



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Obtención de nano-celulosa bacteriana utilizando hidrolizados de
bagazo de caña y cáscara de cacao

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción de Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Erick Fabricio Sailema Sailema

Tutor: Lic. Danae Fernández Rivero MSc.

Ambato – Ecuador

Febrero - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. Danae Fernández Rivero MSc.

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la opción de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero del 2024

.....

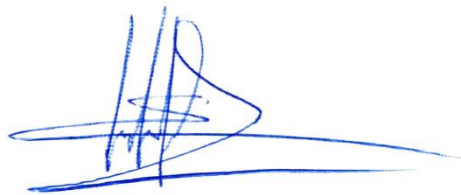
Lic. Danae Fernández Rivero MSc.

C.I. 1757181209

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Erick Fabricio Sailema Sailema manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, como auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Erick Fabricio Sailema Sailema

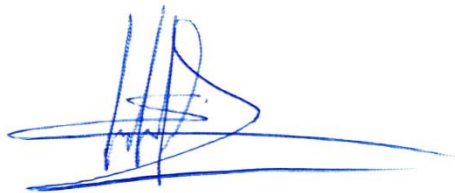
C.I. 1850476522

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso del Informe Final del Trabajo de Titulación, o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



.....
Erick Fabricio Sailema Sailema

C.I. 1850476522

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I. 1103605471

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1803571585

Ambato, 7 de febrero del 2024

DEDICATORIA

A todos esos seres especiales que ahora están cambiando vidas en otros mundos, sé que no era el camino que teníamos planeado, pero créanme que me esfuerzo cada día por ser la mejor versión de mí. Siempre estarán en mi corazón y en mi memoria.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a cada persona que me ha brindado su apoyo. Su presencia en mi vida ha guiado cada uno mis pasos.

A mi familia Mela, Alberto, Alex, Angy y Adelita gracias por confiar en mis decisiones. Su incondicional apoyo en cada etapa de mi vida ha construido mi fortaleza.

A mis amigos José Teneda y Carol Escobar, gracias por ser ese bastón de soporte en este camino.

A mi tutora, Lic. Danae Fernández Rivero, gracias por siempre estar pendiente de mi trabajo de investigación.

Quiero expresar mi eterna gratitud hacia la increíble docente PhD. Liliana Cerda y al respetado PhD. Mario García, gracias por su tiempo, paciencia y apoyo.

A PhD. Alexis Debut y Ing. Karla Vizuete del Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas.

A mis amigos Brenda, Geo, Taty, José T, José V, Rodrigo y en especial a “Grace” gracias por todo tu apoyo brindado y también gracias a cada uno de ustedes por hacer de mi paso por la universidad más llevadera.

Gracias a mis compañeros y amigos del lab 2.1, gracias por compartir sus “aventuras”.

A Santiago Morales, Gracias por enseñarme que la vida puede ser un desafío en ocasiones, pero también puede convertirse en algo extraordinariamente bello cuando sabemos cómo afrontar sus obstáculos. Mi eterna gratitud por tu enseñanza.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Justificación.....	1
1.1.2. Celulosa	2
1.1.3. Fuentes de celulosa.....	3
1.1.3.1. Plantas productoras de celulosa.....	3
1.1.3.2. Otros microorganismos con celulosa como componente estructural ...	4
1.1.4. Celulosa bacteriana.....	4
1.1.4.1. Biosíntesis de celulosa bacteriana	5
1.1.4.2. Propiedades de la celulosa bacteriana	6
1.1.5. Técnicas de fermentación de celulosa bacteriana.....	6
1.1.5.1. Cultivo estático	7
1.1.6. Fuentes de carbono en medios de cultivo.....	7

1.1.6.1.	Cascara de cacao.....	8
1.1.6.2.	Bagazo de caña	8
1.1.7.	Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana.....	9
1.1.7.1.	Industria alimentaria	9
1.1.7.2.	Industria biomédica	9
1.1.8.	Nano-celulosa	10
1.1.8.1.	Estructura y composición	11
1.1.9.	Métodos de obtención de nano-celulosa.....	12
1.1.9.1.	Tratamiento químico (ácido)	12
1.1.9.2.	Tratamiento mecánico	13
1.1.10.	Pruebas de caracterización de nano-celulosa.....	13
1.1.10.1.	Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR).....	13
1.1.10.2.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	14
1.2.	Objetivos.....	14
1.2.1.	Objetivo general	14
1.2.2.	Objetivos específicos	14
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		15
2.1.	Materiales	15
2.1.1.	Material fungible	15
2.1.2.	Reactivos	15
2.1.3.	Equipos de laboratorio.....	16
2.2.	Métodos	17
2.2.1.	Recolección de residuos de agroindustrias utilizados como fuentes de carbono.....	17
2.2.2.	Molienda de residuos agroindustriales	17
2.2.3.	Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis de los residuos agroindustriales (bagazo de caña y cascara de cacao).....	17
2.2.4.	Reactivación de cepas.....	19

2.2.4.1.	Cepas bacterianas	19
2.2.4.2.	Pre-cultivo en medio líquido	19
2.2.5.	Composición de medios mínimos (MM) para la producción de celulosa bacteriana	20
2.2.6.	Producción de celulosa bacteriana en MM modificado estático	20
2.2.7.	Purificación de la celulosa bacteriana	20
2.2.8.	Rendimiento de la celulosa bacteriana	20
2.2.9.	Diseño experimental	21
2.2.10.	Generación de nano-celulosa mediante tratamientos químicos y mecánicos	22
2.2.10.1.	Tratamiento químico (ácido)	22
2.2.10.2.	Tratamiento mecánico (Homogeneizador)	22
2.2.11.	Caracterización de la nano-celulosa generada por tratamientos químicos y mecánicos	23
2.2.11.1.	Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier FTIR	23
2.2.11.2.	Microscopía electrónica de barrido SEM	23
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		24
3.1.	Análisis y discusión	24
3.1.1.	Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis de los residuos agroindustriales (bagazo de caña y cáscara de cacao).....	24
3.1.2.	Rendimiento de la celulosa bacteriana	27
3.1.3.	Caracterización de nano-celulosa obtenida mediante tratamientos químicos y mecánicos	32
3.1.3.1.	Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier FTIR	32
3.1.3.2.	Microscopía electrónica de barrido SEM	34
3.2.	Verificación de la hipótesis.....	39
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		40
4.1.	Conclusiones.....	40

4.2. Recomendaciones	41
MATERIALES DE REFERENCIA.....	42
Referencias bibliográficas.....	42
Anexos	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos del diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis	18
Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de celulosa bacteriana.....	5
Figura 2. Composición y estructura de material lignocelulósico	11
Figura 3. Estructura química de celulosa bacteriana	12
Figura 4. Concentración de azúcares reductores en cáscara de cacao y bagazo de caña, obtenidos por los dos métodos de hidrólisis.....	24
Figura 5. Gráfico de cajas para la concentración de azúcares reductores	26
Figura 6. Rendimiento de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de cacao y bagazo de caña)	28
Figura 7. Gráfico de cajas para los rendimientos de celulosa (g/L), obtenidos para cada tratamiento al utilizar dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de	31
Figura 8. Espectros FTIR de celulosa comercial (Avicel) y nano-celulosa obtenida mediante tratamientos de hidrólisis química y mecánica	32
Figura 9. SEM de nano-celulosa bacteriana resultante del tratamiento ácido.....	35
Figura 10. SEM de nano-celulosa bacteriana resultante del tratamiento ácido.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Hidrólisis de residuos.....	54
Anexo A 1. Concentración de azúcares reductores presentes en los residuos agroindustriales (cáscara de cacao y bagazo de caña).....	54
Anexo A 2. Análisis de varianza de los tratamientos de hidrólisis de cáscara de cacao para la obtención azúcares reductores	54
Anexo A 3. Análisis de varianza de los tratamientos de hidrólisis de bagazo de caña para la obtención de azúcares reductores	54
Anexo A 4. Estandarización de una curva de concentración de glucosa mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	55
Anexo A 5. Curva estándar de glucosa	55
Anexo B. Obtención de celulosa bacteriana.....	56
Anexo B 1. Rendimientos de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (de cacao y bagazo de caña)	56
Anexo B 2. Análisis de varianza del rendimiento de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de cacao y bagazo de caña).....	56
Anexo C. Caracterización de nano-celulosa obtenida mediante tratamientos químicos y mecánicos	57
Anexo C 1. Proceso de producción de celulosa bacteriana	57
Anexo C 2. Celulosa bacteriana purificada almacenada en acético.....	58
Anexo C 3. Nano-celulosa obtenida por los dos procesos de hidrólisis	58
Anexo C 4. Espectro de FTIR de nano-celulosa con sus respectivas etiquetas en cada pico	59

RESUMEN EJECUTIVO

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes en la tierra y se investigan varias aplicaciones en la industria y en medicina. La mayor parte se encuentra en plantas (celulosa vegetal). Sin embargo, la producción de celulosa vegetal enfrenta problemas de deforestación y costosos procesos de purificación. Por otro lado, tenemos a la celulosa bacteriana, la cual presenta varias ventajas por sus características; no obstante, su costo de producción a nivel industrial aun presenta problemas. Por ello, utilizar desechos agroindustriales de cacao y caña como fuente de carbono para obtener celulosa bacteriana presenta una posible solución al problema.

Por tal motivo se planteó evaluar tratamientos de hidrólisis en residuos agroindustriales para la obtención de azúcares fermentables, los cuales serán la fuente de carbono en medios mínimos. Posteriormente, se evaluó el rendimiento de celulosa producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004) en los mismos medios. Una vez determinado tratamiento adecuado para la producción de celulosa, que consistió en utilizar hidrolizado de cáscara de cacao y la bacteria DSM 2004, se compararon dos métodos de hidrólisis de celulosa para obtener uno de sus derivados, la nano-celulosa, misma que se caracterizó morfológicamente mediante FT-IR y SEM.

