18,66± 2,06
Producción (g/L)	4,20±1,34	0,43 ± 0, 16	14,06 ± 0, 69	13,13 ± 1, 09
Rendimiento (%)	27,50±0,25	0,58±0,35	16,24±3,27	33,28±9,86
Grosor (mm)	<1	2,37±0,58	10,00± 00	11,67 ± 0,58
pH medio inicial	5,38±0,04	3,35 ± 0,31	5,5±0,01	5,5±0,01
pH medio final	5,36±0,06	2,59 ± 0,01	3,89 ± 0,01	4,60 ± 0,01

Para evaluar el desempeño de los medios de cultivo los parámetros de producción y rendimiento de la biosíntesis son fundamentales. La producción del biopolímero indica la cantidad de CB obtenida en el bio-reactor durante los 15 días de fermentación. Este valor se expresa como la relación entre el peso seco de la CB por litro de medio de cultivo, y permite comparar la eficiencia del medio utilizado con otros reportados en la literatura. Por otro lado, el rendimiento indica la relación que existe entre el peso seco obtenido de las películas de CB (g) y el peso en gramos de fuente de carbono (azúcares totales) consumidos (g). Este parámetro ayuda a determinar

el aprovechamiento de las fuentes de carbono que *Gluconoacetobacter Xylynus* consume, para la posterior optimización de las condiciones del medio de cultivo. A continuación, se muestran las fórmulas que se usan para el cálculo de la producción y rendimiento (Mohammadkazemi et al., 2015).

$$\text{Producción} = \frac{\text{Peso seco de la membrana de CB}}{1 \text{ L de medio de cultivo}}$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso seco de la membrana de CB (g)}}{\text{Peso de azúcares totales consumidos (g)}} * 100\%$$

Con base a estos parámetros (producción y rendimiento) se puede evaluar el desempeño de los cuatro medios utilizados en este trabajo. Iniciando con la producción, con los datos de la Tabla 7 se puede decir que usando MC-S y MC-DS como medios de cultivo se obtuvo la mayor producción de CB ($14,06 \pm 0,69$ g/L y $13,13 \pm 1,09$ g/L). En segundo lugar, se encuentra el medio estándar HS con una producción de ($4,20 \pm 1,34$ g/L) y la menor producción observada en este trabajo, se obtuvo con el medio MC-C con un valor de ($0,43 \pm 0,16$ g/L). En la Tabla 7, se observa que el MC-C contiene altas concentraciones de azúcares totales (178,1 g/L) y N ($513,8 \pm 76,13$ mg N/L) y a primera vista es difícil determinar si la baja producción de CB con este medio está relacionada con la fuente de nitrógeno, que a pesar de ser abundante no está disponible. Por otro lado, el medio HS se desempeña un poco mejor que el MC-C. En este medio, la fuente de carbono no es tan abundante como en el MC-C (glucosa, 20 g/L), sin embargo, hay suplemento de N como extracto de levadura y peptona (5g/L). Lo que indica que el N es fundamental en la producción de CB. Este efecto se ilustra mejor con el aumento de la producción de CB con los medios MC-S y MC-DS, en los que existe un suplemento de extracto de levadura (5 g/L) y peptona (5g/L) como fuente de N. En estos medios, donde se produce la misma cantidad de CB por litro de medio de cultivo, la fuente de carbono está presente en concentraciones de $143,11 \pm 8,03$ y $59,39$

$\pm 8,72$ g/L de azúcares totales, para el MC-S y el MC-DS respectivamente, lo cual indica que la concentración de azúcares no es la responsable del aumento en la producción de CB sino la disponibilidad del N. Sin embargo, el medio MC-DS también se aditiva con NaH_2PO_4 y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ utilizados como suplementos que optimizan la producción de CB. Adicionalmente, en los medios MC-S y MC-DS se observa un aumento del pH inicial hasta 5,5 (en comparación con el 3,35 del MC-C).

En la literatura se reportan factores como el pH, concentración de azúcares, aireación y fuente de N como fundamentales en la producción de CB. Por ejemplo, el *Acetobacter Xylinum* mejora la producción de CB con el uso de fuentes de N como peptona, caseína hidrolizada, sulfato de amonio y/o glutamato de sodio en concentraciones de (5 g/L) (Ramana et al., 2000). De igual forma, también se reporta que la producción de CB aumenta en valores de pH situados entre el rango de 4 a 6 (Hwang et al., 1999; Jagannath et al., 2008). También, se ha reportado que las concentraciones de fuentes de carbono óptimas para este tipo de microorganismos, se sitúan entre (60 y 70 g/L). Ya que en concentraciones superiores a los 70 g/L de glucosa, sacarosa o manitol como fuentes de carbono, pueden causar estrés en la bacteria (Ramana et al., 2000). Por estas razones, en este trabajo se observa que la producción mejora para los medios de cultivo MC-DS y MC-S.

Por otra parte, para determinar el grado de aprovechamiento de la fuente de carbono en el tiempo de biosíntesis de CB, se compararon los rendimientos obtenidos con los cuatro medios. En la Tabla 7, se observa que con el medio de cultivo MC-DS se obtuvo el mayor rendimiento. El MC-DS presenta una baja concentración de azúcares totales iniciales ($59,39 \pm 8,72$ g/L) con los cuales el microorganismo produjo $13,13 \pm 1,09$ g/L de CB lo que equivale a un rendimiento del 33%. El medio HS presenta rendimiento del 27%, seguido por el MC-S con 16 % y por el MC-C

con 0,58%. Estos resultados permiten concluir que el uso del MC diluido resulta en aumento de los rendimientos de producción de CB.

En adición a los datos consignados en la Tabla 7, el monitoreo permanente de la variación composicional de los medios de cultivo (mediante medición de la composición de azúcares por HPLC y pH) nos permitió determinar la dinámica del consumo de la fuente de carbono durante la biosíntesis de la CB utilizando los cuatro medios investigados. Las Figuras 6 a 9 muestran la variación en la composición del medio de cultivo, así como el monitoreo de la producción de CB durante 15 días de proceso.

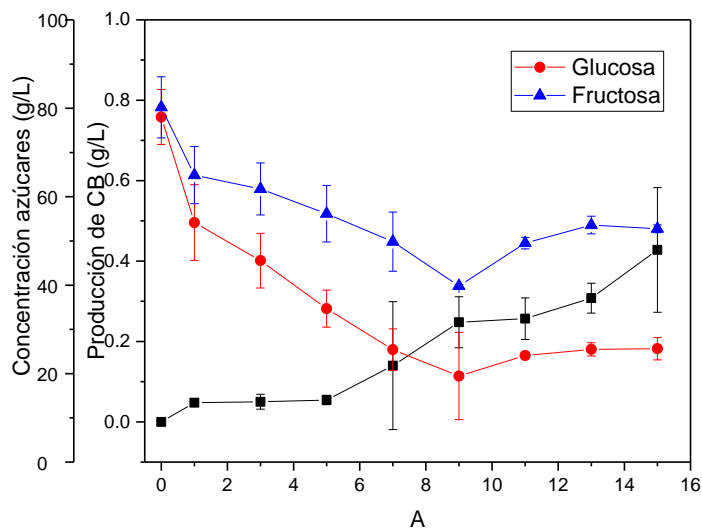


Figura 7. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo MC-C.

