



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Fermentación del mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

Ing. Yazmín Rendón Muñoz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2023

Fermentación del mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

Ing. Yazmín Rendón Muñoz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Ph.D., Ing. Edith M. Cadena Chamorro

Codirector (a):

Ph.D., M. Ing., Ing. Juan Felipe Santa Marín

Línea de Investigación:

Aprovechamiento de residuos agrícolas

Materiales sustentables

Grupo de Investigación:

Ingeniería Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2023

...

—«*La estrella de la tarde está encendida*».
Ávidos buscan su fulgor mis ojos
a través de la bruma, y ascendemos
por el hilo de luz...

Un grillo canta
en los repuestos musgos del cercado,
y un incendio de estrellas se levanta
en tu pecho, tranquilo ante la tarde,
y en mi pecho en la tarde sosegado...

[Fragmento *La estrella de la tarde*]

Porfirio Barba Jacob

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Yazmín Rendón Muñoz

Fecha 28/07/2023

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a mis padres Blanca Muñoz y Álvaro Rendón por su incondicional apoyo, creer en mí, por impulsarme cada día a creer en mis sueños y por haberme inculcado la curiosidad y ansias de saber más, este logro no es sólo para mi sino también para ellos.

Dedico una apreciación especial para mi abuela Teresa de Jesús Londoño “Mery”, quién ha sido una biotecnóloga empírica toda su vida y si hubiese tenido la oportunidad de estudiar habría sido una gran profesional en esta área. A ella le agradezco infinitamente por haber donado sus saberes en la elaboración de vinagres caseros, de donde fue obtenida la bacteria para la realización de este proyecto.

Le agradezco a mi directora Edith M. Cadena Chamorro y co-director Juan Felipe Santa Marín por haber puesto su voto de confianza en mí para desarrollar este proyecto y haberme guiado y tenido paciencia durante todo este proceso investigativo. También a aquellos profesores que me brindaron su ayuda y guía para la consecución actividades experimentales: Robinson Buitrago, Juan Carlos Pérez, Guillermo Correa, Camilo Suarez y Olga Inés Montoya. De igual manera agradezco al profesor Avtar Matharu, Tom Dugmore, Suranjana Bose y Richard Gammons por recibirme en el Centro de Excelencia en Química Verde de la Universidad de York y guiarme en las actividades experimentales allí realizadas.

A mi compañero de laboratorio y amigo Jonnatan Hincapié por su disposición, paciencia y ganas de aprender. Sin su creatividad e innovación este proyecto no habría sido lo mismo. También a la ayuda de Sara Estévez e Isabel Ramírez, cuyo aporte fue invaluable.

Quiero agradecer a todos los amigos que encontré durante este recorrido científico Yuliana Cadavid, Mario Vallejos, Erika Arango, Birina Caballero, Ma. Camila Rodríguez, Eduardo

VI Fermentación de mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

Arroyo, Jorge Figueroa, Margarita Londoño, Nelly Sánchez, Anny Quiceno, Geraldine Durango, Camilo Zapata y a todos aquellos con los que he compartido risas y alegrías, por su motivación y apoyo.

A mí siempre y deslumbrante grupo de “Alumbrados y Buñuelos” Yuliana Cruz, Sara Duque, Ma. Fernanda Pardo y Sara Lucía Mora por las risas, los llantos y las cervezas; por las amistades a prueba de todo.

A José Miguel López, Belén Somarriba, Pablo Aicard, Tatiana Toro y mis maravillosos amigos del latín-gang por mostrarme el mundo más allá de los prejuicios, no importan las etiquetas lo que importa es que somos humanos.

También a los amigos que encontré en el mundo, Benz, Aun, Aoi, Jay, Eksuree, Lee, Thais, Frederick, Rashmi, Mengmeng, Megan, Harry y Oliver; esos donde te das cuenta de que la ciencia y la amistad traspasa fronteras. Y especialmente, quiero agradecer a David White, por su incondicional apoyo durante este proceso.

Finalmente, se agradece a los entes financiadores de este proyecto por promover el desarrollo científico del país, el Fondo Nacional de Financiamiento para La Ciencia, La Tecnología y La Innovación “FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS” y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Colombia (MinCiencias) bajo el proyecto CTO No. 543-2020 Proyecto “*Valorisation of wastes from coffee supply chain in Colombian and UK to develop novel products*”. A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto “*Alianza estratégica para la valorización de residuos provenientes del beneficio de café para la obtención de celulosa bacteriana y su aplicación en matrices poliméricas*” a través de la Convocatoria Nacional para el Fomento de Alianzas Interdisciplinarias que Articulen Investigación, Creación, Extensión y Formación en La Universidad Nacional De Colombia 2019-2021. De igual manera se agradece a La Agencia de Educación Postsecundaria de Medellín – Sapiencia, la Facultad de Ciencias y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín.

Resumen

Fermentación del mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

El café es uno de los productos insignia de la economía colombiana, contribuyendo en 2021 con el 1.0% al PIB nacional y el 15% al PIB agrícola. Sin embargo, su cadena productiva deja tras de sí diferentes residuos que generan un impacto ambiental negativo en las áreas rurales del país, uno de estos residuos es el mucílago que se genera en grandes cantidades y afecta principalmente fuentes hídricas. En aras de buscar usos alternativos para este residuo, el presente trabajo evaluó su potencial como medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana, polímero de gran valor utilizado en diferentes áreas de la industria.

En el desarrollo experimental se utilizó mucílago de café obtenido a través de dos métodos de extracción, fermentación natural y desmucilaginado mecánico, y como medio de cultivo control se usó la formulación HS. Cinco (5) microorganismos productores de celulosa bacteriana se aislaron a partir de vinagre casero de panela, de los cuales el mejor productor de celulosa fue clasificado dentro de la especie *Komagataeibacter intermedius*. La fermentación con este aislado se llevó a cabo en un sistema batch conservando una relación área superficial/volumen de 0.70 cm^{-1} . De igual forma, se evaluó el efecto de variables operaciones como temperatura e inyección de aire en la generación de celulosa con mucílago de café como medio de cultivo.

La mayor producción de celulosa bacteriana se obtuvo con mucílago de fermentación natural ($4.20 \pm 0.01 \text{ g/L}$), seguido por mucílago de desmucilaginado mecánico ($1.69 \pm 0.04 \text{ g/L}$) y el medio HS ($0.77 \pm 0.01 \text{ g/L}$) después de 10 d de fermentación. El seguimiento a la cinética del proceso reveló un decrecimiento abrupto en el pH y oxígeno disuelto en los primeros dos días de fermentación, dando indicios sobre el comportamiento de la bacteria

VIII Fermentación de mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

en estos medios. La modificación de variables operacionales como temperatura y adaptación de un sistema de aireación sobre el proceso fermentativo reveló que la temperatura óptima para la producción de celulosa bacteriana es 35 °C y que los sistemas con inyección de aire propician un incremento del 22% en la generación de celulosa. La caracterización de las matrices celulósicas obtenidas a partir del mucílago de café reveló que estas presentan una alta capacidad de retención de agua ($>150 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{celulosa}}$), alta estabilidad térmica determinada por temperaturas de degradación ($>360 \text{ °C}$), resistencia mecánica con un alto módulo de Young ($>17 \text{ GPa}$) e índice de cristalinidad ($>85\%$).

Lo mencionado anteriormente demuestra que el mucílago puede ser catalogado como un medio cultivo alternativo idóneo en la producción de celulosa bacteriana, ya que genera altos rendimientos y permite obtener celulosas con características promisorias para ser usadas en diferentes aplicaciones.

Palabras claves. aprovechamiento de residuos, cadena productiva de café, celulosa bacteriana, fermentación, medio alternativo, residuo agrícola.

Abstract

Coffee mucilage fermentation to obtain bacterial cellulose using wild strains of *Komagataeibacter* spp.

Coffee is one of the Colombian economy-flagship products, contributing to 1.0% of the national GDP and 15% of the agricultural GDP in 2021. However, coffee supply chain leaves behind different residues that generate a negative environmental impact in the Colombian rural areas. One of these residues is the mucilage, which is generated in large quantities and mainly affects water sources. In order to find alternative uses for this residue, the present work evaluated mucilage potential as a culture medium in the production of bacterial cellulose, a high-value polymer used in different industrial areas.

Coffee mucilage obtained by two extraction methods, natural fermentation and mechanical removal, was used throughout this research. HS formulation was also used as control culture medium. Five (5) bacterial cellulose-producing microorganisms were isolated from homemade raw-sugar-cane vinegar, being the best cellulose producer classified into the species *Komagataeibacter intermedius*. The fermentative process was carried out in a batch system with this isolate, maintaining a surface area/volume ratio of 0.70 cm^{-1} for 10 d. Modifications in operational variables, such as temperature and aeration system, along with coffee mucilage were also evaluated on cellulose generation.

The highest yield of bacterial cellulose was obtained with natural fermentation mucilage ($4.20 \pm 0.01 \text{ g/L}$), followed by mechanical removal mucilage ($1.69 \pm 0.04 \text{ g/L}$) and HS medium ($0.77 \pm 0.01 \text{ g/L}$) after 10 d. A pronounced decrease in pH and dissolved oxygen in the first two days was observed, giving hints about the bacterium behaviour in these media. Changes in operational variables revealed that the optimal temperature to produce bacterial cellulose is $35 \text{ }^\circ\text{C}$, and air-input promotes a 22% increase in cellulose generation. The characterization of the cellulosic matrices obtained from coffee mucilage revealed that they

X Fermentación de mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

have a high-water retention capacity ($>150 \text{ g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{cellulose}}$), high thermal stability ($>360 \text{ }^\circ\text{C}$), mechanical resistance with a high Young modulus' ($>17 \text{ GPa}$), and high crystallinity index ($>85\%$).

The outcomes demonstrate that mucilage can be recognized as a suitable alternative medium since it generates high cellulose yields with promising characteristics.

Keywords: waste management, coffee supply chain, bacterial cellulose, fermentation, alternative medium, agricultural waste.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Abstract	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción	1
Objetivos.....	5
1 Capítulo 1. Marco Teórico	6
1.1 Generalidades: El café y sus subproductos	6
1.1.1 <i>Coffea arabica</i> : breve historia de la caficultura colombiana	6
1.1.2 Procesamiento postcosecha del fruto de café	9
1.1.3 Subproductos del café: Mucílago.....	13
1.2 Celulosa Bacteriana.....	17
1.2.1 El género <i>Komagataeibacter</i>	18
1.2.2 Biosíntesis de celulosa bacteriana.....	21
1.2.3 Producción de Celulosa Bacteriana	24
1.2.4 Aplicaciones de la celulosa bacteriana	31
2 Capítulo 2. Materiales y Métodos	32
2.1 Obtención y pretratamiento de mucílago de café.....	32
2.2 Caracterización fisicoquímica de mucílago	33
2.2.1 Humedad.....	33
2.2.2 Cenizas	33
2.2.3 Azúcares reductores.....	34
2.2.4 Azúcares totales	34
2.2.5 pH.....	35

2.2.6	Demanda Química de Oxígeno	35
2.2.7	Oxígeno disuelto.....	35
2.2.8	Acidez titulable	35
2.2.9	Contenido de polifenoles	35
2.2.10	Composición elemental, azúcares y ácidos	36
2.3	Desarrollo de proceso fermentativo	38
2.3.1	Rastreo y aislamiento de bacterias productoras de celulosa bacteriana	38
2.3.2	Preparación de inóculo	39
2.3.3	Selección de mejor productor de CB	41
2.3.4	Cinética de la producción de celulosa bacteriana	43
2.3.5	Evaluación de variables operacionales sobre la producción de celulosa	43
2.4	Identificación taxonómica	44
2.4.1	Identificación molecular	44
2.4.2	Caracterización morfológica y bioquímica.....	45
2.5	Caracterización de celulosa bacteriana.....	46
2.5.1	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	46
2.5.2	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier	47
2.5.3	Difracción de rayos X e Índice de Cristalinidad	47
2.5.4	Ensayo de tracción	48
2.5.5	Análisis Térmico Simultaneo (ATS)	49
2.5.6	Capacidad de retención de agua	49
3	Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	50
3.1	Caracterización de muestras de mucílago	50
3.2	Rastreo y aislamiento de cepas productoras	56
3.3	Selección de mejor productor de CB.....	58
3.4	Cinética de la producción de CB	63
3.4.1	Producción de CB y consumo de sustrato	63
3.4.2	pH.....	69
3.4.3	Oxígeno disuelto.....	70
3.4.4	Minerales.....	73
3.4.5	Mucílago como medio.....	74
3.5	Efecto de variables operacionales.....	75
3.5.1	Temperatura.....	75

3.5.2 Aireación y alimentación intermitente	76
3.6 Identificación taxonómica del aislado CB5	79
3.6.1 Identificación molecular	79
3.6.2 Características morfológicas y bioquímicas	81
3.7 Caracterización de las matrices de celulosa bacteriana	83
3.7.1 Morfología y estructura de la CB	84
3.7.2 Propiedades mecánicas y térmicas	93
3.7.3 Celulosa hidratada (<i>Never-dried cellulose</i>)	98
4 Conclusiones y Recomendaciones	101
4.1 Conclusiones	101
4.2 Recomendaciones	103
A. Anexo A: Cromatogramas del mucílago de café	105
B. Anexo B: Registro fotográfico de la caracterización bioquímica de CB5.	108
Bibliografía	110

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Comportamiento de la producción de café en Colombia desde 1956 hasta 2022.....	8
Figura 1-2. Composición del fruto de café.	9
Figura 1-3. Proceso de despulpado. A. Modelo Belcosub que integra máquina despulpadora y desmucilagador. B. Entrada de los frutos de café en la máquina despulpadora. C. Pulpa de café. D. Café baba.....	11
Figura 1-4. Procesos para la remoción de mucílago de café. A y B. Fermentación Natural en tanques. C. Desmucilagado Mecánico.....	12
Figura 1-5. Cantidades de productos/subproductos de café generadas en Colombia en 2022.....	14
Figura 1-6. Producción bibliográfica en Celulosa Bacteriana desde 1990 a 2021.....	17
Figura 1-7. “Madre de vinagre” o matriz de celulosa en fermento casero.	19
Figura 1-8. Maquinaria genética y molecular involucrada en la biosíntesis de CB. A. Operón <i>bcs</i> tipo I que codifica para la celulosa sintasa. B. Complejo celulosa sintasa	22
Figura 2-1. Diagrama de flujo del proceso de rastreo y aislamiento de bacterias productoras de celulosa bacteriana.....	39
Figura 2-2. Diagrama de flujo del proceso para la preparación de inóculo.....	41
Figura 2-3. Arreglo factorial del experimento.	42
Figura 2-4. Montaje para prueba de tracción de celulosa bacteriana.....	48
Figura 3-1. Azúcares y ácidos identificados en las muestras de mucílago de café.....	51
Figura 3-2. Resultados del proceso de rastreo y aislamiento. A. Formación de matrices en medio enriquecido. B. Colonias homogéneas proveniente de cultivo enriquecido. C. Prueba de celulosa (+) de las diez colonias evaluadas.	57

Figura 3-3. Gráfico de medias de Tukey HSD para la variable <i>Rendimiento</i> (g_{bs}/L) con los factores A. Bacteria y B. Medio.	59
Figura 3-4. Gráfico de interacciones de la variable <i>Espesor</i> (mm). A. Efectos simples del factor medio en el factor bacteria. B Efectos simples del factor bacteria en el factor medio.	60
Figura 3-5. Gráfico de interacciones de la variable <i>Ysp</i> ($g_{producto}/g_{sustrato}$). A. Efectos simples del factor medio en el factor bacteria. B Efectos simples del factor bacteria en el factor medio.	61
Figura 3-6. Gráfico de medias de Tukey HSD para las variables A. <i>Espesor</i> y B. <i>Ysp</i> en el factor Bacteria.	62
Figura 3-7. Rendimiento de CB (línea sólida) y concentración de azúcares reductores (línea punteada) durante la fermentación con el aislado CB5 en los medios A. DM, B. FN y C. HS evaluados.	64
Figura 3-8. Concentración de azúcares y ácidos del mucílago de café A. FN y B. DM en el día 0 y 10 de la fermentación.	67
Figura 3-9. Comportamiento de pH durante la fermentación con CB5 en los diferentes medios evaluados.	70
Figura 3-10. Comportamiento de oxígeno disuelto en A. mgO_2/L y B. % Saturación durante los 10 días de fermentación con el aislado CB5 en los medios evaluados.	71
Figura 3-11. Formación de matriz celulósica en la superficie del medio de cultivo (mucílago de FN).	72
Figura 3-12. Composición mineral del mucílago A. FN y B. DM en los días 0 y 10 de la fermentación.	74
Figura 3-13. Sistema de flujo intermitente con y sin aireación.	77
Figura 3-14. Concentración de glucosa durante el tiempo de fermentación, con y sin aireación, en un sistema de flujo intermitente.	78
Figura 3-15. Árbol filogenético del género <i>Komagataeibacter</i> incluyendo el aislado CB5	80
Figura 3-16. Características morfológicas del aislado CB5. A. Morfología de colonia a 12.5X, B. Morfología de colonia 25X, C. Microscopía de tinción de Gram 1000X.	81
Figura 3-18. Celulosa Bacteriana obtenida en fermentación de 10 días en medio DM, FN y HS A. antes y B. después de lavado y purificación con NaOH.	84
Figura 3-19. Celulosa sometida a secado por A. liofilización y B. convección forzada.	86

Figura 3-20. Imágenes de CB tomadas con microscopio electrónico a x30000 aumentos y distribución del diametro de las fibrillas. A. HS, B. DM, C. FN.	87
Figura 3-21. Espectro IR de CB obtenida usando mucílago FN y DM, y medio HS.	89
Figura 3-22. Deconvolución de los picos correspondientes a las fracciones I α y I β en el espectro IR.....	91
Figura 3-23. Difractograma de rayos-x de CB obtenida en diferentes medios de cultivo.	92
Figura 3-24. Gráfico Esfuerzo vs Deformación de matrices de celulosa obtenidas en medio FN y DM.	95
Figura 3-25. TGA: Perfil de pérdida de peso (línea sólida); CDB: flujo de calor (línea punteada).....	97
Figura 3-26. Celulosa nunca seca (<i>Never dried cellulose</i>) producida a partir de mucílago de Fermentación Natural.....	99

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Composición del mucílago de acuerdo con el método de obtención.	15
Tabla 1-2. Concentración de nutrientes en el mucílago de café.	15
Tabla 1-3. Uso de mucílago en bioprocesos para obtener productos de interés	16
Tabla 1-4. Especies pertenecientes al género <i>Komagataeibacter</i>	21
Tabla 1-5. Ventajas y desventajas del modo de operación estático y agitado.	25
Tabla 1-6. Composición de medios de cultivos usados para la producción de CB.	26
Tabla 1-7. Producción de celulosa bacteriana a partir de residuos industriales.	28
Tabla 2-1. Formulaciones de aditivos que restringen producción de CB con medio HS y condiciones de incubación.	40
Tabla 3-1. Composición de mucílago de café del municipio de Jardín, Antioquia.	50
Tabla 3-2. Composición mineral del mucílago de café.	55
Tabla 3-3. Análisis de varianza para la variable Rendimiento (g/L)	58
Tabla 3-4. Análisis de varianza para la variable Espesor (mm)	58
Tabla 3-5. Análisis de varianza para la variable Y_{sp} ($g_{CB}/g_{sustrato}$)	58
Tabla 3-6. Rendimiento del producto con respecto a azúcares reductores [Y_{sp} ($g_{CB}/g_{azu.red}$)] y sumatoria de sustratos consumidos [Y_{sp} ($g_{CB}/g_{cons.sust}$)].	68
Tabla 3-7. DQO en medio DM y FN para la producción de CB	73
Tabla 3-8. Rendimientos de CB en función de la temperatura.	75
Tabla 3-9. Rendimiento de CB en un sistema de flujo intermitente con y sin aireación usando mucílago DM.	78
Tabla 3-10. Resultados de ensamblaje para el aislado CB5	79
Tabla 3-11. Características diferenciales del aislado CB5 con respecto a otras especies relacionadas con el género <i>Komagataeibacter</i>	83
Tabla 3-12. Bandas del espectro infrarrojo correspondientes a la CB	89
Tabla 3-13. Fracción $I\alpha$ ($f\alpha$) de alomorfo I e índice de cristalinidad (IC) de CB.	92

XVIII Fermentación de mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

Tabla 3-14. Propiedades mecánicas de celulosa bacteriana obtenida a partir de FN y DM.	95
Tabla 3-15. Parámetros obtenidos del Análisis Térmico Simultáneo para celulosa obtenida a partir de DM, FN y HS.....	98
Tabla 3-16. Capacidad de retención de agua para celulosa obtenida a partir de medios FN, DM y HS.....	99

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas y griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A_i/V	Relación área interfacial del medio de cultivo con respecto al volumen	cm^{-1}	
CRA	Capacidad de Retención de Agua	$\text{g}_{\text{H}_2\text{O}}/\text{g}_{\text{celulosa}}$	Ec. 2-4
DQO	Demanda Química de Oxígeno	$\text{mg O}_2/\text{L}$	
$f\alpha$	Fracción alomorfo Ia	-	Ec. 2-1
IC	Índice de Cristalinidad	%	Ec. 2-2

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AFI	Sistema Aireado de Flujo Intermitente
ATG	Análisis Termogravimétrico
ATS	Análisis Térmico Simultáneo
bh	Base Húmeda
bs	Base Seca
CB-DM	Celulosa bacteriana producida en mucílago desmucilaginado mecánico
CB-FN	Celulosa bacteriana producida en mucílago fermentación natural
CB-HS	Celulosa bacteriana producida en medio sintético HS
CDB	Calorimetría Diferencial de Calor
cps	Café Pergamino Seco
DM	Mucílago extraído con la metodología de desmucilaginado mecánico
DO	Densidad Óptica
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DRX	Difracción de Rayos-X
FN	Mucílago extraído con la metodología de fermentación natural
HR	Humedad Relativa
HS	Medio microbiológico formulado por Hestrin y Schramm (1954)
IR	Infrarrojo
IRFT	Infrarrojo por transformada de Fourier
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
OD	Oxígeno Disuelto
SE	Sistema Estático sin Aireación y Agitación
VNC	Viables No Cultivables

Introducción

Las cadenas productivas agrícolas e industriales son una base fundamental para la economía global, sin embargo, aparte de generar los productos deseados por el mercado, dejan detrás de sí subproductos o residuos que de no ser tratados adecuadamente generarían un impacto ambiental negativo. Recientes investigaciones han intentado utilizar esos residuos o subproductos como materias primas en otras cadenas productivas, con aras de crear un flujo continuo en la que todos los materiales, subproductos y productos, se utilicen para así crear procesos más sostenibles y fomentar la economía circular.

En Colombia, el proceso productivo que más ha aportado a la economía del país a lo largo de la historia es la caficultura, la cual ha hecho que Colombia sea reconocido a nivel mundial. Aunque su reconocimiento lo hace un artículo apetecido en el mercado, su economía y producción fluctuante no ha permitido generar ingresos estables a las 555.700 familias agricultoras que dependen de él (Federación Nacional de Cafeteros, 2017). Sin embargo, a partir del 2015, la producción cafetera ha logrado sobreponerse a esa inestabilidad, produciendo grandes cantidades de café verde para exportar y consumir en el país (Clavijo, 2017); de hecho, a pesar de los percances generados por la pandemia, el sector caficultor sobresalió en la economía colombiana aportando al 1.0% del PIB nacional en 2021 (Gaviria González, 2021).

Considerando que la cadena productiva del café es uno de los procesos agrícolas e industriales que más genera subproductos, este reciente auge en su producción ha hecho que aumente la cantidad de residuos generados (Alves et al., 2017). Uno de los residuos que se destaca en las primeras etapas del procesamiento es el mucílago o mieles del café, el cual se caracteriza por tener alto contenido de azúcares y pectinas que le dan una consistencia viscosa, este residuo puede generar un impacto ambiental negativo debido a su alta cantidad de materia orgánica (Rodríguez-Valencia & Zambrano Franco, 2010). Con

el fin de evitar la degradación ambiental en áreas rurales, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo (Resolución 631, 2015) fijó límites más rigurosos con respecto al vertimiento de aguas residuales provenientes del beneficio húmedo del café a fuentes hídricas. Situación que forzó al gremio caficultor a adoptar como medida inmediata el uso de tanques sépticos para el tratamiento de estos efluentes y reducir su capacidad contaminante (Rodríguez-Valencia et al., 2013; Vida, 2015).

Una alternativa más promisorio a este problema es pensar en estos elementos no como residuos, sino como materias primas que pueden ser utilizadas para la obtención de productos de mayor valor agregado. Considerando que la composición química del mucílago es rica en fuentes de carbono y otros nutrientes, diferentes investigaciones se han enfocado en evaluar su potencial como sustrato en procesos fermentativos, lo que ha propiciado la obtención de compuestos como ácido gálico, ácido láctico, compuestos volátiles y bioetanol (Bhoite et al., 2013; Bonilla-Hermosa et al., 2014; Pleissner et al., 2016).

En este contexto, el mucílago de café se perfila como un medio alternativo de bajo costo para la producción de metabolitos de interés, posicionándose como una opción factible ante los procesos biotecnológicos que ven limitado su desarrollo por los altos precios de los medios de cultivo. Un ejemplo particular de procesos que presenta restricciones monetarias asociadas a los medios de cultivo es la producción de celulosa bacteriana, polímero sintetizado naturalmente por algunas de las especies pertenecientes al género *Komagataeibacter*, en cuyo proceso fermentativo el medio de cultivo representa del 50 al 65% de los costos de la producción total (Kadier et al., 2021).

El estudio de medios del cultivo tradicionales y alternativos (residuos de frutas, melazas de la industria azucarera, residuos de cervecería, entre otros) para incrementar la producción de celulosa bacteriana es una temática ampliamente investigada actualmente (Islam et al., 2017; Kadier et al., 2021; Sperotto et al., 2021). Si bien la celulosa como polisacárido también se puede obtener a partir de tejido vegetal, su extracción requiere de altas concentraciones de álcalis o sustancias oxidantes que generan un impacto ambiental negativo, además, la celulosa extraída de esta fuente no es completamente pura ya que presenta trazas de lignina y hemicelulosa (Radotić & Mičić, 2016; Zhong, 2020). En este

escenario, la celulosa de origen bacteriano representa una mejor alternativa por el alto grado de pureza con la que se obtiene, igualmente, su proceso de purificación no requiere de altas cantidades de sustancias contaminantes (Carreño Pineda, 2011; Kadier et al., 2021).

En términos funcionales, la celulosa bacteriana presenta propiedades superiores a la celulosa vegetal, ya que su conformación estructural le confiere características químicas y mecánicas ideales para su aplicación en áreas como la medicina, industria papelera, industria de alimentos, complemento para la elaboración de matrices poliméricas, diseño de materiales conductores, hasta la obtención de telas especiales, entre otros (Kadier et al., 2021; Klemm et al., 2005; Zhong, 2020). De igual forma, considerando las tendencias económicas, se han estimado pronósticos favorables donde el mercado global de celulosa bacteriana alcanzará los \$570 millones en 2024 y los \$680 millones a finales de 2025, con un incremento a una tasa de crecimiento anual compuesto del 13.3% durante 2018-2025 (Fernandes et al., 2020). Es este aspecto, se evidencia que la celulosa bacteriana, como producto biotecnológico, presenta beneficios notorios y un alto valor agregado. Por ende, en aras de aportar en la búsqueda de estrategias para disminuir los costos de producción de la celulosa bacteriana y encontrar alternativas de valorización para residuos agrícolas como el mucílago de café, el presente trabajo planteó el estudio de mucílago de café como medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana usando aislados nativos pertenecientes al género *Komagataeibacter*.

El desarrollo de la tesis se realizó en cinco fases, de las cuales la primera consistió en la aislamiento e identificación de los microorganismos productores de celulosa bacteriana. En la segunda etapa se seleccionó la cepa que presentó la mejor producción de celulosa usando mucílago de café. La tercera fase evaluó la cinética de producción y consumo de sustrato de la cepa seleccionada. La cuarta fase evaluó el efecto de parámetros operacionales como la temperatura y aireación en la producción de celulosa bacteriana. La quinta fase constó de la caracterización de las matrices producidas.

Los resultados obtenidos demostraron el potencial del mucílago de café como medio de cultivo para la producción de celulosa bacteriana, sobrepasando los rendimientos obtenidos con el medio fermentativo tradicional; a su vez se reconoció el desempeño de la cepa aislada por su capacidad de adaptarse a medios con altas cargas orgánicas como el

4 Fermentación de mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana con aislados nativos de *Komagataeibacter* spp.

mucílago de café. De igual manera, la caracterización realizada a las matrices de celulosa obtenidas indicó una alta estabilidad térmica junto con alto desempeño en pruebas mecánicas. Por lo que, el presente proyecto sienta las bases sobre la gestación de un proceso biológico, en el que se produzca celulosa bacteriana a partir de mucílago de café.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar un proceso fermentativo a partir del mucílago de café para la obtención de celulosa bacteriana usando cepas nativas de *Komagataeibacter* spp.

Objetivos Específicos

- Identificar cepas de bacterias promisorias para la producción de celulosa bacteriana.
- Evaluar el potencial del mucílago como sustrato para la producción de celulosa bacteriana.
- Estimar el efecto de la temperatura e inyección de aire en la producción de celulosa bacteriana.

1 Capítulo 1. Marco Teórico

Los conceptos detallados aquí abordan el café como especie vegetal, el comienzo de la caficultura en Colombia hasta el día de hoy, el procesamiento postcosecha de los frutos de café y los subproductos obtenidos a través de su cadena productiva, haciendo un énfasis especial en el mucílago y su potencial aplicación como materia prima en otros procesos productivos. En este apartado también se hace referencia a los diferentes métodos utilizados para obtener celulosa bacteriana, las diferentes cepas bacterianas identificadas, los modelos fermentativos en los que se produce, además de una breve mención de sus aplicaciones.

1.1 Generalidades: El café y sus subproductos

1.1.1 *Coffea arabica*: breve historia de la caficultura colombiana

Las plantas de café pertenecen a la familia Rubiaceae y se caracterizan por ser dicotiledóneas leñosas de hojas perenes; los árboles de café o cafetos como también se denominan, se desarrollan a gran altura y en climas tropicales. Aunque los botánicos consideran que las plantas de café son árboles tropicales pertenecientes a la familia Rubiaceae y se han descrito cientos de especies pertenecientes al género *Coffea*; el mercado internacional se centra únicamente en dos especies, *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Alves et al., 2017; Charrier & Berthaud, 1985).

La especie *C. canephora* Pierre, mejor conocida como Robusta presenta una alta tolerancia a enfermedades causadas por hongos como la roya y la enfermedad del fruto del café (CBD por sus siglas en inglés). Esta especie es aborigen del África ecuatorial, encontrándose en los bosques bajos de Guinea y Uganda, actualmente su cultivo se extiende desde Asia hasta Suramérica, representando cerca del 30 al 40% de la producción mundial de café (International Trade Centre, 2012). Las características

organolépticas de los cafés Robustas son consideradas inferiores a los presentados por especies arábicas, sin embargo, su contenido de cafeína es superior (2 - 2.5% versus 1.1-1.5%) y presenta mayor contenido de sólidos disueltos. Debido a que presenta resistencia a diferentes plagas y fitopatologías que afectan los cultivos de café, su costo de producción es más bajo, lo que genera un mayor interés en los mercados internacionales (Alves et al., 2017).

Los orígenes de *Coffea arabica* L., también conocida como Arábica, se remontan a los dominios africanos de Yemen en el 850 a.c., región conocida hoy en día como Etiopía; los comerciantes yemenitas fueron los primeros en mercantilizar el café y propagarlo por África, Asia y Europa (Estrada, 2011). Actualmente, el café Arábica representa aproximadamente el 65%-70% de la producción mundial de café. (Alves et al., 2017). Los cultivos de café arábica presentan muy poca variabilidad genética, lo cual los hace susceptibles al ataque de plagas (Hindorf & Omondi, 2011). Sin embargo, se han desarrollado avances técnicos y científicos con lo que se ha obtenido diversas variedades que exhiben resistencia a estos factores adversos. Las variedades arábicas más conocidas en el mercado son Típica, Borbón, Caturra, Mundo novo, Moca, entre otras (Mendes Ferrão, 2009).

Las variedades que originaron la economía del café a lo largo de Centro y Suramérica fueron *C. arabica* var. Típica y *C. arabica* var. Borbón, traídas al continente americano en 1720 y 1860, respectivamente. En Colombia, estas variedades tuvieron una gran importancia en el desarrollo económico del territorio durante el siglo XIX, donde a pesar de la guerra y los conflictos internos la producción de café se intensificó, pasando de 60 mil sacos a 600 mil entre 1870 a 1910 (Estrada, 2011; Florez R & Arias S, 2017). A partir de 1910, se establece una economía cafetera madura; las divisas obtenidas por la exportación de café ayudaron a dar forma al mercado interno colombiano, impulsando otros productos de la agricultura, la ganadería y la industria manufacturera. Estos aportes fueron definitivos para impulsar el crecimiento económico y crear un mercado de bienes y servicios (Estrada, 2011).

A partir de 1950 comienza un periodo de inestabilidad en el negocio cafetero, como se ejemplifica en la Figura 1-1, “la finca cafetera llega sus límites como base de la economía mono cultivo” (Estrada, 2011). Desde la década del 1950 hasta ahora la producción de

café colombiano es catalogada como volátil con tendencia a la estabilidad, aunque, a pesar de esta variabilidad productiva, la Superintendencia de Industria y Comercio (2012) reportó que Colombia contribuía al 30% de la producción mundial de cafés arábicos lavados. Actualmente, el país es el tercer productor a nivel mundial, después de Brasil y Vietnam, sin embargo, los modelos productivos de estos dos países tienden a crecer, mientras el modelo colombiano tiende a quedarse estancado en estas fluctuaciones (Ocampo-López & Alvarez-Herrera, 2017).

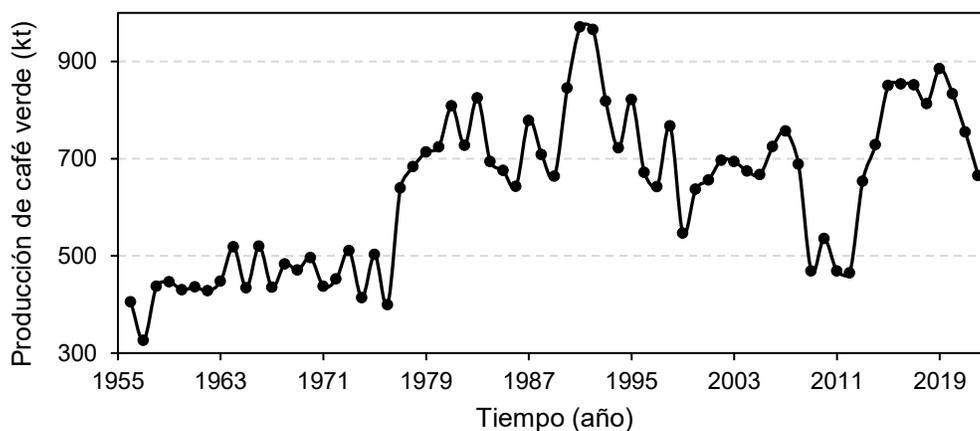


Figura 1-1. Comportamiento de la producción de café en Colombia desde 1956 hasta 2022.

Fuente: Elaboración propia a partir de Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (2023)

El cultivo de café requiere intervención y fortalecimiento a través de instrumentos de gestión de riesgo para promover así inversiones y rentabilidades a largo plazo, que puedan beneficiar a las de 560 mil familias colombianas que depende de él. Este sector fue el pilar del desarrollo económico colombiano en sus inicios y aún es uno de sus principales contribuyentes, con un aporte del 1.0% al PIB nacional y 15% al PIB agrícola en 2021 (Gaviria González, 2021). Aunque el auge de café robusta en el mercado internacional ha opacado el interés en cafés arábicos, es importante destacar que el café colombiano sigue siendo uno de los insumos más reconocidos a nivel mundial y necesita de instrumentos de gestión contundentes para que siga siendo uno de los pilares económicos de un país en proceso de desarrollo como Colombia (Quintero & Rosales, 2014).

1.1.2 Procesamiento postcosecha del fruto de café

La cosecha del fruto o cereza del café se debe realizar en el punto exacto de maduración, la cual se indica por el cambio de tonalidad de la cereza de verde a verde – amarilla, ámbar o rojiza dependiendo de la variedad del café recolectado (Carvajal Herrera et al., 2011; Marín L et al., 2003). Una vez finalizada la recolección, se comienza el procesamiento postcosecha, que consta en separar la semilla o grano de café de las diferentes capas que conforman el fruto. Como se muestra en la Figura 1-2, la cereza está conformada por múltiples capas. La primera capa es el epicarpio o exocarpio, comúnmente denominada la cáscara o piel; la segunda capa es la pulpa o mesocarpio, este también está constituido por una capa de pectina o mucílago, no obstante, esta se considera una tercera capa independiente; la cuarta capa es el endocarpio o pergamino, película blanquecina que envuelve la semilla; la quinta y última capa es el tegumento o película plateada (Alves et al., 2017; León, 2000). En los países caficultores, el proceso de postcosecha llega hasta la remoción del pergamino, dando como resultado el denominado café verde (grano de café más película plateada), el cual es el producto principal de exportación (Alves et al., 2017; Clarke, 1985).

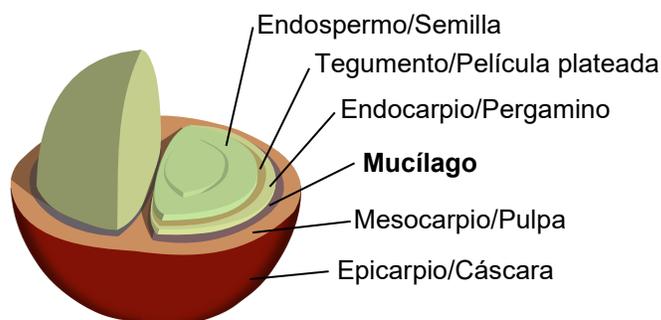


Figura 1-2. Composición del fruto de café.

Fuente: Adaptado y modificado a partir de [Ignacio Icke](http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

De forma convencional se reportan dos metodologías principales para la obtención del café de verde: el proceso en seco que produce cafés naturales, y el proceso húmedo que produce cafés lavados. Es posible obtener café de buena calidad con ambas metodológicas, siempre y cuando cada procedimiento se realice adecuadamente (Clarke, 1985; Mendes Ferrão, 2009).

Los dos métodos requieren que las cerezas de café estén en un estado de maduración óptimo, aunque en el proceso en seco se puede trabajar con los frutos en diferentes estados de desarrollo (Alves et al., 2017). Este procedimiento es uno de los más antiguos y simples, consta de 2 etapas: i) las cerezas de café se secan en su totalidad, comúnmente en campos de sol, o en secadores; ii) el fruto seco (humedad <12%) se descascara por un proceso de molienda o trillado, removiendo la piel, la pulpa y el pergamino en un solo paso. Este proceso se utiliza en los cafés arábicas y robustas producidos en Brasil, Etiopía y Haití, generando bebidas de menor connotación en comparación con los cafés lavados (Alves et al., 2017; Clarke, 1985; International Trade Centre, 2012).