La investigación demostró la idoneidad de utilizar hidrolizados de residuos de cáscara de cacao y bagazo de caña de azúcar como fuentes de carbono de bajo costo para producir celulosa bacteriana. Además, se determinó que los tratamientos de hidrólisis utilizados para la obtención de nano-celulosa no influyen en su morfología.

Palabras clave: nanocelulosa, nanotecnología, residuos agroindustriales, hidrólisis, SEM,

ABSTRACT

Cellulose is one of the most abundant biopolymers on Earth, and various applications in medicine and industry are being investigated. Most of it is found in plants (vegetable cellulose). However, the production of vegetable cellulose faces deforestation and costly purification processes problems. On the other hand, there are bacterial cellulose which has several advantages due to its characteristics; however, its production cost at industrial scale still exhibits problems. Therefore, use agro-industrial waste from cocoa and sugarcane as a carbon source to obtain bacterial cellulose presents a possible solution to the problem.

Consequently, it was proposed to evaluate hydrolysis treatments on agro-industrial wastes to obtain fermentable sugars, which will be the carbon source in minimal mediums. Subsequently, cellulose yield produced by two acetic strains (PDC21 and PDC 25) and *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004) was evaluated in the same medium. Once the appropriate treatment to produce cellulose was determined, which consisted of the use of cocoa shell hydrolyzate and the DSM 2004 bacteria, two cellulose hydrolysis methods were compared to obtain one of its derivatives, nano-cellulose, which was characterized morphologically by FT-IR and SEM.

The research demonstrated the suitability of use hydrolysates of cocoa shell waste and sugarcane bagasse as low-cost carbon sources to produce bacterial cellulose. In addition, it was determined that the hydrolysis treatments used to obtain nano-cellulose do not influence its morphology.

Keywords: nanocellulose, nanotechnology, agroindustrial waste, hydrolysis, SEM,

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación

La celulosa es el biopolímero más abundante en la tierra (Gullo et al., 2017), además, es un polisacárido conformado por una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas por β -1,4-enlaces glucosídicos (Arevalo-Gallegos et al., 2017). Esta puede ser producida por plantas superiores (celulosa vegetal), pero también por procariotas distribuidos en varios taxones (celulosa bacteriana). La celulosa bacteriana presenta varias ventajas sobre la celulosa vegetal, sin embargo, durante años la celulosa vegetal ha sido la más utilizada. Por otro lado, la producción de celulosa vegetal tiene dos grandes problemas, el primero es la deforestación que genera y el segundo es el costo del proceso operativo para la purificación de la celulosa (Bang et al., 2021).

La extracción de celulosa de distintas fuentes vegetales cumple en su mayoría con cuatro etapas principales: el pretratamiento (eliminación de compuestos solubles), tratamiento ácido (eliminación de compuestos pécticos), tratamiento alcalino (eliminación de lignina) y el blanqueo (eliminación de lignina coloreada y materiales cromóforos). Este proceso involucra a productos químicos oxidantes que aumentan los costos de producción, sobre todo en la etapa de blanqueo (Wang & Zhao, 2021). Si bien estos pueden aumentar el brillo de la celulosa también pueden debilitar la resistencia en las fibras de la misma y, por tanto, reducir el rendimiento (Dinçel Kasapoğlu et al., 2023).

En contraste, la celulosa bacteriana tiene una nano estructura única que está conformada por microfibrillas de celulosa orientadas al azar. Su disposición tridimensional y biocompatibilidad con el tejido biológico han hecho de ella una candidata ideal como material médico para la ingeniería de tejidos, ingeniería reconstructiva y el transporte de medicamentos (Volova et al., 2018). Otras características como la capacidad de absorción y retención de agua, alta cristalinidad y porosidad hacen que tenga aplicaciones en la industria cosmética, automotriz, eléctrica y de sensores (Gwon et al., 2019; Lee et al., 2022).

Por tal motivo, la demanda de la celulosa bacteriana sigue creciendo en mercados internacionales. Sin embargo, los costos de medios de cultivo comerciales como Hestrin-Schramm (H-S) utilizados para su obtención, hacen que la celulosa bacteriana aún no sea rentable. Por esta razón, es necesario generar medios de cultivo rentables que utilicen residuos agroindustriales como melaza, suero de queso, cáscara de castaña, cacao o bagazo de caña hidrolizado en su composición (**Khan et al., 2021; Lee et al., 2022**).

En Ecuador existe una gran producción de cacao y caña debido a la ubicación geográfica del país (**Sánchez-Cortez, 2019**). Aunque la agricultura juega un papel importante en su economía muchos de estos productos agrícolas generan grandes cantidades de desperdicios. Ya que de estos productos solo una parte es aprovechada (**Álava et al., 2022**). Según informes de la **Corporación Financiera Nacional, (2022)**, en el año 2021 se generó 11 372 505 toneladas métricas de caña en Ecuador, de las cuales el 25 % del peso total terminará en desechos. En otros informes de la CFN, se dan a conocer que en el mismo año se produjeron 302094 toneladas métricas de cacao, de este fruto solo el 10 % del peso es aprovechable. En este sentido, en el siguiente estudio se ha planteado aprovechar los residuos del fruto del cacao y caña de azúcar para la producción de celulosa mediante herramientas biotecnológicas y su posterior tratamiento para la generación de nano-celulosa.

1.1.2. Celulosa

Es un homopolímero de estructura lineal, conformado por una cadena extendida de subunidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos β -1,4. A su vez, estos homopolímeros están acoplados entre sí a través de enlaces intra e intermoleculares, lo que conlleva a ensamblarse uno a lado del otro en laminas y microfibrillas (**H. Lee et al., 2014**). Esta se puede extraer de fuentes como fibras vegetales, madera, hierbas y fibras de semillas, además puede ser producido por algas, y bacterias (**Uranhimeg et al., 2022**).

1.1.3. Fuentes de celulosa

Existe una variedad de microorganismos capaces de sintetizar y secretar celulosa. En contraste, algunos de ellos tienen la capacidad de degradarla para utilizarla como fuente de energía; mientras que, en otros casos organismos sintetizan celulosa para integrarla a su composición estructural (Shida et al., 2016; Uranchimeg et al., 2022). La síntesis de celulosa, generalmente está atribuido a bacterias, sin embargo, organismos y microorganismos como plantas y algas poseen celulosa en su composición estructural. Por otro lado, algunos hongos son capaces de sintetizar enzimas capaces de degradar la celulosa (Chai et al., 2022; Yang et al., 2023).

1.1.3.1. Plantas productoras de celulosa

Dentro del reino plantae la celulosa se encuentra en una compleja asociación química y física con otros componentes dentro de las paredes celulares de las plantas (Ma et al., 2019). La celulosa vegetal es el principal componente estructural de las células vegetales y otorga resistencia mecánica a la misma, esta se encuentra tanto en la pared celular primaria como secundaria, es esta última donde se encuentra en mayor cantidad (Desprez et al., 2007).

Las células vegetales con mayor porcentaje de celulosa son las que tienen pared celular secundaria ya que tienen la función de soporte, en este proceso de síntesis, la celulosa se va agregando entre la membrana plasmática y la pared celular primaria al final del crecimiento y extensión de la misma. La célula únicamente cumple su función de otorgar resistencia y transportar savia cuando esta muere (Altesor et al., 2008; Angulo et al., 2012).

Las plantas denominadas superiores, de las que se obtiene la madera son las que necesitan un gran soporte para crecer en altura y grosor. En este sentido, el consumo de estas plantas por parte de la industria de la madera genera grandes cantidades de desechos lignocelulósicos, los cuales consisten principalmente de lignina y celulosa (Pereyra, 2021).

1.1.3.2. Otros microorganismos con celulosa como componente estructural

Varias especies de algas son capaces de sintetizar celulosa como parte de sus paredes celulares, entre estas se describen varias especies de algas rojas, verdes, pardas y microalgas (Zanchetta et al., 2021). Según Steven et al., (2022), *Cladophora sp.* presenta un contenido de celulosa del 20- 30 % en relación con el peso total.

Los tunicados son otros organismos que presentan celulosa en su composición, estos animales marinos presentan celulosa de gran pureza en su túnica y al igual que las algas presentan un problema por su crecimiento descontrolado en ciertas zonas acuáticas (Dunlop et al., 2020; Steven et al., 2022).

En contraparte cabe mencionar que existen otros microorganismos que pueden degradar la celulosa, muchas especies de hongos poseen actividad celulítica y son aprovechados para degradar residuos celulósicos (Gutiérrez-Rojas et al., 2015; He et al., 2022).

1.1.4. Celulosa bacteriana

Dentro de la industria, las bacterias son preferidas para la producción de celulosa por su rendimiento de celulosa. Específicamente, las bacterias del género *Komagataeibacter* han sido determinadas como las más eficientes en la producción de celulosa bacteriana (Szymczak et al., 2022). De estas *Komagataeibacter xylinus* es la más utilizada, ya que produce grandes cantidades del homopolímero extracelular. También se reporta la capacidad para producir celulosa en bacterias como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Xanthococcus* y *Alcaligenes* (Syed Abdullah et al., 2022).

En el proceso por el cual las bacterias producen celulosa la glucosa es transformada en cadenas lineales de β -1,4 glucano, estas cadenas de celulosa son secretadas extracelularmente, en donde se cristalizan para formar monofilamentos de celulosa (M. Gao et al., 2019). Estos monofilamentos se unen para dar paso a fibras filamentosas,

que posteriormente generan una estructura tridimensional y gelatinosa en la parte superficial de un medio de cultivo líquido (Hirai et al., 2002).