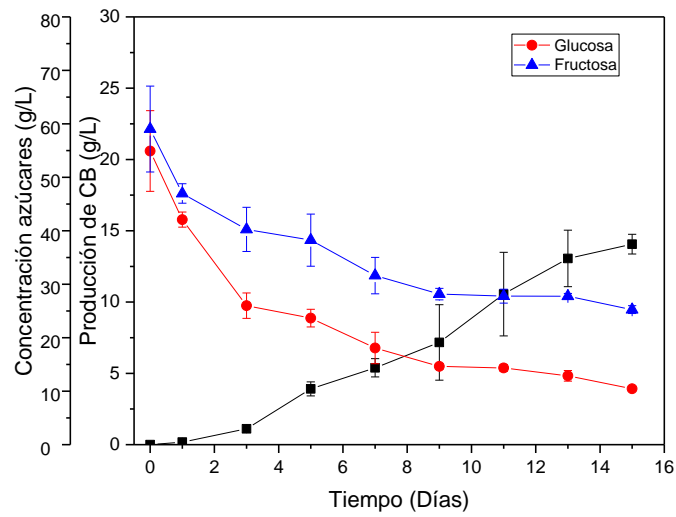


Figura 8. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo de jugo de MC-S.

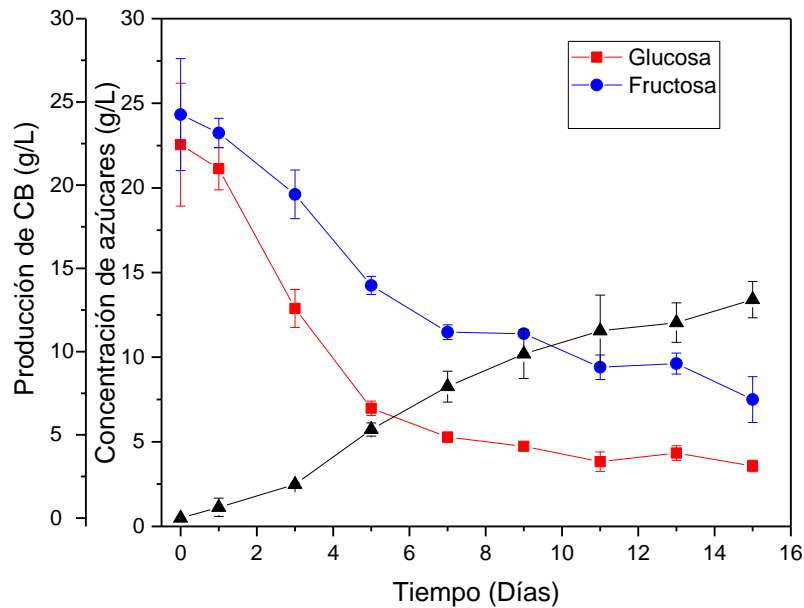


Figura 9. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en el tiempo para el medio de cultivo de jugo de MC-DS.

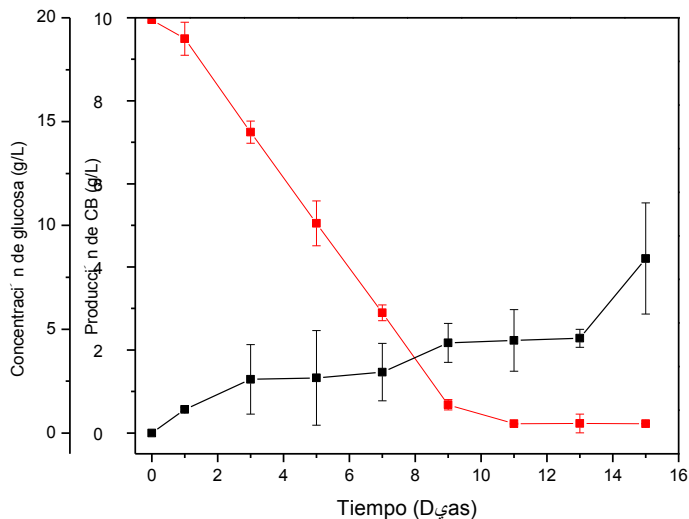


Figura 10. Monitoreo de producción de CB respecto al consumo de azúcar (glucosa) en el tiempo para el medio de cultivo HS.

Las Figuras 6, 7,8 y 9 permiten determinar los porcentajes de azúcares consumidos en el proceso de biosíntesis. Debido al pH ácido y a los parámetros de presión y temperatura que se usan en el proceso de esterilización, no fue posible detectar sacarosa en el medio de MC-C durante los 15 días de producción de CB. Por ejemplo, para el medio de MC-C el microorganismo consume principalmente glucosa (67%) y fructosa (33%). Por otro lado, en el medio de MC-S se consume 81% de la glucosa del medio, 57% de fructosa. Para el medio MC-DS, el consumo de azúcares corresponde a 84% de glucosa, 69% de fructosa. Finalmente, para el medio estándar H-S el microorganismo consume 98% de la glucosa presente.

Las figuras 6, 7 y 8 demuestran claramente que el *Gluconoacetobacter Xylinus* consume preferencialmente glucosa. Este comportamiento es netamente energético, pues el consumo de otro tipo de carbohidrato requiere gasto extra de energía para transformarlo metabólicamente en glucosa (que es la unidad básica del polímero de celulosa). Por otra parte, si la fuente de carbono

es compleja (e.g. oligosacáridos) también se necesitaría energía extra para su degradación y transformación en celulosa (Mikkelsen et al., 2009).

Por otro lado, cuando se comparan las Figuras 6, 7 y 8 se observa que el uso de una fuente adicional de N (peptona) es fundamental para la producción de CB, ya que con MC-C se obtienen $0,43 \pm 0,16$ g/L, mientras que con MC-DS se alcanzan $14,06 \pm 0,69$ g/L y con MC-S $13,13 \pm 1,09$ g/L; es decir, la producción de CB aumenta 30 veces cuando se compara con el mucilago crudo con el suplementado.

Lo que es también interesante es que cuando se comparan las Figuras 7 y 8 (medios MC-S y MC-DS), se observa que cuando se aditiva el medio con peptona y extracto de levadura (fuente de N) aun con una variación grande en la concentración de azúcares ($143,11 \pm 8,03$ g/L para MC-S y $59,39 \pm 8,72$ g/L para MC-DS) se obtienen valores similares en la producción de CB: $14,06 \pm 0,69$ g/L y $13,13 \pm 1,09$ respectivamente.