El proceso húmedo es más sofisticado que el proceso en seco, la vía humedad requiere grandes cantidades de agua y equipo especializado para transformar las cerezas recolectadas, el producto final del proceso es el grano de café cubierto por la película plateada y el pergamino (café pergamino seco - cps) (León, 2000). El proceso en húmedo se desarrolla en la finca cafetera, posteriormente el café pergamino es llevado a establecimientos llamados trilladoras para la remoción del endocarpio y la subsecuente producción del café verde (Murillo & Bressani, 1975). Aunque el uso de esta metodología implica una inversión más grande en términos de infraestructura, los cafés obtenidos son de alta calidad y alto valor comercial (Alves et al., 2017). Es importante recalcar que los frutos que se procesan por vía húmeda deben estar completamente maduros, de lo contrario se pueden obtener café de baja calidad (Mendes Ferrão, 2009).

El proceso por vía húmeda es el más utilizado en Colombia, donde es denominado “Beneficio Húmedo del Café”, de acuerdo con Alves et al. (2017) y Federación Nacional de Cafeteros (2004a, 2004b) este consta de las siguientes etapas:

i) Despulpado: Remoción de la cáscara y pulpa (epicarpio y mesocarpio) del fruto (Figura 1-3). Se recomienda que esta etapa se realice dentro las primeras 6 horas después de la recolección, para evitar el fermento o descomposición del grano recolectado. Una máquina despulpadora recibe el fruto de café y ejerce presión sobre este para liberar la semilla recubierta de mucílago (Café baba).

ii) **Remoción de mucílago:** Esta capa puede ser removida a través de dos procesos, Fermentación Natural y Desmucilaginado Mecánico.

1. Fermentación Natural: La fermentación es un proceso por lotes que ocurre gracias a la microbiota natural presente en la pulpa del café; este conjunto de microorganismos se encarga de degradar las pectinas, azúcares y demás componentes del mucílago. El café baba es almacenado en tanques con una capacidad que pueda contener la producción del día y se dejan allí con agua hasta que se complete el tiempo de fermentación (Figura 1-4A y B). Este tiempo depende de la altitud donde se cultive y procese el grano, según las condiciones puede variar entre 6 a 80 horas.

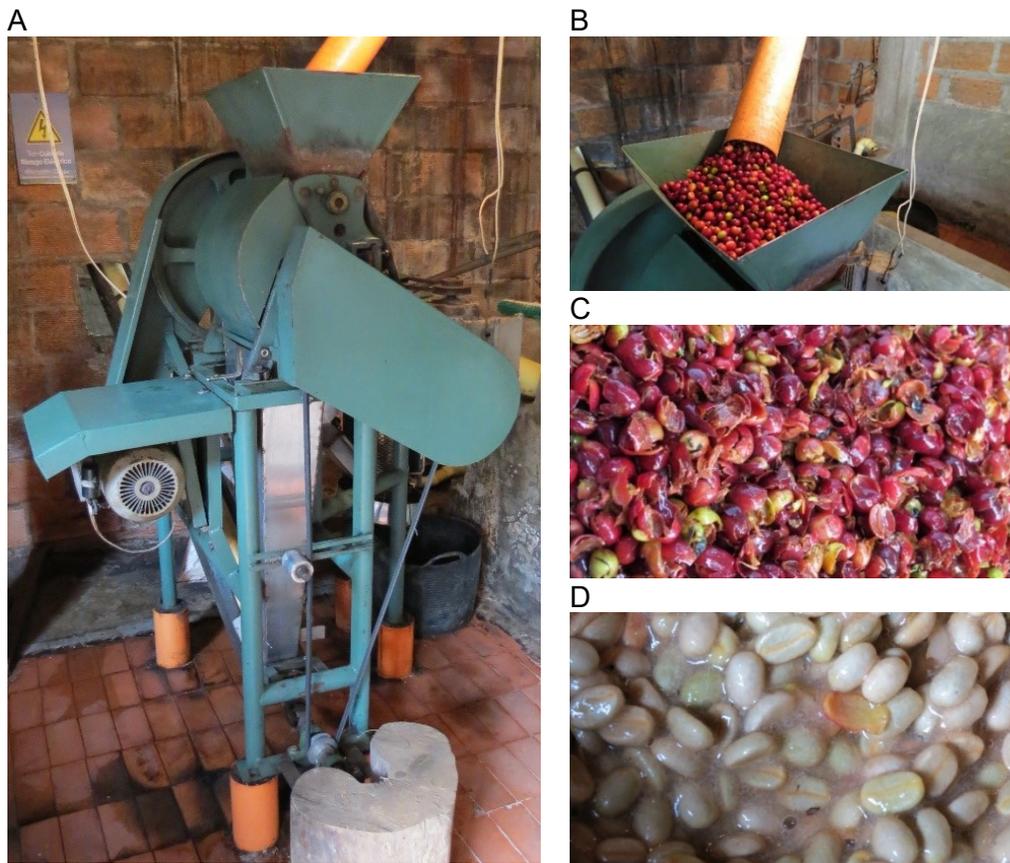


Figura 1-3. Proceso de despulpado. A. Modelo Belcosub que integra máquina despulpadora y desmucilaginator. B. Entrada de los frutos de café en la máquina despulpadora. C. Pulpa de café. D. Café baba.

Fuente: Autor

2. Desmucilaginado Mecánico: El café baba pasa a una máquina desmucilagadora que posee una pared cilíndrica perforada, el mucílago es removido por fricción entre las paredes de esta y el grano de café (Figura 1-4C). Este proceso es relativamente rápido y no requiere altas cantidades de agua, además el mucílago obtenido es fresco, ya que no se ha sometido a una degradación por fermentación. Debido a estas características, este método de desmucilaginado se incluye entre los denominados procesamientos ecológicos del café (Rodríguez et al., 2015).



Figura 1-4. Procesos para la remoción de mucílago de café. A y B. Fermentación Natural en tanques. C. Desmucilaginado Mecánico.

Fuente: Autor

iii) Lavado: Una vez finalizado el tiempo de fermentación o luego del paso del café por el desmucilagador se debe lavar el grano para retirar el mucílago remanente. Se puede realizar en el mismo tanque de fermentación o transportando el mucílago por un canal de correteo lleno de agua, este canal debe tener una pendiente moderada para que el agua y los granos de café se puedan movilizar y así drenar el agua remanente.

iv) Secado y Trilla: Se destaca el secado solar o secado o por aire caliente proveniente de secadores mecánicos, similar al secado hecho con los cafés naturales, donde se

obtiene el denominado café pergamino seco (cps) con una humedad de alrededor del 12%. Después, el cps pasa por una trilladora, máquina de funcionamiento similar a la usada en el despulpado, que separa la capa de pergamino o cascarilla dejando expuesto el café verde.

Los países con más experiencia en implementar este método son Kenia y Colombia, pero estos procedimientos también se extienden a Centroamérica, India, Tanzania, Indonesia, entre otros. Su uso se direcciona al procesamiento de cafés arábigos, ocasionalmente se usa en cafés robustas (Alves et al., 2017; Clarke, 1985).

Existe un tercer proceso que excluye la etapa de fermentación o desmucilaginado, en el cual la cereza madura es despulpada por vía húmeda e inmediatamente es secada, dejando el mucílago adherido al pergamino que posteriormente será removido en el trillado. Este proceso, denominado semi-seco o semi-lavado, ha sido utilizado en África central y Brasil, produciendo cafés catalogados como despulpados naturales (Alves et al., 2017; International Trade Centre, 2012).

1.1.3 Subproductos del café: Mucílago

El beneficio húmedo de café genera subproductos asociados a cada una de las etapas del proceso; se ha estimado que del beneficio tradicional de 100 kg de fruto de café maduro se pueden obtener 40.5 – 45.0 kg de pulpa, 14 – 24.4 kg de mucílago, 3.7 - 4 kg de pergamino y 16 kg de café verde o almendra (Montilla et al., 2008; Muñoz Moreno & Noguera Ortiz, 2016). Relacionando estos valores con la producción colombiana de café en el 2022, la cual alcanzó un máximo de 688 kilotoneladas (kt) de café verde (Federación Nacional de Cafeteros, 2023), se puede deducir que aproximadamente se procesaron 4143 kt de frutos de café, de los cuales se estima que generaron 1677 kt de pulpa, 1111 kt de mucílago, 153 kt de pergamino (Figura 1-5).

La industria cafetera es una de las cadenas productivas que más subproductos genera, la bebida final que se consume en diferentes partes del mundo sólo representa del 5 al 10% del fruto recolectado (del Castillo et al., 2019; Rodríguez-Valencia & Zambrano Franco, 2010). De acuerdo con lo anterior, es evidente que se hace primordial buscar otras

opciones y procesos en los que estos puedan ser incluidos como materias primas. En este contexto, se han incrementado las investigaciones que buscan utilizar los subproductos de la cadena productiva del café para generar metabolitos de interés industrial como el ácido gálico, el ácido láctico, compuestos volátiles y bioetanol a partir de la pulpa y el mucílago (Bhoite et al., 2013; Bonilla-Hermosa et al., 2014; Pleissner et al., 2016), producción de enzimas como proteasa, tanasa y xilanas a partir de la pulpa y el pergamino (Battestin & Macedo, 2007; Murthy et al., 2009; Murthy & Madhava Naidu, 2012).

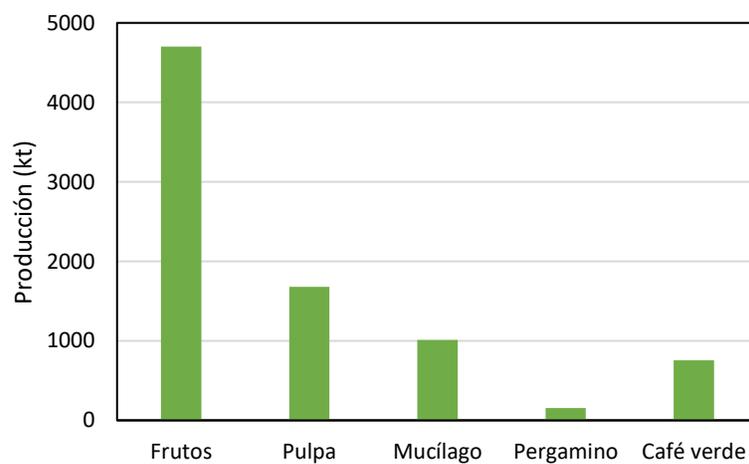


Figura 1-5. Cantidades de productos/subproductos de café generadas en Colombia en 2022.

Fuente: Elaboración propia a partir de Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (2023), Muñoz Moreno & Noguera Ortiz (2016) y Montilla et al. (2008).

El mucílago o comúnmente llamado “mieles del café” ha demostrado tener una composición química ideal para ser utilizado como medio de cultivo en procesos fermentativos (Tabla 1-1 y Tabla 1-2). Se ha evidenciado una cantidad suficiente de azúcares reductores solubles, micronutrientes y contenido de nitrógeno, que pueden ser fácilmente aprovechados por una alta variedad de microorganismos. De hecho, Neu et al. (2016) reporta la presencia de diversidad de azúcares en el mucílago, entre estos glucosa, galactosa, fructosa, xilosa y sacarosa, que suman una concentración total de entre 53 y 60 g/L de sacáridos que pueden ser utilizados como fuente de carbono en el metabolismo microbiano. Cabe destacar que las concentraciones reportadas pueden diferir según la fuente bibliográfica, puesto que estos valores se ven afectados por la variedad de café, las

condiciones medioambientales en las que se desarrollaron los frutos y el tipo de procesamiento (Tabla 1-1) (Ramírez Gómez et al., 2015).

Tabla 1-1. Composición del mucílago de acuerdo con el método de obtención.

Parámetros	Semi-lavado	Desmucilaginado mecánico	Fermentación Natural (20 h)
Humedad (%)	97.56	88.96	88.7
Azúcares totales (%)	1.21	6.54	5.36
Azúcares reductores (%)	1.13	4.03	3.51
Azúcares no reductores (%)	0.08	2.51	1.85
Nitrógeno (%)	-	0.9	-
Proteína (%)	4.26	0.93	-
Lípidos (%)	-	0.126	0.072
Cenizas (%)	0.16	0.43	0.29
DQO (mg O ₂ /L)	10259	-	-
DBO (mg O ₂ /L)	6500	-	-
Acidez (mg CaCO ₃ /L)	-	969	3.350
pH	5.25	-	-

Fuente: Elaboración propia a partir de Bonilla-Hermosa et al. (2014) y Puerta-Quintero & Ríos-Arias (2011)

Tabla 1-2. Concentración de nutrientes en el mucílago de café.

Macronutrientes (%)		
Nitrógeno	N	1.357
Fosforo	P	0.116
Potasio	K	1.282
Calcio	Ca	0.370
Magnesio	Mg	0.088
Micronutrientes (mg/Kg)		
Hierro	Fe	301.87
Manganeso	Mn	26.91
Zinc	Zn	37.26
Cobre	Cu	21.63
Boro	B	27.59

Fuente: Elaboración propia a partir de Sadeghian-Khalajabadi et al. (2006)

Aunque las concentraciones de los componentes del mucílago presentan diferencias según la fuente de obtención, este siempre se caracteriza por un alto contenido de azúcares y otros compuestos orgánicos que aportan al 26% de la contaminación total

generada por los subproductos del café. Este hecho genera efluentes con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) de entre 25000 y 110000 mg O₂/L, la cual los hace altamente contaminantes (Ramírez Gómez et al., 2015). Considerando que el Ministerio de Ambiente y Desarrollo (Resolución 631, 2015) estableció que los vertimientos provenientes beneficio del café ecológico y tradicional no deben superar valores de DQO de 3000 y 600 mg O₂/L, respectivamente, se hace indispensable buscar estrategias para reducir la contaminación asociada a este residuo.

La mayoría de los integrantes del gremio caficultor ha adoptado sistemas de tanque séptico para tratar las mieles del café y reducir su capacidad contaminante (Rodríguez-Valencia et al., 2013). Sin embargo, otros se han centrado en buscar usos alternativos que puedan derivar en la generación de productos a partir de este como la producción de jabones o bebidas energizantes ([Naox®](#), Colombia).

De igual modo, diferentes investigaciones han buscado valorizar el mucílago de café al usarlo como medio alternativo para la obtención de diferentes productos metabólicos. La mayoría de estos estudios han utilizado el mucílago como sustrato único o en combinación con otros componentes nutricionales, obteniendo rendimientos promisorios que podrían impulsar procesos biotecnológicos a partir de este residuo (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Uso de mucílago en bioprocesos para obtener productos de interés

Producto	Tipo de mucílago	Aditivos	Referencias
Ácido láctico	Desmucilaginado mecánico	-	(Pleissner et al., 2016)
Hidrógeno		Residuos de frutas	(Moreno Cárdenas & Zapata Zapata, 2019)
Hidrógeno		Estiércol de cerdo y residuos de cacao	(Hernández et al., 2014)
Celulosa Bacteriana		Medio microbiológico HS	(Flórez García, 2015)
Etanol	No reporta	-	(Orrego et al., 2018)

Fuente: Elaboración propia a partir de las fuentes citadas

1.2 Celulosa Bacteriana

La celulosa es una macromolécula que se constituye por la unión de monómeros de glucopiranososa a través del enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$, que se conoce principalmente por su función estructural en plantas, algas y tunicados (Dufresne, 2012). Este polímero es uno de los recursos renovables más abundantes en la tierra con una tasa de formación anual que supera la tasa de producción mundial de polímeros sintéticos, además sus propiedades estructurales y funcionales a menudo son superiores (Dumitriu, 2005).

Si bien la celulosa se asocia normalmente con organismos superiores, se ha encontrado que este polímero también puede ser producido por ciertas especies de bacterias (K. Y. Lee et al., 2014). Esta celulosa, producto del metabolismo bacteriano, ha ganado un gran interés a nivel académico e industrial, lo cual se evidencia en el incremento de documentos publicados en esta área desde inicio de siglo, donde los estudios realizados se centran tanto en su producción como en sus potenciales aplicaciones y modificaciones (Figura 1-6).

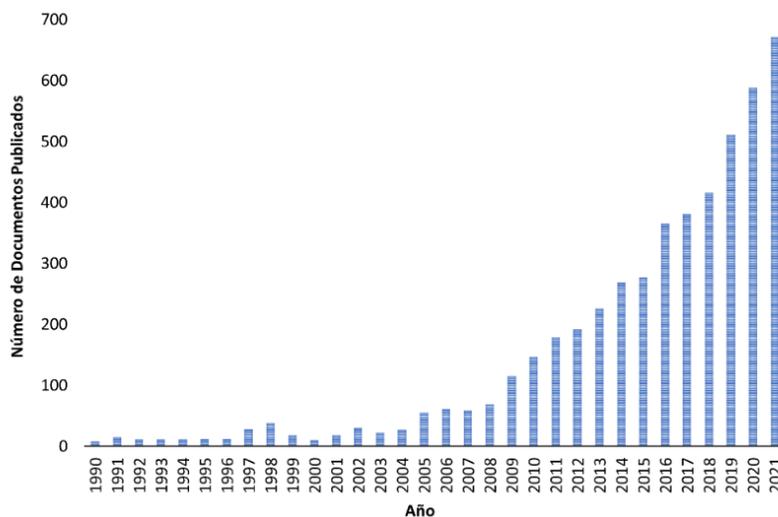


Figura 1-6. Producción bibliográfica en Celulosa Bacteriana desde 1990 a 2021.

Fuente: Elaboración propia a partir de Motor de búsqueda Scopus (Término de búsqueda “Bacterial cellulose”).

La novedad con respecto a la celulosa bacteriana (CB) se centra en que, a diferencia de la celulosa de origen vegetal, esta se obtiene libre de residuos de lignina o hemicelulosa y su proceso de purificación no requiere de altas concentraciones de álcalis o sustancias

oxidantes (Radotić & Mičić, 2016; Zhong, 2020). Aunque su estructura molecular sigue siendo igual a la de las plantas, su alta pureza y modo de producción hacen que adquiera propiedades promisorias para diferentes aplicaciones (Blanco Parte et al., 2020; Kadier et al., 2021). Además, en términos de productividad, se ha estimado que fuentes vegetales madereras contenidas en el espacio de una hectárea tardarían siete años en producir 80 t de celulosa, mientras que una cantidad similar de celulosa bacteriana sería producida en 22 días usando un volumen de trabajo de 500 m³ (Jozala et al., 2016).

De los microorganismos productores de CB, se han reportado diferentes especies pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Gluconoacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacterium*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* (Dourado et al., 2016). Sin embargo, las especies pertenecientes al género *Komagataeibacter* (Yamada et al., 2012) han sido catalogadas como los productores más eficientes y con mayor rendimiento de este exopolímero (Ryngajłto et al., 2020).

Aún no se entiende muy bien cuál es rol biológico o la razón evolutiva por la cual *Komagataeibacter* produce este compuesto en tan altas cantidades. Una explicación inicial fue dada por Cook y Colvin (1980), argumentando que la matriz celulósica ayudaba a flotar a este microorganismo estrictamente aeróbico cerca de la superficie rica en oxígeno; otros autores avalan esta teoría y además argumentan que esta envoltura les brinda protección contra factores adversos como la deficiencia de nutrientes, radiación UV y deshidratación del medio (Anton-Sales et al., 2019). Actualmente la CB es un producto con una alta relevancia y el principal objetivo es innovar en procesos que potencialicen su producción.

1.2.1 El género *Komagataeibacter*

Uno de los primeros reportes en el estudio de bacterias productoras de celulosa lo realizó Brown (1886) en su estudio llamado *On an acetic ferment that forms cellulose*, donde aisló y estudió los microorganismos responsables de producir la llamada “madre del vinagre” o *zooglea* (Figura 1-7). Brown demostró que estos microorganismos eran capaces de producir esta matriz a partir de diferentes fuentes de carbono, además sus experimentos demostraron que su composición química era igual a la celulosa del algodón. Debido a

esta característica especial que le diferenciaba de las ya estudiadas *Bacterium aceti*, a este nuevo microorganismo se le confirió el nombre de *Bacterium xylinum*.

A medida que se hacían avances en la clasificación taxonómica de bacterias, Beijerinck (1898) estableció el género *Acetobacter*; pero sólo hasta 1974 se volvería a mencionar el microorganismo de Brown en la octava edición del Manual de Bergey's, el cual fue reclasificado como *Acetobacter aceti* subs. *xylinus* (de Ley & Frateur, 1974).



Figura 1-7. “Madre de vinagre” o matriz de celulosa en fermento casero.

Fuente: [Warden Wikipedia \(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/\)](http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Casi una década después Yamada (1983), propondría cambios en esta clasificación, elevando este microorganismo al rango de especie (*Acetobacter xylinus*). En 1984, se propuso la división del género *Acetobacter* en dos subgéneros, basado en la diferencia del sistema de ubiquinonas, donde las especies que presentaran ubiquinona Q-10 serían asignadas al subgénero *Gluconoacetobacter*; entre las especies transferidas estuvieron *A. diazotrophicus*, *A. europaeus*, *A. hansenii*, *A. liquefaciens* y la reclasificada *A. xylinus* (Yamada & Kondo, 1984).

En 1997, gracias a los avances en la tecnología de secuenciación y los estudios de clasificación con base en la secuencia de ADN ribosomal 16S, *Gluconoacetobacter* se ascendió a la categoría de género, por lo que *A. xylinus* pasó a llamarse *Gluconoacetobacter xylinus* (Yamada et al., 1997). Diferencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas dentro del nuevo género, hicieron que este se dividiera en dos grupos, *Ga*.

liquefaciens y *Ga. xylinus*, donde el primero se caracteriza por ser motil y producir pigmentos cafés, y el segundo carece de estas características (no motil, no producción de pigmentos) (Yamada & Yukphan, 2008).

Para la década del 2010's, los estudios de los genes constitutivos (*dnaK*, *groEL* y *rpoB*) hechos por Cleenwerck et al. (2010) proporcionaron una evidencia más fehaciente de la diferencia filogenética de los dos grupos de *Gluconoacetobacter*, por lo que Yamada propuso que las bacterias del grupo *Ga. xylinus* fueran elevadas al género *Komagataeibacter*, nombre escogido así en honor al microbiólogo y científico japonés Kazuo Komagata (Komagata et al., 2014; Yamada et al., 2012).

En la actualidad, el género *Komagataeibacter* está incluido en la familia *Acetobacteraceae*, del orden *Rhodospirillales* y la clase *Alphaproteobacteria*, este cuenta con 14 especies (Tabla 1-4), las cuales han sido aisladas principalmente de alimentos fermentados como vinagres, kombucha, nata de coco, entre otros (Gomes et al., 2018). Estos se caracterizan por ser bacilos gram-negativos que miden 0.5-0.8 μm de ancho y 1.0-3.0 μm de largo, se pueden encontrar individuales o unidos en pares o cadenas y sus colonias pueden ser circulares, lisas o rugosas, con elevación convexa o ubonada y color característico blanco, crema o beige (Komagata et al., 2014).

El género *Komagataeibacter* también se clasifica en un grupo de microorganismo denominado Bacterias del Ácido Acético (BAA), estas bacterias tienen la característica de ser Viables No Cultivables (VNC); es decir, en su hábitat natural o fuente de aislamiento proliferan fácilmente, pero al momento de ser extraídas y sembradas en los medios microbiológicos comúnmente usados presentan un crecimiento deficiente (Gerard, 2015; Gomes et al., 2018). A parte de los macronutrientes (C, H, O, N, S, P) y algunos micronutrientes (K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Mo, Ni y Cu) que se deben proporcionar a los medios, estos deben ser enriquecidos con altas concentraciones de la fuente de carbono (azúcares), de alrededor del 1 al 3%; estos medios también se deben enriquecer con proporciones de etanol y ácido acético del 0.5-5% y el 0.1-0.3% v/v, respectivamente. Cumpliendo estos requerimientos nutricionales y asegurando un ambiente de incubación para mesófilos, se ha podido obtener aislados de las BAA (Gerard, 2015; Komagata et al., 2014).

Tabla 1-4. Especies pertenecientes al género *Komagataeibacter*.

No.	Especie	Fuente de aislamiento	País
1	<i>Komagataeibacter diospyri</i>	Frutos de caqui y chicozapote	Tailandia
2	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	Fermentación de vinagre rica en ácido	Alemania y Suiza
3	<i>Komagataeibacter intermedius</i>	Kombucha, cidra, vinagre	Suiza y Eslovenia
4	<i>Komagataeibacter kakiaceti</i>	Vinagre de caqui	Japón
5	<i>Komagataeibacter medellinensis</i>	Vinagre de frutas artesanal	Colombia
6	<i>Komagataeibacter melaceti</i>	Biorreactor para la producción de vinagre de cidra	Eslovenia
7	<i>Komagataeibacter melomenusus</i>		Eslovenia
8	<i>Komagataeibacter nataicola</i>	Nata de coco	Filipinas
9	<i>Komagataeibacter oboediens</i>	Vinagre de vino rojo	Alemania
10	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	Jugo de manzana italiano	Italia
11	<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	Vinagre (antes <i>Ko. hanessi</i>)	Israel
12	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>	Cerezo negro (antes <i>Ko. xylinus</i>)	Japón
13	<i>Komagataeibacter swingsii</i>	Jugo de manzana italiano	Italia
14	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Vinagre	Inglaterra

Fuente: Elaboración propia a partir de Reimer et al. (2022) y Schoch et al. (2020)

1.2.2 Biosíntesis de celulosa bacteriana

El operón *bcs* tipo I que codifica el complejo celulosa sintasa fue identificado por primera vez en la especie *Ko. xylinus*. Este operón codifica cuatro subunidades principales (BcsA, BcsB, BcsC, BcsD), además tiene tres genes accesorios, que codifican proteínas que no están directamente relacionadas con las síntesis de celulosa, pero su ausencia en el proceso limitaría la producción de esta (BcsZ, BcsH y BglX) (Figura 1-8A) (Abidi et al., 2022; Jacek et al., 2019).

El complejo celulosa sintasa se encuentra posicionado entre la membrana lipídica interna, el espacio periplásmico y la membrana lipídica externa del microorganismo productor (Figura 1-8B). Las subunidades BcsA y BcsB conforman el núcleo de la celulosa sintasa y

sin ellas la síntesis de CB no sería posible (Römling & Galperin, 2015). BcsA se encuentra ubicada en la membrana interna de la célula y es la encargada de realizar la reacción de polimerización, mientras que BcsB se encarga del transporte de la cadena sintetizada al espacio periplásmico. BcsC está relacionada con el transporte de la cadena celulósica fuera de la célula; por otro lado, se ha demostrado que BcsD está implicada en los arreglos cristalinos de las cadenas de glucano producidas (Abidi et al., 2022; Jacek et al., 2019). Las subunidades BcsZ y BglX, son conocidas por tener actividad hidrolítica endoglucanasa y β -glucosidasa, respectivamente; mientras que BcsH es una proteína complementaria que afecta los niveles de expresión de BcsB y BcsC, además apoya a BcsD en el arreglo de las cadenas de celulosa nacientes en estructuras cristalinas, su gen codificante (*bcsH*) sólo se encuentra presente en los géneros *Gluconoacetobacter* y *Komagataeibacter* (Abidi et al., 2022; Römling & Galperin, 2015).

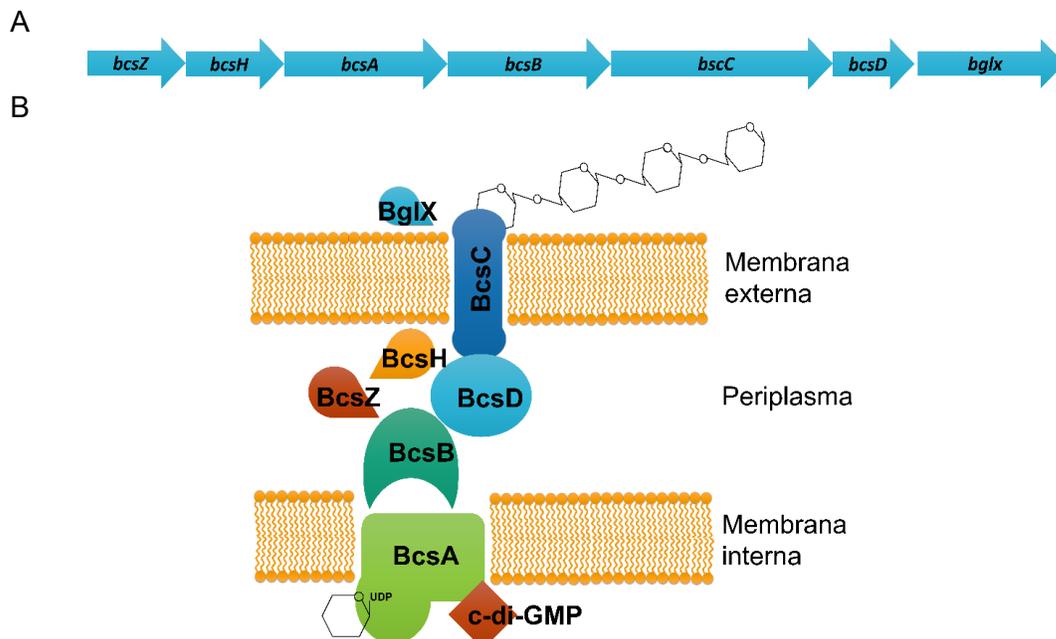


Figura 1-8. Maquinaria genética y molecular involucrada en la biosíntesis de CB. A.

Operón *bcs* tipo I que codifica para la celulosa sintasa. B. Complejo celulosa sintasa

Fuente: Elaboración propia a partir de Abidi et al. (2022) y Römling & Galperin (2015)

Las moléculas de glucosas que entran a la célula no son directamente polimerizadas en cadenas de celulosa, la ruta metabólica empieza con la conversión de glucosa a glucosa-6P por la enzima glucoquinasa (EC 2.7.1.2); la glucosa-6P pasa a glucosa-1P por la

enzima fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2); la glucosa-1P se convierte en uridina-5'-difosfato- α -D-glucosa (UDP-glucosa) por medio de la enzima UTP-glucosa-1-fosfato-uridiltransferasa (EC 2.7.7.9). Finalmente, la subunidad BcsA de la celulosa sintasa (EC 2.4.1.12) reconoce a la UDP-glucosa como sustrato y transfiere el azúcar a la cadena del polímero naciente (Römling & Galperin, 2015). Este grupo UDP, que está unido al carbono 1 de la glucosa, es escindido y liberado cuando ocurre la reacción de condensación.

Contar con monómeros de glucosa libre no es estrictamente necesario para dar inicio a la producción, el proceso puede empezar con el intermediario glucosa-6P y esta se puede obtener a partir de otras rutas metabólicas como las de Pentosas Fosfato, Glicolisis, Gluconeogénesis y Ácidos Tricarboxílicos (Jacek et al., 2019; Jang et al., 2019), por lo que la síntesis de celulosa bacteriana puede comenzar en función de diferentes metabolitos que participan en estas rutas, como hexosas, piruvato, dihidroxiacetona, ácidos dicarboxílicos, e incluso disacáridos que pueden ser escindidos a sus respectivos monosacáridos (Jacek et al., 2019; S.-S. Wang et al., 2018).

Desde el punto de vista de las reacciones metabólicas, el proceso limitante para la producción de CB sería la transformación de glucosa-1P a UDP-glucosa por la enzima EC 2.7.7.9, debido a que genera el sustrato de la celulosa sintasa (Römling & Galperin, 2015). Sin embargo, hay otros procesos que regulan la producción y pueden también ser limitantes. A parte del dominio catalítico de la subunidad BcsA, esta también cuenta con un dominio regulador PilZ, sitio alostérico que se activa por la unión de la diguanosina monofosfato cíclica (c-di-GMP), este mecanismo de regulación postraduccional dependerá de la concentración de c-di-GMP al interior de la célula (Abidi et al., 2022; Jacek et al., 2019). Bajas concentraciones de c-di-GMP conllevaran a bajos rendimientos de celulosa bacteriana.

Actualmente, el entendimiento de esta maquinaria productiva, a nivel genético y metabólico, ha llevado a avances en el mejoramiento de cepas, incremento en el rendimiento de celulosa, o modificaciones *in vitro* de la celulosa producida. Sin embargo, la aplicación de modelos genético-metabólicos aún es limitada para su aplicación en desarrollos de producción a gran escala (Buldum & Mantalaris, 2021).

1.2.3 Producción de Celulosa Bacteriana

Al igual que otros procesos fermentativos, la producción de celulosa bacteriana se ve afectada por diversas variables como el tipo de especie utilizada, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, la concentración inicial de inóculo, el tipo de sustrato o medio de cultivo, el tiempo de incubación, el modo de operación, el tipo de biorreactor, entre otros. La configuración de estas variables afectará el rendimiento de celulosa y también sus propiedades físicas y mecánicas.

1.2.3.1 Modo de operación y técnicas de cultivo

Las técnicas de cultivos para la producción de celulosa bacteriana más empleadas corresponden a sistemas discontinuos (batch) o semicontinuo/intermitente (fed-batch) (Azeredo et al., 2019; Blanco Parte et al., 2020). El sistema continuo no es considerado en la producción debido a que la celulosa tiende a formar aglomerados que causarían problemas en las operaciones corriente abajo (*downstream*).

Los modos de cultivo se pueden emplear en sistemas tanto estáticos como agitados, sin embargo, dependiendo de este tipo de operación se obtendrán celulosas con características diferentes (Fernandes et al., 2020). En el sistema estático se producen películas que se forman en el área interfacial del medio de cultivo, la matriz celulósica crece hasta ocupar el área superficial del medio, mientras que en el sistema agitado regularmente se obtienen pellets esféricos y/o elipsoidales (Azeredo et al., 2019; Kadier et al., 2021).

El estudio de Watanabe et al. (1998) mostró que la estructura reticular de celulosas producidas en operación estática (CB-Es) y agitada (CB-Ag) era similar, sin embargo, las fibrillas de CB-Ag se encontraban curvadas y enredadas, mientras que CB-Es presentó fibrillas extendidas. Estos cambios también se reflejaron en las propiedades mecánicas y estructurales, donde CB-Ag mostró un Módulo de Young menor, pero mayor capacidad de retención de agua y viscosidad que CB-Es. De manera que, el modo de producción influirá en la aplicación que se le vaya a dar a la celulosa bacteriana. Ambos modos de operación presentan ventajas y desventajas que se resumen en la Tabla 1-5.

Tabla 1-5. Ventajas y desventajas del modo de operación estático y agitado.

	Estático	Agitado
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Montaje simple -Obtención de películas de celulosa de diferentes geometrías y tamaños -Modo de operación más utilizado -Previene la generación de mutantes celulosa negativa (Cel-) 	<ul style="list-style-type: none"> -Mayores rendimientos -Favorece transferencia de oxígeno -Homogeneidad de nutrientes en el cultivo
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Largos tiempos de cultivo -Baja productividad -Limitaciones de oxígeno -Condiciones nutricionales no homogéneas 	<ul style="list-style-type: none"> -Estrés de cizalla -Generación de mutantes celulosa negativos (Cel-) -Mayor consumo de energía -Medios no newtonianos y mayor requerimiento de potencia en el rotor.

Fuente: Elaboración propia a partir de Fernandes et al. (2020), Blanco Parte et al. (2020) y Azeredo et al. (2019)

Otro parámetro estudiado en el cultivo estático es la relación área interfacial:volumen de medio de cultivo (A_i/V), ya que puede inferir en la concentración de oxígeno del medio, además es un parámetro que se ha usado para el escalado de este tipo de procesos. Algunos autores han determinado que el valor óptimo de esta relación es de 0.77 cm^{-1} (Sundaram et al., 2021), 0.8 cm^{-1} (Caicedo et al., 2001) y 0.45 cm^{-1} (Molina Ramírez, 2018), este valor puede estar supeditado por la geometría del recipiente donde se lleve a cabo la fermentación.

Los rendimientos de celulosa bacteriana y sus propiedades también dependerán de la geometría del biorreactor (Blanco Parte et al., 2020). Si bien se han usado reactores de tanque agitado y air-lift para la producción de CB, debido a las características de este metabolito se han diseñado diferentes geometrías de birreactores para su producción. Algunos de los diseños empleados son reactor de disco rotatorio, reactor de aerosol, reactor de lecho de goteo, reactor de rodillo ensamblado con ductos de oxígeno, reactores agitados con diferentes geometrías de hélice, reactor de movimiento horizontal (Horizontal lift reactor-HoliR), entre otros (Blanco Parte et al., 2020; K. Y. Lee et al., 2014; Ul-Islam et al., 2015).

1.2.3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo se caracterizan por ser definidos o complejos, en los definidos se conoce la composición exacta de cada uno de los componentes que participan en él,

mientras que en los complejos se utilizan sustancias de las que no es posible determinar su composición química, como la peptona, por lo que no es posible determinar la cantidad exacta de nitrógeno que aportaría este compuesto al medio.

Uno de los medios más reportados para la producción de CB es el medio complejo HS, formulado por Hestrin y Schramm (1954), otras formulaciones de medio complejos que se han usado son las de Yamanaka et al. (1989), Son et al. (2003) y Zhou et al. (2007), también se han planteado medios mínimamente definidos como el especificado por S. S. de Souza et al. (2019) (Tabla 1-6).

Tabla 1-6. Composición de medios de cultivos usados para la producción de CB.

Componentes	% p/v (* % v/v)				
	HS ^c	Yamanaka ^c	Son ^c	Zhou ^c	de Souza ^D
Glucosa	2	5	1.5	1.8	0.45
Sacarosa	-	-	-	2.1	-
Licor fuerte de maíz	-	-	2	2.0	-
Peptona	0.5	-	-	-	-
Extracto de levadura	0.5	0.5	-	-	-
Ácido cítrico	0.115	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	0.274	-	-	-	0.232
KH ₂ PO ₄	-	0.3	0.1	0.2	0.12
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	-	0.005	0.3	0.04	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-	0.05349
NaCl	-	-	-	-	0.2
NaAlg	-	-	-	0.04	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0.5	0.3	0.4	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	0.005	0.08	0.04	0.01971
CaCl ₂ 2H ₂ O	-	-	0.01	-	-
FeSO ₄ 7H ₂ O	-	-	0.0005	-	-
H ₃ BO ₃	-	-	0.0003	-	-
Nicotinamida	-	-	0.00005	-	-
Etanol	-	-	0.6*	-	-
pH	6.0	5.0	6.5	6.0	6.5

C: Medio complejo, D: Definido

Fuente: Elaboración adaptada y modificada de Sperotto et al. (2021)

El planteamiento de diferentes formulaciones de medios para la producción de celulosa bacteriana no tiene como único objetivo incrementar rendimientos. De Souza et al. (2019) realizó una comparación entre el medio definido y dos medios complejos (HS y manitol + extracto-de-levadura + peptona) con la bacteria *Novacetimonas hansenii* ATCC® 23769

(*Komagataeibacter hanseniii*) a 26 °C por 15 días, aunque su medio definido obtuvo rendimientos ligeramente menores a los otros medios, la celulosa obtenida demostró una alta transparencia, que según los autores es una propiedad óptica promisorias para aplicaciones en física y electrónica.

Otros autores, como S.-S. Wang et al. (2018), han tomado a HS como medio referencia, pero han variado la fuente de carbono (Acetato, Etanol, Glucosa, Fructosa, Glicerol, Lactosa, Manitol, Sacarosa) para evidenciar los efectos en el rendimiento de CB, su estudio demostró que, en un a fermentación a 30 °C por 7 días con una cepa de aislada de *Komagataeibacter*, el mayor y menor rendimiento se obtuvo con fructosa (1.529 g/L) y lactosa (0.040 g/L) respectivamente. Sin embargo, con respecto a las propiedades estructurales de la CB, se observó que el mayor índice de cristalinidad (90%) se daba al usar manitol como fuente de carbono.