La función biológica de la celulosa para las bacterias aún no se ha establecido claramente; sin embargo, según Ross et al., (1991) proporciona protección mecánica, química o biológica. Otros autores mencionan que la película de celulosa ofrece protección frente a la luz ultravioleta, otros organismo o microorganismos e iones de metales pesados. Además, permite que las bacterias tengan fácil acceso a la superficie del medio líquido donde pueden aprovechar la disponibilidad de oxígeno (Chai et al., 2022; Klemm et al., 2001).

1.1.4.1. Biosíntesis de celulosa bacteriana

Se han llevado a cabo varias investigaciones sobre la producción de celulosa por parte de *Komagataeibacter xylinus*. En la Figura 1, se observa que la primera reacción comienza por la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato mediante la acción de la enzima glucoquinasa (GC). Seguidamente la enzima fosfoglucomutasa (FGM) cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato. A continuación, ocurre la conversión de glucosa-1-fosfato en uridina-5'-difosfato-alfa-D-glucosa (UDP-glucosa) mediada por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (UTP) y en presencia de UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (Singhania et al., 2021).

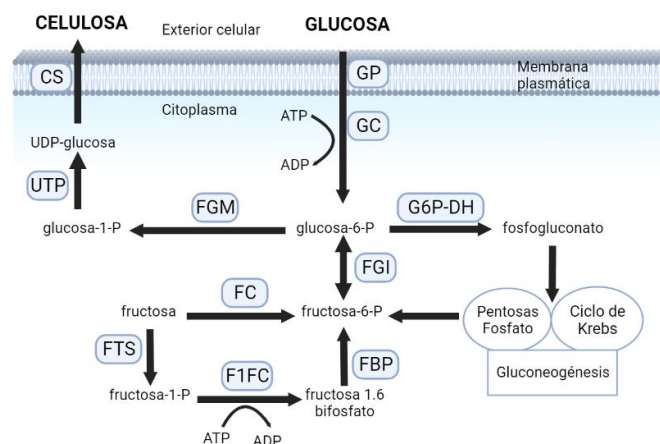


Figura 1. Biosíntesis de celulosa bacteriana

Finalmente, la última conversión se da por la celulosa sintasa (CS) que consta de cuatro subunidades proteicas (BcsA, BcsB, BcsC y BcsD) de estas BcsA y BcsB utiliza UDP-glucosa como precursor para la síntesis de nanofibras de celulosa en el interior citoplasmático de la célula bacteriana, mientras que BcsB y BcsD ayudan a secretar la celulosa en el medio extracelular (**Jang et al., 2019; Morgan et al., 2012**).

1.1.4.2. Propiedades de la celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana presenta una alta pureza debido a su estado libre de lignina, hemicelulosa y pectina, moléculas que generalmente se encuentran en la celulosa proveniente de material vegetal. Adicionalmente, posee características como una excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad (**Gao et al., 2019; Reiniati et al., 2017**). Su estructura tridimensional tiene una alta cristalinidad, alta porosidad, baja densidad en estado seco, excelente permeabilidad y alta retención de agua. Adicionalmente posee elasticidad y adaptabilidad, una alta área de superficie específica, alto grado de polimerización y alta resistencia mecánica en estado de humedad (**Bäckdahl et al., 2006**).

1.1.5. Técnicas de fermentación de celulosa bacteriana

La producción de celulosa bacteriana puede darse por dos métodos, el primero es la fermentación con agitación, en la cual se controlan condiciones de temperatura, pH y revoluciones por minuto (rpm); el segundo es la fermentación estática, en esta únicamente se controlan las condiciones de temperatura y pH (**Lee et al., 2022**). Adicionalmente, el proceso de fermentación puede darse en biorreactores, algunos autores lo consideran como otro método de producción de celulosa. Dentro del cual pueden regularse condiciones como agitación, dimensionamiento del tanque, temperatura, aditivos, oxígeno y concentraciones de nutrientes (**Fernandes et al., 2020**).

Las condiciones de cultivo, los métodos de fermentación, así como las cepas utilizadas tienen gran influencia en las microestructuras y propiedades fisicoquímicas de la celulosa bacteriana (**Gao et al., 2020**). El mayor rendimiento de celulosa se ha

reportado en cultivo estático, además, resulta ser el más eficiente en cuanto a su conformación tridimensional. Sin embargo, el tiempo empleado para la producción de este es mayor en comparación con cultivos con agitación (**Volova et al., 2018**).

1.1.5.1. Cultivo estático

En este método de obtención la celulosa bacteriana se acumula en la unión gas-líquido, su consistencia es similar a una película gelatinosa y toma la forma del recipiente en el cual se produce la fermentación (**Rangaswamy et al., 2015**). La producción de celulosa por este método tiene ciertas limitaciones, ya que requiere de un mayor tiempo de incubación en relación con el método con agitación (**M. Liu et al., 2018**). Adicionalmente, puede considerarse laborioso debido al espacio que requieren los recipientes para el proceso de fermentación (**Aydın & Aksoy, 2014**). Sin embargo, la resistencia mecánica, cristalinidad y el grado de polimerización son característica de la celulosa bacteriana que presentan ventaja en comparación con la celulosa producida en cultivos con agitación (**Fernandes et al., 2020**).

El medio de cultivo H-S es el más utilizado para la producción de celulosa bacteriana, este medio es ideal a escala de laboratorio en trabajos de investigación. Sin embargo, al ser un medio complejo su costo es elevado, por tal motivo, se han planteado el uso de residuos industriales para reemplazar la fuente de carbono en el medio H-S (**Anguluri et al., 2022; Huo et al., 2022; Tsouko et al., 2015**). Adicionalmente, se ha investigado la utilización de estos residuos en medios mínimos y medios minerales. Estos medios generalmente son usados en investigación para un sistema de cribado en el cual, se determinan nuevas fuentes de energía e inhibidores del crecimiento. No obstante, por el bajo costo de los componentes de dichos medios, también son una alternativa para reemplazar medios convencionales en la producción a nivel industrial (**Saiki et al., 2019**).

1.1.6. Fuentes de carbono en medios de cultivo

La selección de la fuente de carbono constituye uno de los aspectos fundamentales para obtener cultivos con alta viabilidad, concentración bacteriana y, por ende, alta

producción de celulosa. Las fuentes de carbono alternativas más usadas son los alcoholes y los hidratos de carbono, fundamentalmente mono y disacáridos (**Suzaki et al., 2015**).

Con respecto a los disacáridos son compuestos de azúcares simples, los cuales necesariamente deben convertirse en monosacáridos previo a su metabolización, ya que estos son azúcares más simples, ejemplo la fructosa, galactosa y la más referente; la glucosa (**Melo Ruiz & Cuamatzi Tapia, 2004**). Por tal motivo, la hidrólisis de residuos orgánicos para la obtención de productos de valor agregado es una idea que se ha implementado en varias industrias, existen distintos tipos de hidrólisis como la ácida, térmica, enzimática o una combinación de ellas (**Cheong et al., 2018**).

1.1.6.1.Cascara de cacao

En la elaboración de productos a base de cacao, la cáscara de este se convierte en un residuo, cuando éste se deposita sobre el suelo de las plantaciones incrementa las posibilidades de infecciones causadas por hongos. Además, el gas metano que se genera de estos residuos por el proceso de descomposición impacta en el medio ambiente (**Díaz-Oviedo et al., 2022**). En contra parte, se informa que el consumo de cascarilla y cáscara de cacao aportan antioxidantes naturales que inactivan los radicales libres dentro del organismo, previniendo enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (**Teneda et al., 2019**). Además, se han realizado diversas investigaciones para determinar la composición de la cáscara de cacao de acuerdo a varios factores ambientales. Según **Resano et al., (2022)**, se ha determinado la presencia de fenoles, carbohidratos, proteínas, grasas y fibra

1.1.6.2.Bagazo de caña

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en Ecuador, la provincia del Guayas cultiva el 88% de caña de azúcar, seguido por Imbabura con el 6%, Loja con el 4% y Cañar con el 2% (**MAG, 2022**). Este cultivo es muy aprovechado por su jugo puesto que contiene sacarosa, glucosa y fructosa, mientras que la fibra contiene celulosa, hemicelulosa y lignina (**Kim & Day, 2011**).

El bagazo es la materia que deja el proceso de extracción del jugo de la caña de azúcar y constituye un subproducto heterogéneo fibroso en cuanto a su composición estructural. Además, este presenta una baja densidad por el proceso de extrusión. Adicionalmente presenta un gran potencial para ser reutilizado en la producción de otros materiales por la gran cantidad de fibra (**Chandler et al., 2012**). Uno de los usos habituales es como materia prima en la fabricación de diversos muebles, producción de bioetanol y producción de energía eléctrica (**Resano et al., 2022**).

1.1.7. Aplicaciones industriales de la celulosa bacteriana

1.1.7.1. Industria alimentaria

La celulosa bacteriana se ha consumido tradicionalmente en distintas regiones del mundo, tradicionalmente el proceso de obtención se basa en la fermentación de jugos de frutas u otras savias (**Huo et al., 2022**). La celulosa resultante de la fermentación adquiere la coloración o sabor del medio en el cual se la realiza (**Choi et al., 2022**). Adicionalmente, se ha determinado que la celulosa bacteriana funciona como una prometedora fibra dietética al ser suplementada con otros alimentos (**Zhai et al., 2018**). Por otra parte, también es utilizada como material de envasado para alimentos frágiles, como agente espesante en cárnicos y embutidos (**Choi et al., 2022**).