Con el exudado de MC-S y MC-DS se obtuvo la mayor producción de CB por la cepa *Gluconoacetobacter Xylinus*, en la Tabla 8 se compara la producción de CB con otros medios de cultivo en los cuales se utilizan fuentes de carbono renovables y/o puras.

Tabla 8.

Rendimiento de la producción de CB con diferentes fuentes de carbono.

Medio de cultivo	Fuente de carbono	Rendimiento (g/L)	Referencias
Melaza de caña de azúcar suplementada con extracto de levadura (4 g/L) y etanol (20 g/L).	Azúcares totales de la caña de azúcar (69,5 °Brix)+ 30 g de glucosa.	4,01	(Machado et al., 2018)

Medio de cultivo	Fuente de carbono	Rendimiento (g/L)	Referencias
Levadura de cerveza sin ningún suplemento.	Azúcares totales presentes en la bebida.	7,02	(Lin et al., 2014)
Licor de mazorca suplementado con sales: MgSO ₄ .7H ₂ O y (NH ₄) ₂ SO ₄ , FeSO ₄ .7H ₂ O, entre otras.	40 g/L de fructosa	5,30	(Bae et al., 2004)
Jugo de naranja suplementado con fuente de N y aditivos de HS.	Azúcares totales presentes en el jugo de naranja (7,3%)	6,9	(Kurosumi et al., 2009)
Jugo de uva suplementado con fuente de N y aditivos de HS.	Azúcares totales presentes en el jugo de uva (10,3%)	8,8	(Kurosumi et al., 2009)
Jugo de manzana suplementado con fuente de N y aditivos de HS.	Azúcares totales presentes en el jugo de manzana (8,5%)	6,1	(Kurosumi et al., 2009)
Licor de mazorca suplementado con Agar y sales(MgSO ₄ .7H ₂ O, (NH ₄) ₂ SO ₄ , FeSO ₄ .7H ₂ O, entre otras)	40 g/L de fructosa	12,8	(Bae et al., 2004)
Solución de glucosa (5%), suplementos y aditivos medio HS.	Glucosa (5%)	40,35	(Moosavi-Nasab et al., 2011)
Suplementado con té verde 3 g/L y aditivos del medio HS.	Manitol (20 g/L)	14.,10	(Nguyen et al., 2008)

Medio de cultivo	Fuente de carbono	Rendimiento (g/L)	Referencias
Jugo de MC suplementado con 5,00 g/L de peptona, 5,00 g/L de extracto de levadura, 1,16 g/L de ácido cítrico y 2,70 g de fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄).	Azúcares totales presentes en el jugo de MC (18%)	14,06	(Este trabajo)

8.4 Caracterización de celulosa bacteriana (CB).

A continuación, se discuten los resultados de la caracterización de películas de CB, se muestran en particular los materiales tratados con NaClO a manera de ilustración pues las películas tratadas con los demás medios (H₂O₂ y ácido peracético) mostraron resultados similares.

8.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) La Figura 10a muestra la CB tratada con NaClO en la cual se observa que este método de limpieza elimina totalmente la coloración que adquiere la película como resultado del contacto con el medio de cultivo. Adicionalmente, el NaClO (así como el H₂O₂ y el ácido peracético) se utilizan para eliminar residuos de microorganismos que quedan adheridos a la película. En las Figuras 10b y 10c, se observan las caras superior e inferior de una película de CB donde se observan redes homogéneas de nanofibras del polímero con diámetros entre 20 y 50 nm y longitudes micrométricas. Diferentes autores reportan estudios morfológicos donde se observan estructuras similares a las de la CB de la Figura 10, con fuentes de carbono convencionales como azúcares simples, por ejemplo, glucosa, fructosa, disacáridos como sacarosa (Yim et al., 2017; Tang et al., 2010; Vandamme et al., 1998; Jung et

al., 2010; Mohammadkazemi et al., 2015) y a partir de residuos agroindustriales como la cáscara de piña (Li et al., 2015; Czaja et al., 2007; Zhu et al., 2014).

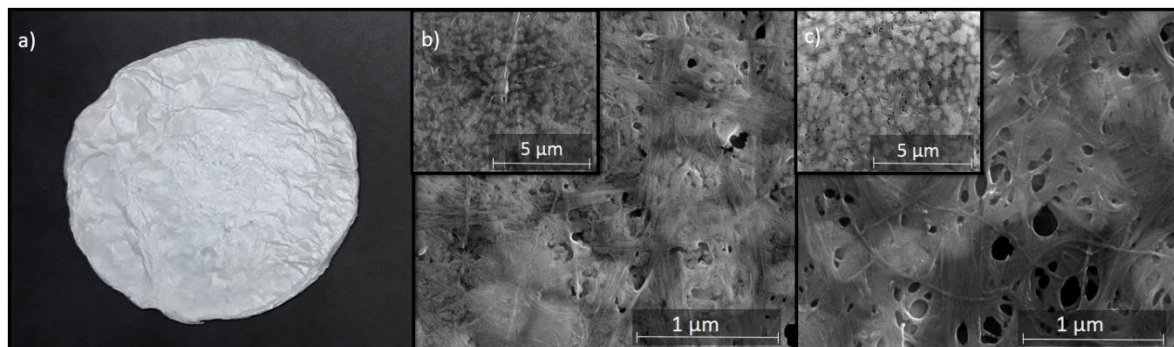


Figura 11. Imágenes ópticas y micrografías SEM de CB: a) tratada con NaClO y liofilizada; b) cara superior de la película; c) cara inferior.

El microorganismo *Gluconacetobacter Xylinus* biosintetiza el polímero en forma de redes compactas y robustas compuestas por nanofibras tejidas unidireccionalmente. Por esta razón, en las micrografías se observan porosidades como resultado de la organización aleatoria de las fibrillas. Estas porosidades, confieren a las películas de CB la capacidad de absorber y retener agua, una característica esencial para la industria biomédica en el área de apósitos para la piel. La CB coadyuva en la regeneración de tejidos y la restauración de vasos sanguíneos pues es biocompatible (Picheth et al., 2017).

En la figura 11b, se observa la sección intermedia de la película de CB. Las fibras se encuentran más separadas entre sí y su diámetro se encuentra entre los 20 a 60 nm. En la literatura se reportan en el rango de 10-100 nm (Moosavi-Nasab et al., 2011; Nguyen et al., 2008; Yim et al., 2017; Tang et al., 2010). Finalmente, en la figura 11a, se observó que, con todos los medios de limpieza utilizados, se remueven las células del microorganismo y/o cualquier otra impureza.