Se han recopilado varios estudios con respecto a la formulación de medios para la obtención de celulosa bacteriana (Sperotto et al., 2021), en la cual se demarcan las ventajas de los medios sintéticos, especialmente los medios definidos. Sin embargo, los bajos rendimientos, altos costos y periodos extensos de incubación no permiten que la producción de celulosa se pueda llevar a gran escala. Los medios de cultivo siguen siendo un factor limitante para esta industria, considerando que representan del 50 al 60% del costo total de la producción, es por lo que se ha planteado el uso de medios alternativos como los residuos industriales. Las corrientes de residuos generadas en varias industrias son sustancias ricas en fuentes de carbono, nitrógeno y minerales, lo que los hace medios ideales para la obtención de CB (Tabla 1-7) (Kadier et al., 2021).

La eficacia de estos medios dependerá de la bacteria productora y las condiciones de operación. Por ejemplo, Algar et al. (2015) evaluó la producción de CB utilizando residuos de piña en sistemas estáticos y agitados, encontrando que en el segundo los rendimientos eran cuatro veces menores que en el primero. En otros estudios se ha encontrado que es importante suplementar los residuos con fuentes de nitrógeno, ya que la deficiencia de estos componentes en el residuo compromete la producción de CB (Saavedra-Sanabria et al., 2021). No obstante, también hay residuos como las frutas podridas que pueden brindar todos los nutrientes necesarios para alcanzar producciones óptimas de CB sin necesidad de ser suplementados (Jozala et al., 2015).

Tabla 1-7. Producción de celulosa bacteriana a partir de residuos industriales.

Bacteria	Residuo	Rendimiento	Tiempo	Temperatura	pHi	Inóculo	Referencia
Estático							
<i>Novacetimonas hansenii</i> (<i>Gluconacetobacter hansenii</i>)	Extracto de pulpa de café	5.6 g/L	14 días	27 °C	4.6	5% v/v	(Rani & Appaiah, 2013)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> NRRL B-42	Melaza de caña + HS	5.8 g/L	14 días	28 °C	5.0	-	(Vazquez et al., 2013)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> NRRL B-42	Glicerol de biodiesel + Licor fuerte de maíz	10 g/L	14 días	28 °C	5.0	-	
<i>Komagataeibacter medellinenses</i>	Panela y residuos de piña	3.24 g/L	13 días	28 °C	3.5	1% v/v	(Algar et al., 2015)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582	Cultivo de frutas podridas	60 g/L	4 días	30 °C	3.8	1x10 ⁻⁶ CFU	(Jozala et al., 2015)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> CGMCC 29554	Agua residual de azufaifo confitado hidrolizada	2.25 g/L	4.75 días	30 °C	-	-	(Z. Li et al., 2015)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23768	Mucílago DM + HS (sin glucosa)	4.8 g/L	7 días	30 °C	5.14	1% v/v	(Flórez García, 2015)
<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>	Melaza de caña hidrolizada, borra de café y 1% v/v EtOH	11.08 g/L	10 días	30 °C	4.0	10% v/v	(K. C. de Souza et al., 2021)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23768	Mucílago de cacao + peptona + extracto de levadura + bufer sodio citrato	14.06 g/L	15 días	30 °C	3.78	1% v/v (1x10 ⁻⁵ CFU)	(Saavedra-Sanabria et al., 2021)
Agitado							
<i>Komagataeibacter medellinenses</i>	Panela y residuos de piña	0.82 g/L	7 días	28 °C	3.5	1% v/v	(Algar et al., 2015)

pHi: pH inicial

Fuente: Elaboración propia adaptada y modificada de Kadier et al. (2021)

1.2.3.3 Otros parámetros de operación

Las bacterias productoras de CB son microorganismos mesófilos que se desarrollan entre 25 a 45 °C (Komagata et al., 2014), por lo que la mayoría de los estudios desarrollados en este ámbito han fijado temperaturas entre 25 y 30 °C de incubación para la producción de CB. De igual manera son microorganismos pertenecientes a las BAA, su pH de crecimiento se encuentra en rangos de 5.5 a 6, sin embargo, se pueden desarrollar a pHs más bajos entre 2.0 y 2.2 (Gerard, 2015), se ha fijado que el pH inicial del medio de cultivo puede variar entre 3.5 y 7 (Fernandes et al., 2020). El oxígeno disuelto también es un factor importante en la producción de celulosa bacteriana, además porque este género se caracteriza por ser aerobio obligado, no obstante, presiones parciales de oxígeno entre 10 al 15% en la fase gaseosa del biorreactor, han incrementado la producción de CB en un 25%, comparado con la presión parcial atmosférica bajo las mismas condiciones (Raghavendran et al., 2020).

El volumen de inóculo o cantidad de células inoculadas es un parámetro que varía mucho de una investigación a otra (Tabla 1-7). Se ha propuesto que un volumen de inóculo del 10 al 15% v/v de un cultivo con una edad de 3 a 30 días es ideal para iniciar la fermentación (Fernandes et al., 2020), sin embargo, no es fácil calcular el número de células presentes en este volumen, ya que, por su característica de VNC y encontrarse en pares o cadenas, los conteos en placa no son técnicas de recuento confiables (Gerard, 2015).

Otro aspecto que restringe el conteo de las bacterias productoras de CB es el atrapamiento de las células en la matriz de celulosa naciente. Algunos autores han planteado el uso de aditivos que restrinjan la formación de CB en la fase de preparación de inóculo y permitan obtener cultivos con una alta concentración celular (Taweecheep et al., 2019; Z. G. Wang et al., 2016), entre los aditivos están la carboxi-metil celulosa y enzimas con actividad celulasa. Varios autores han adoptado el uso de celulasa para la preparación de inóculo y para el subsecuente conteo de células, la restricción de la producción de celulosa en esta etapa les ha permitido medir el crecimiento celular a través de técnicas como Densidad Óptica, medida a 540 o 600 nm (Chao et al., 2000; Taweecheep et al., 2019). Antes de

realizar la transferencia de volumen del cultivo semilla a la fermentación se remueve la enzima celulasa por centrifugación.

1.2.3.4 Lavado y purificación

Al ser un exopolímero, la recuperación de la celulosa bacteriana del medio es un proceso sencillo, ya que existe un límite físico que los separa. Al ser removida de este, la matriz aún queda impregnada con los componentes del medio y con la mayoría de la carga celular. Para eliminar estos componentes generalmente se realiza un lavado inicial con agua desionizada y se expone a agentes blanqueadores utilizados en la industria papelera y de pulpas madereras como el NaOH, KOH, dodecilsulfato, NaClO, NaClO₂, pero en menores concentraciones y cantidades (Carreño Pineda, 2011; Flórez García, 2015; Radotić & Mičić, 2016).

El uso de diferentes agentes químicos, el tiempo de exposición a ellos, la combinación de estos y el sometimiento de las matrices a procesos térmicos durante su purificación son factores que afectan sus propiedades físicas y morfológicas (Amarasekara et al., 2020; Carreño Pineda, 2011; Gea et al., 2011). La purificación de CB es una etapa aguas abajo o *downstream* importante, ya que esta mejora sus propiedades mecánicas, térmicas y estructurales con respecto a matrices no purificadas; tratamientos con NaOH (0.625 M) a temperatura ambiente demostraron un aumento considerable del módulo de Young (de 7.6 a 14.1 GPa) y de la temperatura máxima de degradación (de 289 a 322 °C), propiedades que se acrecentaron aún más cuando se implementó una segunda etapa de purificación con NaClO (2.5% p/p) (Gea et al., 2011). Los métodos de purificación multietapa pueden ocasionar cambios significativos en otras propiedades, por lo que su implementación dependerá de la aplicación final de la celulosa. Amarasekara et al. (2020) evidenciaron diferencias en la capacidad de retención de agua de CB sometida a dos etapas de purificación con NaOH (1.0 M) a 23 y 90°C, seguido de una tercera etapa con H₂O₂ (1.5% p/p), estos autores también demostraron que al sustituir H₂O₂ por NaClO se obtenían matrices con un valor de blancura mayor.

Diferente a los métodos de blanqueo, se ha investigado la purificación de CB con CO₂ y H₂CO₃ supercrítico para la obtención de matrices, no sólo libres del medio de cultivos y

detritos celulares, sino también estériles, con el fin de que estas puedan ser usadas directamente en el área de la medicina una vez procesadas (Pigaleva et al., 2019).

1.2.4 Aplicaciones de la celulosa bacteriana

Son diversas las investigaciones que se han centrado en darle uso a este material. Los avances más prometedores se han dado en las siguientes áreas:

- **Industria alimentaria:** Agente emulsificante, sustituyente de grasas, material para el empaqueo y preservación de alimentos, aportador de fibra dietaria, componente de carne vegetariana y nata de coco (Azeredo et al., 2019).
- **Medicina:** Cobertura funcional para la curación de heridas y quemaduras, sistema de encapsulación y liberación controlada de medicamentos, soporte para células y tejidos humanos, piel y ligamentos artificiales (Blanco Parte et al., 2020).
- **Electrónica:** Matriz conductora de CB funcionalizada con silicio y polianilina, soporte flexible funcionalizado con silicio como ánodo para baterías de litio, película de celulosa transparente funcionalizada con diodos orgánicos luminiscentes (Kadier et al., 2021).

De igual forma, se encuentran productos hechos o derivados de celulosa bacteriana que se comercializan actualmente. Entre ellos se encuentran surfactantes o agentes espesantes para detergentes como CELLULON™ y ARBALON™, ambos producidos por la empresa estadounidense [CPkelco Inc.](#) En el área de alimentos es posible encontrar espesantes o agentes emulsificantes como Sun Artist® y Fibnano producidos por [San-Ei Gen.](#) y [Kusano Sakko Inc.](#), respectivamente. En el área médica se encuentran apósitos para el cuidado de heridas (Nanoderm™) y apósitos funcionalizados con nanopartículas de plata para la prevención de infecciones (Nanoderm™Ag), ambos producidos por la compañía [Axcelon Biopolymers Corp.](#) (Singhania et al., 2022). Se espera que se generen más productos a base de este polímero, ya que se estima que el mercado global de CB alcanzará los \$570 millones en 2024 y los \$680 millones a finales de 2025, con un incremento a una tasa de crecimiento anual compuesto del 13.3% durante 2018-2025 (Fernandes et al., 2020).

2 Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención y pretratamiento de mucílago de café

Se obtuvieron muestras de mucílago generado en dos fincas cafeteras del municipio de Jardín – Antioquia por dos métodos de extracción diferentes, degradación por fermentación natural y desmucilaginado mecánico. Estas metodologías de extracción se implementaron de acuerdo con los procedimientos convencionales que cada caficultor aplica en su finca. Antes de comenzar con esta etapa el café seleccionado por los caficultores fue despulpado en seco.

El mucílago de fermentación natural (FN) se recolectó en la finca La Sara (5°36'34.1" N 75°49'53.5" O, 1856 msnm) en la zona veredal de La Linda del municipio de Jardín - Antioquia, donde se cultivan las variedades 2000 y Castillo Rosario en una extensión de 3 ha. El proceso de fermentación del café despulpado para la remoción del mucílago se realizó en seco, es decir, sin adición de agua, sólo con la humedad natural del café baba, en un tanque de acero inoxidable. Después de 18 - 22 h de fermentación, se le adicionó agua en una relación de ~0.3 L/Kg café cereza y se procedió a mover la masa de café en el tanque para desprender la mayor cantidad de mucílago. Después de la adición del agua, se dejó reposar aproximadamente 1 – 2 h, posterior a este tiempo se recolectó el agua mucilaginoso por medio de un desagua ubicado en los fondos del tanque, la cual correspondió a la muestra de mucílago FN utilizada en este estudio.

El mucílago de demucilaginado mecánico (DM) se recolectó en la finca La Julia (5°36'17.2" N 75°50'51.0" O, 1650 msnm) de la zona veredal El Tapado del municipio de Jardín, Antioquia, donde se cultiva las variedades Caturra, Pajarito, Castillo y 2000 en una extensión de 2.5 ha. La extracción del mucílago se realizó a través de un modelo Belcosub 300, que integra despulpadora y desmucilaginador mecánico, la relación de café cereza con respecto al agua usada en el desmucilaginador fue de ~1 L/Kg café cereza. El

mucílago recolectado correspondió al efluente proveniente del desmucilagador durante el procesado de un lote de café.

Alrededor de 4 L de FN y 10 L de DM fueron dispuestos en bolsas resellables que se almacenaron en recipientes con hielo para su respectivo transporte al Laboratorio de Procesos Agrícolas de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Una vez allí, fueron refrigerados a 4 °C por 12 h hasta su respectivo procesamiento. El pretratamiento se realizó con base en lo implementado por Flórez García (2015), la primera etapa consistió en un proceso de filtración de dos etapas, inicialmente con un tamiz de nylon (tamaño poro: 1 mm), seguido de un tamiz de algodón (tamaño poro: 0.3 mm). Después de la filtración, el mucílago se centrifugó a 8000 rpm por 5 min, el sobrenadante se recolectó y se esterilizó dos veces en autoclave 2840 EL-D (Tuttnauer, Países Bajos) a 121 °C por 15 min y se almacenó en ultracongelación a -30 °C hasta su posterior uso y caracterización fisicoquímica.

2.2 Caracterización fisicoquímica de mucílago

En esta sección se resumen los procedimientos analíticos e instrumentales que se llevaron a cabo para caracterizar las materias primas empleadas y rastrear los diversos cambios que experimentaron debido al proceso fermentativo descrito en la siguiente sección. Con el fin de evidenciar diferencias significativas entre las muestras evaluadas, se realizaron triplicados y/o duplicados en cada una de las pruebas analíticas y los resultados se sometieron a la prueba de Tukey HSD (R x64 v4.1.2, paquete estadístico Agricolae).

2.2.1 Humedad

El porcentaje de humedad de las muestras de mucílago se determinó por medio del método AOAC 925.45A (AOAC, 2012), secando 5 g de muestra en horno de vacío (Memmert VO200, Alemania) a 60 °C y 33 mbar. El porcentaje de humedad se calculó a partir de la diferencia entre el peso de la muestra inicial y el peso de la muestra seca.

2.2.2 Cenizas

El porcentaje de cenizas se determinó con base en el método AOAC 942.05 (Thiex et al., 2012). En un crisol, limpio y seco, se pesaron 2 g de muestra, la cual fue sometida a 550

°C por 3 h en un horno mufla (ACEQ MF-2002, Colombia), después de este tiempo la temperatura se redujo a 250 °C y se aireó la cabina de ignición, posterior a este proceso se sometió la muestra un segundo periodo de calentamiento a 550 °C por 3 h. El porcentaje de cenizas se determinó a partir de la diferencia entre el peso inicial y el peso del residuo de ignición.

2.2.3 Azúcares reductores

Los azúcares reductores se cuantificaron con el método espectrofotométrico del 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS). El reactivo DNS fue preparado de acuerdo con la formulación hecha por Ghose (1987). La mezcla reactiva se hizo con base en las proporciones especificadas por Teixeira et al. (2012) donde 0.5 mL de la muestra problema se mezclaron con 1.5 mL de DNS, esta mezcla se sometió a 80 °C por 10 min, después se sumergió en un baño de agua helada por 7 min (Wood et al., 2012). Seguido del tratamiento térmico, se tomó 0.1 mL de la mezcla reactiva y se diluyó con 1.25 mL de agua destilada. La absorbancia de la solución final se registró a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, Estados Unidos), esta medida se interpoló en una curva de calibración ($y=0.343x-4.753 \times 10^{-2}$, $R^2=0.997$) previamente hecha con estándar de glucosa para determinar la concentración de azúcares reductores (g/L) en la muestra.

2.2.4 Azúcares totales

Los azúcares totales se determinaron por medio del método Ácido Sulfúrico-Ultravioleta (AS-UV) propuesto por Albalasmeh, Berhe, y Ghezzehei (2013). Se adicionó 3 mL de Ácido Sulfúrico concentrado (96%) a 1 mL de la muestra. Esta mezcla reactiva se agitó a 2500 rpm por 30 s en vortex (Nade Vortex Mixer V8, China) y se dispuso en un baño de agua helada por 2 min. La absorbancia se registró a 315 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, Estados Unidos), esta medida se interpoló en una curva de calibración ($y=12.688x+0.0647$, $R^2=0.997$) previamente preparada con estándar de sacarosa (Panreac, Alemania) para determinar la concentración de azúcares totales (g/L) en la muestra.

2.2.5 pH

Se usó pH metro (Hanna Edge®, Estados Unidos), este se calibro de acuerdo con las condiciones de temperatura de las muestras, siguiendo los métodos de la AOAC 973.41/945.10 (AOAC, 2012).

2.2.6 Demanda Química de Oxígeno

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se determinó con base en el método 410.4 de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) (O'Dell, 1996), usando el kit de Hanna® para determinación de DQO. Se agregaron 2 mL de la muestra al reactivo de DQO (HI 93754B -25, Estados Unidos) y se sometió la mezcla a 150 °C por 2 h en digestor (HI 839800, Estados Unidos). La lectura de DQO se realizó en el espectrofotómetro multiparámetro (HI 83099, Estados Unidos).

2.2.7 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto se determinó usando un Medidor Portátil Impermeable de Oxígeno Disuelto y DBO HI98193 (Hanna, Estados Unidos). Este se calibró en dos puntos, con una solución de cero oxígeno, preparada a partir de bisulfito de sodio y exponiendo el sensor a una atmósfera saturada al 100% de oxígeno (Hanna Instruments Inc., s. f.).

2.2.8 Acidez titulable

La cuantificación de la acidez titulable se realizó siguiendo el método AOAC 942.15A/B (AOAC, 2012). Se diluyeron 5 g de muestra en 100 mL de agua destilada, a esta mezcla se le adicionó 4 gotas de fenolftaleína (1% v/v) y se tituló con una solución de 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH). La acidez titulable se expresó como g de ácido acético/100 g de muestra.

2.2.9 Contenido de polifenoles

El contenido de polifenoles del mucílago se determinó siguiendo el método Folin-Ciocalteu (Yepes Betancur, 2019). A 50 µL de la muestra se le adicionaron 125 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac, Alemania) y 425 µL de agua destilada, la cual se dejó reaccionar por 6 min, pasado este tiempo se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio (71%, p/v) y la

mezcla se incubó en oscuridad por 1 h. La absorbancia de la mezcla se leyó a 760 nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, Estados Unidos). Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración previamente preparada ($y=4.305 \times 10^{-3}x$, $R^2=0.996$), los resultados se expresaron como g ácido gálico/ 100 g muestra.

2.2.10 Composición elemental, azúcares y ácidos

Las muestras de mucílago se analizaron en la Universidad de York y Universidad de Leeds, Reino Unido. Con el fin de conservar la integridad de las muestras de mucílago durante el traslado a estas instituciones, estas se deshidrataron por medio de liofilización a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 Pa (Liofilizador Syclon 18 N, China), llevando un registro de su peso y volumen antes y después del proceso de secado. El material liofilizado se transportó en recipientes herméticamente sellados, depositados en cajas con perlas de sílica. Una vez en las universidades de destino, las muestras se resuspendieron en agua desionizada considerando la humedad retirada por el proceso de liofilización.

2.2.10.1 Identificación y cuantificación de minerales

La identificación y cuantificación de minerales se llevó a cabo por medio de la técnica espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, por sus siglas en inglés). Las muestras resuspendidas se diluyeron en una relación 1:10, alrededor de 1.5 – 2.0 mL de esta dilución se inyectó al equipo ICP-OES Thermo iCAP7400 Radial (ThermoFisher, Estados Unidos) por medio de una cámara de rocío. El flujo de argón para la generación de plasma fue de 0.5 mL/min, con potencia de plasma fija a 1150 KW. La altitud de la cámara para el registro de la señal emitida por los átomos presentes en la muestra fue de 10 mm. Las señales emitidas por los átomos ionizados por el plasma se procesaron con el software Qtegra™ (ThermoFisher, Estados Unidos), para la posterior identificación y cuantificación de los mismos (Asendorf, 2016; U.S. EPA, 1994).

2.2.10.2 Identificación y cuantificación de azúcares y ácidos

Los azúcares y ácidos presentes en las muestras se analizaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), usando un HPLC Agilent 1260 Infinity II. Las muestras de mucílago resuspendido se diluyeron en una relación de 1:2 y se

filtraron con filtros de celulosa 0.22 μm . Los compuestos de interés se separaron utilizando una columna Agilent Hi-Plex H+ (300 x 7.7 mm, 8 μm). Las condiciones de operación fueron: fase móvil isocrática de H_2SO_4 0.005 M con un flujo de 0.6 mL/min, volumen de inyección de 5 μL , temperatura de columna de 60 $^\circ\text{C}$, detector de índice de refracción a 55 $^\circ\text{C}$ y un tiempo de ejecución por corrida de 30 min (Ball et al., 2011). Los estándares grado HPLC para la identificación y cuantificación de compuestos se obtuvieron del proveedor de insumos químicos Merck. Los estándares analíticos y su curva de calibración fueron: celobiosa ($y = 69331.72x$; $R^2 = 0.999$), glucosa ($y = 68203.74x$; $R^2 = 0.999$), ramnosa ($y = 125675.84x$; $R^2 = 0.999$), fructosa ($y = 65836.37x$, $R^2 = 0.999$), levoglucosano ($y = 63141.82x$, $R^2 = 0.999$), ácido glucorónico ($y = 52996.57x$, $R^2 = 0.999$), ácido galacturónico ($y = 62313.33x$, $R^2 = 0.999$), ácido láctico ($y = 36132.22x$; $R^2 = 0.999$), ácido fórmico ($y = 14478.53$, $R^2 = 0.999$) ácido acético ($y = 19616.52x$; $R^2 = 0.994$) y ácido levulínico ($y = 47572.30x$; $R^2 = 0.999$).

NOTA: Las muestras de mucílago, usadas en los ensayos realizados en la posterior sección 2.3.5.2, se analizaron por HPLC en el Laboratorio de Procesos Agrícolas de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Se usó un equipo Shimadzu Prominence LC-20AT equipado con un detector de índice de refracción. Las muestras de mucílago se diluyeron en una relación de 1:2 y se filtraron con filtros de celulosa 0.22 μm . Se usó una columna Aminex HPX-87H (5 μm , 300 x 7.8 mm) de BioRad. Las condiciones de operación del equipo fueron: fase móvil isocrática de H_2SO_4 0.005 M con un flujo de 0.6 mL/min, volumen de inyección de 15 μL y temperatura de columna de 65 $^\circ\text{C}$ (Bio Rad Laboratories, s. f.). El estándar analítico y su curva de calibración asociada fue Glucosa ($y = 820.11x - 382.58$, $R^2 = 0.999$).

2.2.10.3 Cuantificación de Carbono-Hidrógeno-Nitrógeno

El análisis de carbono, hidrógeno y nitrógeno (CHN) de las muestras de mucílago liofilizadas (no resuspendidas) se llevó a cabo por medio de un analizador de elementos CE440 (Exeter Analytical, Reino Unido). Aproximadamente 1.6 a 1.8 mg de cada muestra se pesaron en capsulas de estaño utilizando una balanza analítica SE2 (Sartorius, Alemania), los cuales fueron incinerados en el equipo anteriormente mencionado a una temperatura superior a 1800 $^\circ\text{C}$. Los productos de combustión generados pasan por una purga química que asegura su conversión en CO_2 , H_2O , N_2 y remueven halógenos, sulfuro

y fosforo. La mezcla de gases purificada pasa a través de detectores de conductividad térmica de alta precisión, los cuales se encargan de medir la proporción de carbono, hidrógeno y nitrógeno, con respecto a la muestra original (Exeter Analytical, s. f.).

2.3 Desarrollo de proceso fermentativo

2.3.1 Rastreo y aislamiento de bacterias productoras de celulosa bacteriana

El diagrama del proceso de rastreo y aislamiento de las bacterias promisorias para la producción de celulosa bacteriana se representa en la Figura 2-1. Con base en los protocolos de aislamiento de BAA planteados por Gerard (2015) y Fernández et al. (2019), se procedió a extraer asépticamente dos matrices de celulosa (“madre del vinagre”) de la muestra de vinagre panela. Las matrices se sumergieron en agua peptonada, enriquecida con sorbato de potasio (0.02%), por 30 min. Posteriormente, alícuotas del agua peptonada de lavado y fragmentos de las matrices de celulosa se depositaron en cuatro tubos de ensayo que contenían medio líquido HS (glucosa 2%, extracto de levadura 0.5%, peptona 0.5%, Na_2HPO_4 0.274%, ácido cítrico 0.115%, K_2HPO_4 0.075%) (Hestrin & Schramm, 1954), enriquecido con etanol 4% (v/v), ácido acético 2% (v/v), sorbato de potasio 0.02%. La glucosa, el ácido acético, el etanol y el sorbato de potasio se esterilizaron por separado.

En el tubo 1 se depositó muestras del agua peptonada y fragmentos de ambas matrices, en el tubo 2 se depositó fragmentos de la matriz 1, en el tubo 3 se depositó fragmentos de la matriz 2 y en el tubo 4 se transfirieron únicamente alícuotas del agua peptonada. Los tubos de ensayo se dejaron en incubación a 30 °C (75-80% HR) por 5 d. Se realizaron diluciones en serie con las muestras de los tubos que evidenciaron formación de la matriz en la superficie del líquido, para posteriormente ser sembradas en agar HS enriquecido (Agar 1.5%).

Las placas inoculadas se dejaron en incubación por 3 d a la misma temperatura. Después del periodo de incubación se observó crecimiento individual de colonias, de donde se seleccionaron diez al azar y cada una se inoculó en un tubo con medio líquido HS fresco, que se dejó en incubación a las condiciones mencionadas anteriormente por 10 d. Los tubos que presentaron formación de una capa o matriz blanquecina en la superficie del

líquido fueron clasificados como celulosa (+) para las colonias inoculadas, de estos se transfirió líquido a placas con agar HS para la formación de cultivos axénicos.

Las bacterias seleccionadas se criopreservaron con el kit de crioperlas Protect™.

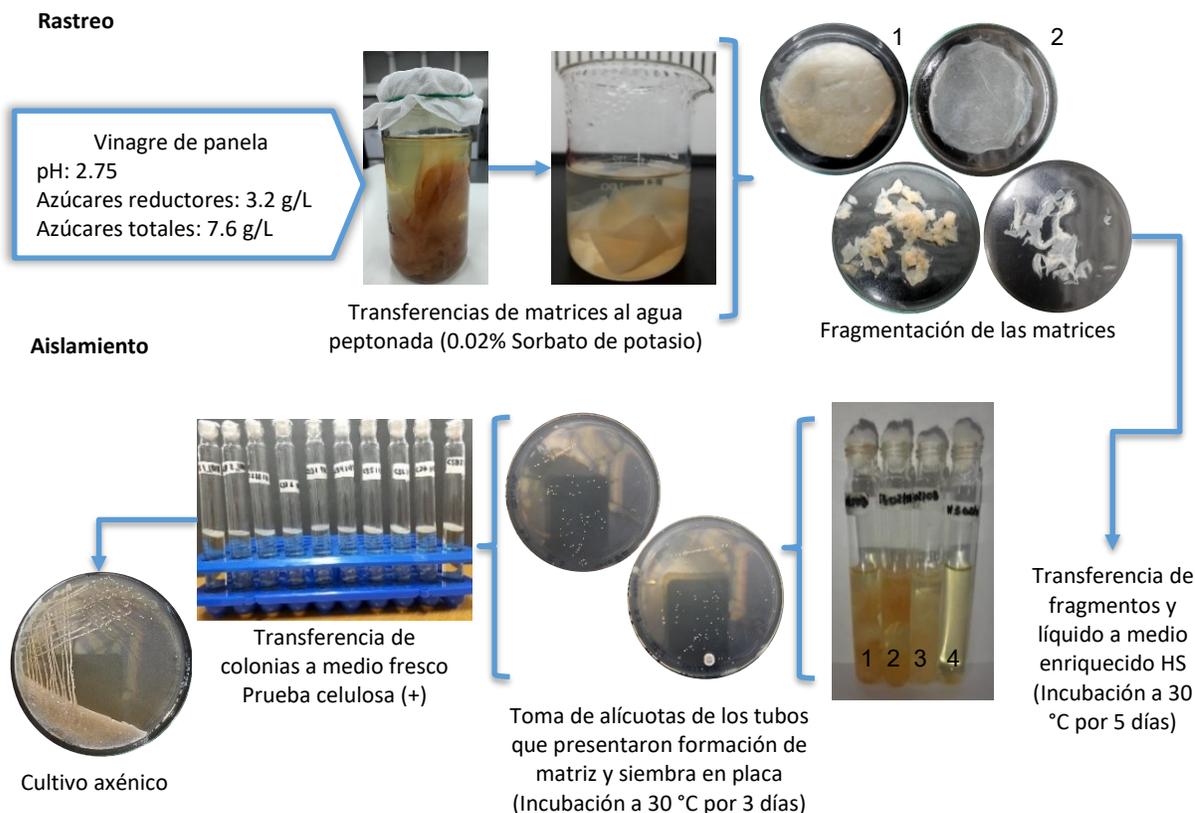


Figura 2-1. Diagrama de flujo del proceso de rastreo y aislamiento de bacterias productoras de celulosa bacteriana.

2.3.2 Preparación de inóculo

2.3.2.1 Formulación del medio de cultivo

Se evaluaron tres aditivos que permiten obtener cultivos de células libres en la especie *Komagataeibacter xylinus* (Z. G. Wang et al., 2016): Carboxi Metil Celulosa (CMC, Tecnas S.A.), Cellic® CTec2 (enzima con actividad celulasa, Novozymes), Viscozyme® [complejo enzimático con actividad beta-glucanasa (endo-1,3(4), celulasa, xilanasas y hemicelulasa,

Novozymes]. Los aditivos se mezclaron en diferentes proporciones con el medio HS (Tabla 2-1).

Colonias individuales de las bacterias seleccionadas y criopreservadas se transfirieron a cada una de las formulaciones propuestas. Finalizado el periodo de incubación se midió densidad óptica (DO) a 540 nm y se evaluó cualitativamente la restricción en la producción de celulosa bacteriana.

Tabla 2-1. Formulaciones de aditivos que restringen producción de CB con medio HS y condiciones de incubación.

Tratamiento	Condiciones de incubación
HS + Cel 0.5% v/v + Vis 0.5% v/v	30 °C (75-80% RH) por 72 h + 37 °C por 2 h Agitación: 200 rpm
HS + Vis 1.0% v/v	
HS + Cel 1.0% v/v	30 °C (75-80% RH) por 72 h Agitación: 200 rpm
HS – CMC 0.5% p/v	
HS - CMC 1.0% p/v	
HS - CMC 1.5% p/v	

CMC: Carboxi Metil Celulosa, Cel: Cellic® CTec2, Vis: Viscozyme®

Al final del ensayo, el aditivo que mejor desempeño tuvo fue Cellic® CTec2 a una concentración de 1% v/v. De igual manera, se evidenció que una concentración de 2% de glucosa en el cultivo inicial no es suficiente para generar la densidad óptica deseada en menos de 24 h, por lo que se incrementó a 4%. La formulación final se denominó HS4CEL, la cual se compuso de glucosa (4%), extracto de levadura (0.5%), peptona (0.5%), Na₂HPO₄ (0.274%), K₂HPO₄ (0.075%), Ácido Cítrico (0.115%), celulasa Cellic® CTec2 (1% v/v).

2.3.2.2 Metodología de preparación de inóculo

La preparación del inóculo se realizó por medio de propagación de cultivo como se muestra en la Figura 2-2. Inicialmente, se transfirió una colonia, proveniente de un cultivo en placa axénico, a 30 mL del medio líquido HS4CEL, sometiéndolo después a un proceso de incubación a 30 °C y 200 rpm por 18 – 24 h.



Figura 2-2. Diagrama de flujo del proceso para la preparación de inóculo.

El crecimiento de la población bacteriana en este cultivo se evidenció por la turbidez del medio al final del proceso de incubación y en ocasiones se corroboró este crecimiento midiendo la DO a 540 nm. Alícuotas de alrededor de 500 μ L de este cultivo líquido se transfirieron a un mayor volumen de medio HS4CEL fresco y se sometió a las mismas condiciones de incubación que el anterior.

Finalizada esta segunda etapa de cultivo, el medio el cultivo se centrifugó a 10000 rpm y 4 °C por 18 min, el sobrenadante se descartó y las células precipitadas se resuspendieron en medio HS sin glucosa, este procedimiento de centrifugación y resuspensión de la celulas se realizó una segunda vez para garantizar la remoción de la enzima celulasa (Cellic® CTec2) (Taweecheep et al., 2019). Una vez completada la etapa de lavado y resuspensión, la DO del cultivo se ajustó a un valor de 0.120 A.

2.3.3 Selección de mejor productor de CB

2.3.3.1 Diseño experimental

En aras de identificar la cepa más promisoría para producción de celulosa, se realizó un diseño factorial completo 5x3 en el que se evaluaron los factores Bacteria y Medio de

cultivo. Los niveles del factor Bacteria fueron las cepas seleccionadas en la sección 2.3.1, mientras que los niveles del factor medio de cultivo fueron medio HS, mucílago FN y mucílago DM (Figura 2-3). Las variables respuesta del diseño experimental fueron el *Rendimiento de celulosa bacteriana* [masa de celulosa seca/volumen de medio (g_{bs}/L)], rendimiento de producto con base en el consumo de azúcares reductores Y_{sp} ($g_{producto}/g_{azu.red.}$) y el *Espesor* de las películas producidas (mm). Se realizaron dos repeticiones por tratamiento, dando como resultado 30 unidades experimentales. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Statgraphic Centurion XVI.

		Bacteria				
		1	2	3	4	5
Medio	FN					
	DM					
	HS					

Figura 2-3. Arreglo factorial del experimento.

2.3.3.2 Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un sistema estacionario en recipientes cilíndricos con un volumen de trabajo de 30 mL, garantizando una relación de A_i/V de 0.70 cm^{-1} . A cada unidad experimental se le transfirió 3 mL de inóculo, correspondiente al 10% v/v del medio. Los recipientes se sellaron con gaza estéril no tejida para garantizar intercambio gaseoso. Las unidades experimentales se incubaron en una cámara climática ICH 260 L (Mettler, Alemania) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (75-80% HR) por 5 días. El consumo de sustrato se evaluó contabilizando los azúcares reductores en el tiempo 0 y 5 d de la fermentación.

2.3.3.3 Lavado y purificación de las matrices

Las matrices de celulosa obtenidas al final del periodo de fermentación fueron lavadas con agua destilada a punto de ebullición hasta presentar una remoción de color aceptable. Después se sumergieron en NaOH, y sometieron a un tratamiento térmico a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Las matrices provenientes de los medios HS y DM se trataron con una concentración

de NaOH de 0.1 M, mientras que las obtenidas por FN se trataron con una concentración de 0.5 M para asegurar una remoción total del color. Una vez finalizado el tratamiento alcalino, se adicionó una gota de fenolftaleína en la superficie de las matrices celulósicas y se realizó un segundo lavado para la remoción del NaOH residual. La desaparición del color rosáceo en las matrices indicó una remoción completa del álcali.

Se registró el peso húmedo de las matrices y se llevaron a un proceso de secado a 30 °C por 48 h en horno de convección forzada con una velocidad de hélice del 20% (Memmert UFE 600, Alemania). Después del periodo de secado, las muestras se dispusieron en un desecador por 1 hora, posterior a la cual se registró el peso seco.

2.3.4 Cinética de la producción de celulosa bacteriana

Se realizó una segunda fermentación con los tres medios; mucílago DM, mucílago FN y medio HS; usando la bacteria que mostro el mejor desempeño en el diseño experimental (sección 3.3). La preparación y condiciones usadas en esta fermentación fueron iguales a las establecidas en la sección 2.3.3, excepto por el tiempo, el cual se extendió a 10 días. Los parámetros consumo de azúcares reductores, pH, oxígeno disuelto, DQO y rendimiento de celulosa bacteriana fueron evaluados los días 0, 1, 2, 4, 6 y 10 de la fermentación. Los parámetros perfil de azúcares y ácidos (HPLC) y concentración de minerales (ICP-OES) se evaluaron los días 0 y 10. Antes de realizar cada análisis los medios de cultivo fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 min para eliminar la biomasa presente en ellos.

El lavado y purificación de las matrices celulósicas se realizó de acuerdo con la sección 2.3.3. Matrices obtenidas a los 10 días de fermentación se sometieron a dos procesos de secado: liofilización (Syclon-18N, China) y secado en horno de convección forzada (Memmert UFE 600, Estados Unidos).

2.3.5 Evaluación de variables operacionales sobre la producción de celulosa

La evaluación de los parámetros operacionales se llevó a cabo utilizando mucílago DM debido a que se contaba con amplia disponibilidad de este residuo para llevar a cabo los procedimientos experimentales.

2.3.5.1 Temperatura

Se llevó a cabo fermentaciones de mucílago a diferentes temperaturas (25, 30, 35 y 40 °C). Las condiciones de la fermentación fueron la mismas que las descritas en la sección 2.3.3, la única diferencia fue el tiempo de incubación, el cual se fijó en 4.5 d. La variable respuesta evaluada fue el rendimiento (g_{bs}/L) en base seca de celulosa bacteriana. Se realizaron tres (3) repeticiones por cada una de las temperaturas evaluadas.

2.3.5.2 Sistema de flujo intermitente y aireado

Se realizaron dos fermentaciones en recipientes cilíndricos con las siguientes dimensiones: Altura 22.3 cm y diámetro 10.2 cm. Estas se realizaron con un volumen de trabajo de 350 mL (A_i/V inicial de 0.2 cm^{-1}), agregando inóculo en una relación 10% v/v. La fermentación tuvo una duración de 11 días y se llevó a cabo a temperatura ambiente (18 – 25 °C). En los días 2 y 4 se agregó 60 mL de mucílago DM dando un A_i/V final de 0.17 cm^{-1} . Se hizo seguimiento del consumo de glucosa en los días 0, 2, 6 y 11. A uno de los fermentadores se le inyectó aire a una presión de 3.5 psi por medio de un difusor de aire tipo disco. Las membranas de celulosa generadas se lavaron y purificaron, y se calculó el rendimiento de celulosa en base seca como punto de comparación entre el montaje aireado y sin airear.

2.4 Identificación taxonómica

Las diferentes pruebas de caracterización taxonómica se realizaron a la bacteria que presentó el mejor desempeño en el ensayo experimental de la sección 2.3.3.

2.4.1 Identificación molecular

2.4.1.1 Extracción de ADN y secuenciación

El ADN genómico (gADN) se extrajo de una colonia bacteriana aislada con el kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Qiagen, 2020). El gDNA extraído se cuantificó mediante absorción de luz a 260 nm utilizando NanoDrop™ 2000-Thermo Scientific™ y se congeló a -20 °C para experimentos de secuenciación genómica posteriores. La secuenciación del gADN extraído se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina NovaSeq 6000 y las bibliotecas de ADN Truseq Nano (350) (Modi et al., 2021), mediante las cuales se generaron lecturas

emparejadas de 150 bases. La profundidad de secuenciación y las lecturas depuradas por calidad se calcularon utilizando el programa Samtools 1.14 (H. Li et al., 2009), mapeando con el programa bowtie2-align-s versión 2.4.4 (Langmead & Salzberg, 2012), dando como resultado una profundidad de 152.29X.