1.1.7.2. Industria biomédica

Existen varios productos comerciales que utilizan la celulosa bacteriana como apósitos para tratar heridas por quemaduras y úlceras en pacientes (**Czaja et al., 2007**). La celulosa bacteriana tiene la ventaja de cumplir con todos los requerimientos que deben tener un material para ser un apósito ideal: no tóxico, no adherente, no provocar traumatismos al retirar el apósito, aislamiento térmico en el área de la herida, permitir intercambio gaseoso, mantener un ambiente húmedo, absorber exudados y prevenir infecciones microbianas (**Niculescu & Grumezescu, 2022**).

En biomedicina, la celulosa además se utiliza como andamios para el crecimiento de células humanas, asimismo cuando esta se combina con otros materiales o biomateriales son usados como implantes de diferentes partes del cuerpo humano. Además, las membranas de celulosa también son usadas como sistemas de administración de fármacos (**Almeida et al., 2014; Y. Liu et al., 2023; Ullah et al., 2023**).

Recientemente, el principal derivado de la celulosa bacteriana, la nano-celulosa, ha ganado un nivel significativo de atención por parte de investigadores, académicos e industriales debido a las aplicaciones que pueden tener cuando la celulosa, adquiere un tamaño nanométrico. Entre estas se encuentran la entrega de medicamentos e inmovilización de enzimas/proteínas, además de tiene gran importancia en biorremediación de fuentes de agua (**Abdelhamid & Mathew, 2021; N. Lin & Dufresne, 2014**).

1.1.8. Nano-celulosa

En estado natural no existen partículas libres de nano-celulosa, sino más bien está se trata de un derivado de la celulosa, la cual está compuesta por microfibras, la cual a su vez está compuesta de nano fibras de nano-celulosa como se observa en la Figura 2 (**Habibi et al., 2010**). Esta cuenta con una estructura rígida en forma de barra con un diámetro de 1 a 100 nm (**Lee et al., 2014**). Y se puede obtener por tratamientos enzimáticos, mecánicos o químicos, los cuales rompen los enlaces que estabilizan la estructura tridimensional de la celulosa (**Abdelhamid & Mathew, 2021; N. Lin & Dufresne, 2014**).

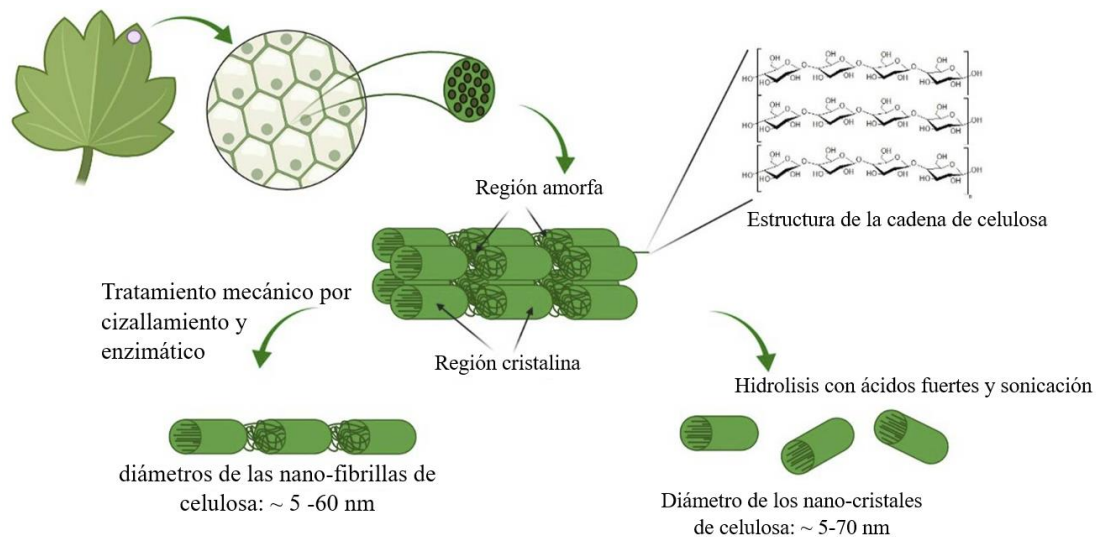


Figura 2. *Composición y estructura de material lignocelulósico*

Fuente: Adaptada de Nanocellulose-based scaffolds for chondrogenic differentiation and expansión. Donde se observa el proceso de obtención de nano-celulosa a partir de materia vegetal. Por Szustak & Gendaszewska-Darmach, (2021)

1.1.8.1. Estructura y composición

Como se observa en la Figura 3 las cadenas de D-glucosa se organizan en nanofibras de 1,5 a 3,5 nm de ancho (**Habibi et al., 2010**) y tienen una longitud variable que puede ir desde el nivel nanométrico al micrométrico (**Huo et al., 2022**). Cada subunidad de D-glucosa adoptan una conformación de silla y está ubicada 180° con respecto al resto de subunidades, al segmento conformado por dos subunidades se lo conoce como celobiosa. La estabilidad de la estructura se da por los enlaces glucosídicos intramoleculares, estos se establecen entre el grupo hidroxilo (-OH) del oxígeno 3, de una subunidad y el oxígeno 2 del anillo de la unidad contigua. Además, se dan enlaces glucosídicos entre el hidroxilo (-OH) del oxígeno 2 y el oxígeno 6 del grupo hidroxilo (-OH) de otra nanofibra (**Habibi et al., 2010**).

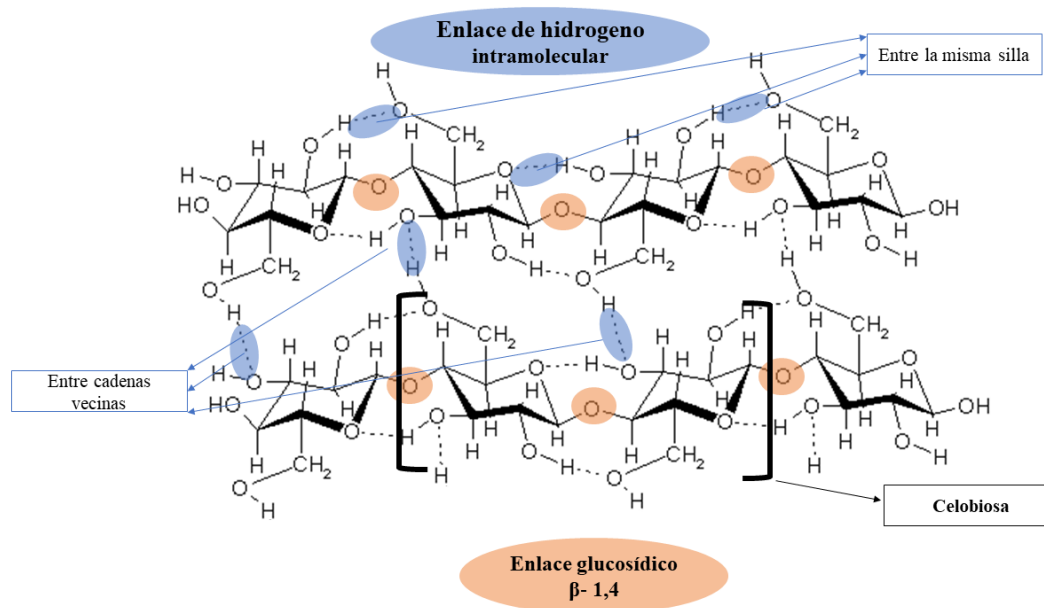


Figura 3. Estructura química de celulosa bacteriana

Fuente: Adaptada Cellulosic ethanol and the future of biofuels: from carbohydrates to hydrocarbons. Donde se observa la estructura molecular de la celulosa. Por **Kallos & Apostolopoulou, (2007)**

1.1.9. Métodos de obtención de nano-celulosa

Para la obtención de nano-celulosa existen varios métodos que incluyen algunas ventajas según el tipo de aplicación a la cual se destine. Los principales métodos de obtención de nano-celulosa es la hidrólisis con ácido sulfúrico, oxidación TEMPO, tratamiento mecánico, homogeneización a alta presión y tratamiento ultrasónico (**Zhaoyi et al., 2021**). Entre los diferentes métodos de obtención, también se debe tomar en cuenta la fuente de la cual proviene la celulosa, dentro de las que incluyen métodos biológicos, fisicoquímicos, químicos y mecánicos (**Jiang et al., 2015**).

1.1.9.1. Tratamiento químico (ácido)

La hidrólisis ácida produce normalmente nanocristales o nanoesferas de celulosa (CNC), pueden provenir de celulosa de diferentes fuentes (plantas, bacterias o algas). Los CNC se asemejan en tamaño a las nanofibras de celulosa (CNF), estas últimas cuentan con longitudes variables e inferiores a 100 nm, con un diámetro de 4 a 20 nm.

Mientras que el diámetro de las CNC es de 3 a 5 nm. Aunque comparten un tamaño similar, los CNC presentan una mayor rigidez debido a su estructura cristalina, en contraste los CNF contiene regiones amorfas y cristalinas haciéndolas más flexibles (Huo et al., 2022; Norizan et al., 2022).

1.1.9.2. Tratamiento mecánico

Para los métodos mecánicos se incluyen dispositivos como homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores, microtrituradores y dispersores de ultrasonido de alta intensidad. A pesar de ello, algunos de estos equipos incluyen varios pasos mediante el equipo de desintegración, además de requerir un elevado consumo de energía para lograr superar los enlaces de hidrógeno interfibrilares. De igual manera buscan cumplir con la deslaminación eficiente de las fibras de celulosa, para lograr liberar las nanofibras (Huo et al., 2022; Wulandari et al., 2016).