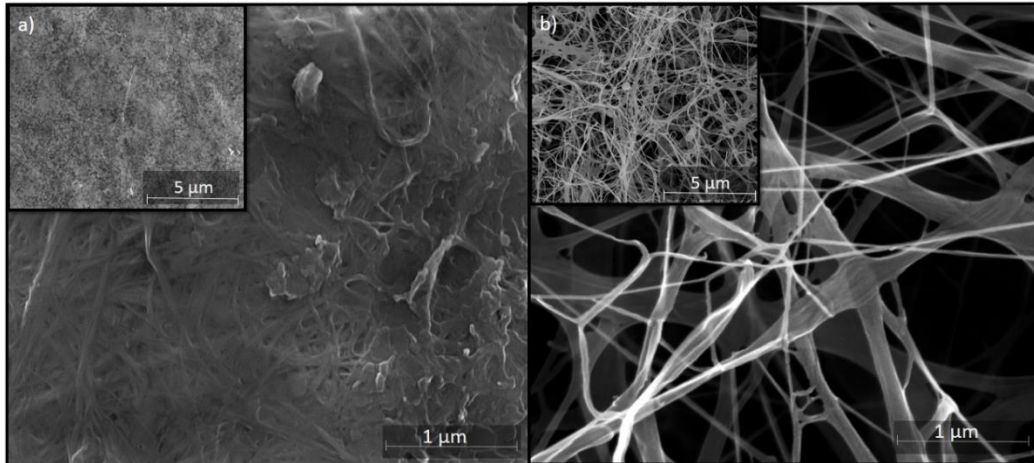


Figura 12. Imágenes SEM de la celulosa bacteriana. A) CB limpiada con ácido peracético previamente liofilizada. B) Capa intermedia de una película de CB.

8.4.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-AR). La Figura 12 muestra los espectros IR de la CB tratada con NaClO y sin limpiar. Pueden observarse las señales características de la CB, como por ejemplo la banda ancha en la región de los $3313\text{-}3341\text{ cm}^{-1}$ típica del estiramiento de los grupos hidroxilo (O-H), a $\sim 2925\text{-}2894\text{ cm}^{-1}$ la vibración de estiramiento C-H, a $\sim 1436\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$ la vibración de flexión C-H y $1054\text{-}1048\text{ cm}^{-1}$ para C-O-C y C-O-H vibración de estiramiento. Aproximadamente a $1620\text{-}1638\text{ cm}^{-1}$ aparece una banda no característica de la CB, que se atribuye al grupo carbonilamida que puede provenir de proteínas y células bacterianas que quedaron en la película de CB sin limpiar y las que no se eliminaron por completo después del tratamiento con NaClO de la membrana CB (Picheth et al., 2017; Backdahl et al., 2006). Por lo tanto, la estructura de la CB producida, no presenta diferencias apreciables con la reportadas en la literatura.

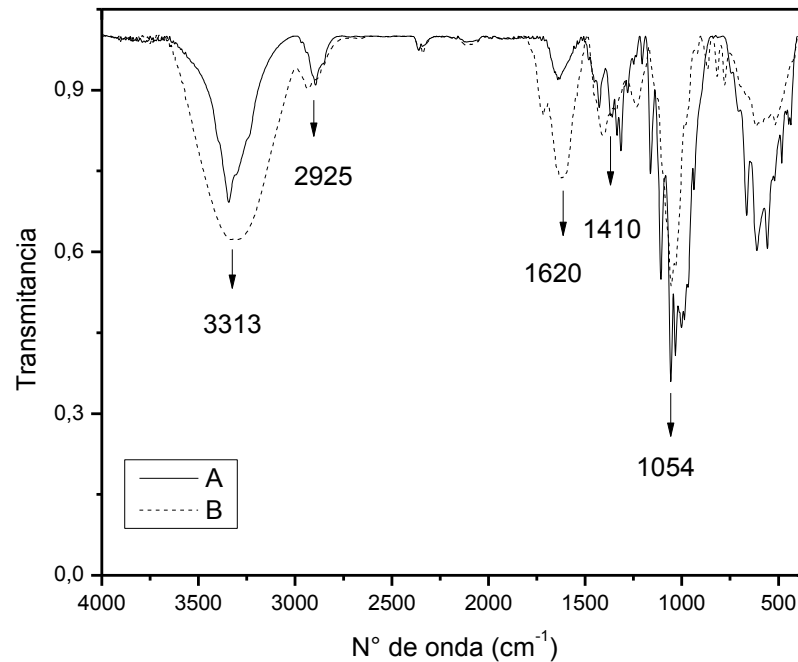


Figura 13. Espectro FT-IR de dos películas de celulosa bacteriana, (A) CB purificada con NaClO, (B) CB sin proceso de limpieza.

8.4.3 Difracción de rayos X (DRX). En la figura 13 se evidencia el perfil de difracción de la CB. Los tres picos característicos de la CB correspondientes a los planos cristalográficos: 1 0 0, 0 1 0 y 1 1 0, situados en los ángulos 2θ : 14.27, 16.73 y 22.52 respectivamente, coinciden con la información consignada en el Centro Internacional de Datos de Difracción (JCPDS) según el archivo N° 50-2241 y es característico de un perfil típico de celulosa I (Sun et al., 2006; Czaja et al., 2004; Mikkelsen et al., 2009).

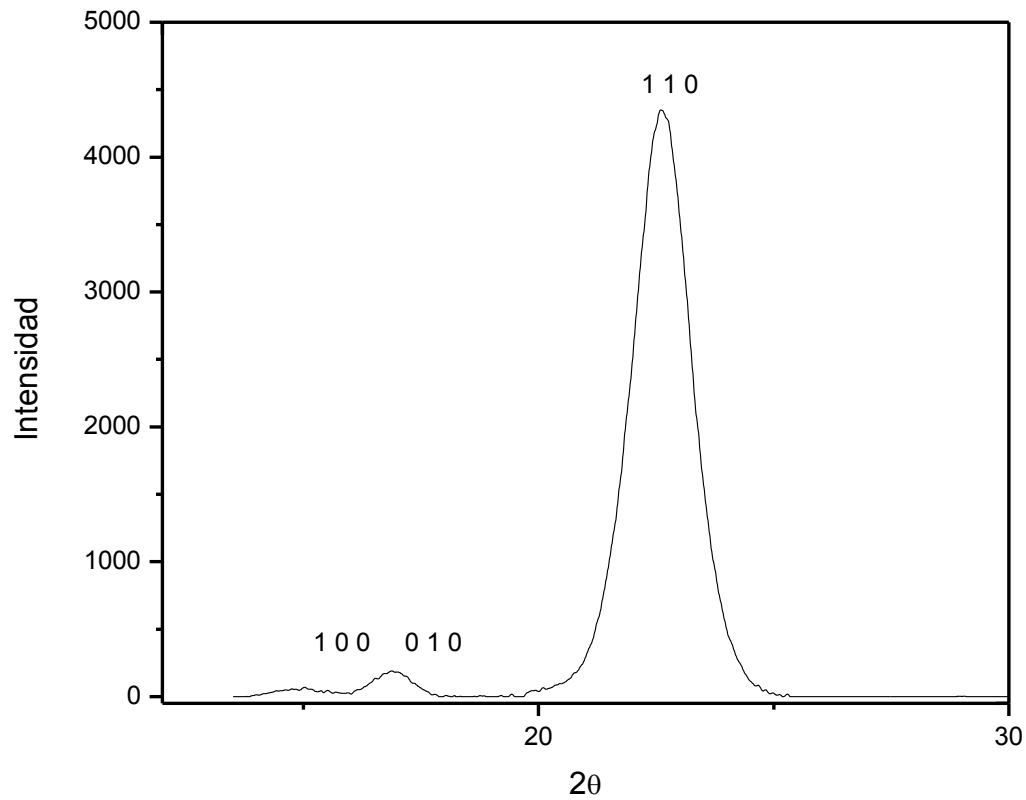


Figura 14. Difractograma de la CB limpiada con NaClO.