2.4.1.2 Análisis taxonómico

La clasificación involucró una asignación taxonómica inicial utilizando el algoritmo CLASSIFIER con la base de datos del Ribosomal Database Project (RDP) y la secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa en estudio (Q. Wang et al., 2007). Posteriormente, se realizó un análisis basado en el promedio de la identidad nucleotídica del genoma (ANI-Average Nucleoide Identity) (Jain et al., 2018). De igual forma, se construyó un árbol filogenético a partir de 100 genes utilizando el software IQ-TREE (Nguyen et al., 2015).

2.4.2 Caracterización morfológica y bioquímica

Para determinar el tipo de envoltura bacteriana se realizó tinción de Gram al inóculo preparado con la metodología de la sección 2.3.2, siguiendo los protocolos de Cappuccino and Welsh (2016). Las imágenes microscópicas se tomaron utilizando un microscopio con cámara integrada (Leica DM1000 LED, Leica ICC50W, Alemania). La morfología de la colonia se registró por medio de imágenes tomadas con estereoscopio de cámara integrada (Leica EZ5, Leica ICC50W, Alemania), usando cultivos en placa con agar HS y periodo de incubación de 3 días a 30 °C.

Las siguientes pruebas bioquímicas se realizaron siguiendo los protocolos reportados por Gerard (2015).

- Catalasa
- Oxidasa
- Producción de pigmentos cafés
- Oxidación de acetato
- Crecimiento en 30% de D-glucosa
- Crecimiento en 3% de NaCl
- Crecimiento en 0.35% de ácido acético
- Crecimiento en metanol

- Producción de ácido a partir de
 - Glucosa
 - Fructosa
 - Galactosa
 - Sacarosa
 - Maltosa
 - Lactosa
 - Etanol
 - Metanol
 - Butanol
 - Glicerol
- Producción de DHA a partir de glicerol
- Oxidación de etanol a CO₂

2.5 Caracterización de celulosa bacteriana

Técnicas de caracterización de materiales fueron aplicadas a las matrices producidas en el ensayo cinético a los 10 días de la fermentación. Las técnicas de Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRFT), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Difracción de Rayos X (DRX) y Análisis Térmico Simultáneo (ATS) se aplicaron a las matrices liofilizadas. Las matrices deshidratadas por convección forzada se sometieron al de ensayo de tracción. La Capacidad de Retención de Agua (CRA) se evaluó en las matrices de celulosa hidratadas.

2.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JSM-7100F (Jeol, Japón) con una tensión de aceleración de 10.0 kV para analizar las morfologías de las superficies de las películas. Las matrices fueron previamente recubiertas con partículas de oro a través de un sistema de pulverización catódica secuencial (Sputtering – Q300T D), operando a 25 mA y tiempo de deposición de 50 s (UI-Hamid, 2018).

2.5.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las matrices de celulosa producidas se llevó a cabo en un espectrómetro de referencia IRTrace-100 (Shimadzu, Japón). Se utilizó reflectancia total atenuada (ATR) como método de muestreo, fijando un rango de lectura de 4000 – 500 cm^{-1} a una resolución de 2 cm^{-1} . Se utilizaron las bases de datos Shimadzu Standard Library Vol. 1shim1404-1 y Shimadzu Standard Library Vol. 2shim2404-1 para realizar identificación del material.

A partir de los espectros IR obtenidos se cuantificó la fracción del alomorfo α presente en las matrices por medio de la ecuación 2-1.

$$f_{\alpha} = \frac{A_{750}}{A_{750} + A_{710}} \quad 2-1$$

Donde A_{750} y A_{710} corresponden a las áreas de los picos que reflejan el contenido de los alomorfos α y β , respectivamente (S.-S. Wang et al., 2018; Yamamoto et al., 1996). La deconvolución e integración de los picos se llevó a cabo en el software OriginPro 2022 con un ajuste de curva Gaussiano.

2.5.3 Difracción de rayos X e Índice de Cristalinidad

Los perfiles de difracción de rayos X (DRX) de muestras de celulosa; obtenidas por fermentación de mucílago FN, mucílago DM y medio HS; se adquirieron en un difractómetro de rayos X de muestras de polvo Panalytical Aeris ($\text{CuK}\alpha = 1.544426 \text{ \AA}$) usando un tamaño de paso de 0.022° (rango: $5 - 60^{\circ}$) y un tiempo de recolección de 24 s por paso. Las películas de CB de cada tratamiento se colocaron en un porta muestras perforado para la recolección del espectro. El índice de cristalinidad (IC) se calculó mediante dos métodos, el método de la altura del pico cristalino planteada por Seagal et al. (1959) (ecuación 2-2) y el método de deconvolución de picos descrito por (Park et al., 2010), donde se relaciona el área cristalina con el área total del espectro (ecuación 2-3). La deconvolución e integración de los picos cristalinos se llevó a cabo en el software OriginPro 2022, usando un ajuste de curva Gaussiano y Gaussian-LorenCross.

$$IC = \frac{I_{200} - I_{Am}}{I_{200}} \quad 2-2$$

$$IC = \frac{A_{Cristalina}}{A_{Espectro}} \quad 2-3$$

2.5.4 Ensayo de tracción

Las películas de celulosa producidas con los medios DM y FN fueron sometidas al ensayo de tracción. Las dimensiones de las probetas fueron de 40 mm de largo, 10 mm de ancho y el espesor promedio de las películas se midió con un micrómetro IP65 (Mitutoyo, Estados Unidos). Estas probetas de celulosa se incorporaron en el medio de dos láminas de cartón para ser adaptadas a la máquina universal Autograph AGX-V (Shimadzu, Japón) (Figura 2-4).

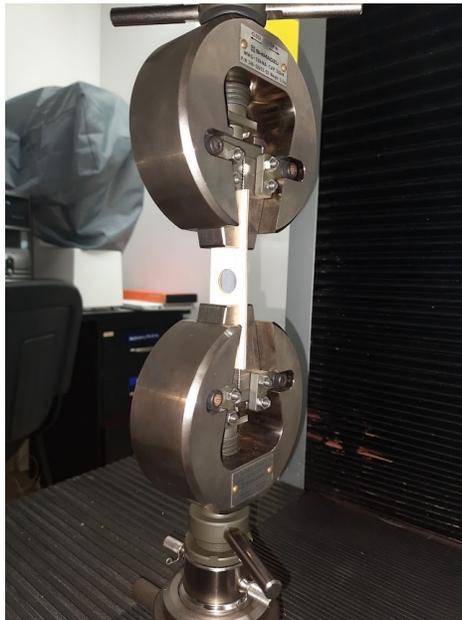


Figura 2-4. Montaje para prueba de tracción de celulosa bacteriana.

La máquina se operó en base a la norma ASTM D638, a una velocidad de desplazamiento de 5 mm/min y una separación de agarre de 30 mm, antes del ensayo las probetas fueron acondicionadas a 25 °C y 50% HR por 24 h (ASTM, 2022). Los parámetros medidos fueron:

módulo elástico aparente (módulo de Young, GPa), porcentaje de elongación (%), carga máxima (N) y esfuerzo final (MPa).

2.5.5 Análisis Térmico Simultaneo (ATS)

Muestras de 3 a 6 mg de las películas de celulosa se sometieron a calentamiento de 20 a 600 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno en un Analizador Térmico Simultaneo (TA Instruments Q600 SDT, Estados Unidos) (Ayyappan et al., 2022). Se registró el porcentaje de pérdida de peso con respecto al incremento en la temperatura (Análisis Térmico Gravimétrico, ATG). De la misma manera se registró el flujo de calor (Calorimetría Diferencia de Barrido, CDB) en unidades de W/g. Los siguientes parámetros se determinaron usando el software TA Universal Instruments (TA Instruments, New Castle): Pérdida de masa total (%), Temperatura de inicio (°C), Temp. Máx. de degradación (°C), Residuo (%), Temperatura de fusión (°C) y Entalpia (J/g).

2.5.6 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) se calculó siguiendo las metodologías de Schrecker-Gostomski et al. (2005) y Serafica et al.(2002). Las películas de celulosa se colocaron en un tamiz de acero inoxidable (tamaño de poro de 0.1 mm), se recubrieron con plástico para evitar la evaporación y se dejaron escurrir durante 1 hora antes de pesarlas, posteriormente, se sometieron a un proceso de secado a 30 °C en horno de convección forzada. La CRA se calculó como la relación entre la masa de agua eliminada durante el secado y la masa de celulosa seca (ecuación 2-4).

$$CRA = \frac{g_{H_2O}}{g_{celulosa\ seca}} \quad 2-4$$

3 Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización de muestras de mucílago

Los parámetros medidos en el mucílago muestran una gran diferencia entre los dos procesos de extracción, desmucilaginado mecánico y fermentación natural, siendo el mucílago FN, el que presentó valores más altos en contenido de azúcares reductores, cenizas, nitrógeno, acidez, pH y DQO (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Composición de mucílago de café del municipio de Jardín, Antioquia.

Propiedad	Unidades	DM	FN
Humedad	% bh	95.47±0.01 a	90.74±0.01 b
Cenizas	% bh	2.37±0.17 b	3.35±0.12 a
CHN			
C	% bs	36.325±0.487 a	36.625±0.162 a
H	% bs	7.155±0.078 a	6.975±0.134 a
N	% bs	0.875±0.050 b	1.270±0.071 a
Acidez titulable	g Ác. Láctico/100g muestra.	0.289±0.007 b	0.456±0.002 a
pH _{T=21 °C}	-	3.90±0.01 b	4.11±0.04 a
Azúcares reductores	g/L	31.71±0.71 b	74.30±1.94 a
	% p/p bh	3.123±0.070 b	7.177±0.187 a
Polifenoles totales	g ác. gálico/100 g muestra	0.06±0.01 b	0.28±0.01 a
DQO	mgO ₂ /L	44743.8±1906.3 b	105075.0±675.0 a

Diferentes letras en la misma fila indica diferencia significativa por prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$)

bh: base húmeda, bs: base seca, DM: mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago Fermentación Natural, DQO: Demanda Química de Oxígeno

Con respecto a la determinación de compuestos a través de cromatografía líquida, en ambas muestras de mucílago se pudo identificar y cuantificar nueve componentes correspondientes a celobiosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, glucosa, fructosa, levoglucosano, ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético (Figura 3-1). Los cromatogramas obtenidos también revelaron tres compuestos, que no pudieron ser

identificados con los estándares analíticos evaluados, en los tiempos de retención 10.50, 11.65 y 17.36 min, siendo el pico del primer tiempo el que presento el área más prominente (Anexo A). De acuerdo con el orden de elución y los tiempos de retención presentados por estos tres compuestos, se podría inferir que los correspondientes a los tiempos de retención 10.50 y 11.65 min se relacionan con tri- o disacáridos como la rafinosa, maltotriosa, maltosa, lactosa o sacarosa, mientras que el compuesto de 17.36 min se puede relacionar con un monosacárido como galactosa, apiosa, fucosa o ácidos de bajo peso molecular (Avallone et al., 2000; Ball et al., 2011).

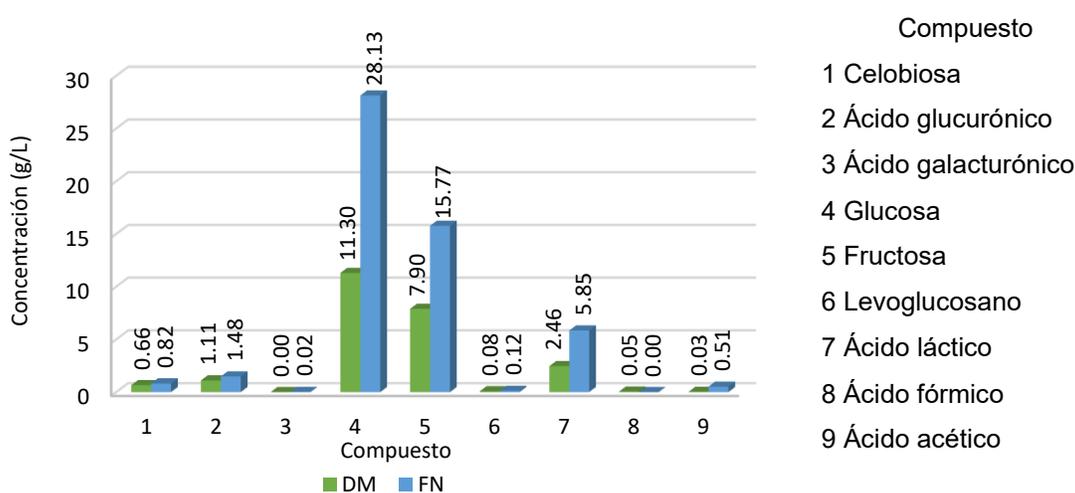


Figura 3-1. Azúcares y ácidos identificados en las muestras de mucílago de café.

DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural

Los azúcares reductores en el mucílago DM (3.12% b.h. ó 31.71 g/L) fueron menores que los valores reportados en la literatura, donde se encuentran porcentajes iniciales de 4.61% bh (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011). De igual forma, los azúcares cuantificados por HPLC para mucílago DM presentaron bajas concentraciones comparados con los reportados en otros estudios, donde pueden encontrarse concentraciones de glucosa entre 21 a 37 g/L, sacarosa 10 y 27 g/L y fructosa entre 14.7 y 28 g/L (Flórez García, 2015; Neu et al., 2016; Orrego et al., 2018). Por lo que, los datos encontrados aquí son inusuales con respecto a otras investigaciones en las que se ha reportado que el mucílago DM puede llegar a tener una concentración de sacáridos de entre 53 y 60 g/L (Neu et al., 2016).

Los resultados atípicos presentados por el mucílago DM de la presente investigación podrían estar relacionados con el procesamiento en el desmucilaginador, ya que para el

modelo Belcosub 300, se recomienda usar una relación de agua-café cereza de 0.2 L/Kg (Sanz Uribe et al., 2011), sin embargo, en la finca cafetera de donde se tomó la muestra se usó una relación de un ~ 1 L/Kg, lo que podría haber diluido los componentes azucarados del mucílago DM. Otra causa del decrecimiento de los azúcares podría estar asociada al lapso entre la recolección del mucílago y su esterilización, ya que se ha evidenciado que, para este tipo de mucílago, los azúcares reductores (%p/p bh) disminuyen en un 5% después de 20 h de almacenamiento en ambientes refrigerados (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011). Por lo que, así se haya garantizado una cadena de frío en el transporte y almacenamiento de este residuo hasta su respectivo procesamiento, estas condiciones pudieron no haber sido suficientes para evitar la degradación de componentes por la acción de los microorganismos presentes en el fruto de café, el agua con la que se procesó, el suelo del cafetal y las instalaciones donde se realiza el proceso de desmucilaginado (Puerta-Quintero et al., 2012). Se plantea que la composición final del mucílago DM pudo verse afectada por la etapa de filtración, ya que esta separó una gran cantidad de material particulado, el cual podría haber retenido los sustratos solubles del mucílago; de igual forma, una parte de la disminución de los azúcares se podría atribuir a una coprecipitación de estos durante la etapa de centrifugado (Skoog et al., 2014). Si bien son diversas las causas que habrían afectado la composición química final del mucílago DM, se considera que la calidad y la calibración o relación de agua usada en el desmucilagador mecánico habría sido el factor principal de la baja concentración de azúcares en este medio.

En lo que respecta al mucílago FN, este presentó valores de azúcares reductores (7.17% bh y 74.30 g/L) dos veces mayor a la reportada para mucílagos que han sido fermentados entre 18 y 24 h (3.51 % bh) (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011). Lo que indica otro valor inusual en la materia prima obtenida, ya que diversos estudios han demostrado que los carbohidratos del café baba disminuyen hasta un 60% después de 20 h de fermentación natural, además se ha reportado que el pH de este café pasa de 5.6 a 4.4 por la producción de diferentes ácidos orgánicos durante este proceso, como ácido láctico y acético (Avallone, Guyot, et al., 2001; Córdoba Castro & Guerrero Fajardo, 2016; Jackels & Jackels, 2005).

Se considera que la principal causa de las características inusuales presentadas por el mucílago FN en este estudio se deben a la metodología de fermentación usada por el caficultor, ya que, a diferencia de los estudios citados anteriormente, este proceso se llevó a cabo en seco, es decir, tanto en el despulpado como en la fermentación no hubo adición de agua, sino que se trabajó con la humedad natural del fruto de café y del café baba. De hecho, Avallone, Guiraud, et al. (2001) demostró que en la fermentación en seco no genera una alta degradación en los poli- y monosacáridos presentes en el mucílago. Estos autores también encontraron que la degradación se centra en los componentes pécticos del mucílago, causando una disminución en su grado de esterificación y viscosidad y aumentado su grado de acetilación, lo que genera una leve licuefacción de estos compuestos y propicia el desprendimiento del mucílago de la capa de pergamino. Debido a que, la fermentación del café es un proceso no controlado que involucra diversos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Elhalis et al., 2023), la humedad del café baba podría haber fomentado únicamente el desarrollo de microflora pectolítica (Avallone, Guyot, et al., 2001; Haile & Kang, 2019a), que consume en menor medida las fuentes de carbono más simples, tal como lo relaciona Avallone, Guiraud, et al. (2001) en sus hallazgos.

Otro factor importante, que habría propiciado una alta concentración de azúcares en el mucílago FN, fue el lavado del café después de la fermentación. En esta etapa, el caficultor adicionó una relación de agua de ~0.3 L/Kg café cereza al tanque de fermentación, con la cual mezcló y agitó vigorosamente la masa de café para garantizar el desprendimiento de la mayor cantidad de mucílago, posteriormente se dejó el agua en reposo entre 1 y 2 h, permitiendo el asentamiento de los componentes más espesos del mucílago en el fondo del tanque, de donde se recolectó la muestra de este material. Según los estudios de Zambrano-Franco & Isaza-Hinestroza (1994), enfocados en el lavado del café fermentado en seco, las aguas de este primer lavado pueden llegar a contener el mayor porcentaje de mucílago (~70%), junto con la mayor cantidad de sólidos totales disponibles en este (~203000 mg/L), por ello, el mucílago FN obtenido fue un material altamente concentrado.

Con respecto a los aspectos logísticos transporte y procesamiento de la materia prima, el mucílago FN recolectado se transportó y almacenó bajo las mismas condiciones del mucílago DM. De manera que, si hubo una degradación de los azúcares durante ese intervalo de tiempo, como lo reportó Puerta-Quintero & Ríos-Arias (2011) para el mucílago

DM, no se reflejó en la caracterización fisicoquímica. De igual forma, en la filtración y centrifugación no se observó una cantidad elevada de material particulado, lo que se podría atribuir a la degradación de compuestos pécticos en la fermentación seca (Avallone, Guiraud, et al., 2001) y su posterior dilución en el agua de lavado. Esta desintegración de la matriz podría haber propiciado la liberación de sacáridos, ya que se ha reportado que después de la fermentación del café baba los componentes solubles aumentan en el líquido mucilaginoso (Haile & Kang, 2019b).

En lo que respecta a los otros componentes caracterizados (Tabla 3-1), el contenido de nitrógeno en base seca fue diferente en ambas muestras de mucílago, siendo mayor en FN que en DM, este valor puede estar condicionado a la variedad de café beneficiada, factores ambientales, entre otros (Ramírez Gómez et al., 2015; Sadeghian-Khalajabadi et al., 2006). El contenido de carbono en base seca fue igual para ambas muestras de mucílago, sin embargo, este valor es global y no permite diferenciar entre fuentes de carbono asimilables o no asimilables por parte de la bacteria, el carbono disponible también está supeditado al contenido de agua de la muestra, ya que el mucílago DM presentó un mayor porcentaje de humedad, el carbono en este medio estuvo más diluido que en el medio FN. En lo referente a compuestos bioactivos, diferentes estudios han demostrado la presencia de polifenoles en la matriz mucilaginoso, los valores obtenidos aquí son superiores a los reportados por Bonilla-Hermosa et al. (2014) (0.022 g Ác. Gálico/100 g muestra), no obstante, son bastante inferiores a lo reportados por KC et al. (2021) (161.8 g Ác. Gálico/100 g muestra).

En relación con los ácidos orgánicos identificados en la matriz mucilaginoso, la presencia de ácido láctico, acético y fórmico se debe a las bacterias que toman parte en la fermentación del café baba, sin embargo, la concentración de ác. acético fue menor a lo reportado por Avallone, Guyot, et al. (2001), por lo que, es muy probable que esta baja proporción se deba a la volatilización de este durante la etapa de esterilización del mucílago a altas temperaturas. Por otro lado, es coherente encontrar presencia de ácido glucurónico y galacturónico en las muestras de mucílago, ya que estos hacen parte de los monómeros que conforman la pectina (Georgiev et al., 2017; Renard et al., 1999), y se ha reportado que esta matriz es rica en este heteropolisacárido (Bonilla-Hermosa et al., 2014).

Otro componente representativo de este medio fue el porcentaje de cenizas, que está relacionado con el contenido mineral y da un indicio del contenido de iones metálicos presentes en la muestra (Skoog et al., 2014). Con el análisis de minerales (Tabla 3-2) se corroboró que el mucílago FN presenta una mayor concentración de los elementos analizados que el mucílago DM, excepto por la concentración de Si y P que fueron mayores en este último. A pesar de la diferencia entre ambos, la concentración de K, Ca, P y Mg sí corresponde con lo reportado en otros estudios, donde estos elementos se encuentran siempre en mayor proporción y el resto de los minerales en concentraciones menores, no obstante, estos estudios no reportan un rango de concentración delimitado para cada uno de ellos (Orrego et al., 2018; Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011; Sadeghian-Khalajabadi et al., 2006).

Tabla 3-2. Composición mineral del mucílago de café.

Mucílago	Concentración (mg/L)							
	K	Ca	Mg	P	Fe	Si	Al	Mn
DM	1236.47	100.13	54.95	89.66	8.06	14.43	2.88	3.42
FN	1539.93	123.72	72.88	89.04	12.44	12.99	4.74	4.96

DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural

Aunque este estudio intentó cubrir la mayoría de técnicas disponibles para identificar los constituyentes de las muestras de mucílago de café recolectadas, entre ellas no se contó con técnicas para identificar otros componentes como el contenido de oligosacáridos (Reichembach & de Oliveira Petkowicz, 2020; Remoroza et al., 2012), contenido de pectinas, contenido de etanol, presencia de lípidos (Bonilla-Hermosa et al., 2014; KC et al., 2021), entre otros constituyentes que pueden hacer parte de la matriz mucilaginoso. La identificación y cuantificación de este tipo de compuestos es importante porque permite saber cómo se distribuye el contenido global de carbono de la muestra y cuáles de esos compuestos pueden ser fuentes de carbono potenciales en una fermentación.

Como se expuso anteriormente, la composición del mucílago puede variar dependiendo de la variedad del café de donde se extrajo, el tipo de extracción, la calidad del cultivo, el tipo de pretratamiento que se le realizó al material una vez obtenido, entre otros factores (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011; Ramírez Gómez et al., 2015). A pesar de las diferencias entre los mucílagos estudiados, un factor común es que ambos superaron el límite permisible de DQO fijado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo (Resolución 631,

2015), el cual establece que los vertimientos provenientes del beneficio del café deben presentar una DQO de 600 mgO₂/L para beneficios tradicionales (fermentación natural) y 3000 mgO₂/L para beneficios ecológicos (desmucilaginado mecánico).

Por ende, se hace necesario usar metodologías para eliminar o reducir el potencial contaminante de este residuo, el cual depende de la alta cantidad de azúcares y otros compuestos orgánicos que este presenta. No obstante, esta característica también los hace una materia prima promisoría para ser usado como sustrato en procesos fermentativos. En el área de la producción de celulosa bacteriana, la tendencia es buscar medios alternativos que reduzcan los costes de los medios sintéticos (Kadier et al., 2021), de manera que los mucílagos evaluados en este estudio podrían ser considerados medios alternativos promisorios, debido a su contenido de azúcares, nitrógeno y minerales.

3.2 Rastreo y aislamiento de cepas productoras

El vinagre casero de panela utilizado presentó matrices densas como principal fuente de bacterias productoras de CB, además la caracterización de este producto fermentado reveló propiedades acordes para el desarrollo de BAA como un pH bajo (2.75) y cantidad aceptable de azúcares totales (Figura 2-1) (Komagata et al., 2014).

Al igual que en los ensayos realizados por Fernández et al. (2019), la formación de matrices blanquecinas en la superficie de los medios enriquecidos de los tubos 2 y 3 es prueba de la presencia de bacterias productoras de celulosa bacteriana (Figura 3-2A). Las alícuotas de estos tubos que fueron sembradas en placas agar generaron colonias blanquecinas homogéneas entre sí (Figura 3-2B), todas las colonias presentadas fueron catalogadas como microorganismos potenciales para la producción de CB, sin embargo, debido a la capacidad experimental, sólo se escogieron diez colonias para evaluar la característica de celulosa positiva (Cel+). Las diez colonias evaluadas produjeron CB (Figura 3-2C), pero, solo cinco de ellas presentaron formación de una matriz visible en menos de tres días, por lo que se colectaron para realizar cultivo axénico en placa y se etiquetaron como CB1, CB2, CB3, CB4 y CB5.

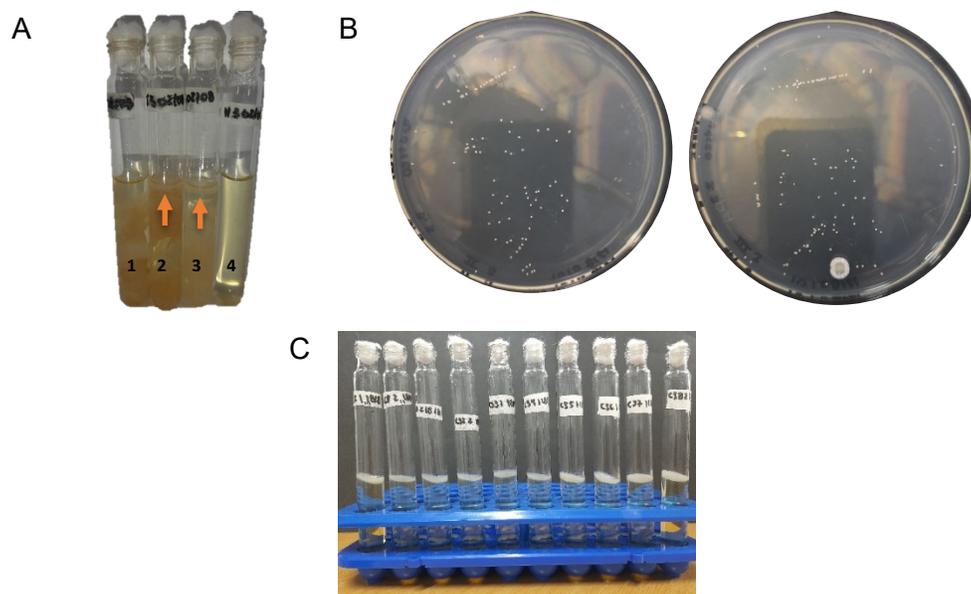


Figura 3-2. Resultados del proceso de rastreo y aislamiento. A. Formación de matrices en medio enriquecido. B. Colonias homogéneas proveniente de cultivo enriquecido. C. Prueba de celulosa (+) de las diez colonias evaluadas.

En el área del rastreo y aislamiento de BAA, los medios enriquecidos con una combinación de etanol y ácido acético han permitido la obtención de especies del género *Komagataeibacter* (*Gluconoacetobacter*). De hecho, se ha demostrado que medios de cultivo que carecen de estos componentes no presentan un ambiente enteramente favorable para el desarrollo de este tipo de microorganismos (Brown, 1886; Gerard, 2015; Lisdiyanti et al., 2003; Reimer et al., 2022). De manera que, el seguimiento de los protocolos planteados por estos autores permitió un correcto aislamiento de las cinco bacterias productoras de CB en el presente trabajo.

De igual manera, el suplemento de sorbato de potasio (0.02%) al agua peptonada y en los medios utilizados en esta etapa inhibió en gran medida la proliferación de mohos y levaduras, corroborando el efecto positivo de este aditivo en el desarrollo de cultivos bacterianos libres de contaminación, especialmente los de agar en placa de Petri (Gerard, 2015). Aunque la mayoría de los estudios recomiendan el uso de cicloheximida como aditivo en medio enriquecidos para evitar la proliferación de organismos oportunistas (Lisdiyanti et al., 2003), el sorbato de potasio demostró ser un agente efectivo en este caso.

3.3 Selección de mejor productor de CB

El análisis de varianza se utilizó como herramienta estadística para evaluar los resultados del diseño experimental y reveló que la variable *Rendimiento (g/L)* (Tabla 3-3) no presentó interacción entre los factores Bacteria y Medio ($p > 0.05$), pero esta interacción sí fue significativa ($p < 0.05$) para las variables *Espesor (mm)* (Tabla 3-4) y *Ysp (g/g)* (Tabla 3-5).

Tabla 3-3. Análisis de varianza para la variable Rendimiento (g/L)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos Principales					
A: Bacteria	0.570494	4	0.142624	12.85	0.0001***
B: Medio	25.8215	2	12.9107	1163.36	0.0000***
Interacciones					
AB	0.123516	8	0.0154396	1.39	0.2767
Residuos	0.166467	15	0.0110978		
Total (Corregido)	26.682	29			

*** $p < 0.001$

Tabla 3-4. Análisis de varianza para la variable Espesor (mm)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos Principales					
A: Bacteria	24.4605	4	6.11513	39.63	0.0000
B: Medio	47.8137	2	23.9068	154.94	0.0000
Interacciones					
AB	5.7908	8	0.723849	4.69	0.0049
Residuos	2.31443	15	0.154295		
Total (Corregido)	80.3794	29			

Tabla 3-5. Análisis de varianza para la variable Ysp ($g_{CB}/g_{sustrato}$)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos Principales					
A: Bacteria	0.049168	4	0.012292	26.59	0.0000
B: Medio	0.256309	2	0.128154	277.24	0.0000
Interacciones					
AB	0.0316662	8	0.00395828	8.56	0.0002
Residuos	0.00693387	15	0.000462258		
Total (Corregido)	0.344077	29			

En el caso de la variable *Rendimiento*, ya que no hubo interacción, fue posible identificar cuál de los niveles de cada factor tuvo un mejor desempeño por medio del análisis de los efectos principales. Para ello, se generó un gráfico de medias de Tukey HSD con un nivel de confianza del 95% para Bacteria y Medio por separado. En la Figura 3-3A se observa que las bacterias que presentaron el mayor rendimiento fueron CB1, CB2 y CB5, y las de menor rendimiento fueron CB3 y CB4. En la Figura 3-3B, se observa que el medio FN generó un mejor desempeño, seguido por DM y HS.

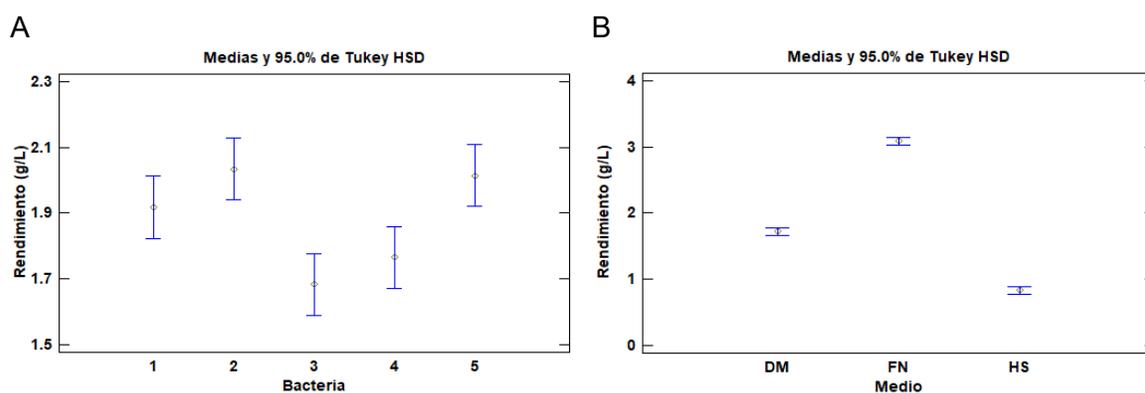


Figura 3-3. Gráfico de medias de Tukey HSD para la variable *Rendimiento* (g_{bs}/L) con los factores A. Bacteria y B. Medio.

DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural, HS: Medio HS

Las consideraciones con respecto a las otras dos variables dependientes, *Espesor* y *Ysp* se deben realizar a través de los efectos simples, es decir el desempeño de cada uno de los niveles de un factor evaluado a través de los niveles del otro factor (Montgomery, 2019).

En la variable *Espesor*, el gráfico de interacción del factor Medio en el factor Bacteria muestra que los niveles de este primero no se entrecruzan entre sí, por lo que se podría decir que la interacción de los factores no es tan fuerte en este caso, sin embargo, esta dio significativa ya que las tres líneas que representan los medios no son completamente paralelas entre sí (Figura 3-4A). De este gráfico se puede también inferir que el mucílago FN genera películas con mayor espesor que los medios DM y HS.

En el caso donde se evalúa el factor bacteria en el factor medio para la variable *Espesor*, sí se observa entrecruzamiento de los niveles (Figura 3-4B). Las mejores bacterias en este

caso fueron CB2 y CB5 en los medios FN y DM, siendo CB5 la que más sobresale en el medio FN. En el medio DM sobresalieron CB2, CB1 y CB5. A pesar de la interacción es posible evidenciar que las bacterias que generan matrices celulósicas con un espesor menor son CB3 y CB4.

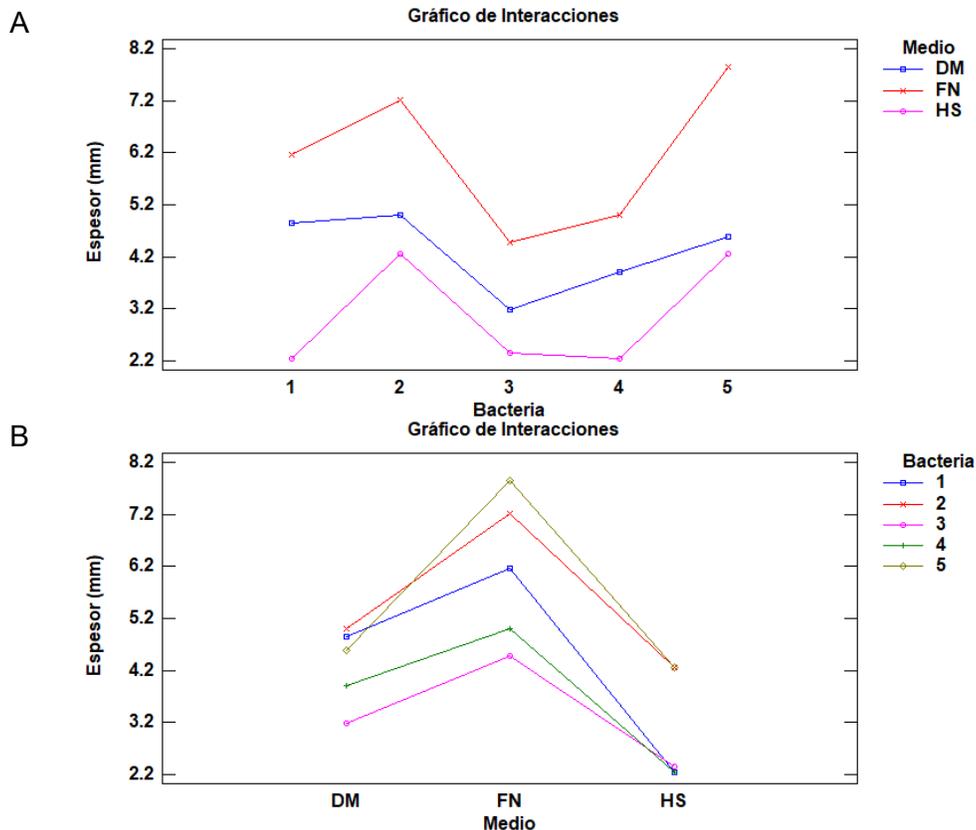


Figura 3-4. Gráfico de interacciones de la variable *Espesor (mm)*. A. Efectos simples del factor medio en el factor bacteria. B Efectos simples del factor bacteria en el factor medio. DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural, HS: Medio HS

Un comportamiento similar se observa para la variable *Ysp*, el grafico de interacciones de Medio-en-Bacteria (Figura 3-5A) muestra que, al usar el medio DM, las bacterias produjeron una alta cantidad de CB sin tener que consumir cantidades considerables de sustrato. Con respecto a la interacción de Bacteria-en-Medio (Figura 3-5B), las bacterias CB1 y CB5 mostraron mejor desempeño en los tres medios usados.

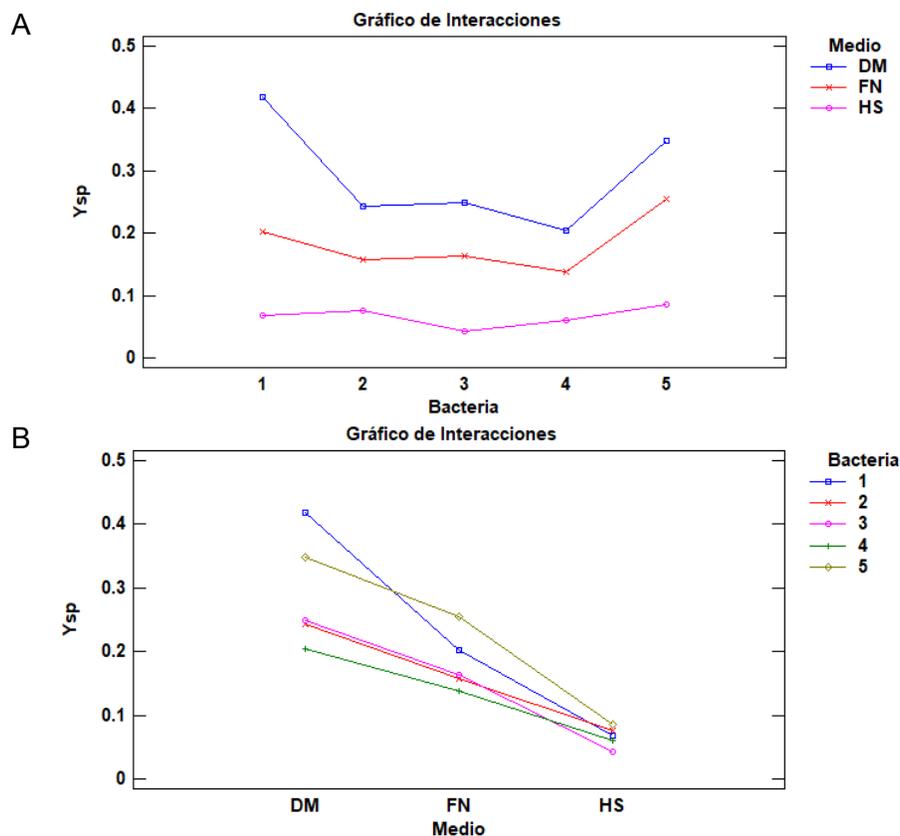


Figura 3-5. Gráfico de interacciones de la variable Y_{sp} ($g_{producto}/g_{sustrato}$). A. Efectos simples del factor medio en el factor bacteria. B Efectos simples del factor bacteria en el factor medio.

DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural, HS: Medio HS

A partir de los resultados obtenidos es posible deducir que el medio que mejor favorece las variables *Rendimiento* y *Espesor* es el mucílago FN, mientras que para la variable Y_{sp} , el medio DM mostró tener un mejor desempeño. El medio HS registró los menores valores en las tres variables evaluadas. El contenido de azúcares de ambos mucílagos es superior al contenido de azúcares del medio HS, característica que favorece el rendimiento de celulosa en estos, tal como se ha evidenciado en estudios similares (Jozala et al., 2015).