1.1.10. Pruebas de caracterización de nano-celulosa

Es necesario reconocer varias de las propiedades físicas de las nanopartículas para lograr definir si se trata de nanofibras o nanoesferas, además de determinar su tamaño, morfología, estructura. Para lo cual se recomienda realizar evaluaciones mediante Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (Lee et al., 2014; Norizan et al., 2022).

1.1.10.1. Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica permite el análisis de grupos funcionales en compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, el fundamento radica en que la radiación infrarroja a la cual es expuesta la muestra puede atravesarla o esta puede ser absorbida. La señal de esta interacción es detectada y genera un interferograma, el cual mediante la transformada de Fourier es transformado en un espectro FTIR (Berna, 2017; Thermo Fisher Scientific, 2023). Este espectro ofrece bandas que son características de la vibración de cada grupo funcional (Khan et al., 2018).

En el caso de la nano-celulosa, FTIR busca determinar si existe algún tipo de variación en la composición de esta, ya que puede ser influenciada por la presencia de otras moléculas como la lignina o hemicelulosa, en el caso del proceso de purificación de la celulosa vegetal. Así también se puede identificar grupos sulfatos cuando la nano-celulosa fuese obtenida por tratamientos ácidos (**Berna, 2017; Volova et al., 2018**).

1.1.10.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

SEM permite la obtención de imágenes nanoscópicas de muestras biológicas, orgánicas e inorgánicas, por tanto, es usada en ciencias biológicas, ciencia de materiales y la de semiconductores (**Dahmen et al., 2016**).

El fundamente se basa en la interacción de un haz de luz primario cuando entra en contacto con la muestra, las señales de dicha interacción pueden ser electrones, rayos X y fotones, los cuales son captados e interpretados por detectores específicos para cada señal. Estos detectores crean imágenes de alta resolución de la muestra (**CARR et al., 1982; Zergane et al., 2020**). En este caso el análisis de SEM para las nanopartículas permite caracterizar su morfología, geometría y distribución. La mayoría de las micropartículas tienden a presentar forma de varilla semejante a una fibra, lo cual puede determinar la influencia del método de hidrólisis (**Theivasanthi et al., 2018**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Obtener nano-celulosa bacteriana utilizando hidrolizados de bagazo de caña y cáscara de cacao.

1.2.2. Objetivos específicos

- Producir celulosa bacteriana a partir de hidrolizados de bagazo de caña y cáscara de cacao en medios mínimos modificados.
- Generar nano-celulosa mediante tratamientos químicos y mecánicos.
- Caracterizar la nano-celulosa obtenida por tratamientos químicos y mecánicos.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Se presentan a continuación los materiales empleados en el presente trabajo de investigación (reactivos, equipos de laboratorio y material fungible):

2.1.1. Material fungible

- Agitadores magnéticos
- Balones de aforo (25 mL; 100 mL; 500 ml; 1000 mL)
- Caja de guantes de nitrilo (100 u)
- Cajas Petri
- Cubetas UV/Vis desechables
- Frascos tapa rosca azul (100 mL; 500 mL; 1000 mL)
- Gradilla para tubos Eppendorf
- Gradilla para tubos Falcon
- Matraz Erlenmeyer (250 ml; 500 mL)
- Mecheros
- Probetas (10 ml; 500 mL)
- Puntas para micropipetas (2 – 20 μ L; 20 – 200 μ L; 100 – 1000 μ L; 1 – 10 mL)
- Rotuladores
- Tubos eppendorf (1,5 ml)
- Tubos Falcon (15 mL; 50 mL)
- Vasos de precipitación (100 mL; 250 mL; 500 ml)

2.1.2. Reactivos

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
- Ácido clorhídrico 37 % (HCl)
- Ácido sulfúrico concentrado 96 % (H_2SO_4)
- Bacto agar
- Cloruro de calcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Cloruro de sodio (NaCl)

- Etanol 70 %
- Etanol 95 %
- Extracto de levadura
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Glucosa
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Peptona
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Tartrato doble de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

2.1.3. Equipos de laboratorio

- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110)
- Balanza analítica (Adventurer Pro/OHAUS)
- Cámara de flujo laminar tipo 1 (OptiMAIRR)
- Centrifuga (para tubos de 1,5 mL)
- Centrifuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen) (para tubos de 15 mL y 50 mL)
- Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Estufa
- Horno secador GANDER MTN
- Incubadoras
- Micropipetas
- Micropipetas (2 – 20 μL ; 20 – 200 μL ; 100 – 1000 μL ; 1 – 10 mL)
- Mini Spray Dryer BUCHI-B290
- Molinillo eléctrico de café
- Plancha de agitación y calentamiento
- Potenciómetro (Mettler Toledo Seven Compact)
- Refrigerador/congelador (LG)
- Ultra congelador (Binder)
- Vortex MIXER

2.2.Métodos

2.2.1. Recolección de residuos de agroindustrias utilizados como fuentes de carbono

Se obtuvieron 4 kilos de bagazo de caña de la parroquia Totoras Km 5 ½ vía a Baños provincia de Tungurahua. De la misma manera se compraron 4 kilos de cacao de la finca “Familia García” en el cantón Lago Agrio de la provincia de Sucumbíos. Estas muestras fueron transportadas hasta los laboratorios de la UODIDE en Universidad Técnica de Ambato, donde se procesaron las muestras de acuerdo con la metodología establecida.

2.2.2. Molienda de residuos agroindustriales

Se extrajeron el mucilago y los granos del cacao para obtener la cáscara del mismo, posteriormente los dos residuos (bagazo de caña y cáscara de cacao) fueron cortados y deshidratados al someterlos a 60 °C durante 24 horas. Posteriormente, los residuos fueron triturados en un molinillo eléctrico hasta reducirlos a una consistencia fina y similar a la del polvo o harina (**Christiansen, 2012**).

2.2.3. Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis de los residuos agroindustriales (bagazo de caña y cascara de cacao)

La determinación de las condiciones de hidrólisis permitió conocer el tratamiento que generó mayor concentración de azúcares reductores a partir de los residuos agroindustriales. Se consideró como variables independientes a los tratamientos empleados para la hidrólisis (Tabla 1), mientras que los azúcares reductores liberados se consideraron como la variable dependiente. Para el análisis de los resultados, los datos fueron analizados con ayuda de un programa estadístico, utilizando un ANOVA simple con un 95% de confianza.

Se evaluaron dos tratamientos para la hidrólisis: (1) En agua más un ciclo de esterilización en autoclave (121°C por 30 min a una presión de 15 Psi) y (2) En H₂SO₄ al 2.0 % v/v más un ciclo de esterilización en autoclave (121°C por 30 min a una presión de 15 Psi) (Ayala et al., 2021). Adicionalmente, se incluyó un control, el cual

consistía en un tratamiento donde los residuos se suspendieron en agua sin condiciones de esterilización por autoclave (121°C por 30 min a una presión de 15 Psi). Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento de hidrólisis.

Tabla 1. *Tratamientos del diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis*

Tratamientos	Observaciones
1. Control (Agua)	3
2. Agua + ciclo de autoclave (121°C, 30 min y 15 Psi)	3
3. (H ₂ SO ₄ al 2.0 % v/v) + ciclo de autoclave (121°C, 30 min y 15 Psi)	3

La hidrólisis se realizó en microtubos de 1.5 mL, a los cuales se agregó masa de cada molienda (cáscara de cacao y bagazo de caña) y el volumen de los solventes de cada tratamiento (agua y H₂SO₄ al 2.0 % v/v) para llegar a una concentración del 10 % (p/v). Todos los tratamientos se homogenizaron con ayuda de un vórtex, seguidamente, los microtubos se recubrieron de papel aluminio para evitar derrame de ácido al ser sometidos a las condiciones de esterilización por autoclave. Para concluir con la hidrólisis, los microtubos fueron enfriados hasta llegar a temperatura ambiente y se procedió a clarificarlos mediante centrifugación a 12 000 × g durante 20 min (**Cheng et al., 2019**).

Se utilizó el método del ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) para determinar la concentración de azúcares reductores en cada tratamiento de hidrólisis. Para esto, previamente se neutralizó el tratamiento ácido mediante la adición de NaOH (5M). A continuación, en microtubos con tapa rosca de 1.5 mL se mezclaron 100 µL del hidrolizado diluido con 100 µL del reactivo DNS (relación 1/1). Estos se incubaron a 100 °C en un baño seco durante 5 min. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo durante 10 min. Para determinar la concentración de azúcares reductores, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm (**Deshavath et al., 2020**). Se empleó una curva estándar con glucosa como referencia para realizar la medición de azúcares reductores en las muestras (Anexo A 5).

2.2.4. Reactivación de cepas

2.2.4.1. Cepas bacterianas

Para la producción de celulosa bacteriana con diferentes fuentes de carbono se utilizó la cepa *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004, adquirida de la colección DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig Alemania y que actualmente se encuentra disponible en el cepario perteneciente a la Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía, PhD., docente-investigadora de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato. Mientras que, las cepas acéticas “PDC 21” y “PDC 25” fueron obtenidas por **Dávalos & Cerda (2022)** “Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos” y actualmente se encuentran dentro del cepario mencionado anteriormente.

2.2.4.2. Pre-cultivo en medio líquido

Se realizaron cultivos bacterianos de las cepas PDC 21, PDC 25 y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 en medio H-S solidificado con bacto agar y pH 6 (Anexo B 1), para lo cual, las cepas PDC 21 y PDC 25 se dejaron incubar por 10 días a 25 °C, mientras que *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 se dejó incubar por 10 días a 30 °C. Posteriormente, el pre-cultivo se realizó en condiciones estáticas, transfiriendo una colonia de cada cultivo al caldo H-S en tubos Falcon durante 10 días, temperatura correspondiente a cada cepa y pH 6 (**Dávalos P & Liliana C, 2022; Li et al., 2021; Raiszadeh-Jahromi et al., 2020**).