Así mismo, DRX nos permite obtener el índice de cristalinidad y el tamaño del cristalito como se muestra en la tabla 9. El índice de cristalinidad de la CB producida a partir de mucílago de cacao es de 86%, que es superior al de materiales similares obtenidos a partir de otras fuentes de carbono convencionales y medios de cultivo como se observa en la tabla 10.

Tabla 9.

Cristalinidad y tamaño del cristalito de la CB limpiada con NaClO.

Porcentaje de cristalinidad (%)	Tamaño del cristalito (nm)
86,5	8,26

Tabla 10.

Comparación del porcentaje de cristalinidad y tamaño del cristalino con diferentes fuentes de carbono implementadas en la producción de CB.

Fuente de Carbono	% de Cristalinidad	Referencia
Manitol	66	(Gomes et al., 2013)
Extractos de arroz suplementado con glucosa	56	(Shezad et al., 2010)
Azúcares totales del bagazo de Uva	74	(Mohammadkazemi et al., 2015)
Azúcares totales de la melaza de caña de azúcar.	67	(Goelzer et al., 2009)
Glicerol obtenido del biodiesel	76	(Vazquez et al., 2012)
Mucílago de cacao suplementado	86,5	Este trabajo

8.4.4 Análisis Termogravimétrico del polímero (TGA). La Figura 14 muestra la estabilidad térmica de la CB. La degradación térmica de la celulosa comprende un grupo de reacciones endotérmicas relacionadas con la deshidratación, despolimerización, oxidación, descarboxilación y procesos de trans glicosilación. Inicialmente se observa un pequeño cambio de peso, entre los 30 y 140 °C, de 7,87% atribuido a la reacción de deshidratación (Ovalle-Serrano et al., 2018). El segundo evento ocurre alrededor de los 270-450 °C, donde inicia la degradación de la muestra en una pérdida de peso significativa del 64,05%. Esto está asociado a la reacción de depolimerización que conlleva a la ruptura del enlace en el esqueleto del polímero (escisión de la cadena) que puede ocurrir en los extremos de la cadena o en posiciones aleatorias en la cadena. También pueden ocurrir en esta etapa reacciones de descomposición de las unidades de glucosa y formación de residuos de carbono (Barud et al., 2007). A más de 450 °C, la producción de compuestos volátiles

se completa y la pérdida de peso continúa debido a la oxidación del carbono remanente a CO_2 , CO y agua (Chiau et al., 2015; Wong et al., 2009).

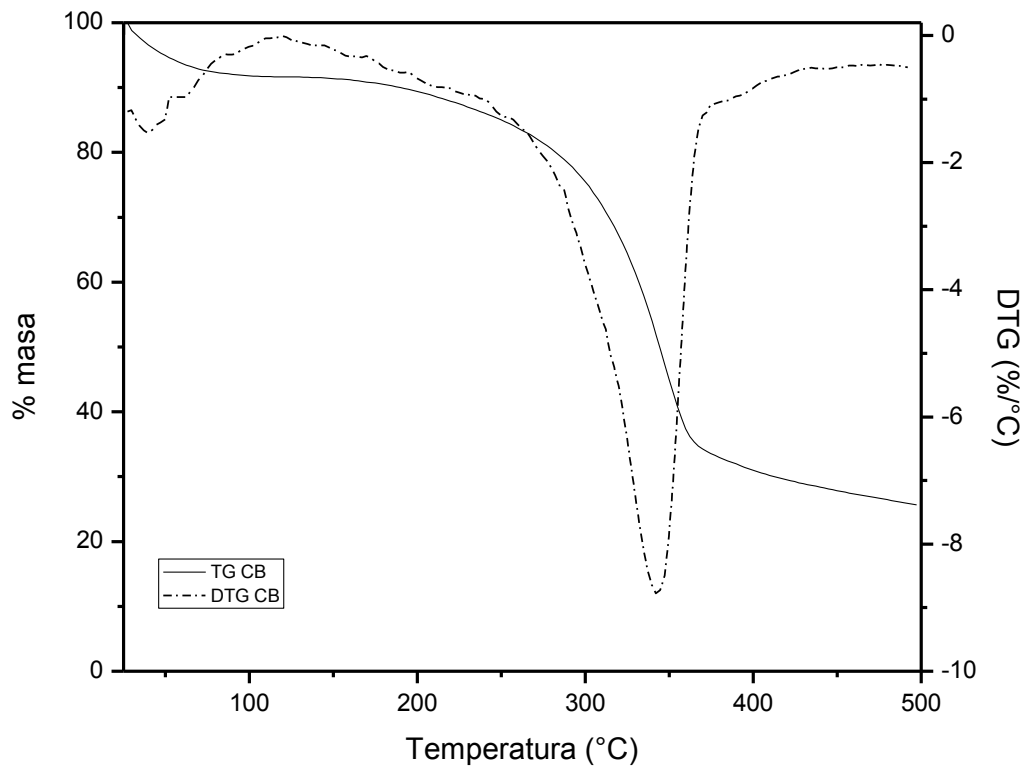


Figura 15. Curva TG y DTG de Biocelulosa.

Así mismo, en la Figura 14 se observa con línea discontinua el derivado Termogravimétrico (DTG). El pico dominante entre 300 y 350 ° C corresponde a procesos de degradación de celulosa que incluyen la depolimerización, la deshidratación, la degradación de las unidades de glucopiranosil y la posterior oxidación a residuos carbonizados (Wong et al., 2009).

9. Conclusiones

- El mucilago fresco de cacao es rico en azúcares (glucosa y fructosa principalmente) y minerales (especialmente potasio), que lo hacen un residuo agroindustrial con gran potencial como fuente de carbono para uso en procesos biotecnológicos.
- El microorganismo *Gluconacetobacter xylinus* es capaz de producir celulosa bacteriana utilizando como fuente de carbono los azúcares presentes en el MC.
- Para la producción de CB es necesario adicionar una fuente de nitrógeno disponible (peptona) al medio de cultivo, ya que con el MC únicamente la productividad del polímero no es alta.
- El *Gluconacetobacter* utiliza principalmente la glucosa contenida en el MC, aunque también consume fructosa y glucosa en menores proporciones.
- La mayor producción de CB se logró con los medios de cultivo MC-S y MC-DS durante 15 días de incubación. La diferencia entre estos dos medios es la cantidad de azúcares, lo que repercute directamente en el rendimiento de la fermentación haciendo que con el MC-DS se obtengan mayores rendimientos que con MC-S.
- Con base en lo reportado para la producción de CB usando diferentes residuos agroindustriales como fuente de carbono, las películas de CB obtenidas superaron algunas características importantes, como la cristalinidad que fue del 87%, el grosor de las películas que fue de aprox. 10-11mm y alcanzando producciones de 13 y 14 g/L.