De las bacterias evaluadas, CB1, CB2 y CB5 fueron las que tuvieron mejor desempeño en las tres variables estudiadas, mientras que CB3 y CB4 no fueron sobresalientes en este ámbito. Considerando esta tendencia en los resultados, es posible determinar el desempeño global de cada una de las bacterias en las variables *Espesor* y Y_{sp} por medio

de un análisis de efectos principales. De esta manera se generó el gráfico de medias de Tukey HSD que relaciona *Espesor* y *Ysp* con el factor Bacteria, donde se evidencia el bajo rendimiento de CB3 y CB4 (Figura 3-6A y B).

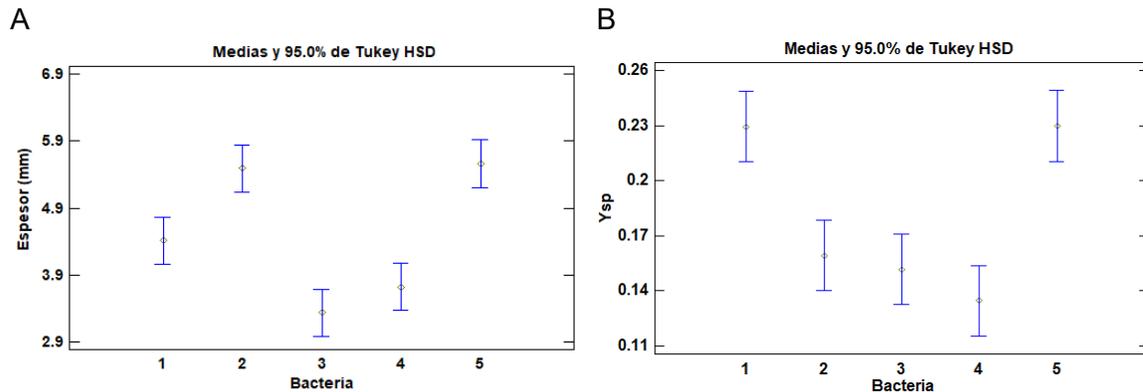


Figura 3-6. Gráfico de medias de Tukey HSD para las variables A. *Espesor* y B. *Ysp* en el factor Bacteria.

DM: Mucílago de Desmucilaginado Mecánico, FN: Mucílago de Fermentación Natural, HS: Medio HS

No es un hecho aislado que bacterias productoras de CB, obtenidas de una misma fuente, presenten un comportamiento diferente al ser evaluadas bajo las mismas condiciones de cultivo (Jalili Tabaii & Emtiazi, 2016). En el presente estudio se evidenció este mismo comportamiento y, de hecho, se demostró que la bacteria CB5 siempre estuvo en el grupo de mejor desempeño de las tres variables estudiadas, por ello se selecciona como el mejor productor bajo las condiciones de fermentación evaluadas.

Se debe recalcar que las bacterias evaluadas en este estudio no se sometieron a un proceso de adaptación previo a los medios utilizados, por lo que presentan potencial para crecer en otros medios alternativos con una alta carga orgánica o subproductos de otro tipo de industrias. También se ha evidenciado que ciertas cepas de *Ko. xylinus* que presentan un rendimiento óptimo en fermentación estática reducen su producción en fermentaciones agitadas y viceversa (Singhsa et al., 2018). Por lo que las bacterias CB3 y CB4 que tuvieron un desempeño menor en la fermentación estática probablemente podrían mostrar mayores rendimientos si se evaluaran bajo otras condiciones de cultivo.

3.4 Cinética de la producción de CB

Referente a la producción de CB es común encontrar tiempos de fermentación de 4 hasta 22 días (Fernandes et al., 2020; Kadier et al., 2021). En aras de evidenciar cambios en las variables del proceso fermentativo en el tiempo, se extendió la fermentación a 10 días usando el aislado CB5 con los medios de cultivo FN, DM y HS. A través de este seguimiento en el tiempo se evidenció el comportamiento de la producción de CB con respecto al consumo de los sustratos presentes en el mucílago, además del consumo de oxígeno y minerales y de la acidificación del medio.

3.4.1 Producción de CB y consumo de sustrato

El comportamiento de la producción y consumo de sustrato (azúcares reductores) en el tiempo se muestra en la Figura 3-7. Se evidencia que las primeras 24 horas de la fermentación se observan niveles similares de rendimiento de CB en todos los medios, este primer punto de la fermentación se asemeja a la fase de latencia de crecimiento microbiano en el que la bacteria se adapta al sustrato suministrado (Doran, 2013). Esta puede ser vista como un análogo para la producción de la celulosa bacteriana, en la que la bacteria se adapta al sustrato para comenzar una producción mayor (Sun et al., 2018).

En lo referente al consumo de sustrato, se observa que para los medios HS y FN (Figura 3-7B y C), este se estabiliza a partir del día 4 de la fermentación, mientras que para el mucílago DM (Figura 3-7A), se presume que este consumo tiende a estabilizarse a partir del día 1; aunque el único dato que no se ajusta a esta tendencia es la concentración de azúcares reductores en el día 4, su desviación no es muy pronunciada; de igual forma esta tendencia a la estabilidad sí se representa en los días 2, 6 y 10 de la fermentación. Con respecto al rendimiento de CB en el día 10 de la fermentación, este alcanzó valores de 0.771, 1.685 y 4.208 g_{bs}/L en los medios HS, DM y FN, respectivamente. En el medio HS se observó un equilibrio de la producción y el consumo sustrato al mismo tiempo (día 6) (Figura 3-7C), lo que indica que una vez consumida la única fuente de carbono del medio, se restringe la producción del metabolito deseado. Por lo contrario, tanto en el mucílago FN como DM, la producción de CB continuó así se hubiese estabilizado el consumo de azúcares reductores, sólo en el medio DM se observó estabilidad en la producción de celulosa bacteriana a partir del día 6, mientras que en el mucílago FN no es muy evidente si la producción se estabiliza o sigue creciendo a partir del día 10.

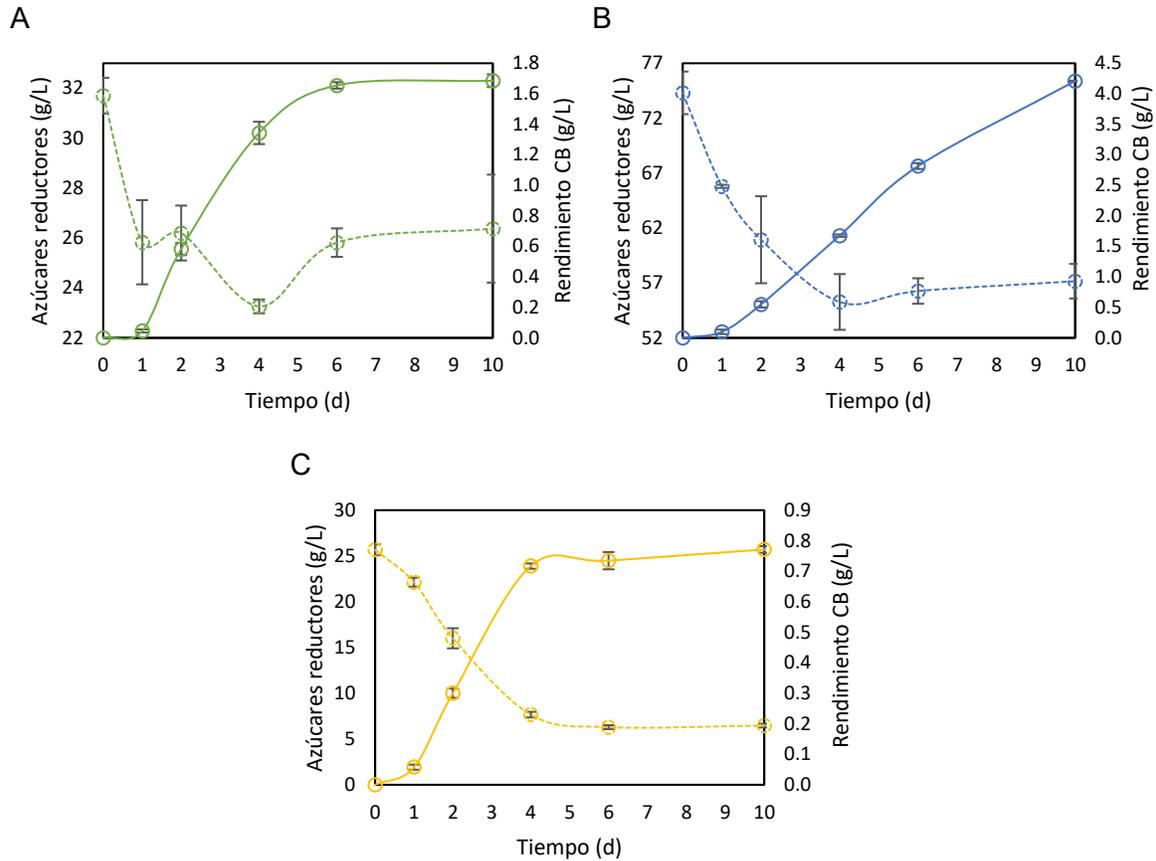


Figura 3-7. Rendimiento de CB (línea sólida) y concentración de azúcares reductores (línea punteada) durante la fermentación con el aislado CB5 en los medios A. DM, B. FN y C. HS evaluados.

DM: Mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN Mucílago Fermentación Natural, HS: Medio HS.

El porqué del incremento en el rendimiento de CB a pesar de que la tasa de consumo de sustrato es constante puede estar relacionado con la técnica implementada para medir el uso del sustrato y el metabolismo intrínseco de la bacteria. Con respecto al seguimiento de la fuente de carbono en el medio, el método utilizado fue el DNS (sección 2.2.3), el cual sólo identifica azúcares reductores, pero otras fuentes que pueden ser asimiladas por la bacteria como azúcares no reductores, ciertos oligosacáridos y ácidos como la sacarosa, estaquiosa, rafinosa, ácido acético y láctico no se pueden contabilizar por medio de esta técnica (Wood et al., 2012). Además, esta metodología presenta interferencias al contabilizar azúcares reductores en matrices complejas, haciendo que la coloración de la

reacción se incrementa por la presencia de polifenoles o furanos (Deshavath et al., 2020; Rivers et al., 1984), de manera que, es muy probable que el valor de los azúcares reductores en DM y FN durante la fermentación se hayan sobreestimado debido a los polifenoles presentes en las matrices de mucílago (Tabla 3-1).

En lo concerniente al metabolismo de la bacteria, esta habría consumido otros sustratos que no se pudieron identificar por medio del DNS. Esta modificación en el consumo de fuentes de carbono se denomina represión del catabolito de carbono (*carbon catabolite repression*) (Görke & Stülke, 2008), donde primero se asimila fuentes de carbono más simples como monosacáridos (glucosa, fructosa) y una vez que estas fuentes de carbono se han agotado en el medio, el metabolismo cambia para consumir sustratos más complejos (sacarosa, rafinosa, estaquiosa) (Qiu & Netravali, 2014a, 2014b). Por ello, se deduce que a partir del día 1 para mucílago DM y el día 4 del mucílago FN, la bacteria empezó a consumir otros sustratos que propiciaron la producción de celulosa bacteriana.

De acuerdo con lo planteado y haciendo uso de la técnica de HPLC, se presume que el pico del tiempo de retención 10.50 min (Anexo A), el cual no se pudo identificar por la carencia del estándar apropiado, podría estar en la categoría de no identificables por DNS como tri- o disacáridos del tipo sacarosa o rafinosa (Ball et al., 2011; Reichembach & de Oliveira Petkowicz, 2020). Comparando los cromatogramas del día 0 y 10 de la fermentación (Anexo A), se evidencia una reducción en el pico señalado, lo que indica consumo de este compuesto. De igual forma, otras sustancias que no se cuantificaron en este estudio; como oligosacáridos, pectina, etanol, lípidos, entre otros constituyentes de la matriz mucilaginoso (Bonilla-Hermosa et al., 2014; KC et al., 2021; Reichembach & de Oliveira Petkowicz, 2020; Remoroza et al., 2012); podrían haber tomado parte en el metabolismo de la bacteria, ya que se ha reportado que las bacterias de este género tienen la capacidad de consumir diferentes fuentes de carbono (Andritsou et al., 2018; Hong et al., 2012; Jang et al., 2019; S.-S. Wang et al., 2018).

A pesar de lo anterior, un hecho que sí se puede afirmar con base en los resultados obtenidos en la presente investigación es que una alta concentración de sacáridos propicia altos rendimientos de CB, tal como se evidenció en los rendimientos obtenidos en la fermentación con FN. Resultados similares fueron encontrados por Rani & Appaiah (2013), quienes obtuvieron un rendimiento de 5.6 g/L en 14 días de fermentación con extractos de

pulpa, obtenida por el procesamiento en seco del café, los cuales presentaron un contenido de azúcares del 7.2%, similar a los de mucílago FN del presente trabajo (7.17%), estos autores también demostraron que el rendimiento decrecía a medida que el extracto de pulpa era diluido. En contraste, el mucílago DM utilizado en este estudio presentó un rendimiento intermedio debido a su baja concentración de azúcares con respecto a FN; sin embargo, Floréz García (2015) obtuvo rendimientos promisorios de 4.2 g/L de CB en 7 días de fermentación con mucílago DM, el cual exhibió una mayor concentración de carbohidratos (azúcares totales 9.23 g/100 g) que el de la presente investigación, además la generación de CB en ese estudio también se favoreció por el suplemento del mucílago con los componentes del medio HS (peptona, extracto de levadura, ácido cítrico y Na_2HPO_4 ; excepto glucosa), ya que se ha demostrado que la adición de fuentes nitrogenadas, como peptona y extracto de levadura, favorece en la producción de CB en medios alternativos (Saavedra-Sanabria et al., 2021).

Además de la concentración elevada de sacáridos en los mucilagos en comparación con el medio HS, otro factor que propició la formación de CB fue la diversidad de fuentes de carbono que fueron asimiladas por el aislado CB5. Evaluando un consumo detallado de los azúcares y ácidos en el mucílago, se observó que esta bacteria tuvo afinidad por la mayoría de estos, ya que en el día 10 de la fermentación se nota un agotamiento de estos sustratos en el medio, excepto por la celobiosa que se consumió en menores proporciones (Figura 3-8). Esto hace del aislado CB5 un microorganismo versátil que puede metabolizar y aprovechar diferentes fuentes de carbono para generar CB como se ha demostrado en otras investigaciones (Andritsou et al., 2018; Hong et al., 2012; Jang et al., 2019; S.-S. Wang et al., 2018).

De hecho, se ha reportado que los compuestos identificados en el mucílago tienen un efecto positivo en la producción de CB, por ejemplo, mezclas de glucosa y fructosa (1:3) propician incrementos en el rendimiento de CB, donde la bacteria utiliza la glucosa para producir ácido glucónico y la fructosa para la producción de CB (Raghavendran et al., 2020); el ácido láctico y acético, utilizados como única fuente de carbono, pueden generar CB, además promueven la producción de este metabolito cuando se utilizan en combinación con otros sustratos (Rani & Appaiah, 2013; H.-J. Son et al., 2001; S.-S. Wang et al., 2018); asimismo, el ácido fórmico suplementado en bajas concentraciones al medio

fomenta incrementos considerables de CB (Chen et al., 2022); al igual que la presencia de ácido glucurónico en el medio duplica la generación de este metabolito (Mazhar et al., 2010). Por el contrario, la celobiosa no es una fuente de carbono que promueva, en gran medida, la formación de CB (Castro et al., 2012; Qi et al., 2017). En lo que respecta al levoglucosano y ácido galacturónico, no se encontraron estudios que los relacione con la producción de CB, sin embargo, los resultados aquí presentados demuestran que la bacteria CB5 tiene la capacidad de asimilarlos.

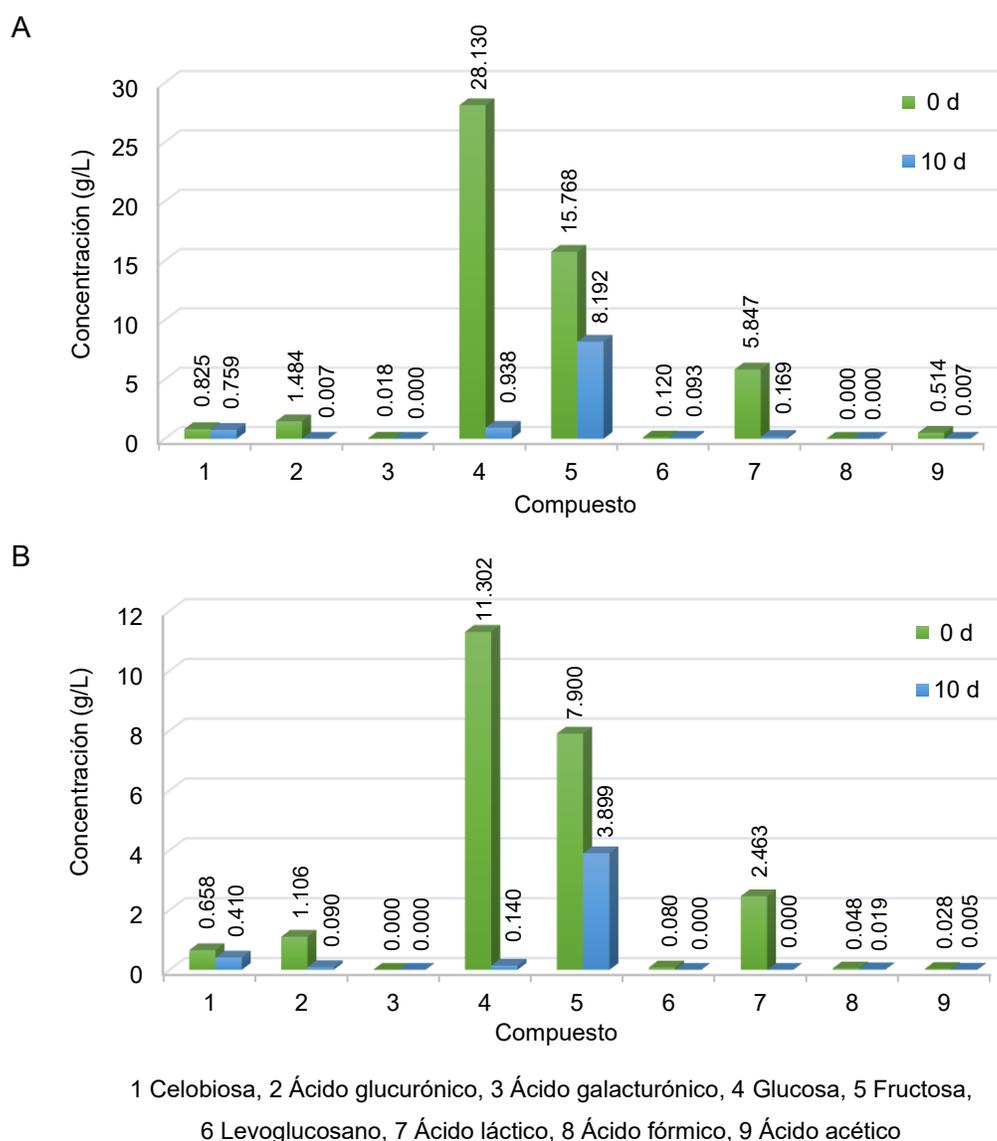


Figura 3-8. Concentración de azúcares y ácidos del mucílago de café A. FN y B. DM en el día 0 y 10 de la fermentación.

DM: Mucílago Desmucilaginado mecánico, FN Mucílago Fermentación Natural.

De acuerdo con lo anterior, se demuestra que el mucílago *per se* contiene una mezcla de sustratos que favorecen la formación de este exo-polímero. Igualmente, se ha indagado en los beneficios que implica utilizar medios alternativos con múltiples fuentes de carbono en procesos fermentativos, puesto que se ha demostrado que promueven la formación del metabolito deseado, sin embargo, también implican retos, ya que agregan complejidad al entendimiento y desarrollo de modelos fermentativos (N. Liu et al., 2020).

En modelos fermentativos donde se usa una única fuente de carbono como los realizados por Wang et al. (2018), el cálculo de parámetros como el rendimiento de producto con base a sustrato consumido (Y_{sp}) es fácil de deducir, ya que el cálculo de esta variable se basa en el concepto de reactivo limitante (fuente de carbono), cuyo consumo controla la producción del metabolito deseado (Castañeda, 2019). En ese sentido, el Y_{ps} calculado para el medio HS con base en el consumo de azúcares reductores es fehaciente, puesto que la única fuente de carbono de este medio era la glucosa, caso que no se presenta para FN y DM, donde sólo se puede reportar un parámetro aproximado con base en los resultados obtenidos con la técnica del DNS (Tabla 3-6). En cuanto a esto, Krahulec et al. (2010), usando sustratos mixtos para la producción de xilitol, calculó este rendimiento con base en la sumatoria del consumo las fuentes de carbono individuales asimiladas en la fermentación; aproximación que también se implementó para FN y DM usando los resultados de HPLC (Tabla 3-6).

Tabla 3-6. Rendimiento del producto con respecto a azúcares reductores [Y_{sp} ($g_{CB}/g_{azu.red.}$)] y sumatoria de sustratos consumidos [Y_{sp} ($g_{CB}/g_{cons.sust.}$)].

Medio	Y_{sp} ($g_{CB}/g_{azu.red.}$)	Y_{sp} ($g_{CB}/g_{cons.sust.}$)
HS	0.0402±0.0014 c	-
FN	0.2455±0.0358 b	0.0989±0.0038 a
DM	0.3163±0.1355 a	0.0886±0.0031 b

Diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa por prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

DM: Mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN Mucílago Fermentación Natural, HS: Medio HS.

El Y_{sp} informa sobre la eficiencia de la fermentación y la eficiencia del microorganismo para convertir la fuente de carbono en el producto deseado, relacionando este parámetro

con la glucosa del medio HS, el Y_{sp} fue menor con respecto al reportado por Wang et al. (2018) en una fermentación de 14 días ($Y_{sp} = 0.0563$), asimismo el Y_{sp} para FN y DM, calculado por medio de las dos aproximaciones, sobrepasó el valor exhibido por este medio sintético. Si bien los resultados para FN y DM son aproximaciones, ambos demuestran que hubo una mejor utilización de las fuentes de carbono al usar el mucílago que al usar el medio sintético, no obstante, se evidencia que el cálculo con base en el consumo de azúcares reductores sobredimensiona este parámetro, ya que no toma en cuenta todos los sustratos consumidos. En términos comparativos, el cálculo con base a la sumatoria del consumo de los i sustratos demostró que el uso de las fuentes de carbono en el mucílago mejoró la conversión de estos a CB y duplicó el rendimiento (Y_{sp}) de este metabolito, aumentando la eficiencia de la fermentación.

3.4.2 pH

En los tres medios evaluados se presentó una disminución del pH a lo largo de la fermentación (Figura 3-9), comportamiento que está relacionado con la producción de ácido por parte de la bacteria, puesto que se ha reportado que este grupo de microorganismos puede producir ácidos a partir de diferentes fuentes de carbono, como glucosa y etanol (Komagata et al., 2014). La glucosa es convertida a ácido glucónico por medio de la enzima glucosa oxidasa, mientras que el etanol se convierte a ácido acético por medio de las enzimas alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa (Gerard, 2015; Sun et al., 2018).

Siendo la glucosa la principal fuente de carbono en el medio HS, una proporción de esta pudo ser convertida a ácido glucónico por el aislado CB5, lo que se evidencia en el decaimiento del pH entre los días 0 y 4 de la fermentación; asimismo los mucílagos DM y FN exhibieron una concentración de glucosa de 11.30 y 28.13 g/L, respectivamente, y al igual que el medio HS su pH decreció a valores entre 3.08 y 3.35. No obstante, la producción de CB se duplicó y quintuplicó en los medios de mucílago con respecto al medio HS; como se discutió anteriormente, esto puede deberse a la asimilación de otros sustratos presentes por parte del aislado CB5 (Figura 3-8)

Aunque el valor de pH inicial de los medios de cultivo en la producción de CB también ha sido objeto de estudio, no se ha llegado a un consenso de cuál es el mejor para este tipo de

procesos ya que depende de la cepa evaluada, el medio y tipo de operación empleados. Castro et al. (2012) determinaron que el pH inicial óptimo para *Ko. medellinensis* usando medio HS era 3.5, permitiéndole obtener rendimientos de 4.5 g/L en un cultivo estático en 8 días. Mientras que H.-J. Son et al. (2003) demostraron que valores iniciales de pH menores a 4 desfavorecían el rendimiento de *Ko. xylinus* en medios agitados, pero a un pH inicial de 5 a 7 se incrementaba los rendimientos.

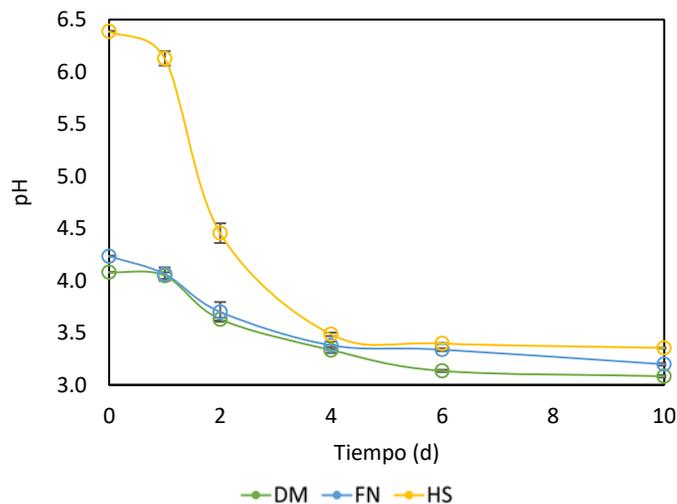


Figura 3-9. Comportamiento de pH durante la fermentación con CB5 en los diferentes medios evaluados.

DM: Mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN Mucílago Fermentación Natural, HS: Medio HS.

En lo que respecta a este estudio, el pH inicial de FN y DM no limitó la producción de celulosa bacteriana en los primeros días de la fermentación, pero el decrecimiento de este pudo interferir en la producción de celulosa en el medio DM, puesto que la producción en este se ralentiza a partir del día 6, el mismo periodo en el que el pH alcanza valores por debajo de 3.3.

3.4.3 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (OD) en el medio también es un factor importante en la producción de CB, en la fermentación realizada con el aislado CB5 se observa que en las primeras 24 horas se consume aproximadamente el 70% del oxígeno inicial de los medios (Figura 3-10). Varios autores han reportado que altas concentraciones de oxígeno disuelto en el

medio favorecen la producción de ácido glucónico (Sun et al., 2018; Tantratian et al., 2005). Sun et al. (2018) demostraron que la cepa *Ko. xylinus* NUST.42 (*Acetobacter xylinus*) genera mayores concentraciones de ácido glucónico cuando todo el oxígeno disuelto en el medio se consume, pero parte de este ácido se metaboliza para la producción de celulosa bacteriana posterior al agotamiento del oxígeno en el medio. Es posible que un caso similar presentara el aislado CB5 en el medio HS, ya que a partir del día 2 se observó el mayor decrecimiento de pH, pero también se evidenció mayor formación de celulosa bacteriana.

Aunque estos estudios de oxígeno disuelto se han hecho en cultivos agitados y aireados con medios sintéticos, se ha evidenciado que se debe garantizar una transferencia que no sature el medio por encima de 24% de oxígeno para así obtener rendimientos óptimos (Bae & Shoda, 2005) o permitir que la agitación transfiera la cantidad de oxígeno exacta que será inmediatamente asimilada por la célula, porque si las concentraciones de OD son superiores aumentara la producción de ácido glucónico y disminuirá el rendimiento de CB (Tantratian et al., 2005).

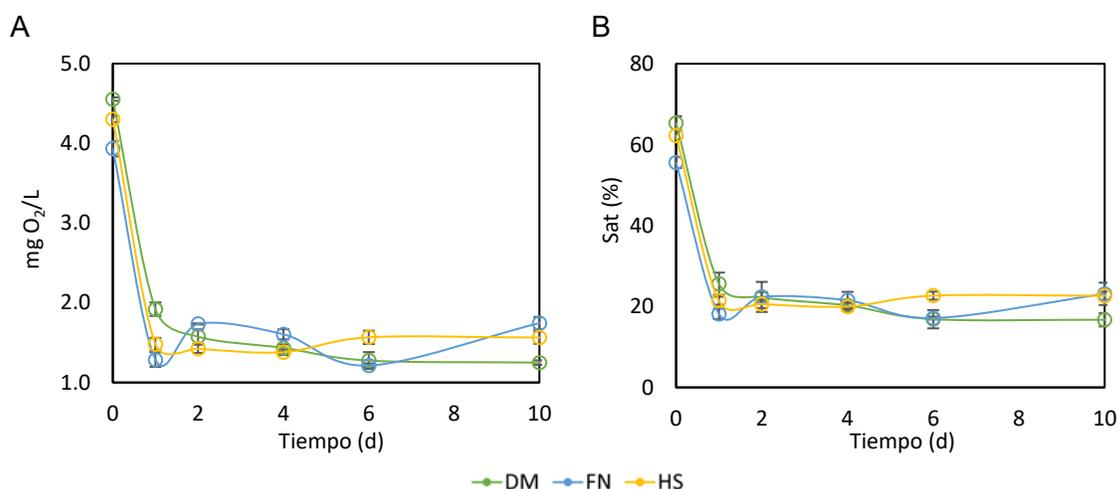


Figura 3-10. Comportamiento de oxígeno disuelto en A. mgO₂/L y B. % Saturación durante los 10 días de fermentación con el aislado CB5 en los medios evaluados.

DM: Mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN Mucílago Fermentación Natural, HS: Medio HS.

A diferencia de los estudios citados anteriormente, el sistema fermentativo evaluado aquí fue estático, sin aireación y agitación, por lo que una vez se desarrolla la matriz en la superficie del líquido (Figura 3-11), no es posible garantizar la transferencia de oxígeno al

medio y en el caso de que la bacteria requiera oxidar azúcares o materia orgánica para después dirigirlos a la producción de celulosa bacteriana no podrá hacerlo (Blanco Parte et al., 2020). No obstante, a pesar de que la concentración de oxígeno disminuyó de 4.5 a 1.5 mg O₂/L (65 a 16% de saturación) después de 24 h de fermentación, la formación de CB no se restringió, por lo contrario, después de la reducción de oxígeno en el medio se observó un incremento en la producción de CB (Figura 3-7), por lo que condiciones de bajo oxígeno podrían propiciar una mayor formación del metabolito por parte del aislado CB5. El agotamiento de oxígeno y posterior producción de CB en los mucílagos se asemeja también a lo presentado por Sun et al. (2018). Además, M. Liu et al. (2018) sugiere que condiciones de hipoxia potenciarían la producción de CB, lo que también explicaría el porqué del comportamiento de producción en el medio FN, que parece no estabilizarse en el tiempo 10.

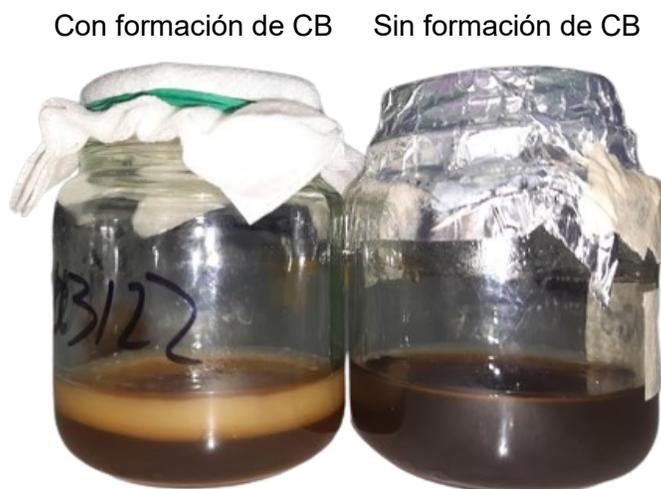


Figura 3-11. Formación de matriz celulósica en la superficie del medio de cultivo (mucílago de FN).

CB: Celulosa Bacteriana, FN Mucílago Fermentación Natural.

En este montaje experimental también se observó una reducción de 16.96% y 10.69% en la DQO del mucílago FN y DM, respectivamente (Tabla 3-7). Lo que indica que la fracción de oxígeno consumido ayudó a disminuir esta capacidad contaminante, mientras se generaba el producto deseado. Aunque los valores de DQO al final del proceso aún están por fuera de los límites establecidos por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo (Resolución 631, 2015), es notoria la contribución en el área ambiental al reducir en cierta medida la carga orgánica de este subproducto y también en el ámbito de desarrollo de bioprocesos

al mejorar los rendimientos en la producción de celulosa bacteriana sin depender de medios sintéticos.

Tabla 3-7. DQO en medio DM y FN para la producción de CB

Tiempo	0 días	10 días
Mucílago	mg O₂/L	
FN	105075.00±675.00 a	87237.5±770.65 b
DM	44743.75±1906.25 a	39962.5±904.09 b

Diferentes letras en la misma fila indica diferencia significativa por prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$)

CB: Celulosa Bacteriana, FN Mucílago Fermentación Natural, DM: Mucílago Desmucilaginado mecánico, DQO: Demanda Química de Oxígeno.

3.4.4 Minerales

Los minerales presentes en el medio de cultivo también pueden influir de igual manera en la producción de celulosa bacteriana. De hecho, Almeida et al. (2013) evaluaron la producción de CB en la cepa *Ko. xylinus* ATCC 23769 (*Acetobacter xylinus*) usando agua de coco maduro (ACM) y verde (ACV) como medio de cultivo, enriquecido con diferentes fuentes de minerales. Su estudio reveló que para el medio ACM el mineral más consumido fue P, seguido por Fe, Na, K y Mg; en el medio ACV, los minerales más consumidos fueron Na, Mg, K, P y Fe; en ese orden. Bajo esas condiciones. la mayor concentración de celulosa alcanzada fue de 6.0 g/L con el medio ACM y un contenido mineral de KH_2PO_4 (5000 mg/L), FeSO_4 , (5 mg/L), NaH_2PO_4 (300 mg/L).

En el caso del mucílago de café, la fermentación llevada a cabo en DM evidenció un alto consumo de K, Ca, Mg, Fe, Al y Mn (Figura 3-12B), mientras que los niveles de P y Si permanecieron casi invariables, sugiriendo que, bajo las condiciones de este medio, el consumo de estos elementos fue beneficioso para el microorganismo CB5. El comportamiento de consumo de minerales en mucílago DM se asemeja al reportado por Almeida et al. (2013), coincidiendo en que K, Mg y Fe fueron los elementos más consumidos.

En lo que respecta al mucílago FN (Figura 3-12A) no se evidenció consumo de los minerales cuantificados y algunos de ellos presentaron un comportamiento errático al mostrar un leve crecimiento al día 10 de la fermentación, sin embargo, sólo se realizó una

repetición para la cuantificación de los minerales presentados, por lo que, lo que parecen datos anómalos podrían encontrarse en el rango de la desviación estándar, considerando también que las variaciones en la concentración de minerales entre el día 0 y 10 no son muy pronunciadas para este medio.

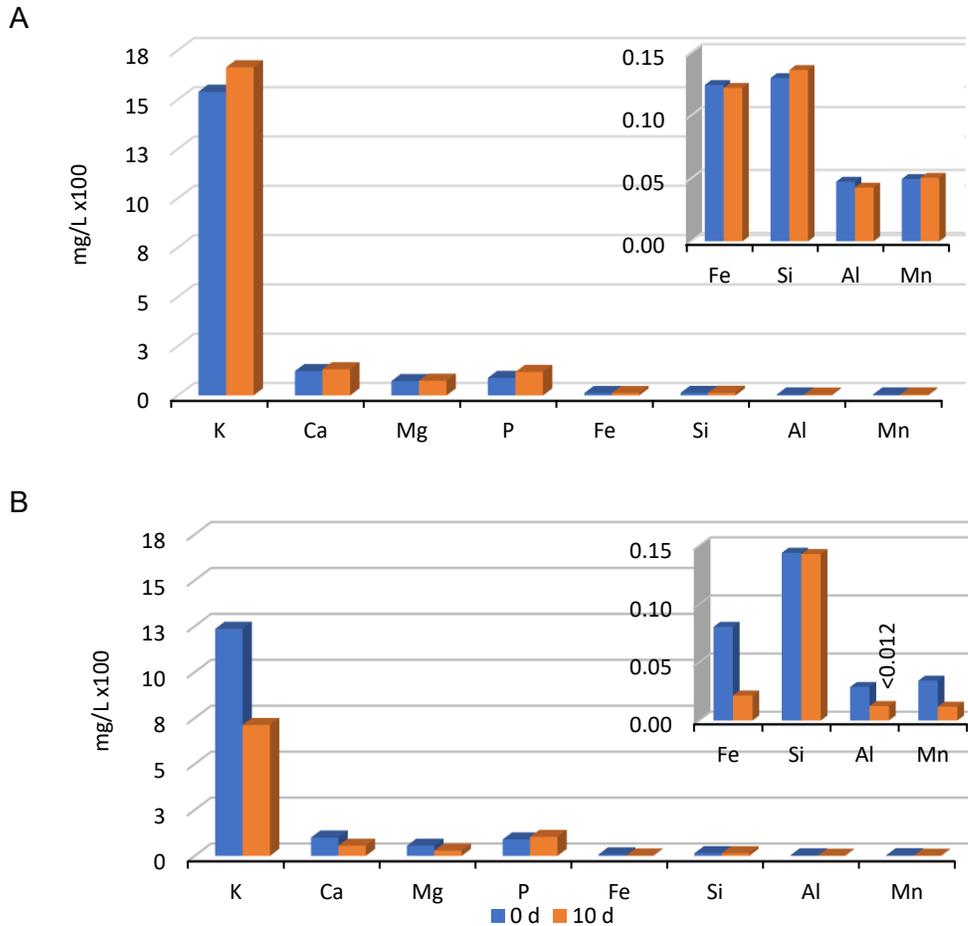


Figura 3-12. Composición mineral del mucílago A. FN y B. DM en los días 0 y 10 de la fermentación.

DM: Mucílago Desmucilaginado mecánico, FN: Mucílago Fermentación Natural.

3.4.5 Mucílago como medio

Por todas las características presentadas, tanto FN como DM, demostraron ser un medio eficaz para la producción de CB con respecto al medio sintético HS. Además, este subproducto tiene potencial de ser materia prima en este bioproceso no sólo por su composición química, sino porque a diferencia de otros subproductos agrícolas utilizados

para la generación de CB, este no requirió de pretratamientos químicos como hidrólisis ácidas para liberación de azúcares (Z. Li et al., 2015; K. C. de Souza et al., 2021) o la eliminación de componentes inhibitorios como la nicotina residual en subproductos de plantaciones de tabaco (Ye et al., 2019). Sólo involucró pretratamientos físicos para la eliminación de material particulado y la posterior esterilización, haciéndolo un medio de uso directo.

3.5 Efecto de variables operacionales

Existen muchos parámetros que se han estudiado en la producción de CB para incrementar su rendimiento, como pH, volumen de inóculo, temperatura, inclusión de aditivos en el medio de cultivo, entre otros (Fernandes et al., 2020). Los resultados de estos dependerán principalmente de las cepas evaluadas y su habilidad de adaptación a las condiciones sometidas (Singhsa et al., 2018). Es por lo que se propuso evaluar las condiciones de temperatura y aireación a las que el asilado CB5 pueda incrementar la producción de CB usando el medio de cultivo DM; el uso de este medio de cultivo se debió a que se contaba con mayor disponibilidad de este para realizar los montajes pertinentes en esta sección.