Posteriormente, el volumen de inóculo fue obtenido del pre-cultivo, al trasvasar la celulosa formada a un medio líquido fresco de H-S, seguidamente se vibró la celulosa en el medio para liberar las células unidas a la misma. Para ajustar la densidad celular de los inóculos de cada cepa, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis, en el cual se midió la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600 nm. La DO de cada inoculo se ajustó aproximadamente a 0,1. Cabe aclarar que la estimación de la densidad celular es subjetiva, debido a que el tamaño de las células bacterianas y la configuración del espectrofotómetro influyen en los análisis (**Mira et al., 2022**).

2.2.5. Composición de medios mínimos (MM) para la producción de celulosa bacteriana

Los residuos industriales se usaron como sustitutos de la fuente de carbono (D-glucosa) en el medio mínimo, estos fueron sometidos al tratamiento de hidrólisis óptimo para la obtención de azúcares reductores, previamente descrito en el apartado 2.2.3. Para determinar el volumen de los hidrolizados a emplear en los medios de cultivo, se cuantificó la concentración de azúcares reductores en los hidrolizados empleando el método DNS, descrito en el apartado 2.2.3. Posteriormente, el medio se ajustó a pH 6 y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Para el medio mínimo estándar se utilizó glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo.

2.2.6. Producción de celulosa bacteriana en MM modificado estático

Para iniciar la fermentación, se agregaron 50 mL del medio mínimo estándar y modificado en cada matraz Erlenmeyer. Posteriormente, se inoculó cada matraz con un volumen inicial de 1 mL de los medios líquidos que previamente se ajustaron a la densidad celular requerida para cada cepa. Finalmente, se dejó incubar en condiciones estáticas durante 15 días a las temperaturas requeridas por cada cepa (**Volova et al., 2018**) (**Raiszadeh-Jahromi et al., 2020**).

2.2.7. Purificación de la celulosa bacteriana

La película de celulosa bacteriana se retiró de la superficie del medio de cultivo y posteriormente se lavó con agua destilada. Seguidamente fueron calentadas a una temperatura de 60 °C en una solución de NaOH al 1 % p/v durante 20 min para eliminar restos de células bacterianas y otros componentes del medio del cultivo (**Anguluri et al., 2022**). Finalmente, las películas se enjuagaron con agua destilada hasta neutralizar la celulosa, el pH se comprobó utilizando una solución de fenolftaleína al 1 %.

2.2.8. Rendimiento de la celulosa bacteriana

El rendimiento total de la celulosa bacteriana se determinó como, el peso de la celulosa seca por cada 50 mL del medio de cultivo (g/L) (**Volova et al., 2018**). Para esto, la

celulosa previamente purificada se secó sobre papel encerado a 60 °C en una estufa, hasta que el peso de la celulosa bacteriana permanezca constante (Lee et al., 2022).

2.2.9. Diseño experimental

En el trabajo de investigación se aplicó un diseño factorial AxB, en donde el primer factor analizado fue la fuente de carbono (cáscara de cacao, bagazo de caña y glucosa), el segundo factor fueron las cepas acéticas (“PDC 21” y “PDC 25” y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004). La variable respuesta fue el rendimiento de la celulosa bacteriana obtenido. A continuación, en la Tabla 2 se muestran los factores y niveles a evaluar en este estudio.

Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental

Factores	Niveles
A: Fuente de carbono	a1: Glucosa (estándar)
	a2: Bagazo de caña
	a3: Cáscara de cacao
B. Cepa acéticas	b1.” PDC 21”
	b2. “PDC 25”
	b3. “ <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004”

- **Hipótesis**

- ✓ **Hipótesis nula**

El tipo de residuo agroindustrial y las cepas acéticas utilizadas no influyen significativamente en la obtención de celulosa bacteriana en medio mínimo mínimo modificado.

✓ **Hipótesis alternativa**

El tipo de residuo agroindustrial y las cepas acéticas utilizadas influyen significativamente en la obtención de celulosa bacteriana en medio mínimo mínimo modificado.

• **Variables**

✓ **Variables dependientes**

Rendimiento de la celulosa

✓ **Variables independientes**

- Fuente de carbono (cáscara de cacao, bagazo de caña y glucosa)
- Cepas acéticas (PDC 21, PDC 25 y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004)

2.2.10. Generación de nano-celulosa mediante tratamientos químicos y mecánicos

Para este objetivo se siguió la metodología descrita anteriormente en el apartado 2.2.7, “purificación de celulosa bacteriana”, utilizando el medio de cultivo y la cepa que tuvieron el mayor rendimiento.

2.2.10.1. Tratamiento químico (ácido)

La celulosa bacteriana fue sometida a hidrólisis ácida, mediante la adición de ácido clorhídrico 5M y celulosa bacteriana purificada a un tubo Falcon, la reacción se dejó incubar a 50 °C en una estufa durante 48h. Posteriormente las muestras fueron neutralizadas mediante lavados sucesivos con agua destilada (**Huo et al., 2022; Kwon et al., 2020**).

2.2.10.2. Tratamiento mecánico (Homogeneizador)

La solución de celulosa bacteriana fue sometida a un proceso de homogeneización mediante un homogeneizador de alta velocidad (MTOPS-SR30) a tercera velocidad, este proceso se repitió 4 veces en intervalos de tiempo de 1 min, la duración del proceso

de homogenización fue de 3 min entre cada repetición. Para esto, se pesó celulosa deshidratada a temperatura ambiente por 5 min y se suspendió en agua dentro de un tubo Falcon en una proporción (1/15). Adicionalmente, los tubos falcons se sumergieron en hielo durante el proceso de homogenización (Norizan et al., 2022).

2.2.11. Caracterización de la nano-celulosa generada por tratamientos químicos y mecánicos

2.2.11.1. Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier FTIR

La caracterización a través de FTIR se realizó con el Espectroscopio Infrarrojo por la Transformada de Fourier acoplado con el módulo Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) ubicado en el Laboratorio de Canje Deuda - España de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Para este análisis, se tomaron muestras húmedas de la nano-celulosa obtenida por los dos tratamientos de hidrólisis (químico y mecánico) y se colocaron en el módulo de ATR. Se registraron espectros de las celulosas de ambos tratamientos con sus picos en las bandas más representativas y adicionalmente se corrió un espectro con las celulosas de ambos tratamientos y una celulosa comercial (Avicel). Se usó un rango espectral entre 500 y 4000 cm^{-1} (Bang et al., 2021).

2.2.11.2. Microscopía electrónica de barrido SEM

Se evaluó la morfología y tamaño de la nano-celulosa bacteriana obtenida por dos tratamientos de hidrólisis (químico y mecánico) mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (MIRA 3, TESCAN, Brno, República Checa), presente en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).

Para esto la muestra se fijó en un porta muestras de aluminio con cinta de carbón. Seguidamente, se realizará un recubrimiento metálico con un equipo de bomba rotativa, por pulverización catódica (Q150R ES, Quorum, Laughton, Reino Unido).

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión

3.1.1. Determinación de las condiciones óptimas para la hidrólisis de los residuos agroindustriales (bagazo de caña y cáscara de cacao)

Los resultados de la concentración de azúcares reductores por cada 100 mg de residuo industrial, que incluye la cáscara de cacao y bagazo de caña, obtenidos a través de los dos métodos de hidrólisis se presentan en la Figura 4. Como se observa, la mayor concentración de azúcares reductores se obtuvo del método de hidrólisis en H₂SO₄ al 2.0 % v/v, el cual fue sometido a un ciclo de autoclave (121°C, 30 min y 15 Psi).

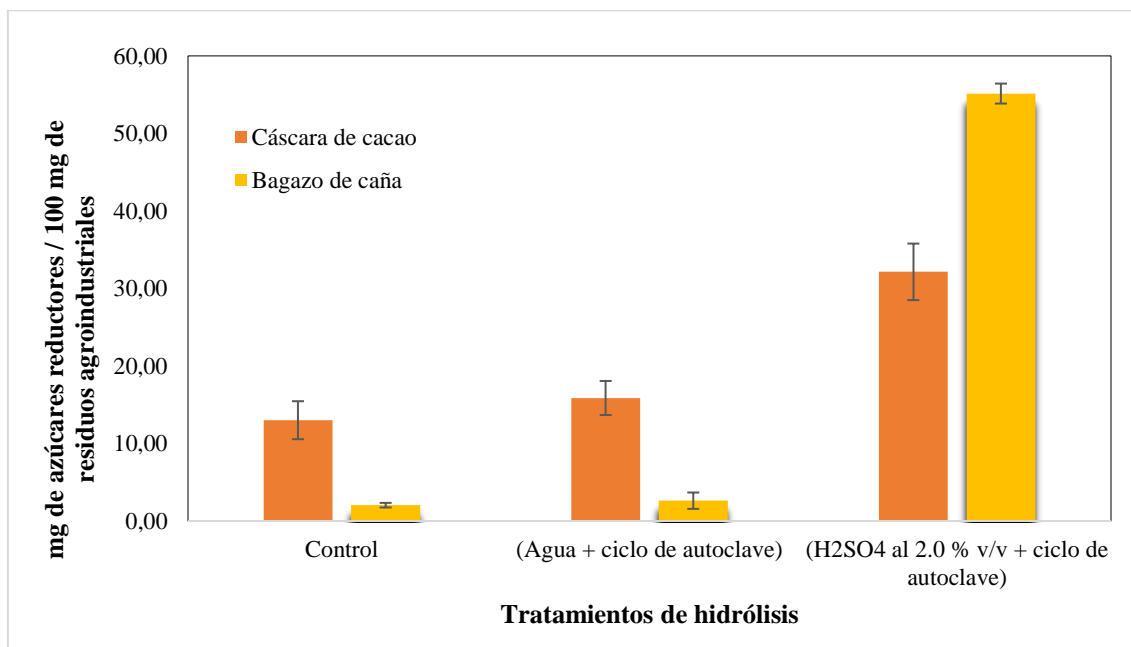


Figura 4. Concentración de azúcares reductores en cáscara de cacao y bagazo de caña, obtenidos por los dos métodos de hidrólisis