10. Recomendaciones

- Realizar un diseño experimental en el cual se proponga medir y modificar variables como la temperatura de incubación, pH, la concentración de la fuente de carbono, el área superficial de las películas y la purificación para optimizar los rendimientos en la producción de CB.
- Medir las concentraciones de ácidos orgánicos implementando cromatografía líquida de alta resolución para analizar las diferencias de pH en el medio de cultivo a través del tiempo de fermentación.

Referencias bibliográficas

- Adams, M. R., Dougan, J., Glossop, E. J., & Twiddy, D. R. (1982). Cocoa sweatings—an effluent of potential value. *Agricultural Wastes*, 4(3), 225-229.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of food science and technology*, 50(6), 1097-1105.
- Andrade, F. K., Costa, R., Domingues, L., Soares, R., & Gama, M. (2010). Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 4034-4041.
- Anvoh, K. Y. B., Bi, A. Z., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2), 129-133.
- Anvoh, K., Guéhi, T., Beugré, G., Kinimo, J., & Gnakri, D. (2010). Comparison of biochemical changes during alcoholic fermentation of cocoa juice conducted by spontaneous and induced processes for the production of ethanol. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 10(6).
- Axelsson, D. E., & Russell, K. E. (1985). Characterization of polymers by means of ¹³C NMR spectroscopy:(a) Morphology by Solid-State NMR (b) End-Group Studies. *Progress in polymer science*, 11(3), 221-282. Zarcinas, B. A., Cartwright, B., & Spouncer, L. R. (1987). Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 18(1), 131-146.
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141-2149.

- Bae, S., & Shoda, M. (2004). Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology progress*, 20(5), 1366-1371.
- Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(1), 33-38.
- Balladares, C., Chóez-Guaranda, I., García, J., Sosa, D., Pérez, S., González, J. E., & Manzano, P. (2016). Physicochemical characterization of *Theobroma cacao* L. sweatings in Ecuadorian coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 741-745.
- Balladares, C., Chóez-Guaranda, I., García, J., Sosa, D., Pérez, S., González, J. E., ... & Manzano, P. (2016). Physicochemical characterization of *Theobroma cacao* L. sweatings in Ecuadorian coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 741-745.
- Barud, H., Ribeiro, C., Crespi, M., Martines, M., Dexpert-Ghys, J., Marques, R., Messaddeq, Y. and Ribeiro, S. (2007). Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes.
- Bellote, A. F., Ferreira, C. A., Silva, H. D., & Andrade, G. D. C. (1995). Efecto de la aplicación de ceniza de caldera y residuo de celulosa en el suelo y en el crecimiento de *Eucalyptus grandis*. *Bosque, Valdivia*, 16(1), 95-100.
- Brown Jr, R. M. (2012). Algae as tools in studying the biosynthesis of cellulose. *Cell Walls and Surfaces, Reproduction, Photosynthesis*, 1, 20.
- Buamah, R., Dzogbefia, V. P., & Oldham, J. H. (1997). Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 457-462.
- Cala, R. (2001). Las Voces prehispanas cacao, cacahuete y maíz en diccionarios generales de lengua castellana, catalana e italiana del siglo XX. *Boletín Americanista*, 51, 25-41.
- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16).

- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caro, G., Mondragon, I., & Gañán, P. (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96-102.
- Chávez-Pacheco, J. L., Martínez Yee, S., Contreras Zentella, M., & Escamilla Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1).
- Cheng, H. P., Wang, P. M., Chen, J. W., & Wu, W. T. (2002). Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(2), 125-132.
- Chiau Yeng L, Rahman A, Long S (2015) Thermal and flexural properties of regenerated cellulose (RC)/Poly(3-hydroxybutyrate) biocomposites. 11:67–72
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of food composition and analysis*, 18(2-3), 121-130.
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9.
- Crescente, O., Acosta, M., Guevara, M., & Estaba, A. (1999). Aprovechamiento de los desechos de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12.
- Czaja, W., Romanovicz, D., & Malcolm Brown, R. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3-4), 403-411.

- Dcyd0ggl1hia3.cloudfront.net. (2018). Thermal Characterization of Polymers. [online] Available at: https://dcyd0ggl1hia3.cloudfront.net/media/thermal-analysis/brochures/Thermal_Characterization_of_Polymers_en_web.pdf [Accessed 4 Oct. 2018].
- Dias, D. R., Schwan, R. F., Freire, E. S., & Serôdio, R. D. S. (2007). Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. *International journal of food science & technology*, 42(3), 319-329.
- Enríquez, G. A. (1985). Curso sobre el cultivo del cacao (No. 22). Bib. Orton IICA/CATIE.
- FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS, Disponible en: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/> Consultado el 14 Sep. 2017].
- Flórez, IC. (2015). Producción de celulosa bacteriana a partir de procesos fermentativos utilizando mucilago de café como fuente de carbono. Universidad industrial de Santander.
- Fontana, J. D., De Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., ... & Farah, L. F. X. (1990). *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(1), 253-264.
- Freed, L. E., & Vunjak-Novakovic, G. (1995). *Tissue engineering of cartilage. The biomedical engineering handbook*, 1.
- Gayathry, g. (2013). *Bioconversion and value addition of mature coconut water and cashew apple juice into bacterial cellulose using Gluconacetobacter SP*(doctoral dissertation, tamil nadu Agricultural University Coimbatore).
- Giraldo, C. A. R. (2012). *La celulosa bacteriana: un mundo de nanoposibilidades*. *Universitas Científica*, 15(2), 16-19.
- Goelzer, F. D. E., Faria-Tischer, P. C. S., Vitorino, J. C., Sierakowski, M. R., & Tischer, C. A. (2009). *Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from Acetobacter xylinum from processed rice bark*. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 546-551.

- Goelzer, F. D. E., Faria-Tischer, P. C. S., Vitorino, J. C., Sierakowski, M. R., & Tischer, C. A. (2009). Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 546-551.
- Goelzer, F. D. E., Faria-Tischer, P. C. S., Vitorino, J. C., Sierakowski, M. R., & Tischer, C. A. (2009). Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 546-551
- Gomes, F. P., Silva, N. H., Trovatti, E., Serafim, L. S., Duarte, M. F., Silvestre, A. J., ... & Freire, C. S. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and bioenergy*, 55, 205-211.
- Gyedu, E. (2001). Cocoa pulp juice (sweatings) as a potential raw material for the development of soft drink. *Journal of the Ghana Science Association*, 3(3), 57-61.
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S. F., Yang, G., & Jönsson, L. J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology*, 104, 503-508.
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S. F., Yang, G., & Jönsson, L. J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology*, 104, 503-508.
- Hsieh, Y. C., Yano, H., Nogi, M., & Eichhorn, S. J. (2008). An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. *Cellulose*, 15(4), 507-513.
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 183-188.
- ICCO (2015a). ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLI, No. 2, (Cocoa year 2016/17).
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. *Journal of materials science*, 35(2), 261-270.