3.5.1 Temperatura

Las BAA son considerados microorganismos mesófilos, cuyas temperaturas de desarrollo se encuentran entre los 25 y 45 °C (Komagata et al., 2014). Es por lo que se evaluó la producción de CB en este rango de temperatura (25, 30, 35 y 40 °C), usando mucílago DM en una fermentación de 4.5 días. Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza de una sola vía y la prueba de Tukey HSD (Tabla 3-8).

Tabla 3-8. Rendimientos de CB en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	Rendimiento (g/L)*
25	1.327±0.072 b
30	1.606±0.099 ab
35	1.694±0.005 a
40	1.583±0.073 ab

*Fermentación 4.5 días.

Diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa por prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

La mejor temperatura de producción fue 35 °C, en un segundo lugar las mejores temperaturas fueron 30 y 40 °C, la temperatura de menor desempeño fue 25 °C. La prueba de Tukey de diferencias significativas reveló que el incremento en el rendimiento de celulosa a 35 °C con respecto a la de 30 °C es de 5.47%. Este incremento en la producción es promisorio, puesto que a esta temperatura reduce casi a la mitad el tiempo requerido para generar la misma cantidad de CB que se produjo a 30 °C durante 10 días de fermentación (Figura 3-7).

Otras investigaciones han encontrado temperaturas óptimas para la producción de CB con *Komagataeibacter xylinus* BPR2001 (*A. xylinus*) de 25 °C creciendo en jarabe de arce (Zeng, Small, et al., 2011), de 20 °C para *Novacetimonas hansenii* (*Gluconoacetobacter hansenii*) creciendo en medio HS y de 35 °C para *Ko. xylinus* (*A. xylinus*) creciendo en un medio definido (Dobre et al., 2008); evidenciando que la temperatura de producción dependerá de la especie utilizada. En climas tropicales, como el de Colombia, el uso de temperaturas menores a 25 °C, supondrían el uso de sistemas de refrigeración para cumplir con las condiciones óptimas de las bacterias, por lo que el aislado CB5 presenta condiciones de operación que no implicarían un costo energético elevado. Actualmente, la mayoría de los estudios reportados utilizan una temperatura estándar de 25-30 °C (Kadier et al., 2021).

3.5.2 Aireación y alimentación intermitente

De acuerdo con la discusión planteada en la sección 3.4, el oxígeno es un parámetro fundamental en la producción de CB, especialmente si se trabaja con un medio de cultivo que presenta una alta carga orgánica y de DQO como lo es el mucílago. Es por lo que se construyó un sistema que permitiera la inyección de aire y a su vez permitiera realizar adiciones intermitentes de mucílago DM durante el tiempo de la fermentación, este se comparó frente a otro sistema de flujo intermitente no aireado (Figura 3-13).

Otros estudios de investigación han planteado el uso de sistemas con agitación para mejorar la transferencia de oxígeno, sin embargo, se ha reportado que esta genera daño de cizalla en las paredes de las bacterias perjudicando su membrana, donde se encuentra

el complejo celulosa sintasa, por lo que el resultado es la generación de mutantes celulosa negativa (Cel-), es decir bacterias que pierden la capacidad de producción de CB (Blanco Parte et al., 2020; Doran, 2013; Z. G. Wang et al., 2016; Watanabe et al., 1998). Las turbulencias generadas en los sistemas neumáticos o aireados son menores a los sistemas agitados por turbinas, por lo que se hacen más beneficios para este tipo de procesos ya que evitan en gran medida la disrupción de la envoltura celular (de Jesus et al., 2017). De igual forma, se han reportado casos en los que la agitación reduce el rendimiento de celulosa comparado con el sistema estático, como el estudio llevado a cabo por Algar et al. (2015) con medio de cultivo de panela y residuos de piña usando como bacteria productora *Ko. medellinenses* en cultivo agitado a 100 rpm, quienes reportaron una disminución en la producción del 74.69% con respecto a la fermentación estática.

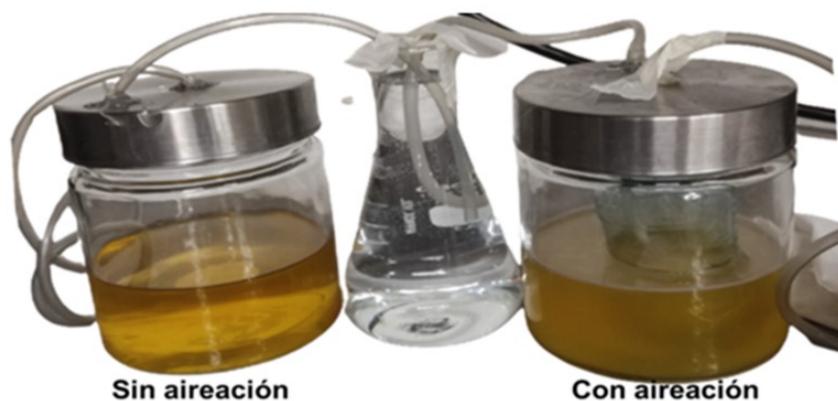


Figura 3-13. Sistema de flujo intermitente con y sin aireación.

Los resultados obtenidos con el sistema construido en el presente trabajo evidenciaron un efecto positivo en la inyección de aire, incrementando la producción de CB en un 22.6% con respecto al sistema de flujo intermitente no aireado (Tabla 3-9).

Además, se observó que el sistema aireado permitió un agotamiento casi total de la glucosa al final de la fermentación (Figura 3-14). Independiente de las adiciones intermitentes de mucílago hechas durante los días 2 y 4, el consumo de estos siguió decreciendo, mientras que en el sistema no aireado se evidenció una interrupción en el consumo de sustrato hasta el día 6, en el que se evidenció decrecimiento de la concentración de glucosa en el medio.

Tabla 3-9. Rendimiento de CB en un sistema de flujo intermitente con y sin aireación usando mucílago DM.

Modo de fermentación	Rendimiento (g _{bs} /L)*
Aireado	1.470
Sin aireación	1.138

*Fermentación 11 días

Es importante hacer mención de que durante el estudio de este montaje no se realizó seguimiento a otros azúcares presentes en el mucílago DM, por lo que se debe aclarar que la saturación presentada por la bacteria en CB5 en el sistema no aireado no sólo corresponderá a la glucosa presente en el medio, sino a los otros componentes de este que también requieren de oxígeno para ser metabolizados.

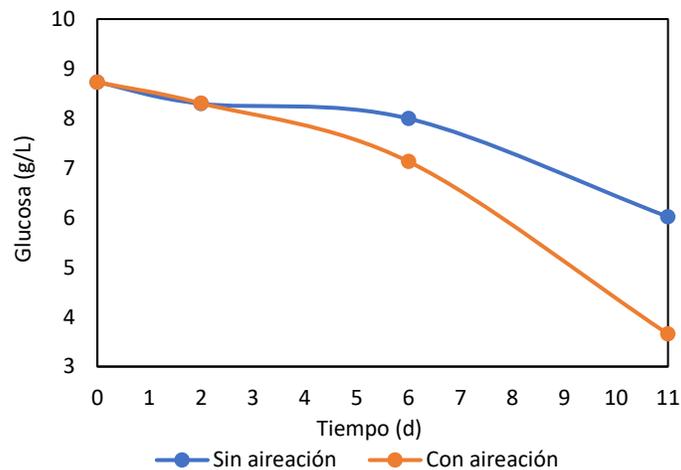


Figura 3-14. Concentración de glucosa durante el tiempo de fermentación, con y sin aireación, en un sistema de flujo intermitente.

De acuerdo con lo estudios de Sun et al. (2018) y S.-S. Wang et al. (2018), un ambiente rico en oxígeno oxidará la glucosa a ácido glucónico y este también servirá como precursor de celulosa bacteriana, razón por la que el sistema aireado podría haber evidenciado una mejor metabolización de este sustrato y un mayor rendimiento de celulosa.

Evaluando la producción en el sistema aireado y de flujo intermitente (AFI) y el sistema estático sin aireación y agitación (SE) utilizado inicialmente, el segundo día rendimientos mayores en un 13% con 10 días de fermentación. Sin embargo, ambos sistemas no

pueden ser comparables porque no contaron con la misma geometría de reactor y condiciones de operación. El SE contó con un A_i/V de 0.70 cm^{-1} , mientras que el AFI empezó con A_i/V de 0.2 cm^{-1} y debido a la adición de mucílago esta se redujo a 0.17 cm^{-1} . Lo que genera desventajas en la producción ya que se ha demostrado que A_i/V de $0.77\text{-}0.8 \text{ cm}^{-1}$ es un valor óptimo para la producción de CB en sistemas estáticos (Caicedo et al., 2001; Ye et al., 2019).

Otros factores que pudieron afectar el desempeño del sistema AFI con respecto al SE, fueron la temperatura y la concentración inicial de glucosa. La fermentación AFI se llevó a cabo a temperatura ambiente, mientras que la temperatura de la fermentación SE se desarrolló a una temperatura constante de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Además, los mucílagos utilizados en ambos montajes presentaron diferencias en la concentración inicial de glucosa 8.73 g/L (AFI) y 11.30 g/L (SE). No obstante, a pesar de las diferencias presentadas por ambos sistemas, los rendimientos obtenidos fueron cercanos (AFI: 1.470 g/L y SE: 1.685 g/L).

3.6 Identificación taxonómica del aislado CB5

3.6.1 Identificación molecular

A partir del genoma ensamblado (Tabla 3-10), se usó inicialmente la secuencia de ARN ribosomal 46S para determinar el género de la especie utilizando el algoritmo CLASSIFIER del Ribosomal Database Project (RDP). El algoritmo arrojó como resultado que la bacteria CB5 pertenece efectivamente al género *Komagataeibacter* con un nivel de probabilidad del 100%.

Tabla 3-10. Resultados de ensamblaje para el aislado CB5

Estadísticas de ensamblaje	Aislado CB5	<i>Ko. intermedius</i> AF2 (dos Santos et al., 2015)
Longitud total de la secuencia	3966211 pb	4465062 pb
N50	145161 pb	70565 pb
Contenido de GC (%)	61.7	61.35
Número de rRNA	3	11
Número de tRNA	55	64

Para determinar la especie dentro de este género se utilizó la técnica de Average Nucleotide Identity (ANI), la cual se basa en la hibridación DNA-DNA *in silico* (Raina et al.,

2019), con el software MAFFT versión 7. Este análisis determinó que el asilado CB5 pertenece a la especie *Komagataeibacter intermedius* presentando un *cut off score* del 98.90%. Además del resultado reportado por el método de ANI, se realizó un árbol filogenético con 100 genes identificados en el genoma, el cual arrojó ausencia de diferencia genética del aislado CB5 con la cepa *Komagataeibacter intermedius* AF2 (Figura 3-15), confirmado su pertenencia a esta especie.

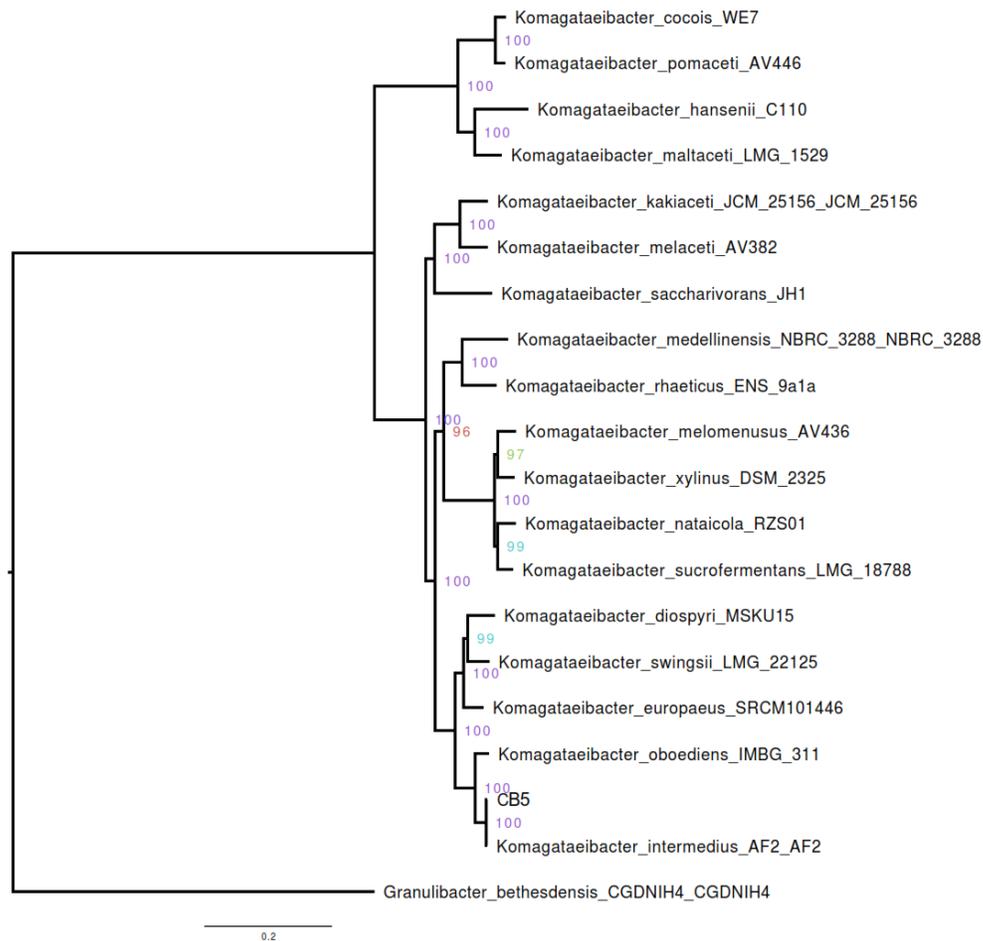


Figura 3-15. Árbol filogenético del género *Komagataeibacter* incluyendo el aislado CB5

El genoma ensamblado para otra cepa de esta misma especie se reporta en la Tabla 3-10, en general estos se asemejan entre sí en el contenido de GC, que también es similar para otras especies reportadas del mismo género *K. xylinus* NBRC 3288 (60.92%) (Ogino et al., 2011), *K. europaeus* 5P3 (61.2%) y *K. oboediens* 174Bp2 (61.3%) (Andrés-Barrao et al.,

2011). Lo cual para el género *Komagataeibacter* y *Gluconoacetobacter* se encuentra en porcentaje promedio de 61% (Dourado et al., 2016).

3.6.2 Características morfológicas y bioquímicas

Una vez identificada la cepa por medio de la aproximación pseudo polifásica, se hace propio complementar su caracterización con métodos quimo-taxonómicos, en los que se evalúan las principales características bioquímicas y morfológicas del género y la especie (Raina et al., 2019).

El aislado CB5, ahora clasificado en la especie *Ko. intermedius*, presentó una envoltura celular Gram negativa (Figura 3-16C); además su color y morfología de colonia fue de blanco-crema de forma irregular, margen lobulado y superficie de contorno (Figura 3-16A y B); lo que se enmarca en las características comunes del género *Komagataeibacter* y de las BAA (Komagata et al., 2014).

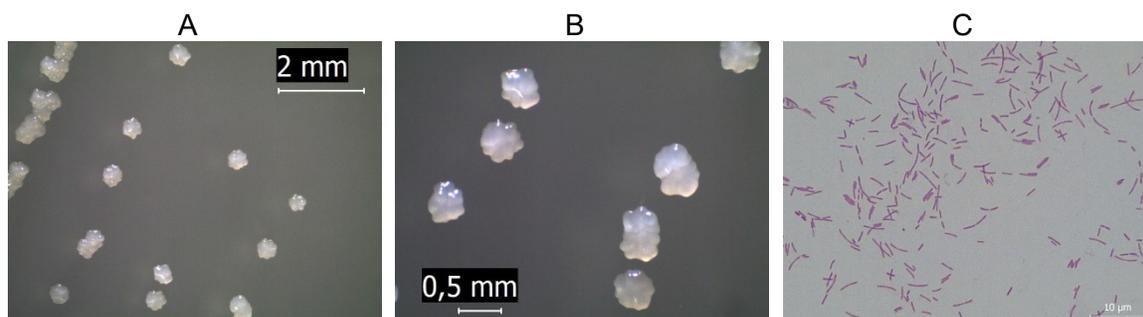


Figura 3-16. Características morfológicas del aislado CB5. A. Morfología de colonia a 12.5X, B. Morfología de colonia 25X, C. Microscopía de tinción de Gram 1000X.

Con las diferentes pruebas bioquímicas realizadas se corroboró características propias de la familia *Acetobacteraceae* como catalasa (+) y oxidasa (-) (Bergey & Holt, 1994). Las características de la especie representativa TF2 de *Ko. intermedius* también se evidenciaron en el aislado CB5, así como la capacidad de crecer en concentraciones altas de etanol y ácido acético, aunque la presencia de este último no es necesaria para su crecimiento (Boesch et al., 1998).

Las pruebas bioquímicas realizadas al aislado CB5 se detallan en la (Tabla 3-11) y se comparan con otras especies del género. Entre las características más destacables del

aislado CB5 está su capacidad de crecer en concentraciones de glucosa del 30%, lo que confirma su habilidad de crecer en medios sobresaturados de sustrato. Por otro lado, se evidencia que la bacteria no crece a altas concentraciones salinas (3% NaCl) lo que puede reducir su aplicación en medios que presente un alto estrés osmótico.

A partir de los ensayos bioquímicos se corrobora la producción de ácido a partir de glucosa, la cual fue muy prominente durante el tiempo de incubación (Anexo B), de igual forma se constató la producción de ácido a partir de etanol, pero no se evidenció que este se sobreoxidara a CO₂ en la prueba con agar Carr, difiriendo del comportamiento normalmente reportado para este género (Bergey & Holt, 1994; Komagata et al., 2014). Se dio producción débil de ácido a partir de fructosa, galactosa y glicerol, pero no se demostró producción alguna con sacarosa, lactosa, maltosa, butanol y metanol; en los últimos dos también se observó un crecimiento reducido o nulo. La producción de DHA a partir de glicerol constata la capacidad de este microorganismo para usar glicerol en el metabolismo energético (Black, 2013).

Las fuentes de carbono ensayadas que no generaron ácido son sustratos potenciales para la producción de celulosa bacteriana, ya que se evitaría la producción de ácido podría dirigir toda su metabolización a la producción de CB (Zhong et al., 2013).

Las pruebas bioquímicas referencian la capacidad de la bacteria para usar ciertos compuestos en su metabolismo energético; en este género son diversos los reportes que han evaluado diferentes fuentes de carbono y medios de cultivo, tanto definidos como complejos y alternativos, en este género (Kadier et al., 2021; Sperotto et al., 2021). Aunque aún no se tiene un entendimiento completo de cómo estos son procesado al interior de la célula, se han hecho avances que permiten entender cómo estos compuestos intervienen en las rutas metabólicas de la bacteria y aportan en la generación de CB (S.-S. Wang et al., 2018). Por lo que se debe seguir ahondando en el estudio de la interacción entre el sustrato y la bacteria para desarrollar producciones óptimas y viables económicamente de CB.

Tabla 3-11. Características diferenciales del aislado CB5 con respecto a otras especies relacionadas con el género *Komagataeibacter*.

1 Aislado CB5, 2 *Komagataeibacter xylinus* 3 *Komagataeibacter medellinenses* ID13488
4 *Komagataeibacter intermedius* TF2 (LMG 18909).

Prueba bioquímica	1	2	3	4
Confirmación de familia Acetobacteraceae				
Catalasa	+	+	nr	nr
Oxidasa	-	nr	nr	nr
Características Fisiológicas y Bioquímicas				
Producción de pigmentos cafés	-	-	nr	-
Oxidación de acetato	+	+	nr	+
Crecimiento en 30% de D-Glucosa	+	-	-	-
Crecimiento en 3% de NaCl	-	nr	nr	nr
Crecimiento en 0.35% de ácido acético	+	nr	nr	nr
Crecimiento en metanol	-	-	nr	nr
Producción de ácido a partir de:				
Glucosa	+	+	+	+
Fructosa	D	-	nr	nr
Galactosa	D	+	nr	nr
Sacarosa	-	+/-	+	-
Maltosa	-	nr	nr	nr
Lactosa	-	nr	nr	nr
Etanol	+	+	+	nr
Metanol	-	nr	nr	nr
Butanol	-	nr	nr	nr
Glicerol	D	nr	nr	nr
Producción de DHA a partir de glicerol	+	+	nr	nr
Oxidación de etanol a ácido acético	+	+	+	+
Oxidación de ácido acético a CO ₂	-	+	nr	nr
Producción de celulosa	+	+	+	+
+: Positivo; -: Negativo; D: Débil; nr: no reporta				

Fuente: (Castro et al., 2013; Komagata et al., 2014; C.-J. Son et al., 2002; Yamada et al., 2012)

3.7 Caracterización de las matrices de celulosa bacteriana

Los diferentes cambios en las dinámicas industriales y la necesidad de generar materiales poliméricos biodegradables y sustentables ha hecho que los polisacáridos, en especial la celulosa de origen vegetal y, recientemente, la celulosa bacteriana, sean una alternativa promisoriosa para reemplazar los materiales poliméricos derivados del petróleo (Dumitriu,

2005). Especialmente, la CB ha mostrado tener propiedades novedosas que le permiten ser un polímero versátil con aplicaciones en medicina, industria alimentaria, electrónica, entre otras (Azeredo et al., 2019; Blanco Parte et al., 2020; Cazón & Vázquez, 2021; Kadier et al., 2021).

Factores como el tipo de cepa productora, las condiciones de cultivo y los métodos de purificación pueden generar cambios en las propiedades de la CB (Carreño Pineda, 2011; Singhsa et al., 2018), por lo que se hace imperito definir las propiedades estructurales, mecánicas y térmicas de las matrices de celulosa obtenidas en fermentación con mucílago FN y DM y el de medio sintético HS.

3.7.1 Morfología y estructura de la CB

Independiente del medio de producción, las matrices obtenidas evidenciaron hinchamiento debido a la inclusión de agua en su estructura, la cual les otorga una apariencia gelatinosa (Figura 3-17). Durante la producción, los diversos constituyentes del medio de cultivo también interactúan con la estructura celulósica naciente, quedando retenidos en esta y otorgándole la misma coloración del medio (Figura 3-17A).

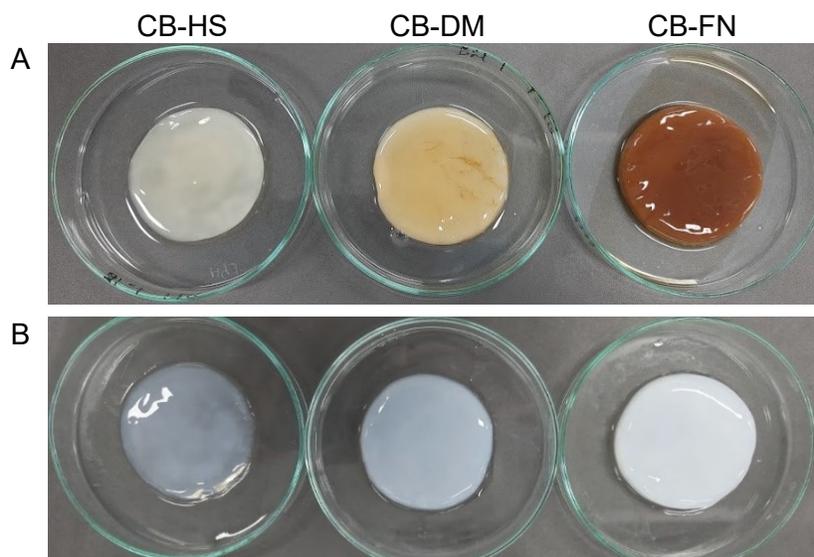


Figura 3-17. Celulosa Bacteriana obtenida en fermentación de 10 días en medio DM, FN y HS A. antes y B. después de lavado y purificación con NaOH.

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

En el proceso de purificación las matrices de celulosa se lavaron inicialmente con agua destilada (en ebullición) con el fin de remover el color inicial, esta etapa estuvo seguida de un tratamiento alcalino con NaOH, a una concentración de 0.1 M y 0.5 M para las matrices obtenidas con los medios DM y HS, y FN, respectivamente. Esta operación aguas abajo (*downstream*) permite remover las impurezas del medio y obtener matrices blanquecinas; para las matrices provenientes de FN se debió usar una concentración de NaOH más alta con el fin de obtener matrices con una blancura aceptable (Figura 3-17B).

En el proceso de secado al aire libre o por convección ocurre el fenómeno de hornificación, denominado así por la industria papelera y pulpas lignocelulósicas; este se refiere al endurecimiento del polímero debido a la remoción o pérdida de agua; las fibras del polímero se contraen y agregan entre sí, lo que genera un cambio estructural no, o parcialmente, reversible, haciendo que la estructura se colapse y se formen películas delgadas (Fernandes Diniz et al., 2004).

Inicialmente, este fenómeno fue atribuido a la formación de puentes de hidrógeno formados entre las fibrillas de celulosa durante el secado; sin embargo, gracias a metodologías de simulación y análisis molecular se ha deducido que la fuerza de enlace del puente de hidrógeno no es suficiente para fijar esta estructura irreversiblemente; por lo que, la hornificación también se debe a las fuerzas de London interactuando entre la superficies de las fibrillas y a fuerzas capilares, dadas por retención de moléculas de agua atrapadas en cavidades sub nanométricas de la estructura celulósica (Wohlert et al., 2022).

Fue posible evidenciar hornificación en las matrices celulósicas una vez sometidas al proceso de secado por convección forzada y liofilización. No obstante, se nota la diferencia de las películas obtenidas con ambos procesos. La liofilización generó celulosa con apariencia nacarada en la superficie y espesores no homogéneos a lo largo de la matriz (Figura 3-18A), mientras que el secado por convección produjo películas con una superficie lisa, homogénea y con cierto grado de transparencia óptica (Figura 3-18B). Las propiedades macroestructurales también se relacionan con la micro y nano estructura presente en las fibras que conforman la celulosa, por lo que es importante también caracterizar este aspecto de las matrices.

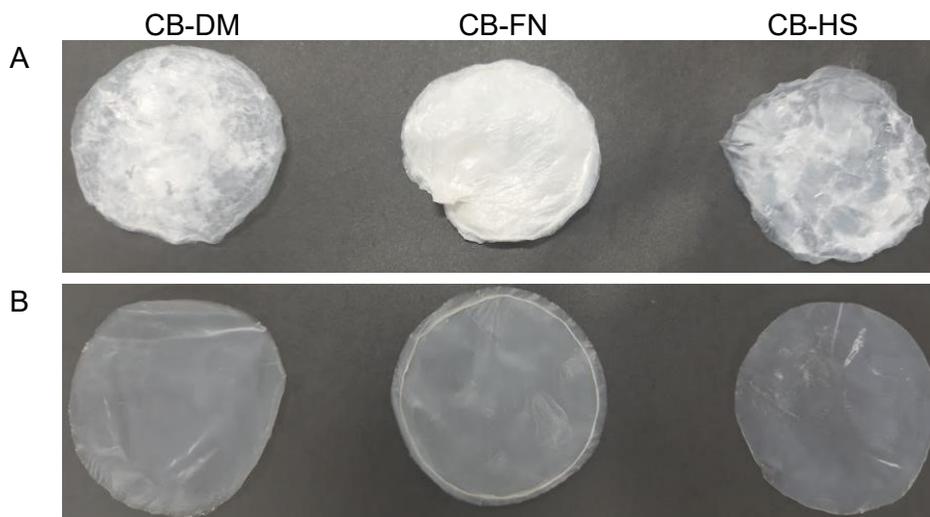


Figura 3-18. Celulosa sometida a secado por A. liofilización y B. convección forzada.

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

La caracterización de la morfología de las fibras de celulosa bacteriana se realizó a través de técnicas como la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), la cual permitió obtener imágenes de las fibrillas individuales que conforman la matriz. La celulosa liofilizada presentó una estructura reticular, sin un orden aparente; también es posible observar que las hebras de celulosa presentaron una superficie lisa y sin alteración morfológica (Figura 3-19). Es común encontrar esta estructura tipo malla cuando se realizan fermentaciones en modo estático, diferente a las obtenidas en procesos agitados donde los hilos del polímero se aglomeran entre sí, perdiendo su estructura fibrilar (Singhsa et al., 2018).

Después de la liofilización, las celulosas producidas en FN (CB-FN) presentaron una formación menos compacta (Figura 3-19C) que las celulosas producidas en los medios DM y HS (CB-DM y CB-HS) (Figura 3-19A y B), lo cual se puede relacionar con que CB-FN se caracterizó por tener un mayor espesor que habría permitido generar un espacio intersticial más amplio entre las fibras. Otro aspecto estructural que diferenció la CB-FN, de la CB-DM y CB-HS fue la distribución promedio del diámetro, donde la primera presentó un promedio de 60-70 nm y las segundas un promedio de 40-50 nm.

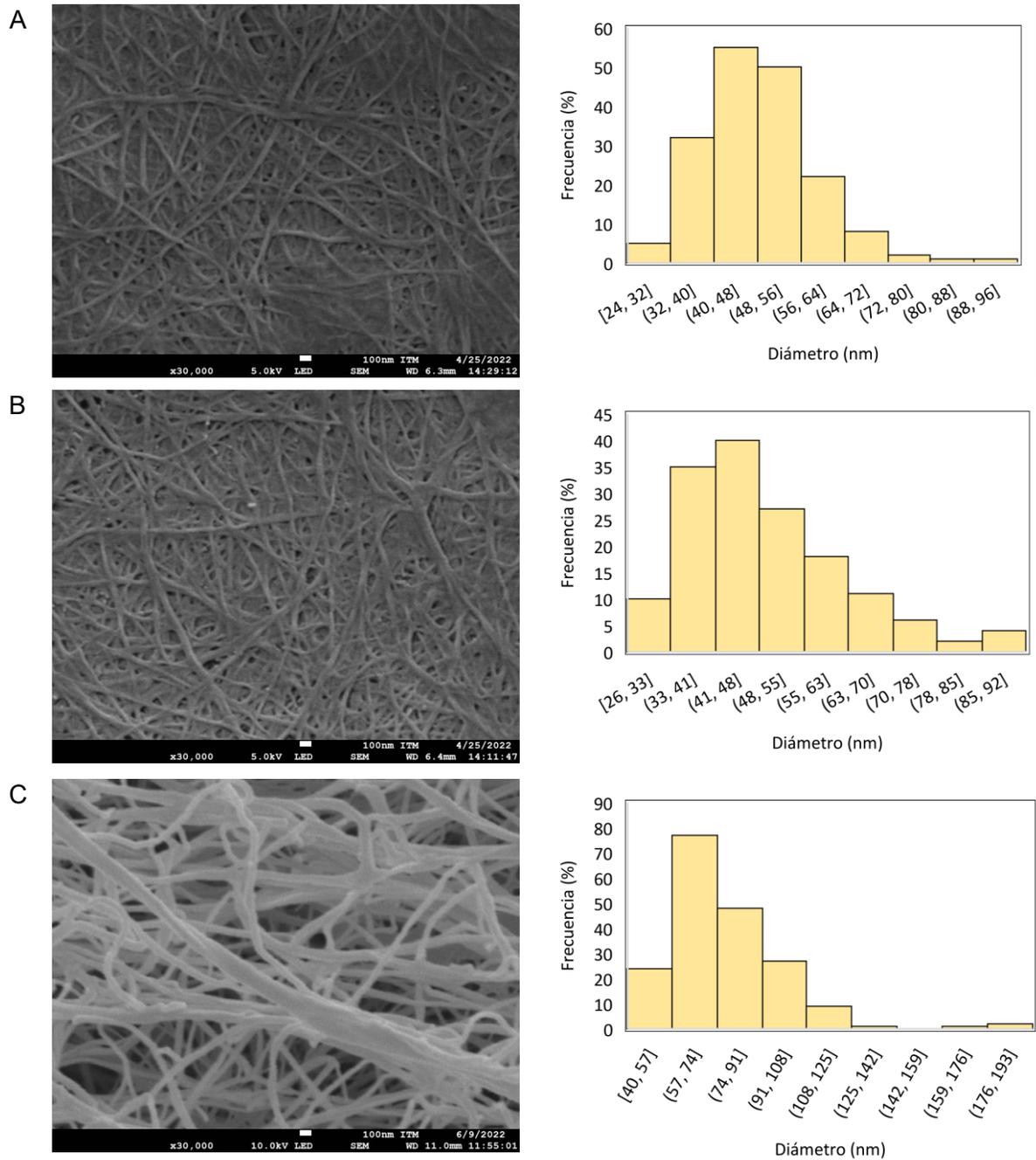


Figura 3-19. Imágenes de CB tomadas con microscopio electrónico a x30000 aumentos y distribución del diámetro de las fibrillas. A. CB-HS, B. CB-DM, C. CB-FN.

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

Las dimensiones de las fibras de celulosa bacteriana suelen ser del orden nanométrico (de 10 a 150 nm) con respecto a las celulosas de origen vegetal; además, su grado de pureza

es alto, ya que no se encuentra aglomerada o compactada con otros compuestos como la lignina y la hemicelulosa (Cazón & Vázquez, 2021; Radotić & Mičić, 2016; Saavedra-Sanabria et al., 2021). La distribución de diámetro de las fibras se puede ver afectada por el tipo de medio y la cepa bacteriana usada en la fermentación, por ejemplo, se han reportado diámetros de 50-60 nm al usar lixiviados de cacao (Saavedra-Sanabria et al., 2021), 3-14 nm usando lixiviados de la industria de azufaifo confitado (Z. Li et al., 2015) y de 40-50 nm usando medios sintéticos con diferentes fuentes de carbono (Volova et al., 2018; S.-S. Wang et al., 2018). De acuerdo con esta información, se evidencia que las dimensiones de la nanoestructura de la CB obtenida en el presente trabajo, se enmarca en los rangos de investigaciones previas.

La estructura de los materiales también se estudia a través de métodos espectrométricos, los cuales dan información sobre la estructura molecular y los diferentes arreglos espaciales que pueden adquirir los átomos que la conforman (Dumitriu, 2005). En el presente estudio, las técnicas implementadas para el análisis de la CB fueron Infrarrojo por Transformada de Fourier (IRTF) y Difracción de Rayos-X (DRX).

La espectrometría en el infrarrojo medio permite detectar los grupos funcionales que conforman la estructura molecular de un compuesto orgánico, la irradiación de luz infrarroja interactúa con los enlaces químicos haciendo que estos vibren o roten, este comportamiento se registra como señales únicas para cada compuesto, generando una huella dactilar que permite identificarlos o detectar variaciones en este (Dumitriu, 2005). Los espectros infrarrojos de las matrices evidenciaron los picos característicos de los grupos funcionales presentes en la celulosa bacteriana (Figura 3-20, Tabla 3-12), gracias al uso de las bases de datos Shimadzu Standard Library Vol. 1shim1404-1 y Shimadzu Standard Library Vol. 2shim2404-1 fue posible corroborar que el producto obtenido es efectivamente celulosa y que pertenece al grupo de celulosas microcristalinas, similar a la celulosa Avicel® (Dumitriu, 2005). A pesar de que estas fueron obtenidas en diferentes medios, los espectros IR para las tres muestras no evidenciaron diferencias notorias. Espectros similares fueron obtenidos por S.-S. Wang et al. (2018) al evaluar la producción de celulosa bacteriana con diferentes fuentes de carbono. Se resalta que, el pico debido al estiramiento del grupo -OH no presenta ensanchamiento como se observa en otros

compuestos orgánicos, esto se debe, posiblemente, a que el fenómeno de hornificación enmascara estos grupos funcionales cuando la estructura colapsa entre sí.

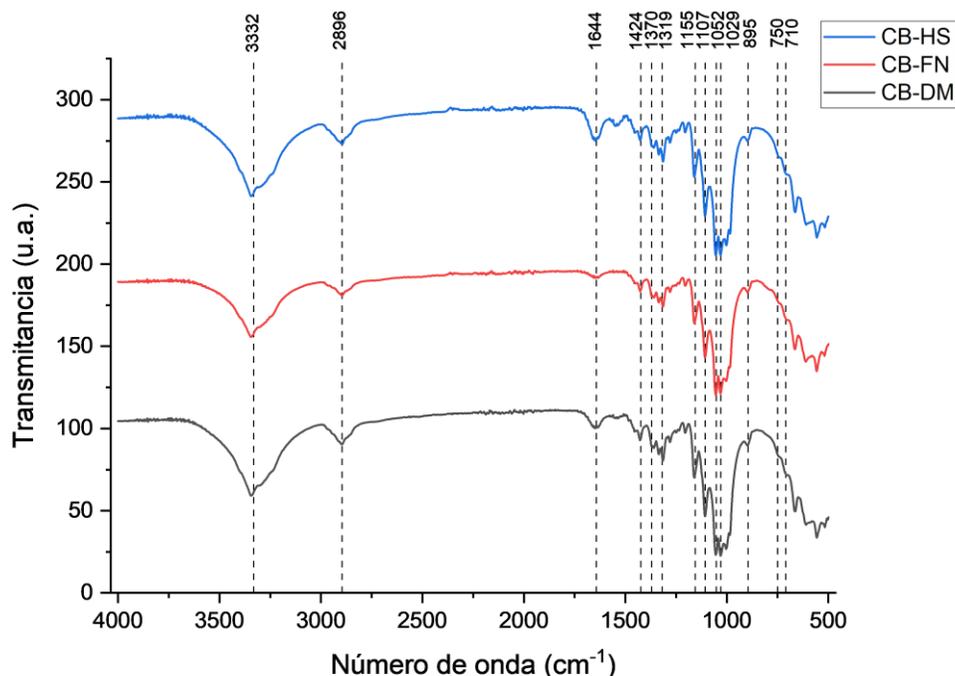


Figura 3-20. Espectro IR de CB obtenida usando mucílago FN y DM, y medio HS.

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

Tabla 3-12. Bandas del espectro infrarrojo correspondientes a la CB

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
710	Contribuciones de la fracción Iβ
750	Contribuciones de la fracción Iα
876-897	Estiramiento C-O-C en el enlace glucosídico β(1→4)
1029-1031	Vibración esquelética del anillo de piranosa C-O-O
1051-1054	Vibración esquelética del anillo de piranosa C-O-O
1107	Estiramiento C-O-C en el enlace glucosídico β(1→4)
1144-1159	Estiramiento C-O-C en el enlace glucosídico β(1→4)
1316-1327	Vibración esquelética C-C y C-O
1370-1374	Doblamiento O-H
1417-1429	Doblamiento CH ₂
1644-1646	Doblamiento OH de agua absorbida
2896-2922	Estiramiento C-H
3323-3332	Estiramiento del grupo OH interactuando con puentes de H

Fuente: Adaptado y modificado a partir de Khenblouche et al. (2019), Andritsou et al. (2018) y Yamamoto, Horii, y Hirai (1996).

La estructura molecular de los polímeros adquiere una configuración tridimensional a medida que estos se van generando, estas pueden adoptar configuraciones amorfas (sin orden aparente) o cristalinas (las cadenas presentan un orden repetitivo en el espacio) (Universitat Politècnica de València, 2011).