El control determinó la concentración de azúcares reductores presentes en la cáscara de cacao y bagazo de caña (Anexo A 1). La concentración en la cáscara de cacao fue de 13,00 mg, con una desviación estándar de $\pm 2,45$ mg de azúcares reductores por cada 100 mg de cáscara de cacao. Se observó una amplia variabilidad en las concentraciones reportadas por diversos autores, los cuales muestran concentraciones que están dentro de un rango de 2,93 a 11,36 mg de azúcares reductores por cada 100 mg de cáscara de cacao (Díaz-Oviedo et al., 2022; Maldonado, 2018; Teneda et al., 2019; Yaya et al., 2023). Según Castillo et al., (2018), existen factores como: sequías prolongadas,

manejo agronómico, variedad cultivada y periodo de cosecha; que influyen sobre la composición química y nutricional del fruto de cacao.

De igual manera se determinó que la concentración de azúcares reductores en el bagazo de caña fue de 2,04 mg, con una desviación estándar de $\pm 0,29$ mg de azúcares reductores por cada 100 mg de bagazo de caña. Este valor entra dentro del rango reportado por **(Francisco & Moreno, 2007)**, donde se menciona que, dependiendo del estado de la madurez de la caña, la concentración de azúcares reductores está dentro de 1 a 5 mg/ 100 mg de caña.

El tratamiento con H_2SO_4 al 2.0 % v/v empleado en la hidrólisis de cáscara de cacao y bagazo de caña mostró concentraciones de azúcares reductores superiores al control y al tratamiento alterno (agua + ciclo de autoclave). Por cada 100 mg de cáscara de cacao de obtuvieron 32,14 mg, con una desviación estándar de $\pm 3,65$ mg azúcares reductores. Esta concentración se asemeja a la obtenida por **Maldonado, (2018)**, quien obtuvo 32,36 mg de azúcares reductores al utilizar 0,5 % de ácido sulfúrico y 125 °C por un tiempo de 15 min. De igual manera se estableció que de 100 mg de bagazo de caña se obtuvieron 55,14 mg de azúcares reductores, con una desviación estándar de $\pm 1,29$ mg. En un estudio realizado por **Chandler et al., (2012)**, se alcanzaron 32,14 mg de azúcares reductores por cada 100 mg de bagazo de caña. En otro estudio se determinó que la concentración de azúcares reductores depende de variables como el tiempo de hidrólisis y la temperatura **(Ferrer et al., 2002)**.

El incremento en la concentración de azúcares reductores en el tratamiento con H_2SO_4 al 2.0 % v/v se produce debido a la hidrólisis de los enlaces glucosídicos presentes en la hemicelulosa y celulosa. Mismos que están formados por monómeros de D-glucosa, los cuales son liberados durante la hidrólisis **(Gutiérrez-Rojas et al., 2015)**. Por tal motivo, el porcentaje de azúcares reductores obtenidos del proceso de hidrólisis ácida está directamente relacionado al porcentaje de celulosa **(Jiang et al., 2015)** y hemicelulosas presentes en el material vegetal **(Riaño et al., 2012)**.

Según **Riaño et al., (2012)** la cáscara de cacao presenta 26,24 % de celulosa y 5,38 % de hemicelulosa. Mientras que el bagazo de caña presenta valores dentro de un rango del 40 – 60 % de celulosa y del 20 – 40 % de hemicelulosa (**Ferrer et al., 2002**). La presencia de mayor contenido de celulosa y hemicelulosa en el bagazo de caña explica la diferencia en la concentración de azúcares reductores posterior al método de hidrólisis, entre la casara de cacao y el bagazo de caña (**Chandler et al., 2012**).

En la Figura 5 se muestra el gráfico de cajas para los tratamientos de hidrólisis y el control. Dónde el control y el tratamiento (agua + ciclo de auto clave) no presenta una diferencia estadísticamente significativa; mientras que, el tratamiento de (H_2SO_4 al 2.0 % v/v + ciclo de autoclave), si presenta una diferencia estadísticamente significativa con el control y el tratamiento de (agua + ciclo de auto clave). Lo cual se corrobora con los análisis estadísticos de análisis de varianza (ANOVA) (Anexo A 2) (Anexo A3) de los tratamientos de hidrólisis y el control, estableciendo que existe una diferencia estadísticamente significativa, ya que el valor $p=0.0003$ fue menor al esperado ($p=0.05$) en el caso de la hidrólisis de cáscara de cacao y en el caso de la hidrólisis del bagazo de piña el valor $p=0$ fue menor al esperado ($p=0.05$).

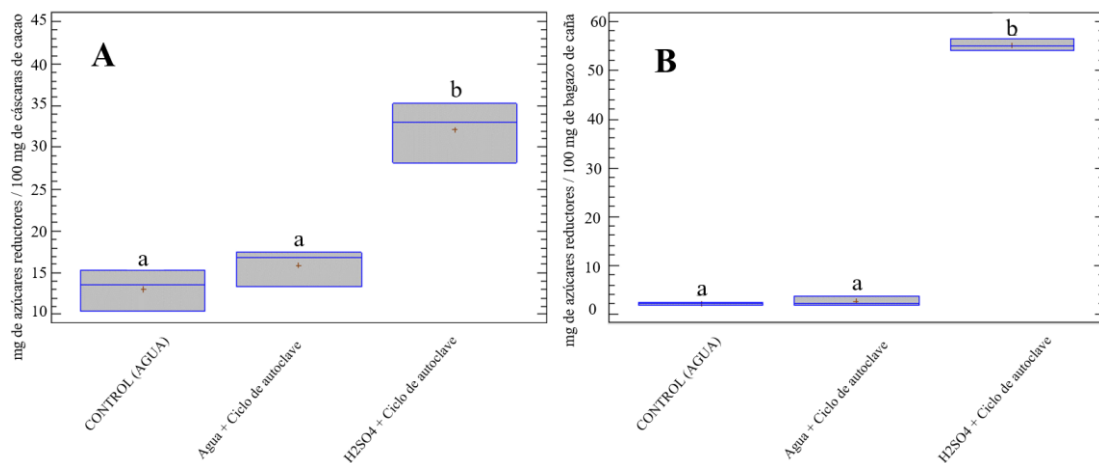


Figura 5. Gráfico de cajas para la concentración de azúcares reductores

A. Rendimiento de azúcares reductores de cáscara de cacao. B. Rendimiento de azúcares reductores de bagazo de caña. B. Los tratamientos que presenten las mismas letras (**a** o **b**) no representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de múltiples rangos

De acuerdo con el gráfico de cajas los tratamientos de hidrólisis de cáscara de cacao y bagazo de caña con H_2SO_4 , son los que producen mayor concentración de azúcares reductores. Mientras que la concentración de azúcares reductores obtenidos con el tratamiento de hidrólisis con agua y el control, presentan valores similares. Esto se corrobora con la prueba de rangos múltiples, en la cual el control y la hidrólisis con agua como disolvente no presentaron diferencias significativas en ambos desechos agroindustriales.

3.1.2. Rendimiento de la celulosa bactriana

En la presente investigación se analizaron fuentes de carbono de bajo costo como la cáscara de cacao y bagazo de caña, previamente hidrolizados, para la producción de celulosa bacteriana. En la Figura 6, se muestra el rendimiento (g/L) de celulosa bacteriana en medios de cultivo mínimos que fueron modificados mediante la sustitución de glucosa por otras fuentes de carbono. Se obtuvieron concentraciones de 13,71 y 14,16 g/L de azúcares fermentables por litro de medio de cultivo para cáscara de cacao y bagazo de caña, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó el rendimiento (g/l) de celulosa por dos cepas acéticas (PDC21 Y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004).