- Innerlohinger, J., Weber, H. K., & Kraft, G. (2006, December). Aerocellulose: Aerogels and Aerogel-like Materials made from Cellulose. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 244, No. 1, pp. 126-135). WILEY-VCH Verlag.
- Ishihara, M., Matsunaga, M., Hayashi, N., & Tišler, V. (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 986-991
- Jagannath, A., Kalaiselvan, A., Manjunatha, S. S., Raju, P. S., & Bawa, A. S. (2008). The effect of pH, sucrose and ammonium sulphate concentrations on the production of bacterial cellulose (Nata-de-coco) by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2593.
- Jung, H. I., Jeong, J. H., Lee, O. M., Park, G. T., Kim, K. K., Park, H. C., ... & Son, H. J. (2010). Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresource technology*, 101(10), 3602-3608.
- Kaushik, A., & Singh, M. (2011). Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. *Carbohydrate research*, 346(1), 76-85
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.
- Khalil, H. A., Davoudpour, Y., Islam, M. N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., & Jawaid, M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: a review. *Carbohydrate polymers*, 99, 649-665.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603.
- Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Research International*, 82, 44-52.

- Kongruang, S. (2007). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 763-774). Humana Press.
- Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333-335.
- Lee, M. (2016). *X-Ray Diffraction for Materials Research: From Fundamentals to Applications*. CRC Press. Pág 4-6
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716.
- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., & Liu, H. (2015). Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate polymers*, 120, 115-119.
- Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R., & Li, Z. (2014). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource technology*, 151, 113-119.
- Machado, R. T., Meneguim, A. B., Sábio, R. M., Franco, D. F., Antonio, S. G., Gutierrez, J., ... & Lustri, W. R. (2018). *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. *Industrial Crops and Products*, 122, 637-646.
- Maneerung, T., Tokura, S., & Rujiravanit, R. (2008). Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 72(1), 43-51.
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18-22.

- Meng, F., Chae, S. R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H. S., & Yang, F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water research*, 43(6), 1489-1512.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., & Gidley, M. J. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 576-583.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate polymers*, 117, 518-523.
- Moosavi-Nasab, M., & Yousefi, A. (2011). Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iranian journal of biotechnology*, 9(2), 94-101.
- Musa, A. I., & Lal, P. (2018). Analysis of heavy metals and minerals in fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry coupled with atomic absorption spectroscopy.
- Nguyen, T., Nguyen T., Ho Thi T., Nguyen T. A study of wine fermentation from mucilage of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) *DALAT University Journal of Science* volume 6, issue 3, 2016 387–397.
- Nguyen, V. T., Flanagan, B., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Current Microbiology*, 57(5), 449.
- Nguyen, V. T., Gidley, M. J., & Dykes, G. A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food microbiology*, 25(3), 471-478.
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., & Mitsuhashi, S. (1990). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 25(6), 2997-3001.
- Noro, N., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(2), 199-205.

- Okiyama, A., Motoki, M., & Yamanaka, S. (1993). Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food hydrocolloids*, 6(6), 503-511.
- Ovalle-Serrano, S. A., Gómez, F. N., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2018). Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from Colombian Figue decortication by-products. *Carbohydrate polymers*, 189, 169-177.
- Pecoraro, É., Manzani, D., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. (2008). Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (pp. 369-383).
- Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(5), 1277.
- Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., ... & de Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International journal of biological macromolecules*, 104, 97-106.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634-640.
- Ramana, K. V., Tomar, A., & Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 245-248.
- Richmond, P. A. (1991). Occurrence and functions of native cellulose. *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*, 5-23.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., López-Oliva, E., et al. (2011). Cocoa rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(12), 1895-1899.
- Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., & Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao

- (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1(1), 24.
- Rubini, T. S., Zahouli, I. B., Ban-Koffi, L., Fae, M. A., & Nemlin, J. G. (2010). Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1564–1571.
- Saibuatong, O. A., & Phisalaphong, M. (2010). Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 455-460.
- Sastre, J., Sahuquillo, A., Vidal, M., & Rauret, G. (2002). Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta*, 462(1), 59-72.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., & Park, J. K. (2013). Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1585-1598.
- Shezad, O., Khan, S., Khan, T., & Park, J. K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 173-180.
- Steffensen, I. L., Frølich, W., Dahl, K. H., Iversen, P. O., Lyche, J. L., Lillegaard, I. T. L., & Alexander, J. (2018). Benefit and risk assessment of increasing potassium intake by replacement of sodium chloride with potassium chloride in industrial food products in Norway. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 329-340.
- Sun, D., Zhou, L., Wu, Q., & Yang, S. (2007). Preliminary research on structure and properties of nano-cellulose. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 22(4), 677.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., & Gatenholm, P. (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4), 419-431.
- Tang, W., Jia, S., Jia, Y., & Yang, H. (2010). The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 125.

- Thompson, D. N., & Hamilton, M. A. (2001). Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. In *Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 503-513). Humana Press, Totowa, NJ.
- Thompson, D. N., & Hamilton, M. A. (2001). Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. In *Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 503-513). Humana Press, Totowa, NJ.
- Thorold, C. A. (1975). *Diseases of cocoa*. Clarendon Press..
- Torres-Moreno, M., Torrescasana, E., Salas-Salvadó, J., & Blanch, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food chemistry*, 166, 125-132.
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., & De Wulf, P. (1998). Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 93-99.
- Vazquez, A., Foresti, M., Cerrutti, P. and Galvagno, M. (2012). Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), pp.545-554.
- Villanueva, Y., & Ffer, Y. (2006). *Elaboración de pinturas látex vinil-acríticas*.
- Wan, Y. Z., Huang, Y., Yuan, C. D., Raman, S., Zhu, Y., Jiang, H. J., ... & Gao, C. (2007). Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 27(4), 855-864.
- Wong, S. S., Kasapis, S., & Tan, Y. M. (2009). Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 280-287.
- Wong, S. S., Kasapis, S., & Tan, Y. M. (2009). Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 280-287.