La estructura cristalina de la celulosa ha sido ampliamente estudiada, esta se atribuye a un diverso número de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares formados por los grupos OH del polímero, los cuales dan la posibilidad de tener diferentes arreglos cristalinos o alomorfos (Dumitriu, 2005; Kim et al., 2013; Park et al., 2010; Wada et al., 1993; Wohler et al., 2022). Se han identificado cuatro alomorfos (I, II, III y VI) en la celulosa, donde I es la forma más abundante en la naturaleza y es denominada celulosa nativa, los otros alomorfos se generan por el sometimiento de la celulosa a diferentes tratamientos químicos (Dumitriu, 2005). A su vez, el alomorfo I está conformado por dos formas cristalinas, I α y I β , que se diferencian en la estructura de su celda unitaria (I α : triclínica; I β : monoclínica) (Dumitriu, 2005; Wada et al., 1993).

El estudio de estas formas cristalinas se hace de manera precisa a través de técnicas robustas como la resonancia magnética nuclear, sin embargo, se ha demostrado que por medio de IRFT también es posible cuantificar la fracción I α presente en celulosa (S.-S. Wang et al., 2018; Yamamoto et al., 1996). Por medio de la deconvolución del espectro IR se obtuvo el área correspondiente a los picos 750 y 710 cm⁻¹ (Figura 3-21), que fueron utilizadas en la ecuación 2-1 para estimar la fracción I α (f α) de las celulosas obtenidas (Tabla 3-13).

Anteriormente se ha reportado que la celulosa de origen bacteriano presenta una mayor proporción de I α , con respecto a la proveniente de plantas (Dumitriu, 2005; Kim et al., 2013). Contrario a lo que se reporta en la literatura, las muestras de celulosa bacteriana evaluadas presentaron una fracción I α menor a 0.40, siendo CB-FN la que presentó el menor valor (0.24) (Tabla 3-13). La forma I α es termodinámicamente menos estable que I β , y puede permutarse en esta por medio de tratamientos térmicos y alcalinos (Wada et al., 1993), ya que las matrices fueron purificadas con agua desionizada y álcali a una

temperatura elevada se facilitaron las condiciones para que esta fracción disminuyera y predominara la $I\beta$.

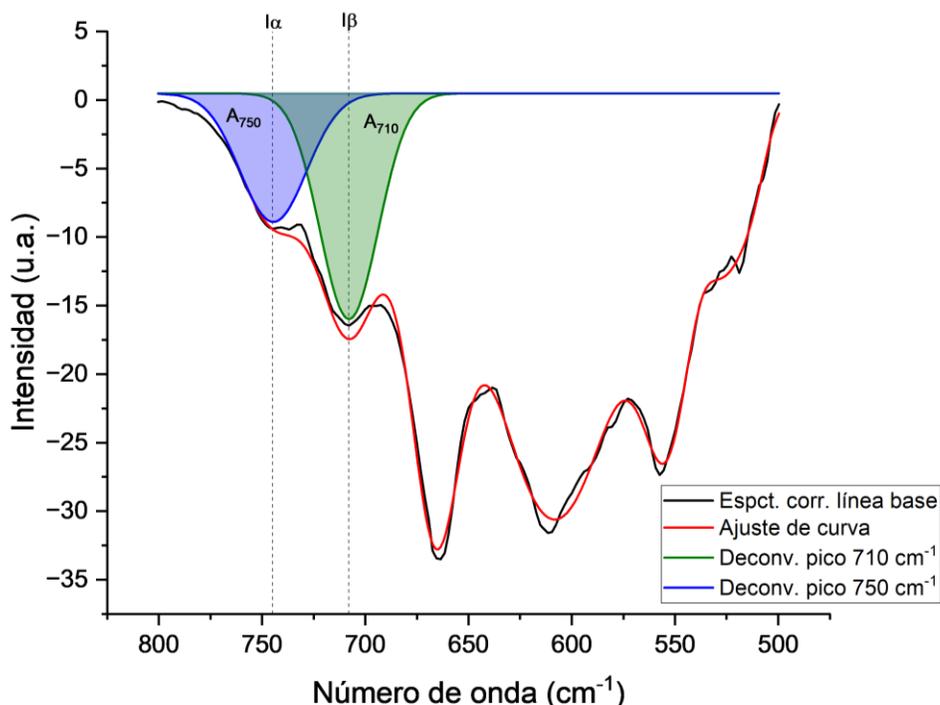


Figura 3-21. Deconvolución de los picos correspondientes a las fracciones $I\alpha$ y $I\beta$ en el espectro IR.

Otra técnica que permite un mejor entendimiento del arreglo estructural de los polímeros es la DRX, cuyo espectro permite examinar los planos cristalinos presentes en la celulosa y contabilizar el porcentaje de las regiones cristalinas y amorfas usando del índice de cristalinidad (IC) (Park et al., 2010; Segal et al., 1959). Los difractogramas obtenidos presentaron tres picos característicos de la celulosa bacteriana, la intensidad de estos picos fue mucho mayor en CB-FN, seguida por CB-DM y CB-HS (Figura 3-22). Cada pico representa uno de los planos cristalinos que conforma el alomorfo I de la celulosa bacteriana, estos fueron asignados con los índices de Miller característicos de la fracción $I\beta$ (1-10), (110) y (200); de haber sido mayoritaria la fracción $I\alpha$ hallada por la metodología IRTF, estos se habrían designado como (100), (010) y (110) (C. M. Lee et al., 2015; Wada et al., 1993).

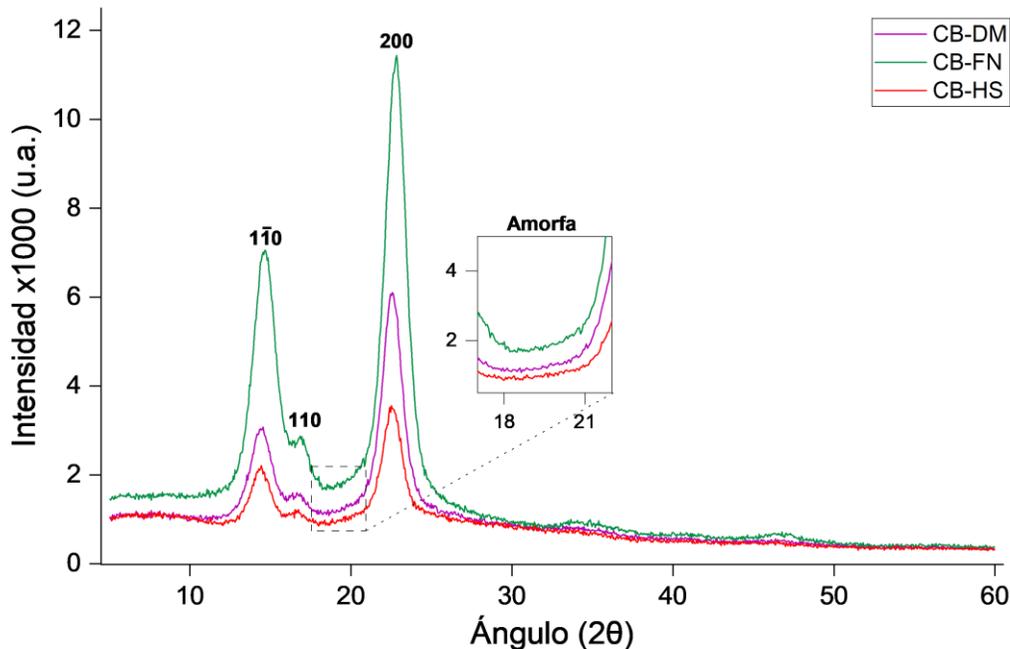


Figura 3-22. Diffractograma de rayos-x de CB obtenida en diferentes medios de cultivo. CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

A partir de la información otorgada por los difractogramas se calculó el IC de las celulosas por medio de dos métodos, la ecuación 2-2 (Segal et al., 1959) y la deconvolución del área cristalina y su relación con el área total del espectro (ecuación 2-3) (Park et al., 2010). Los valores de IC generados con el método de deconvolución suelen ser menores al del método de Segal (Park et al., 2010), sin embargo, los resultados con ambos métodos demostraron que tanto CB-FN como CB-DM presentaron un mayor IC que CB-HS (Tabla 3-13).

Tabla 3-13. Fracción I α ($f\alpha$) de alomorfo I e índice de cristalinidad (IC) de CB

Medio	$f\alpha$ (IRTF)	IC (DRX)	
		Segal et al. (1959)	Deconvolución Park et al. (2010)
CB-DM	0.37	82.21	75.99
CB-FN	0.24	85.47	77.52
CB-HS	0.38	75.92	68.30

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

El IC de la celulosa bacteriana se puede ver afectado por diferentes factores asociados a la producción y el secado. Zeng et al. (2011) reportó que este se puede disminuir por la presencia de iones Na^+ y buffer citrato en el medio, además verificó que la mejor fuente de carbono para la producción, y a su vez la que propiciaba mayores IC, era la fructosa; hecho que también se ha evidenciado en otras investigaciones (S.-S. Wang et al., 2018). Estos reportes son acordes con la presente investigación, ya que los medios FN y DM presentaron un contenido notorio de fructosa lo que habría propiciado los altos valores de IC, a diferencia de HS. Con respecto al procesamiento postproducción de la celulosa, Zhang et al. (2011) evidenció que el IC también se puede ver afectado por el método de secado utilizado, reportando que el secado por convección forzada genera matrices con mayor IC que las sometidas a horno de vacío y liofilización.

El IC de Segal et al. (1959) obtenido para las CB del presente estudio concuerda con otros valores reportados en la literatura para CB obtenidas a partir de medios alternativos como residuos de piña combinados con panela (85%) (Algar et al., 2015), mucílago DM combinado con medio HS (85%) (Flórez García, 2015), aguas residuales de confitería de azufaifo (86%) (Z. Li et al., 2015), exudado de cacao (86.5%) (Saavedra-Sanabria et al., 2021) y residuos de cáscaras de frutas cítricas (86.7%) (Andritsou et al., 2018). Se destaca principalmente que la CB posee una cristalinidad mucho mayor a la proveniente de plantas, que se estima entre 40 y 60% (Cazón & Vázquez, 2021). El grado de cristalinidad presente en la estructura celulósica puede influenciar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas, lo que representa una importante característica para sus futuras aplicaciones (Meza-Contreras et al., 2018).

3.7.2 Propiedades mecánicas y térmicas

En el diseño y estudio de materiales, el entendimiento de sus propiedades permite proyectar las diferentes aplicaciones en las que este puede ser utilizado. Esto implica determinar cómo reaccionaría al ser sometido a diferentes esfuerzos o su estabilidad cuando es expuesto a cambios de temperatura, es por ello que diversos polímeros se someten a ensayos de tracción o análisis térmicos (Davis, 2004; Poletto et al., 2013).

3.7.2.1 Ensayo de tracción

Las pruebas mecánicas generalmente se usan para seleccionar materiales en aplicaciones ingenieriles o para determinar si un material cumple con las especificaciones de calidad deseadas; estas pruebas también pueden ser usadas para comparar el desempeño de nuevos materiales con los actuales en el mercado (Davis, 2004). Una de las pruebas más representativas es el ensayo de tracción uniaxial que consiste en suspender probetas, elaboradas a partir del material de interés, entre dos pinzas de agarre y aplicar una fuerza en dirección contraria hasta que estas alcancen su punto de quiebre, esta prueba se realiza con un dispositivo llamado máquina universal y los resultados que se obtienen indican la resistencia que presenta el material cuando es sometido a estas fuerzas uniaxiales (Davis, 2004).

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de tracción evidenciaron que la CB-DM presentó una resistencia mayor a CB-FN, sin embargo, no presentaron diferencias significativas según la prueba de Tukey tanto en el porcentaje de elongación como en el módulo de elasticidad (Tabla 3-14). Aunque la máxima fuerza la presentó CB-FN, el área transversal de las matrices generadas por fermentación fue diferente, por lo que es más objetivo comparar estas dos muestras por medio de la resistencia (Davis, 2004). Las nanofibras de celulosa han sido catalogadas como materiales con propiedades mecánicas promisorias, la distribución del diámetro de fibra de CB-DM presentó valores menores a CB-FN, factor al que se le podría atribuir la diferencia en el esfuerzo de ambas películas.

En la Figura 3-23 se presenta el perfil de las curvas de esfuerzo vs deformación de las muestras de celulosa evaluadas, esta demuestra que no existió encuellamiento de las probetas utilizadas antes del punto de quiebre; este resultado, junto con el porcentaje de elongación, indica que las películas obtenidas no son materiales dúctiles y presentan una menor flexibilidad (Davis, 2004). De hecho, se ha reportado que la flexibilidad de los materiales celulósicos es inversamente proporcional a su cristalinidad (Meza-Contreras et al., 2018; Yamanaka et al., 1989), por lo que es coherente que las matrices obtenidas en este estudio sean poco flexibles, ya que su IC fue elevado. Por otro lado, también se ha evidenciado que la alta cristalinidad de las nanofibras de celulosa tiene un efecto positivo en su módulo de elasticidad, siendo mayor que el de algunas fibras sintéticas como el poliparafenileno tereftalamida y la fibra de vidrio (Yao et al., 2017).

Tabla 3-14. Propiedades mecánicas de celulosa bacteriana obtenida a partir de FN y DM.

Parámetros	CB-DM	CB-FN
Dimensiones		
Área transversal (mm ²)	0.14 ± 0.04 b	0.51 ± 0.06 a
Propiedad mecánica		
Max. Fuerza (N)	72.72 ± 8.53 b	123.41 ± 15.07 a
Esfuerzo (MPa)	514.82 ± 60.41 a	246.21 ± 30.07 b
Elongación (%)	3.86 ± 1.27 a	3.32 ± 0.40 a
Mod. De Elasticidad (GPa)	17.37 ± 2.98 a	13.46 ± 2.13 a

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural.

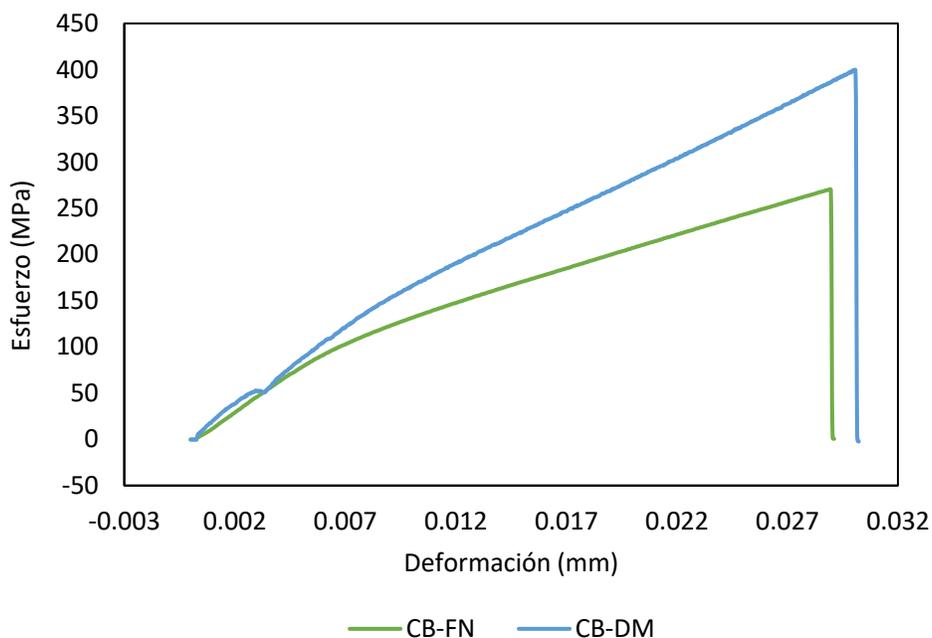


Figura 3-23. Gráfico Esfuerzo vs Deformación de matrices de celulosa obtenidas en medio FN y DM.

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural.

El módulo de elasticidad de las películas de celulosa obtenidas en el presente trabajo fue muy similar a los reportados por Nishi et al. (1990) y Yamanaka et al. (1989), cuyas láminas de celulosa bacteriana presentaron un módulo de Young >15 GPa. De acuerdo con lo planteado por estos autores, esta propiedad, más la baja densidad que presentan las

películas de CB, las hace un material idóneo para la elaboración de diafragmas acústicos con respecto a otros polímeros sintéticos.

Otras aplicaciones que se han proyectado para la CB es su uso en la elaboración de empaques para alimentos, ya que posee mejores propiedades mecánicas (esfuerzo y módulo) en comparación con los polímeros sintéticos no biodegradables usados actualmente, sin embargo, la baja flexibilidad que la CB presenta a limitado su aplicación en esta área (Cazón & Vázquez, 2021). Diferentes investigaciones han buscado realizar modificaciones *in situ* (durante la fermentación) o *ex situ* (después de la fermentación) de la CB para mejorar sus propiedades, algunas se realizan mezclando el medio de cultivo o la celulosa obtenida con glicerol, alcohol polivinílico, proteína de soya, entre otros compuestos que mejoren su flexibilidad (Cazón & Vázquez, 2021).

3.7.2.2 Análisis térmico simultaneo (ATS)

El ATS consiste en la realización de termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (CDB) sobre una muestra de estudio simultáneamente, lo que permite una mejor correlación de los cambios másicos con los cambios energéticos de la muestra debido a los cambios en la temperatura (ebatco, s. f.). La TGA permite estudiar los cambios químicos y físicos de la materia a media que esta se somete a un incremento en la temperatura. Entre los fenómenos físicos se encuentra la vaporización, sublimación, absorción y desorción; los fenómenos químicos se clasifican en quimisorción, deshidratación, descomposición/degradación y reacciones sólido-gas (Pa'e et al., 2018). La CDB brinda información sobre el flujo de calor necesario para incrementar la temperatura de la muestra y las diferentes transiciones que ocurren en el material debido a estos incrementos térmicos, de los cuales se pueden registrar fenómenos exotérmicos y endotérmicos, además de energía de fusión, temperatura de transición vítrea, cristalización y calor específico (Pa'e et al., 2018).

Los resultados del TGA revelaron que las muestras de celulosa evaluadas presentaron degradación en un solo paso, rasgo característico de este polímero, y no hubo pérdida de agua en las primeras etapas del calentamiento, lo que indica que la muestra no tenía agua adsorbida en su superficie (Figura 3-24) (Oliveira et al., 2015); otros aspecto importante de esta degradación es que el polímero no se encuentra contaminado con trazas de medio

de cultivo u otros contaminantes orgánicos, puesto que se habrían observado varios pasos de degradación en la curva de TGA (Pa'e et al., 2018). Las muestras CB-DM y CB-FN demostraron tener una mayor estabilidad térmica que la CB-HS, ya que presentaron mayores temperaturas de inicio y de degradación (Tabla 3-15). Sin embargo, la CB-HS finalizó el periodo de pirólisis con un porcentaje de residuo mayor, lo que podría indicar minerales residuales que no se removieron durante el proceso de lavado o un mejor entrecruzamiento de las fibras de celulosa lo que evitó una mayor degradación del polímero.

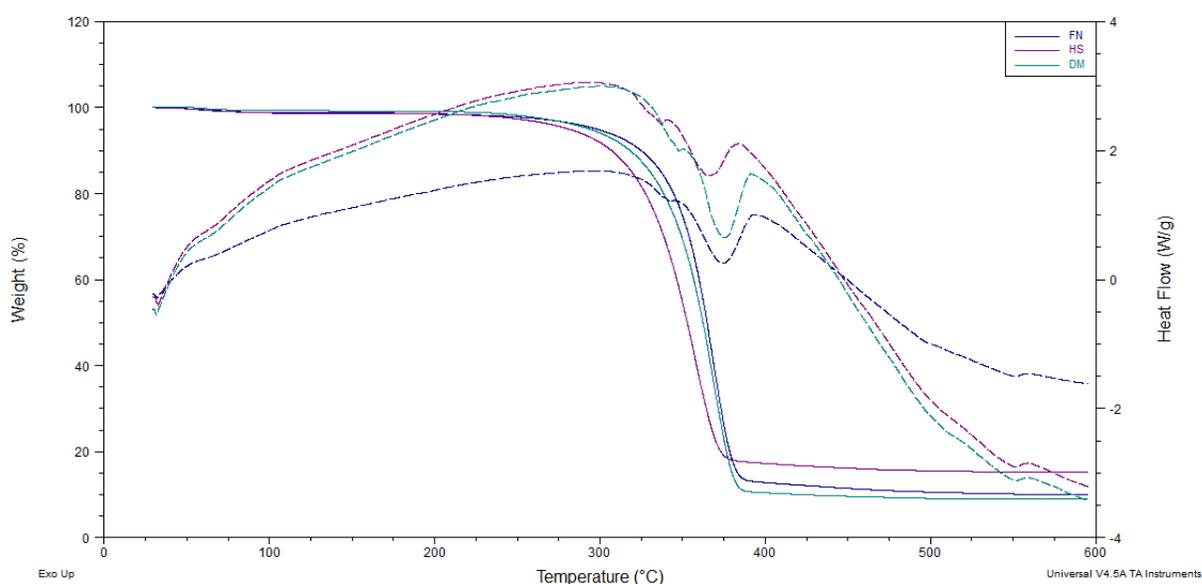


Figura 3-24. TGA: Perfil de pérdida de peso (línea sólida); CDB: flujo de calor (línea punteada).

DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, HS: Celulosa de Medio HS.

Con respecto a los datos arrojados por la CDB, las tres muestras evaluadas presentaron un aumento en el flujo de calor a medida que se incrementaba la temperatura, hasta llegar a dos sucesos endotérmicos (Figura 3-24). El primer suceso endotérmico estuvo aproximadamente 10 °C por encima de la temperatura *onset* de cada muestra y presentó una entalpía de 4 - 9 J/g; el segundo suceso endotérmico está relacionado con la energía de degradación del polímero, comportamiento normal de este polímero cuando se somete a este tipo de procesos térmicos (ebatco, s. f.; Udoetok et al., 2018), la cual fue mayor para CB-DM, seguido por CB-FN y CB-HS (Tabla 3-15).

Se ha reportado que CB con alta cristalinidad presenta mayor estabilidad térmica (Meza-Contreras et al., 2018; Poletto et al., 2013), lo que pudo influir en que la CB-HS se degradara a menor temperatura, ya que su IC fue menor al de CB-DM y CB-FN. Se pudo observar que el perfil flujo de calor para CB-DM y CB-HS fue similar, lo que se pudo deber a que la distribución de diámetro de sus fibrillas elementales presentó dimensiones similares.

Tabla 3-15. Parámetros obtenidos del Análisis Térmico Simultáneo para celulosa obtenida a partir de DM, FN y HS.

Parámetro	CB-DM	CB-FN	CB-HS
Análisis Termogravimétrico			
Pérdida de masa total (%)	91.30	90.18	85.02
Temperatura de inicio (°C)	327.00	333.59	307.22
Temp. Máx. de degradación (°C)	368.65	368.57	357.70
Residuo (%)	8.70	9.82	14.98
Calorimetría Diferencial de Barrido			
Temperatura de fusión 1 (°C)	347.70	342.42	336.76
Entalpia 1 (J/g)	8.84	4.14	8.87
Temperatura de fusión 2 (°C)	374.89	373.81	364.93
Entalpia 2 (J/g)	128.9	112.9	83.48

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

La estabilidad térmica de la celulosa de origen vegetal y bacteriano suele estar en el rango de 300 a 400 °C, sin embargo, en el caso de la CB se ha notado que ciertos medios sí pueden influir en la temperatura máxima de degradación (Saavedra-Sanabria et al., 2021; Vazquez et al., 2013; Ye et al., 2019). Los medios alternativos utilizados en la presente investigación no sólo demostraron potencializar el rendimiento de producto con la cepa evaluada, sino que también contribuyeron a la generación de matrices con propiedades superiores a las obtenidas con el medio sintético HS.

3.7.3 Celulosa hidratada (*Never-dried cellulose*)

Las matrices de celulosa bacterianas se producen como biopolímeros hidratados o *never-dried*, como se denomina en inglés, ya que las fibrillas de celulosa entrapan el agua del

medio de cultivo a medida que se van sintetizando lo que les da una apariencia voluminosa y gelatinosa (Kadier et al., 2021) (Figura 3-25).

El agua incluida se puede caracterizar por medio de la capacidad de retención de agua, propiedad de importancia en diversos tipos de aplicaciones como la industria alimentaria, la medicina y el estudio de suelos en agricultura (Azeredo et al., 2019; Blanco Parte et al., 2020; Mohite & Patil, 2014). Esta propiedad está relacionada con la capacidad que tiene cierta matriz para retener el agua que naturalmente se encuentra en ella o agua que ha sido añadida para ser absorbida (Haque et al., 2016; Sudha, 2011).

La capacidad de la retención de agua ha sido un parámetro importante en la caracterización de celulosa bacteriana, lo que ha llevado a la estandarización de metodologías para su medición (Schrecker & Gostomski, 2005). En el caso de las matrices de celulosa producidas, CB-FN evidenció mayor capacidad de retención de agua, seguido por CB-DM y CB-HS (Tabla 3-16).



Figura 3-25. Celulosa nunca seca (*Never dried cellulose*) producida a partir de mucílago de Fermentación Natural

Tabla 3-16. Capacidad de retención de agua para celulosa obtenida a partir de medios FN, DM y HS.

Medio	CB-DM	CB-FN	CB-HS
CRA (g_{Agua}/g_{cel seca})	122.90±6.31 b	152.70±5.23 a	111.96±2.03 c

CB-DM: Celulosa de Mucílago Desmucilaginado Mecánico, CB-FN: Celulosa de Mucílago Fermentación Natural, CB-HS: Celulosa de Medio HS.

La CB-FN presentó un mayor espesor con respecto las otras matrices (Figura 3-4B) y la mayoría de sus fibrillas elementales tuvieron un diámetro mayor a las de CB-DM y CB-HS (Figura 3-19), factores que pudieron influir en su alta CRA. Las matrices obtenidas en la presente investigación demostraron tener un CRA superior a las obtenidas por UI-Islam et al. (2012) para el desarrollo de apósitos, lo que demuestra el potencial de CB-FN y CB-DM para desarrollar productos en el área de la medicina.

4 Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los residuos provenientes del sector agrícola cuentan con una composición ideal que los convierte en materias primas adecuadas para el desarrollo de nuevos productos y procesos productivos. El mucílago proveniente de la industria cafetera colombiana cuenta con fuentes de carbono que pueden ser aprovechadas por organismos productores de metabolitos de interés.

La celulosa de origen bacteriano es un metabolito con alto valor agregado, tanto a nivel investigativo como industrial, ya que presenta propiedades versátiles que le permiten ser utilizada en diferentes áreas de aplicación. Las bacterias pertenecientes al género *Komagataeibacter* son los microorganismos más representativos en la producción de este exo-polímero, las cuales han sido aisladas de bebidas fermentadas, frutas o matrices azucaradas, por lo que presentan unas condiciones de cultivo demandantes.

Las técnicas de aislamiento en las que se trabaja con medios enriquecidos para simular el hábitat natural de los microorganismos demostraron ser métodos útiles para la obtención de este tipo de bacterias. El complemento de medios microbiológicos con etanol y ácido acético y altas concentraciones de glucosa (2% p/v ó 20 g/L) permitió la obtención de los cinco aislados (CB1, CB2, CB3, CB4 y CB5) con capacidad de producir celulosa bacteriana.

Estas cepas productoras requieren altas concentraciones de fuentes de carbono para su desarrollo y consecución del metabolito deseado, por lo que las muestras de mucílago evaluadas en la presente investigación demostraron tener una composición ideal para ser usado como medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana.

Las muestras de mucílago de café utilizadas presentaron diversos constituyentes que los hace ideales para su como medio de cultivo en procesos fermentativos ideales. El mucílago FN presentó una mayor concentración de azúcares reductores (74.30 ± 1.94 g/L) y nitrógeno ($1.27 \pm 0.07\%$ bs) con respecto a DM (azúcares reductores: 31.71 ± 0.71 g/L; nitrógeno: $0.88 \pm 0.05\%$ bs). De igual manera, los compuestos identificados por HPLC (glucosa, fructosa, celobiosa, levoglucosano, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido láctico, ácido fórmico y ácido acético) se presentaron en una mayor proporción en el mucílago FN que en el DM. En lo que respecta a la caracterización elemental, ambos mucílagos presentaron cantidades similares de los minerales K, Ca, Mg, P, Fe, Si, Al y Mn, siendo los cuatro primeros los que exhibieron una mayor concentración (50 – 1500 mg/L). La diferencia en las concentraciones de estos constituyentes influyó en los resultados obtenidos de la Demanda Química de Oxígeno, la cual fue mayor en el mucílago FN (105075.0 ± 675.0 mg O₂/L) que en DM (44743.8 ± 1906.3 mg O₂/L).

Factores como la variedad de café beneficiada, el lugar de recolección, las variaciones en las metodologías usadas por el caficultor en el proceso de beneficio y los procesos de recolección y procesamiento del residuo influyen en las características finales del mucílago. Los mucílagos obtenidos en el presente trabajo difirieron en composición química con respecto a los reportados en otros estudios; no obstante, el uso de estos como medio de cultivo en la fermentación con las cinco cepas aisladas resultó en altos rendimientos de celulosa bacteriana con respecto al medio HS.

La cepa con mejor capacidad productora, clasificada taxonómicamente en la especie *Komagataeibacter intermedius*, obtuvo el mayor rendimiento de celulosa con FN (4.20 ± 0.01 g/L), seguido por DM (1.69 ± 0.04 g/L) y el medio HS (0.77 ± 0.01 g/L) después de 10 días de fermentación. La diferencia entre los rendimientos se dio principalmente por la alta concentración de las fuentes de carbono y las otras sustancias presentes en los mucílagos, los cuales fueron consumidos por la cepa de *Ko. intermedius* para la generación de celulosa bacteriana, crecimiento y mantenimiento celular, lo que puso en desventaja al medio sintético HS, cuya única fuente de carbono (glucosa) no permitió generar altos rendimientos.

De igual manera, el microorganismo *Ko. intermedius* presentó una alta adaptabilidad y afinidad por medios como el mucílago que poseen cargas orgánicas elevadas, lo que propició el consumo de las fuentes de carbono y la reducción de la Demanda Química de Oxígeno del mucílago FN y DM en un 16.96% y 10.69%, respectivamente, durante la fermentación.

El desempeño de la bacteria *Ko. intermedius* mejoró al evaluar su producción bajo otros parámetros operacionales, siendo 35 °C la temperatura en la que presentó la mejor producción, con la cual se obtuvo un rendimiento de 1.694 ± 0.005 g/L usando mucílago DM en 4 d de fermentación, reduciendo el tiempo de producción a la mitad con respecto a las condiciones 30 °C y 10 d. Similarmente, se corroboró que el sistema aireado manufacturado en la presente investigación propició un mejor consumo de las fuentes de carbono presentes en el medio, generando una producción 22% mayor que el de la fermentación sin inyección de aire. De esta manera se evidenció que la temperatura y la inyección de aire son variables que afectan la producción de celulosa usando esta cepa.

Las matrices producidas a partir de mucílago DM y FN presentaron un diámetro de fibras elementales de orden nanométrico (40 – 80 nm) y una estructura tridimensional con predominancia cristalina (IC_{Segal} : 80 – 90%), lo que se relaciona con un desempeño superior en pruebas mecánicas y estabilidad térmica, presentado un módulo elástico entre 13 y 18 GPa y una máxima temperatura de degradación >350 °C, además las matrices hidratadas presentaron una alta capacidad de retención de agua (120 – 150 g; propiedades que las posicionan como un polímero de interés para su aplicación en el desarrollo de paquetes para alimentos, diafragmas acústicos o apósitos médicos.

Se hace promisorio continuar investigando en la producción de celulosa bacteriana a partir de residuos agrícolas y su aplicación en nichos de mercado colombiano para crear una demanda de producto en el país.

4.2 Recomendaciones

- Incluir la cepa aislada en una colección de microorganismos certificada para preservar sus características genéticas en condiciones estandarizadas y controladas.

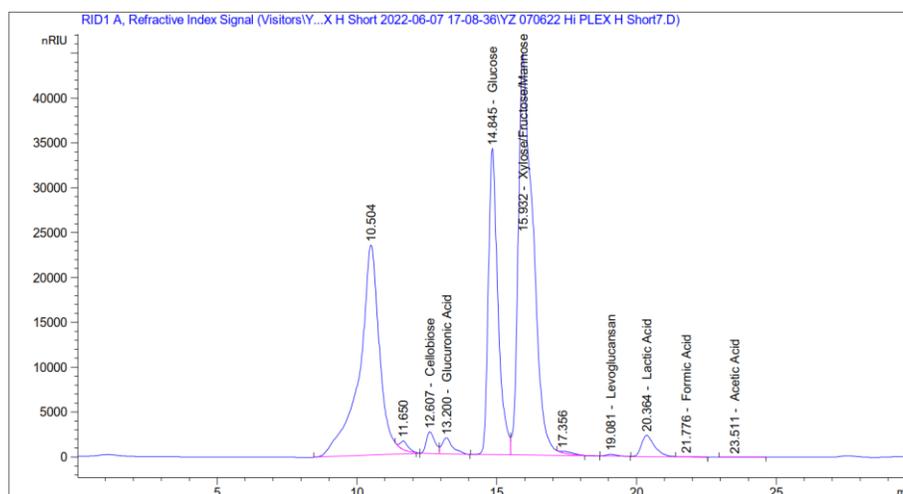
- Incluir un agente fungicida, como la cicloheximida, en la preparación de agar HS, ya que su alta concentración de azúcares lo hace un medio susceptible a la contaminación por mohos oportunistas.
- Utilizar técnicas más robustas como HPLC acoplado a Espectroscopía de Masas para realizar una identificación completa de los compuestos presentes en el mucílago de café.
- Estudiar las 5 bacterias aisladas bajo otros modos de operación.
- Estandarizar los procesos de obtención de mucílago DM y FN con respecto al lugar de recolección y la variedad de café beneficiada, además de seguir lo establecido por la Federación Nacional de Cafeteros para la estandarización de la relación de agua-café en la fermentación natural y la calibración de agua en la máquina despulpadora.
- Evaluar el comportamiento cinético del aislado CB5 en un periodo de fermentación de 16 días con mucílago FN, evaluando la producción cada 24 h, para detectar un posible tiempo de máxima producción, como el detectado para el mucílago DM y medio HS.
- Se recomienda realizar un diseño experimental más robusto como el Plackett-Burman con el que se pueda determinar qué variables influyen en el proceso de producción de CB, como pH inicial, relación área superficial-volumen, agitación, aireación, entre otras.
- Posterior a la identificación de las variables más influyentes del proceso se puede realizar un diseño de superficie de respuesta para encontrar el óptimo de producción.
- Incorporar sistemas de medición de pH y oxígeno disuelto al sistema de aireación construido en el presente trabajo.
- Evaluar la estabilidad térmica de las matrices de celulosa por medio de un Análisis Térmico Simultáneo combinando la pirolisis con una atmósfera de N₂ y O₂.
- Complementar la caracterización de las matrices de celulosa bacteriana hidratadas por medio de técnicas reométricas como las curvas de frecuencia para determinar su grado de viscoelasticidad. De igual forma realizar una caracterización viscométrica para definir el grado de polimerización de las matrices obtenidas.

A. Anexo A: Cromatogramas del mucílago de café

Las técnicas de cromatografía permiten separar, identificar y cuantificar diferentes compuestos en una muestra problema. Las muestras complejas como los residuos agrícolas tienen un sin número de compuestos que no es posible identificar con una única técnica. En el caso del mucílago de café fue posible determinar una gran variedad de azúcares y ácidos gracias a los reactivos estándares disponibles en la Universidad de York.

Sin embargo, se pudo observar picos presentes en los cromatogramas de mucílago DM y FN en el tiempo 0 de la fermentación para los cuales no se contaba con un estándar y no se pudieron identificar, como los picos obtenidos a los tiempos de retención 10.504, 10.673, 11.650 y 17.356 min.

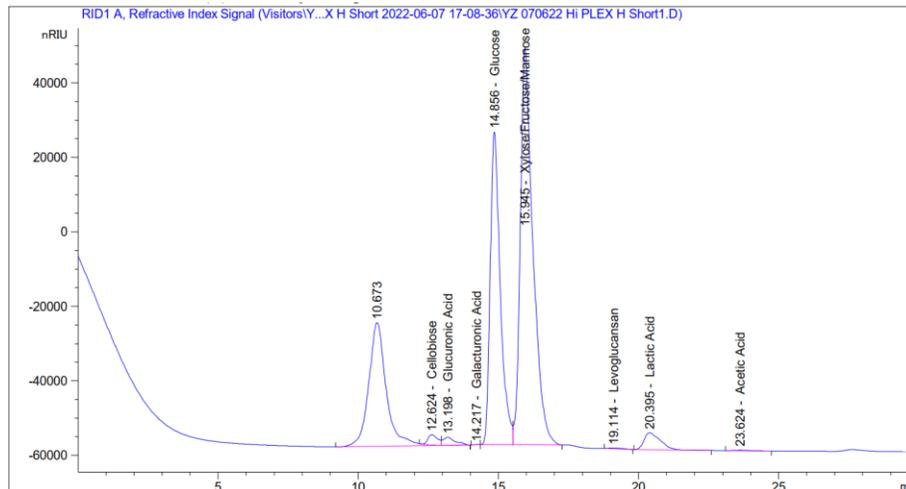
Cromatograma para el mucílago DM en el tiempo 0 de la fermentación



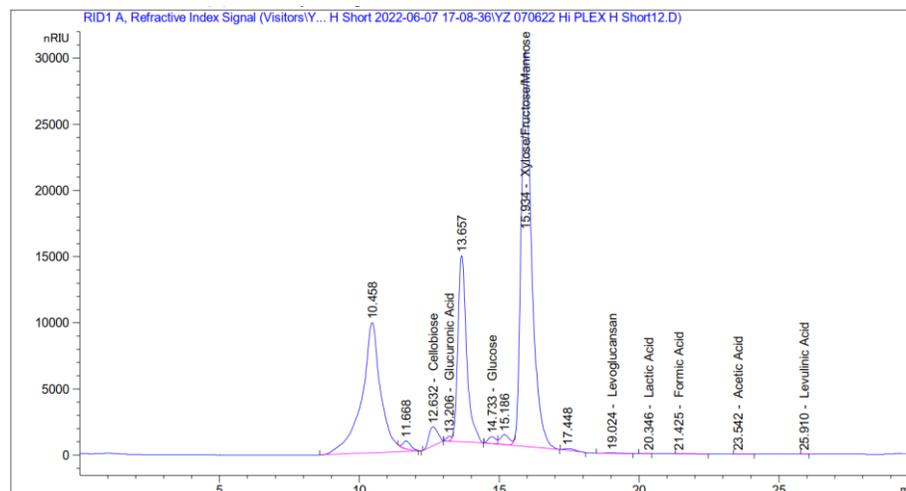
Con respecto a los picos que no se pudieron identificar, los que salen en los primeros tiempos se puede suponer que son oligosacáridos o disacáridos que por su alto peso

molecular eluyen primero. Los picos no identificables en tiempo posteriores se pueden deber a ácidos orgánicos.