- Yim, S. M., Song, J. E., & Kim, H. R. (2017). Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. *Process Biochemistry*, 59, 26-36.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N., & Watanabe, K. (1997). Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2), 219-224.
- Zeng, X., Small, D. P., & Wan, W. (2011). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 506-513.
- Zhao, Q., Zhao, M., Li, J., Yang, B., Su, G., Cui, C., & Jiang, Y. (2009). Effect of hydroxypropyl methylcellulose on the textural and whipping properties of whipped cream. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2168-2173.
- Zhou, W., & Wang, Z. L. (Eds.). (2007). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. Springer science & business media.) pág 1-2.
- Zhu, C., Li, F., Zhou, X., Lin, L., & Zhang, T. (2014). Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(5), 1548-1557.
- Zhu, H., Jia, S., Yang, H., Tang, W., Jia, Y., & Tan, Z. (2010). Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine. *Food Science and Biotechnology*, 19(6), 1479-1484.

Apéndices

Apéndice A. Validación del método por HPLC-RID para la cuantificación de azúcares.

1. Método

Tabla 1. Método utilizado para la cuantificación de azúcares y el seguimiento del consumo de glucosa por el microorganismo GX durante 15 días.

Parámetros	Método
Columna	SUPELCOGEL C-610H con fase estacionaria de poliestireno- divenilbenceno (PS/DVB).
Fase Móvil	Ácido fosfórico 0.1%
Flujo	0,6 mL/min
Detector	RID
Temperatura del horno	30 °C
Temperatura del detector	35 °C
Volumen de inyección	20 µL

2. Cromatograma

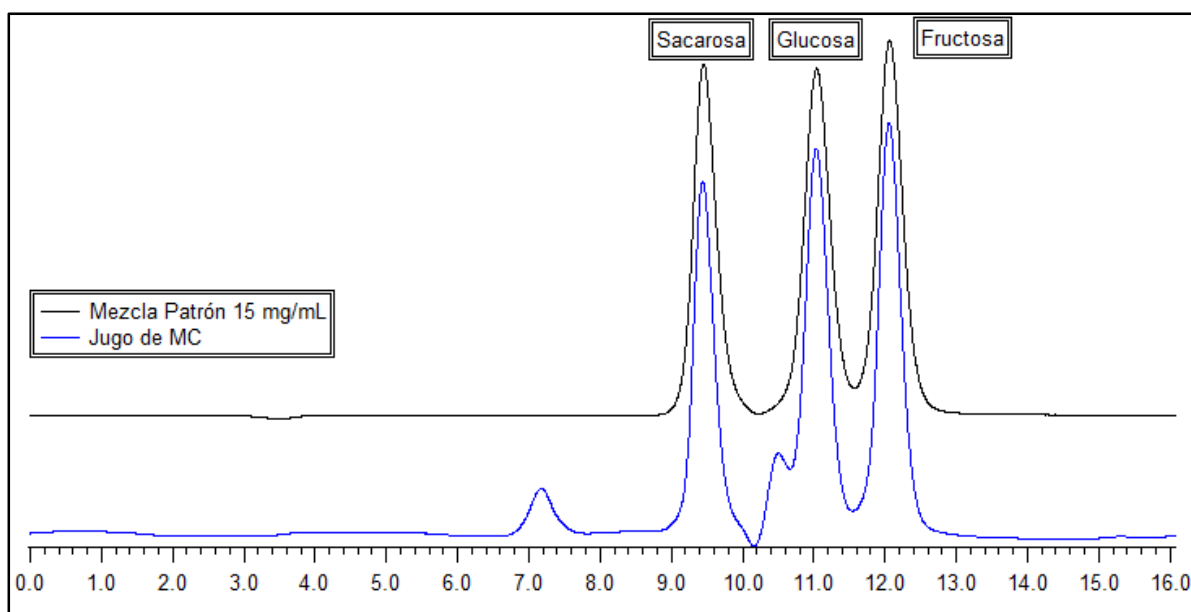


Figura 1. Separación de sacarosa, glucosa y fructosa por el método propuesto.

3. Determinación de k' , α y R_s

Tabla 2. Descriptores analíticos para el método propuesto HPLC-RID.

Compuesto	tR (min)	W1/2 (min)	tM (min)	k'^a	α^b	R_s^c
Sacarosa	9,40	0,353	2,71	2,471	1,236 (S,G)	2,318 (S,G)
Glucosa	10,98	0,401	2,71	3,054	1,390 (S,F)	3,949 (S,F)
Fructosa	12,01	0,389	2,71	3,433	1,124 (G,F)	1,556 (G,F)

a: k' : Factor de retención, k' óptimo:2-5.

b: Alfa: α : Factor de selectividad, α óptimo >1

c: R_s : Resolución de la columna, Resolución >1.5

S: Sacarosa

G: Glucosa

F: Fructosa

4. Linealidad

Bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente, se encontró una relación lineal entre las concentraciones de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) y RI. Para todos estos azúcares, los valores de r^2 fueron > 0.99 (Tabla 9).

Tabla 3. Linealidad en azúcares por detección RI.

Compuesto	Rango (g/L)	r^{2a}	Ecuación de la recta ^b
Sacarosa	1-30	0,998	$y = 0,4332x + 0,1154$
Glucosa	1-30	0,998	$y = 0,4961x + 0,0253$
Fructosa	1-30	0,999	$y = 0,522x + 0,0161$

a: Coeficiente de determinación.

b: x: Concentración (g/L); y: Área.

5. Precisión

Para evaluar la repetibilidad del método, se realizaron seis mediciones. Las determinaciones se llevaron a cabo el mismo día. Las desviaciones estándar y las desviaciones estándar relativas. (R.S.D) muestran buena precisión (Tabla 12, 13 y 14) dentro de Límites de variabilidad aceptable en los métodos de análisis $< 2.5\%$ RSD.

Tabla 4. Datos obtenidos de cada uno de los 7 patrones preparados para la determinación del %RSD en sacarosa.

Sacarosa			
Concentración (g/L)	Promedio Área (vol*s)	Desviación estándar	%RSD
1	0,554	0,00589	1,064
5	1,918	0,01472	0,7673
10	4,560	0,03899	0,8550
15	7,035	0,03017	0,4288
20	8,818	0,05636	0,6391
25	9,713	0,22268	2,2925
30	12,9	0,00	0,00

RSD: Desviación estándar relativa.

Tabla 5. Datos obtenidos de cada uno de los 7 patrones preparados para la determinación del %RSD en glucosa.

Glucosa			
Concentración (g/L)	Promedio Área (vol*s)	Desviación estándar	%RSD
1	0,597	0,00698	1,170
5	2,102	0,02317	1,1023
10	5,063	0,04179	0,8254
15	7,87	0,02000	0,2541
20	9,963	0,02875	0,2886
25	11,067	0,25820	2,3331
30	14,73	0,05164	0,3505

Tabla 6. Datos obtenidos de cada uno de los 7 patrones preparados para la determinación del %RSD en fructosa.

Fructosa			
Concentración (g/L)	Promedio Área (vol*s)	Desviación estándar	%RSD
1	0,629	0,00543	0,863
5	2,195	0,02429	1,1066
10	5,323	0,02338	0,4392
15	8,268	0,02994	0,3622
20	10,467	0,05164	0,4934
25	11,567	0,25820	2,2323
30	15,5	0,00	0,00