Cromatograma para el mucílago FN en el tiempo 0 de la fermentación

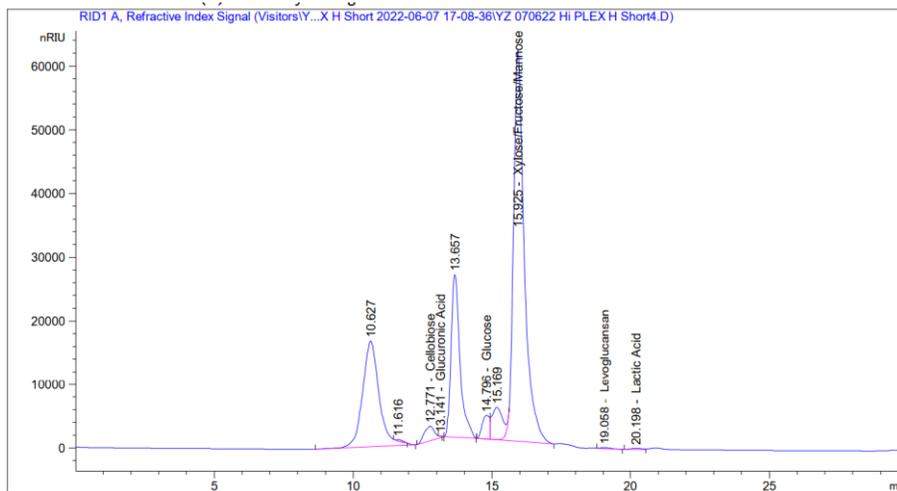


Cromatograma para el mucílago DM en el tiempo 10 de la fermentación



De igual forma se puede observar la aparición de picos no identificables en el tiempo 10 de la fermentación para ambas muestras de mucílago en el tiempo de retención 11.668, 13.657 y 15.169 min, los cuáles pueden pertenecer a ácidos generados en la fermentación, lo que explicaría la disminución en el pH.

Cromatograma para el mucílago FN en el tiempo 10 de la fermentación



B. Anexo B: Registro fotográfico de la caracterización bioquímica de CB5.

En este anexo se ejemplifican los cambios de coloración efectuados en los medios utilizados para el desarrollo de las pruebas bioquímicas.

Producción de ácidos a partir de diferentes sustratos



Control

Glucosa (+)

Galactosa (D)

Etanol (+)

Sacarosa (-)

+: Positivo; -: Negativo; D: Débil

DHA a partir de Glicerol



Catalasa (+)



Oxidación del etanol a CO₂



Control



**Respuesta
(-)**

Oxidación de acetato



Control



Respuesta (+)

Bibliografía

- Abidi, W., Torres-Sánchez, L., Siroy, A., & Krasteva, P. V. (2022). Weaving of bacterial cellulose by the Bcs secretion systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab051>
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Algar, I., Fernandes, S. C. M., Mondragon, G., Castro, C., Garcia-Astrain, C., Gabilondo, N., Retegi, A., & Eceiza, A. (2015). Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(1). <https://doi.org/10.1002/app.41237>
- Almeida, D. M., Prestes, R. A., Fonseca, A. F. da, Woiciechowski, A. L., & Wosiacki, G. (2013). Minerals consumption by *Acetobacter xylinum* on cultivation medium on coconut water. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 197-206. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000012>
- Alves, R. C., Rodrigues, F., Antónia Nunes, M., Vinha, A. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2017). State of the art in coffee processing by-products. In *Handbook of Coffee Processing By-Products* (pp. 1-26). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811290-8.00001-3>
- Amarasekara, A. S., Wang, D., & Grady, T. L. (2020). A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences*, 2(2), 240. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>
- Andrés-Barrao, C., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Descombes, P., Ortega Pérez, R., & Barja, F. (2011). Genome Sequences of the High-Acetic Acid-Resistant Bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890 T and *G. europaeus* LMG 18494 (Reference Strains), *G. europaeus* 5P3, and *Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (Isolated from Vinegar). *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2670-2671. <https://doi.org/10.1128/JB.00229-11>
- Andritsou, V., de Melo, E. M., Tsouko, E., Ladakis, D., Maragkoudaki, S., Koutinas, A. A., & Matharu, A. S. (2018). Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. *ACS Omega*, 3(8), 10365-10373. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01315>

- Anton-Sales, I., Beekmann, U., Laromaine, A., Roig, A., & Kralisch, D. (2019). Opportunities of Bacterial Cellulose to Treat Epithelial Tissues. *Current Drug Targets*, 20(8), 808-822. <https://doi.org/10.2174/1389450120666181129092144>
- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC.
- Asendorf, S. (2016). U. S. EPA Method 200.7 - Wastewater Analysis for Trace Metals Using an Auto-Dilution System Coupled to the Thermo Scientific iCAP 7000 Plus Series ICP-OES. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCMD%2FAApplication-Notes%2FAN-43376-ICP-OES-Trace-Metals-Wastewater-AN43376-EN.pdf>
- ASTM. (2022). Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics (ASTM D638). ASTM. <https://www.astm.org/d0638-22.html>
- Avallone, S., Guiraud, J.-P., Guyot, B., Olguin, E., & Brillouet, J.-M. (2000). Polysaccharide Constituents of Coffee-Bean Mucilage. *Journal of Food Science*, 65(8), 1308-1311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10602.x>
- Avallone, S., Guiraud, J.-P., Guyot, B., Olguin, E., & Brillouet, J.-M. (2001). Fate of Mucilage Cell Wall Polysaccharides during Coffee Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5556-5559. <https://doi.org/10.1021/jf010510s>
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.-M., Olguin, E., & Guiraud, J.-P. (2001). Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. *Current Microbiology*, 42(4), 252-256. <https://doi.org/10.1007/s002840110213>
- Ayyappan, V. G., Vhatkar, S. S., Bose, S., Sampath, S., Das, S. K., Samanta, D., & Mandal, A. B. (2022). Incorporations of gold, silver and carbon nanomaterials to kombucha-derived bacterial cellulose: Development of antibacterial leather-like materials. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(1), 100278. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100278>
- Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *En Frontiers in Sustainable Food Systems (Vol. 3)*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>
- Bae, S., & Shoda, M. (2005). Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 20-28. <https://doi.org/10.1002/bit.20325>
- Ball, S., Bullock, S., Lloyd, L., Keeley, M., & Ewen, A. (2011). Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8801EN%20Hi-Plex%20Compendium.pdf>
- Battestin, V., & Macedo, G. A. (2007). Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 98(9), 1832-1837. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.06.031>
- Beijerinck, M. L. (1898). Über die Arten der Essigbakterien. *Zentralbl. Parasitenkund. Infektionskr. Hyg. Abt. II*, 4, 209-215.

- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (J. G. Holt, Ed.; 7th Editio). Williams & Wilkins. <https://books.google.com.co/books?id=jtMLZaa5ONcC>
- Bhoite, R. N., Navya, P. N., & Murthy, P. S. (2013). Statistical optimization of bioprocess parameters for enhanced gallic acid production from coffee pulp tannins by *penicillium verrucosum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(4), 350-363. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.737399>
- Bio Rad Laboratories. (s. f.). Guide to Aminex HPLC Columns for food and Beverage, Biotechnology, and Bio-Organic Acids. Bio Rad Laboratories, Inc. Recuperado 23 de febrero de 2023, de www.hplc.sk/pdf/Biorad/Guide_to_Aminex_HPLC_columns.pdf
- Black, C. S. (2013). Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by immobilized *Gluconacetobacter xylinus* cells [University of Waikato]. <https://hdl.handle.net/10289/7955>
- Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C.-C., Verma, V., Wang, H.-T., Ismadji, S., & Cheng, K.-C. (2020). Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 397-414. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>
- Boesch, C., Trček, J., Sievers, M., & Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(2), 220-229. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80026-X)
- Bonilla-Hermosa, V. A., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology*, 166, 142-150. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.05.031>
- Brown, A. J. (1886). XLIII- On an Acetic Ferment which form Cellulose. *Journal of Chemical Society, Transaction*, 49, 432-439. <https://doi.org/10.1039/CT8864900432>
- Buldum, G., & Mantalaris, A. (2021). Systematic Understanding of Recent Developments in Bacterial Cellulose Biosynthesis at Genetic, Bioprocess and Product Levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7192. <https://doi.org/10.3390/ijms22137192>
- Caicedo, L. A., de Franca, F. P., & López, L. (2001). FACTORES PARA EL ESCALADO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR FERMENTACIÓN ESTÁTICA. *Revista Colombiana de Química*, 30(2), 155-162.
- Cappuccino, James. G., & Welsh, C. T. (2016). *Microbiology: A Laboratory Manual* (Eleventh edition). Pearson.
- Carreño Pineda, L. D. (2011). Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana. Universidad Nacional de Colombia.
- Carvajal Herrera, J. J., Aristizábal Torres, I. D., Oliveros Tascón, C. E., & Mejía Montoya, J. W. (2011). Colorimetría del Fruto de Café (*Coffea arabica* L.) Durante su Desarrollo y Maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6229-6240. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n2/v64n2a20.pdf>

- Castañeda, M. T. (2019). Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/89651>
- Castillo, M. D. del, Fernandez-Gomez, B., Martinez-Saez, N., Iriondo-DeHond, A., & Mesa, M. D. (2019). Chapter 12. Coffee By-products. En *Coffee* (pp. 309-334). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782622437-00309>
- Castro, C., Cleenwerck, I., Trček, J., Zuluaga, R., de Vos, P., Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J.-L., & Gañán, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_3), 1119-1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.043414-0>
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J.-L., Caro, G., Rojas, O. J., Mondragon, I., & Gañán, P. (2012). Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1033-1037. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.045>
- Cazón, P., & Vázquez, M. (2021). Improving bacterial cellulose films by ex-situ and in-situ modifications: A review. *Food Hydrocolloids*, 113, 106514. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106514>
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., & Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 345-352. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M)
- Charrier, A., & Berthaud, J. (1985). Botanical Classification of Coffee. En M. N. Clifford & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 13-47). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1_2
- Chen, T.-Y., Santoso, S. P., & Lin, S.-P. (2022). Using Formic Acid to Promote Bacterial Cellulose Production and Analysis of Its Material Properties for Food Packaging Applications. *Fermentation*, 8(11), 608. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110608>
- Clarke, R. J. (1985). Green Coffee Processing. En M. N. Clifford & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 230-250). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1_10
- Clavijo, S. (2017). Panorama cafetero 2017 - 2018. La Republica. <https://www.larepublica.co/analisis/sergio-clavijo-500041/panorama-cafetero-2017-2018-2571638>
- Cleenwerck, I., de Vos, P., & de Vuyst, L. (2010). Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans* as *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2277-2283. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018465-0>

- Cook, K. E., & Colvin, J. R. (1980). Evidence for a beneficial influence of cellulose production on growth of *Acetobacter xylinum* in liquid medium. *Current Microbiology*, 3(4), 203-205. <https://doi.org/10.1007/BF02602449>
- Córdoba Castro, N. M., & Guerrero Fajardo, J. esteban. (2016). CARACTERIZACIÓN DE LOS PROCESOS TRADICIONALES DE FERMENTACIÓN DE CAFÉ EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO. *Biocnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 75. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)75-83](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)75-83)
- Davis, J. R. (2004). *Tensile Testing (2.a ed.)*. ASM International.
- de Jesus, S. S., Moreira Neto, J., & Maciel Filho, R. (2017). Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional airlift, stirred airlift and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A comparative study. *Biochemical Engineering Journal*, 118, 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.019>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Dobre, T., Stoica, A., Parvulescu, O. C., Stroescu, M., & Iavorschi, G. (2008). Factors Influence on Bacterial Cellulose Growth in Static Reactors. *REVISTA DE CHIMIE-BUCHAREST-ORIGINAL EDITION*, 59(5), 591.
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles (Second)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>
- Dourado, F., Ryngajllo, M., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., & Gama, M. (2016). Taxonomic Review and Microbial Ecology in Bacterial NanoCellulose Fermentation. En *Bacterial Nanocellulose* (pp. 1-17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63458-0.00001-9>
- Dufresne, A. (2012). Cellulose and potential reinforcement. En *Nanocellulose* (pp. 1-42). De Gruyter.
- Dumitriu, S. (2005). *Polysaccharides (2.a ed.)*. Marcel Dekker.
- ebatco. (s. f.). SIMULTANEOUS THERMAL ANALYSIS (STA). Recuperado 9 de diciembre de 2022, de <https://www.ebatco.com/laboratory-services/chemical/simultaneous-thermal-analysis-sta/>
- Elhalis, H., Cox, J., & Zhao, J. (2023). Coffee fermentation: Expedition from traditional to controlled process and perspectives for industrialization. *Applied Food Research*, 3(1), 100253. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100253>
- Estrada, F. (2011). Por los senderos del café. La bebida del diablo: Historia económica y política del café en Colombia. *Credencial Historia*, 261. <http://www.banrepcultural.org/biblioteca-virtual/credencial-historia/numero-261/por-los-senderos-del-cafe-la-bebida-del-diablo>

- Exeter Analytical. (s. f.). 232 – Theory of Operation CE440 Elemental Analyser. Exeter Analytical. Recuperado 23 de febrero de 2023, de <https://www.exeteranalytical.co.uk/application-notes/>
- Federación Nacional de Cafeteros. (2004a). Beneficio del café 1: Despulpado, Remoción de mucílago y Lavado. En *Cartilla cafetera* (Número 20, pp. 151-172). Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/cartillas/publicaciones_cartilla_cafetera_cap_20_beneficio_del_cafe_1_despulpado
- Federación Nacional de Cafeteros. (2004b). Beneficio del café 2: Secado del café pergamino. En *Cartilla Cafetera* (pp. 174-190). https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/cartillas/publicaciones_cartilla_cafetera_cap_20_beneficio_del_cafe_2_secado_del
- Federación Nacional de Cafeteros. (2017). FNC en Cifras. 1-5. <https://federaciondefcafeteros.org/static/files/FNCCIFRAS2017.pdf>
- Federación Nacional de Cafeteros. (2023). Precios, área y producción del café. <https://federaciondefcafeteros.org/app/uploads/2020/01/Precios-area-y-produccion-de-cafe.xlsx>
- Fernandes Diniz, J. M. B., Gil, M. H., & Castro, J. A. A. M. (2004). Hornification?its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science and Technology*, 37(6), 489-494. <https://doi.org/10.1007/s00226-003-0216-2>
- Fernandes, I. de A. A., Pedro, A. C., Ribeiro, V. R., Bortolini, D. G., Ozaki, M. S. C., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I. (2020). Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2598-2611. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.255>
- Fernández, J., Morena, A. G., Valenzuela, S. V., Pastor, F. I. J., Díaz, P., & Martínez, J. (2019). Microbial Cellulose from a *Komagataeibacter intermedius* Strain Isolated from Commercial Wine Vinegar. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 956-967. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01403-4>
- Flórez García, I. C. (2015). PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE PROCESOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO MUCÍLAGO DE CAFÉ COMO FUENTE DE CARBONO. Universidad Industrial de Santander.
- Florez R, C. P., & Arias S, J. C. (2017). Guía para la caracterización de las variedades de café: Claves para su identificación. *Avances Técnicos Cenicafé*, 476, 1-12. https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/avances_tecnicos/avance_tecnico_0476
- Gaviria González, N. (2021, diciembre 15). Con precios récord, el café volvió a tomar las riendas de la economía del país en 2021. *AGRONEGOCIOS*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/con-precios-record-el-cafe-volvio-a-tomar-las-riendas-de-la-economia-del-pais-en-2021-3275453>

- Gea, S., Reynolds, C. T., Roohpour, N., Wirjosentono, B., Soykeabkaew, N., Bilotti, E., & Peijs, T. (2011). Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. *Bioresource Technology*, 102(19), 9105-9110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.077>
- Georgiev, Y. N., Paulsen, B. S., Kiyohara, H., Ciz, M., Ognyanov, M. H., Vasicek, O., Rise, F., Denev, P. N., Lojek, A., Batsalova, T. G., Dzhambazov, B. M., Yamada, H., Lund, R., Barsett, H., Krastanov, A. I., Yanakieva, I. Z., & Kratchanova, M. G. (2017). Tilia tomentosa pectins exhibit dual mode of action on phagocytes as β -glucuronic acid monomers are abundant in their rhamnogalacturonans I. *Carbohydrate Polymers*, 175, 178-191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.073>
- Gerard, L. M. (2015). Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/59401>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613-624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Grupo de Estudios Económicos, & Superintendencia de Industria y Comercio. (2012). Estudios de Mercado: Estudio sobre el sector del Café en Colombia. En Superintendencia de Industria y Comercio (Número 5). Superintendencia de Industria y Comercio.
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019a). The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019b). Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms*, 7(10), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>
- Hanna Instruments Inc. (s. f.). Manual de Instrucciones - HI98193 Medidor de oxígeno disuelto DBO/OUR/SOUR (pp. 1-64). Hanna Instruments Inc. Recuperado 2 de febrero de 2023, de https://cdn.hannacolombia.com/hannacdn/support/manual/2019/05/Manual_HI98193.pdf
- Haque, Md. A., Timilsena, Y. P., & Adhikari, B. (2016). Food Proteins, Structure, and Function. En Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03057-2>
- Hernández, M. A., Rodríguez Susa, M., & Andres, Y. (2014). Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. *Bioresource Technology*, 168, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.101>

- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345-352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Hindorf, H., & Omondi, C. O. (2011). A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research*, 2(2), 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.08.006>
- Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>
- International Trade Centre. (2012). *The Coffee Exporter's Guide* (3rd Editio). www.intracen.org
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1166-1173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110>
- Jacek, P., Dourado, F., Gama, M., & Bielecki, S. (2019). Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 633-649. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13386>
- Jackels, S. C., & Jackels, C. F. (2005). Characterization of the Coffee Mucilage Fermentation Process Using Chemical Indicators: A Field Study in Nicaragua. *Journal of Food Science*, 70(5), C321-C325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09960.x>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jalili Tabaii, M., & Emtiazi, G. (2016). Comparison of Bacterial Cellulose Production among Different Strains and Fermented Media. *Applied Food Biotechnology*, 3(1), 35-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.22037/afb.v3i1.10582>
- Jang, W. D., Kim, T. Y., Kim, H. U., Shim, W. Y., Ryu, J. Y., Park, J. H., & Lee, S. Y. (2019). Genomic and metabolic analysis of *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 producing bacterial cellulose nanofiber. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12), 3372-3381. <https://doi.org/10.1002/bit.27150>
- Jozala, A. F., de Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., Grotto, D., Gerenutti, M., & Chaud, M. V. (2016). Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2063-2072. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>
- Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A. (2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1181-1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>

- Kadier, A., Ilyas, R. A., Huzaifah, M. R. M., Harihastuti, N., Sapuan, S. M., Harussani, M. M., Azlin, M. N. M., Yuliasni, R., Ibrahim, R., Atikah, N., Wang, J., Chandrasekhar, K., Islam, A., Sharma, S., Punia, S., Rajasekar, A., Asyraf, M. R. M., Ishak, M. R., & Puglia, D. (2021). Use of Industrial Wastes as Sustainable Nutrient Sources for Bacterial Cellulose (BC) Production: Mechanism, Advances, and Future Perspectives. *Polymers*, 13(19), 3365. <https://doi.org/10.3390/polym13193365>
- KC, Y., Subba, R., Shiwakoti, L. D., Dhungana, P. K., Bajagain, R., Chaudhary, D. K., Pant, B. R., Bajgai, T. R., Lamichhane, J., Timilsina, S., Upadhyaya, J., & Dahal, R. H. (2021). Utilizing Coffee Pulp and Mucilage for Producing Alcohol-Based Beverage. *Fermentation*, 7(2), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020053>
- Khenblouche, A., Bechki, D., Gouamid, M., Charradi, K., Segni, L., Hadjadj, M., & Boughali, S. (2019). Extraction and characterization of cellulose microfibers from *Retama raetam* stems. *Polímeros*, 29(1), 1-8. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.05218>
- Kim, S. H., Lee, C. M., & Kafle, K. (2013). Characterization of crystalline cellulose in biomass: Basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(12), 2127-2141. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0162-0>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358-3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Komagata, K., Iino, T., & Yamada, Y. (2014). The Family Acetobacteraceae. En *The Prokaryotes* (pp. 3-78). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_396
- Krahulec, S., Petschacher, B., Wallner, M., Longus, K., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2010). Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-16>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee, C. M., Gu, J., Kafle, K., Catchmark, J., & Kim, S. H. (2015). Cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density. *Carbohydrate Polymers*, 133, 270-276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.091>
- Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 10-32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. Editorial Agroamérica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <https://books.google.com.co/books?id=NBtu79LJ4h4C>

- Ley, J. de, & Frateur, J. (1974). Genus *Acetobacter* Beijerinck 1898. En R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (eighth, Vol. 215, pp. 276-278). The Williams & Wilkins Co.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2003). Diversity of Acetic Acid Bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 91-99.
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24559-w>
- Liu, N., Santala, S., & Stephanopoulos, G. (2020). Mixed carbon substrates: a necessary nuisance or a missed opportunity? *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.07.003>
- Marín L, S. M., Arcila P, J., Montoya R, E. C., & Oliveros T, C. E. (2003). Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea Arabica* L. var Colombia). *Cenicafé*, 54(3), 208-225.
- Mazhar, U. I., A, J. H. H., Shah, N., & Park, J. kon. (2010). Effect of glucuronic acid monomers on the production of bacterial cellulose. *한국생물공학회 학술대회*, 276. <https://www.earticle.net/Article/A129678>
- Mendes Ferrão, J. E. (2009). O café: a bebida negra dos sonhos claros. Chaves Ferreira Publicações. <https://books.google.com.co/books?id=zuO6ZwEACAAJ>
- Meza-Contreras, J. C., Manriquez-Gonzalez, R., Gutiérrez-Ortega, J. A., & Gonzalez-Garcia, Y. (2018). XRD and solid state ¹³C-NMR evaluation of the crystallinity enhancement of ¹³C-labeled bacterial cellulose biosynthesized by *Komagataeibacter xylinus* under different stimuli: A comparative strategy of analyses. *Carbohydrate Research*, 461, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.03.005>
- Modi, A., Vai, S., Caramelli, D., & Lari, M. (2021). The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System (pp. 15-42). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2
- Mohite, B. v., & Patil, S. v. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(2), 101-110. <https://doi.org/10.1002/bab.1148>
- Molina Ramírez, C. A. (2018). Escalado de la producción de nanocelulosa bacteriana empleando la bacteria *K. medellinensis* y como sustrato residuos agroindustriales procedentes del

departamento del Magdalena- Colombia [Universidad Pontificia Bolivariana]. <http://hdl.handle.net/20.500.11912/4466>

- Montgomery, D. C. (2019). *Design and Analysis of Experiments*. Wiley.
- Montilla, J., Arcila, J., Aristizábal, M., Montoya, E., Puerta, G., Oliveros, C., & Cadena, G. (2008). Propiedades físicas y factores de conversión del café en el proceso de beneficio. *Avances Técnicos Cenicafe*, 370, 1-8.
- Moreno Cárdenas, E. L., & Zapata Zapata, A. D. (2019). Biohydrogen production by co-digestion of fruits and vegetable waste and coffee mucilage. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 9007-9018. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n3.73140>
- Muñoz Moreno, D. F., & Noguera Ortiz, M. (2016). Evaluación de las propiedades físicas y factores de conversión de café variedad Castillo y Colombia (*Coffea arabica* L.) durante el proceso de beneficio y trilla, a diferentes alturas sobre el nivel del mar en fincas cafeteras del municipio de Colón, Departamento de Nariño [Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/12141>
- Murillo, B., & Bressani, R. M. (1975). Pulpa y pergamino de café, 10: cambios en la composición química del pergamino de café por efecto de diferentes tratamientos alcalinos. *Coffee pulp and coffee hulls*, Turrialba (IICA) v. 25 (2) p. 179-182. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ORTON.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mnfn=037925>
- Murthy, P. S., & Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Murthy, P. S., Madhava Naidu, M., & Srinivas, P. (2009). Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(8), 1246-1249. <https://doi.org/10.1002/jctb.2142>
- Neu, A.-K., Pleissner, D., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G. I., & Venus, J. (2016). Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure L(+)-lactic acid production. *Bioresource Technology*, 211, 398-405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.122>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nishi, Y., Uryu, M., Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., & Mitsunashi, S. (1990). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose - Part 2. *Journal of Materials Science*, 25(6), 2997-3001. <https://doi.org/10.1007/BF00584917>
- Ocampo-López, O. L., & Alvarez-Herrera, L. M. (2017). Tendencia de la producción y el consumo del café en Colombia. *Apuntes del CENES*, 36(64), 139-165.

- O'Dell, J. W. (1996). The determination of chemical oxygen demand by semi-automated colorimetry. United States Environmental Protection Agency.
- Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, H., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K., Matsushita, K., Fujita, N., & Shirai, M. (2011). Complete Genome Sequence of NBRC 3288, a Unique Cellulose-Nonproducing Strain of *Gluconacetobacter xylinus* Isolated from Vinegar. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6997-6998. <https://doi.org/10.1128/JB.06158-11>
- Oliveira, R. L., Vieira, J. G., Barud, H. S., Assunção, R. M. N., Rodrigues Filho, G., Ribeiro, S. J. L., & Messadeq, Y. (2015). Synthesis and Characterization of Methylcellulose Produced from Bacterial Cellulose under Heterogeneous Condition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150163>
- Orrego, D., Zapata-Zapata, A. D., & Kim, D. (2018). Optimization and scale-up of coffee mucilage fermentation for ethanol production. *Energies*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/en11040786>
- Pa'e, N., Salehudin, M. H., Hassan, N. D., Marsin, A. M., & Muhamad, I. I. (2018). Thermal Behavior of Bacterial Cellulose Based Hydrogels with Other Composites and Related Instrumental Analysis (pp. 1-25). https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_26-1
- Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>
- Pigaleva, M. A., Bulat, M. v., Gromovykh, T. I., Gavryushina, I. A., Lutsenko, S. v., Gallyamov, M. O., Novikov, I. v., Buyanovskaya, A. G., & Kiselyova, O. I. (2019). A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The Journal of Supercritical Fluids*, 147, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.009>
- Pleissner, D., Neu, A. K., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G. I., & Venus, J. (2016). Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresource Technology*, 218, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.078>
- Poletto, M., Pistor, V., & Zattera, J. A. (2013). Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. *En Cellulose - Fundamental Aspects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50452>
- Puerta, G. I., & Ríos, S. (2011). Composición química del mucilago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23-40. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/478>
- Puerta-Quintero, G. I., Marín M, J., & Osorio B, G. A. (2012). MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ SEGÚN SU MADUREZ Y SELECCIÓN. *Revista Cenicafé*, 63(2), 58-78.
- Puerta-Quintero, G. I., & Ríos-Arias, S. (2011). Composición química del mucilago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23-40. <http://www.cenicafe.org/es/documents/2.pdf>

- Qi, G.-X., Luo, M.-T., Huang, C., Guo, H.-J., Chen, X.-F., Xiong, L., Wang, B., Lin, X.-Q., Peng, F., & Chen, X.-D. (2017). Comparison of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* on bagasse acid and enzymatic hydrolysates. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(28), 45066. <https://doi.org/10.1002/app.45066>
- Qiagen. (2020). DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® Kit Handbook. Qiagen. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=329362e4-03e6-4ae1-9e4e-bbce41abe4b7&lang=en>
- Qiu, K., & Netravali, A. N. (2014a). «Green» composites based on bacterial cellulose produced using novel low cost carbon source and soy protein resin. En W. V. Gutowski & H. Dodiuk (Eds.), *Recent Advances in Adhesion Science and Technology in Honor of Dr. Kash Mittal* (pp. 193-208). CRC Press. <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b16347-15>
- Qiu, K., & Netravali, A. N. (2014b). A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. *Polymer Reviews*, 54(4), 598-626. <https://doi.org/10.1080/15583724.2014.896018>
- Quintero, L., & Rosales, M. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. *Visión Gerencial*, 13(2), 291-307.
- Radotić, K., & Mičić, M. (2016). Methods for Extraction and Purification of Lignin and Cellulose from Plant Tissues (pp. 365-376). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3185-9_26
- Raghavendran, V., Asare, E., & Roy, I. (2020). Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. En *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 77, pp. 89-138). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.07.002>
- Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., & Suar, M. (2019). A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. En *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 137-152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>
- Ramírez Gómez, C. A., Oliveros T, C. E., & Sanz U, J. R. (2015). Manejo De Lixiviados Y Aguas De Lavado En El Proceso De Beneficio Húmedo Del Café. *Revista Cenicafe*, 66(1), 46-60. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/608>
- Rani, M. U., & Appaiah, K. A. A. (2013). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 755-762. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0401-5>
- Reichembach, L. H., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2020). Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. *Carbohydrate Polymers*, 245, 116473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116473>
- Reimer, L. C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., & Overmann, J. (2022). Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D741-D746. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab961>

- Remoroza, C., Cord-Landwehr, S., Leijdekkers, A. G. M., Moerschbacher, B. M., Schols, H. A., & Gruppen, H. (2012). Combined HILIC-ELSD/ESI-MSn enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.058>
- Renard, C. M. G. C., Crepeau, M.-J., & Thibault, J.-F. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566-574. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00896.x>
- Resolución 631, 2015 (2015). <https://www.minambiente.gov.co/documento-normativa/resolucion-631-de-2015/>
- Rivers, D. B., Gracheck, S. J., Woodford, L. C., & Emert, G. H. (1984). Limitations of the DNS assay for reducing sugars from saccharified lignocellulosics. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(7), 800-802. <https://doi.org/10.1002/bit.260260727>
- Rodríguez, N., Sanz, J., Oliveros, C., & Ramírez, C. (2015). Beneficio del café en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones en café (CENICAFE).
- Rodríguez-Valencia, N., & Zambrano Franco, D. A. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Avances Técnicos Cenicafe*, 393, 1-8. <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/351/1/avt0393.pdf>
- Rodríguez-Valencia, N., Zambrano Franco, D. A., & Ramírez, C. A. (2013). Manejo y disposición de los subproductos y de las aguas residuales del beneficio del café. En *Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura* (Vol. 3, pp. 111-136). Federación Nacional de Cafeteros. https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/4347/1/cenbook-0026_31.pdf
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. En *Trends in Microbiology* (Vol. 23, Número 9, pp. 545-557). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>
- Ryngajłło, M., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Kubiak, K., Ludwicka, K., & Bielecki, S. (2020). Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6565-6585. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10671-3>
- Saavedra-Sanabria, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118645>
- Sadeghian-Khalajabadi, S., Mejía-Muñoz, B., & Arcilaga-Pulgarín, J. (2006). Composición Elemental De Frutos De Café Y Extracción De Nutrientes Por La Cosecha En La Zona Cafetera De Colombia. *Avances Técnicos Cenicafe*, 364, 251-261.
- Santos, R. A. C. dos, Berretta, A. A., Barud, H. da S., Ribeiro, S. J. L., González-García, L. N., Zucchi, T. D., Goldman, G. H., & Riaño-Pachón, D. M. (2015). Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter intermedius* Strain AF2, a Producer of Cellulose, Isolated from

Kombucha Tea. Genome Announcements, 3(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01404-15>

Sanz Uribe, J. R., Oliveros Tascón, C. E., Ramírez Gómez, C. A., López Posada, U., & Velásquez Henao, J. (2011). Controle los flujos de café y agua en el modelo Belcosub. Avances Técnicos Cenicafe, 405, 1-8. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/40/1/avt0405.pdf>

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the water holding capacity of microbial cellulose. Biotechnology Letters, 27(19), 1435-1438. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1465-y>

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. Textile Research Journal, 29(10), 786-794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

Serafica, G., Mormino, R., & Bungay, H. (2002). Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. Applied Microbiology and Biotechnology, 58(6), 756-760. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0978-8>

Singhania, R. R., Patel, A. K., Tseng, Y.-S., Kumar, V., Chen, C.-W., Haldar, D., Saini, J. K., & Dong, C.-D. (2022). Developments in bioprocess for bacterial cellulose production. Bioresource Technology, 344, 126343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126343>

Singhsa, P., Narain, R., & Manuspiya, H. (2018). Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. Cellulose, 25(3), 1571-1581. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1699-1>

Skoog, D. A., West, D. M., Crouch, S. R., & Holler, F. J. (2014). Fundamentos de química analítica (9.a ed.). Cengage Learning Editores S.A. de C.V.

Son, C.-J., Chung, S.-Y., Lee, J.-E., & Kim, S.-J. (2002). Isolation and Cultivation Characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 Producing Bacterial Cellulose in Shaking Cultures. Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(5), 722-728.

Son, H.-J., Heo, M.-S., Kim, Y.-G., & Lee, S.-J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. Biotechnology and Applied Biochemistry, 33(1), 1. <https://doi.org/10.1042/BA20000065>

Son, H.-J., Kim, H.-G., Kim, K.-K., Kim, H.-S., Kim, Y.-G., & Lee, S.-J. (2003). Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. Bioresource Technology, 86(3), 215-219. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00176-1)

- Souza, K. C. de, Trindade, N. M., Amorim, J. D. P. de, Nascimento, H. A. do, Costa, A. F. S., Henrique, M. A., Caetano, V. F., Sarubbo, L. A., & Vinhas, G. M. (2021). Kinetic Study of a Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter Rhaeticus* Using Coffee Grounds and Sugarcane Molasses. *Materials Research*, 24(3). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2020-0454>
- Souza, S. S. de, Berti, F. v., de Oliveira, K. P. v., Pittella, C. Q. P., de Castro, J. v., Pelissari, C., Rambo, C. R., & Porto, L. M. (2019). Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. *Cellulose*, 26(3), 1641-1655. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2178-4>
- Sperotto, G., Stasiak, L. G., Godoi, J. P. M. G., Gabiatti, N. C., & de Souza, S. S. (2021). A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. *Cellulose*, 28(5), 2649-2673. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5>
- Sudha, M. L. (2011). Apple Pomace (By-Product of Fruit Juice Industry) as a Flour Fortification Strategy. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (pp. 395-405). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380886-8.10036-4>
- Sun, B., Zi, Q., Chen, C., Zhang, H., Gu, Y., Liang, G., & Sun, D. (2018). STUDY OF SPECIFIC METABOLIC PATTERN OF *ACETOBACTER XYLINUM* NUST4.2 AND BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION IMPROVEMENT. *Cellulose Chemistry and Technology*, 52(9-10), 795-801. [https://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT9-10\(2018\)/p.795-801.pdf](https://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT9-10(2018)/p.795-801.pdf)
- Sundaram, M. K., Nehru, G., Tadi, S. R. R., Katsuno, N., Nishizu, T., & Sivaprakasam, S. (2021). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* utilizing agro-industrial residues and its application in coffee milk stabilization. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01867-2>
- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P., & Phunsri, A. (2005). Effect of Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter* sp. *Journal of scientific research, Chulalongkorn University Common abbreviations: J. Sci. Res. Chula. Univ. [ZDB]*, 30(2), 179-186.
- Taweecheep, P., Naloka, K., Matsutani, M., Yakushi, T., Matsushita, K., & Theeragool, G. (2019). Superfine bacterial nanocellulose produced by reverse mutations in the *bcsC* gene during adaptive breeding of *Komagataeibacter oboediens*. *Carbohydrate Polymers*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115243>
- Teixeira, R. S. S., da Silva, A. S., Ferreira-Leitão, V. S., & Bon, E. P. da S. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydrate Research*, 363, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024>
- Thiex, N., Novotny, L., & Crawford, A. (2012). Determination of Ash in Animal Feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 95(5), 1392-1397. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-129>

- Udoetok, I. A., Wilson, L. D., & Headley, J. v. (2018). Ultra-sonication assisted cross-linking of cellulose polymers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42, 567-576. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.017>
- UI-Hamid, A. (2018). *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98482-7>
- UI-Islam, M., Khan, S., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2015). Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. *Biotechnology Journal*, 10(12). <https://doi.org/10.1002/biot.201500106>
- UI-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>
- Universitat Politècnica de València. (2011, octubre 24). Materiales poliméricos: cristalinidad | 19/22 | UPV. https://www.youtube.com/watch?v=LOAFbiM_ibU
- U.S. EPA. (1994). Method 200.7: Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. <https://www.epa.gov/esam/method-2007-determination-metals-and-trace-elements-water-and-wastes-inductively-coupled>
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545-554. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>
- Vida. (2015). Habrá duras sanciones por vertimientos que contaminen cuerpos de agua. *EL TIEMPO*. <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-15430915>
- Volova, T. G., Prudnikova, S. v., Sukovatyi, A. G., & Shishatskaya, E. I. (2018). Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7417-7428. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9198-8>
- Wada, M., Sugiyama, J., & Okano, T. (1993). Native celluloses on the basis of two crystalline phase ($I\alpha/I\beta$) system. *Journal of Applied Polymer Science*, 49(8), 1491-1496. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070490817>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, S.-S., Han, Y.-H., Chen, J.-L., Zhang, D.-C., Shi, X.-X., Ye, Y.-X., Chen, D.-L., & Li, M. (2018). Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers*, 10(9), 963. <https://doi.org/10.3390/polym10090963>

- Wang, Z. G., Xiang, D., Wang, X. B., & Li, C. F. (2016). Preparation of an inoculum of *Gluconacetobacter xylinus* without mutants in shaken culture. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 713-720. <https://doi.org/10.1111/jam.13193>
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. *Cellulose*, 5(3), 187-200. <https://doi.org/10.1023/A:1009272904582>
- Wohlert, M., Benselfelt, T., Wågberg, L., Furó, I., Berglund, L. A., & Wohlert, J. (2022). Cellulose and the role of hydrogen bonds: not in charge of everything. *Cellulose*, 29(1), 1-23. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04325-4>
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>
- Yamada, Y. (1983). *Acetobacter xylinus* sp. nov., nom. rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 29(5), 417-420. <https://doi.org/10.2323/jgam.29.417>
- Yamada, Y., Hoshino, K., & Ishikawa, T. (1997). The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1244-1251. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1244>
- Yamada, Y., & Kondo, K. (1984). *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30(4), 297-303. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.297>
- Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077>
- Yamada, Y., Yukphan, P., Thi, H., Vu, L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). 58, 397-404.
- Yamamoto, H., Horii, F., & Hirai, A. (1996). In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I α and I β at the early stage of incubation. *Cellulose*, 3(1), 229-242. <https://doi.org/10.1007/BF02228804>
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose - Part 1. *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141-3145. <https://doi.org/10.1007/BF01139032>
- Yao, J., Chen, S., Chen, Y., Wang, B., Pei, Q., & Wang, H. (2017). Macrofibers with High Mechanical Performance Based on Aligned Bacterial Cellulose Nanofibers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(24), 20330-20339. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14650>

- Ye, J., Zheng, S., Zhang, Z., Yang, F., Ma, K., Feng, Y., Zheng, J., Mao, D., & Yang, X. (2019). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium. *Bioresource Technology*, 274, 518-524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.028>
- Yepes Betancur, D. P. (2019). Extracción de compuestos bioactivos a partir de semilla de aguacate (*Persea americana* Mill cv. Hass) por Fermentación en Medio Sólido y aplicación en matrices alimentaria. Universidad Nacional de Colombia.
- Zambrano-Franco, D. A., & Isaza-Hinestroza, J. D. (1994). Lavado del café en los tanques de fermentación. *Revista Cenicafé*, 43(5), 106-118. <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc045%2803%29106-118.pdf>
- Zeng, X., Liu, J., Chen, J., Wang, Q., Li, Z., & Wang, H. (2011). Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1993-1999. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0989-5>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.02.034>
- Zhang, C. J., Wang, L., Zhao, J. C., & Zhu, P. (2011). Effect of Drying Methods on Structure and Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Films. *Advanced Materials Research*, 239-242, 2667-2670. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.239-242.2667>
- Zhong, C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>
- Zhong, C., Zhang, G.-C., Liu, M., Zheng, X.-T., Han, P.-P., & Jia, S.-R. (2013). Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6189-6199. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4908-8>
- Zhou, L. L., Sun, D. P., Hu, L. Y., Li, Y. W., & Yang, J. Z. (2007). Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(7), 483-489. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0218-4>