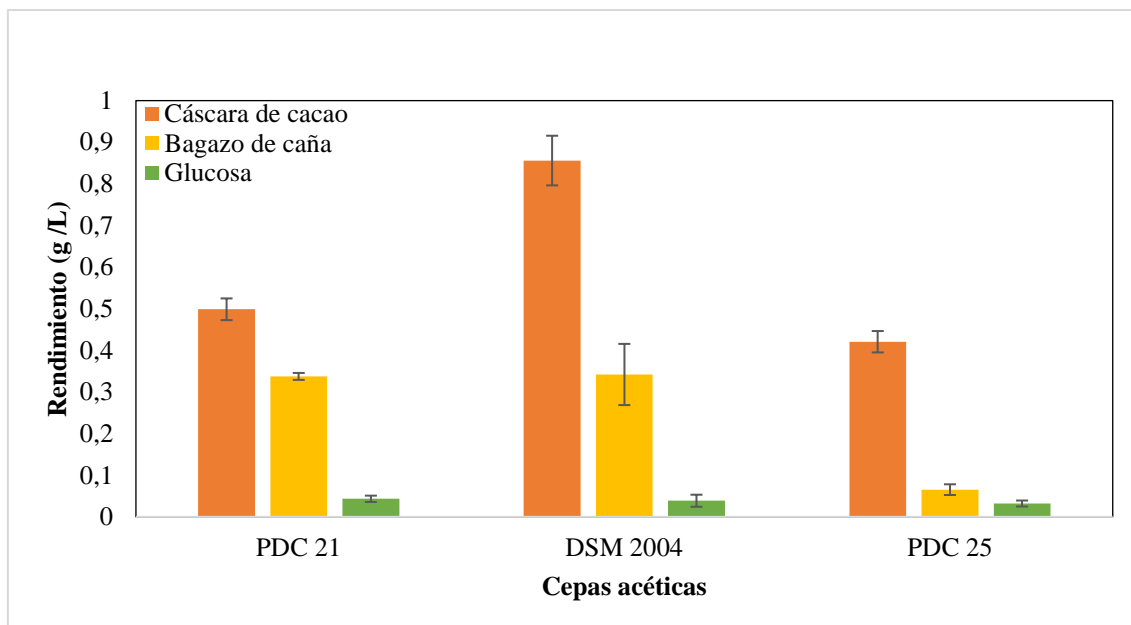


Figura 6. Rendimiento de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de cacao y bagazo de caña)

Como se muestra en la Figura 5, se obtuvo el mayor rendimiento (g/L) al utilizar hidrolizados de cáscara de cacao (PDC 21 0,49 g/L; PDC 25 0,42 g/L y DSM 2004 0,86 g/L) y bagazo de caña (PDC 21 0,34 g/L; PDC25 0,07 g/L y DSM 2004 0,34 g/L), con relación al medio de cultivo mínimo estándar que utiliza glucosa como fuente de carbono (PDC 21 0,04; PDC25 0,03 y DSM 2004 0,04 g/L) (Anexo B 2)

El aumento del rendimiento al sustituir la glucosa por azúcares fermentables provenientes de residuos en medios de cultivo ya ha sido reportado en varias investigaciones. **Raiszadeh-Jahromi et al., (2020)**, menciona que el empleo de fuentes de carbono alternativas en el medio de cultivo H-S, ofrece una ventaja significativa debido a sus bajos costos y al aumento en el rendimiento de celulosa (**Vazquez et al., 2013**). Según **Mani Pujitha et al., (2018)**, el incremento del rendimiento se debe a los componentes nutricionales presentes en los hidrolizados. En la cáscara de cacao se han determinado azúcares, polifenoles, proteína, grasa y fibra cruda, mientras que en el bagazo de caña presenta en mayor concentración azúcares y fibra cruda (**Resano et al., 2022; Yaya et al., 2023**).

Según estudios realizados por **Z. Cheng et al., (2016)** & **Son et al., (2003)**, se observa una diferencia en los rendimientos de celulosa obtenidos por la misma bacteria, *Acetobacter xylinum*, al utilizar dos tipos de medios de cultivo, medio H-S y medio mínimo. Los resultados mostraron que al utilizar medio H-S se obtuvo una cantidad de celulosa de 1,87 g/L; mientras que, al emplear el medio mínimo, el rendimiento fue de 0,22 g/L. En esta investigación, los rendimientos obtenidos al utilizar el hidrolizado de cacao como fuente de carbono fueron superiores a los reportados por **Son et al., (2003)**, específicamente, las cepas PDC 21, PDC 25 y DSM2004. Las cuales mostraron rendimientos de celulosa de 0,49 g/L, 0,42 g/L y 0,86 g/L. Adicionalmente, estos rendimientos están dentro del rango de valores reportados para las cepas de *K. xylinus* en medio H-S con glucosa (0,24 -3,1 g/L) (**Esmail et al., 2022; Mikkelsen et al., 2009**).

Adicionalmente, se observó que los medios de cultivo con bajas concentraciones de azúcares reductores: cáscara de cacao (13,71 g/L) y bagazo de caña (14,16 g/L), presentaron mayores rendimientos en comparación al medio de cultivo con glucosa (20 g/L). Diversos autores han informado que el aumento en el rendimiento de celulosa bacteriana se encuentra directamente relacionado con el incremento en la concentración de glucosa en medio H-S (**Jang et al., 2019; Volova et al., 2018**). No obstante, según **Heo & Son, (2002)**, en su estudio de optimización de medios de cultivo basales para la producción de celulosa, determinó que es posible un mayor rendimiento utilizando concentraciones de glucosa desde el 1% p/v.

Esto es apreciable al utilizar glucosa como medio de cultivo en una concentración de (20 g /L), los cuales presentan los rendimientos más bajos (0,04, 0,04 y 0,03 g/L), correspondientes a PDC 21. DSM 2004 y PDC 25. Esto puede ser explicado con datos reportados por **Masaoka et al., (1993)**, quien informa que existe una reducción en la producción de celulosa al aumentar la concentración inicial de glucosa en medios mínimos. Así mismo, sugiere que, para iniciar cultivos discontinuos, es conveniente utilizar una baja concentración de glucosa.

En cuanto a las diferencias en el rendimiento entre las dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y DSM 2004, pueden atribuirse al origen de las dos primeras cepas, las cuales fueron aisladas de un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), por sus siglas en ingles. Según **Cerda & Dávalos, (2022)**, reporta que las cepas (PDC21 y PDC 25) podrían tratarse de dos consorcios microbianos aislados de SCOBY de kombucha. Se han reportado distintos resultados al trabajar con consorcios microbianos para la producción de celulosa. De acuerdo con **Devanthi et al., (2021)** las interacciones presentes en un consorcio podrían estimular un elevado crecimiento, no obstante, el resultado en esta investigación es la reducción del rendimiento microbiano.

En la Figura 7, se muestra el gráfico de cajas para los tratamientos empleados en la producción de celulosa bacteriana. Dónde los tratamientos (PDC 21 - Glucosa), (DSM 2004 - Glucosa), (PDC 25 - Glucosa) y (PDC 25 - Bagazo de caña) no presentan una diferencia estadísticamente significativa; de la misma manera los tratamientos (PDC 21 - Bagazo de caña) y (DSM 2004 - Bagazo de caña). Mientras, que el tratamiento de (PDC 21 - Cáscara de cacao), (DSM 2004 - Cáscara de cacao) y (PDC 25 - Cáscara de caña) si presenta una diferencia estadísticamente significativa con el resto de los tratamientos. Lo cual se corrobora con el análisis estadístico del ANOVA (Anexo B 2), de los rendimientos obtenidos por cada tratamiento, donde se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa, ya que el valor $p=0$ fue menor al esperado ($p=0.05$).

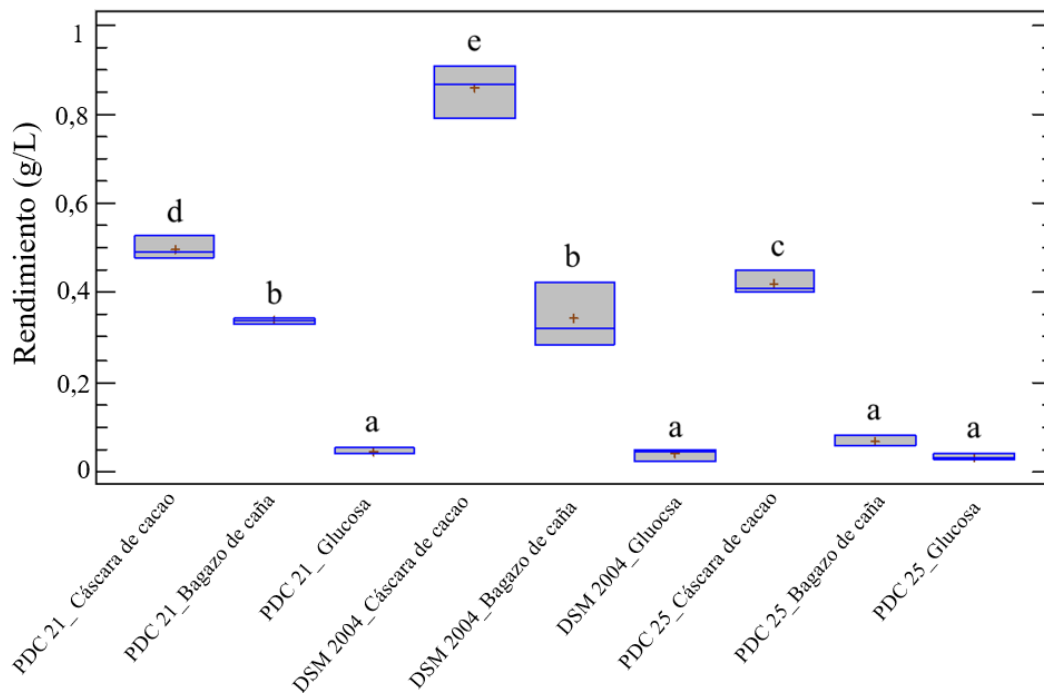


Figura 7. Gráfico de cajas para los rendimientos de celulosa (g/L), obtenidos para cada tratamiento al utilizar dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de

de

Los tratamientos que presentan las mismas letras (**a**, **b**, **c**, **d** o **e**) no representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de múltiples rangos

De acuerdo con el gráfico de cajas los mayores rendimientos se obtuvieron con el tratamiento empleando la cepa DSM 2004 y cáscara de cacao, seguido del tratamiento con la cepa PD C21 y cáscara de cacao, y en tercer lugar el tratamiento con la cepa PDC 25 y cascara de cacao. Esto se corrobora con la prueba de rangos múltiples, en la cual todos los tratamientos que emplearon glucosa como fuente de carbono no presentaron diferencias significativas entre ellas. Otros tratamientos que no presentaron diferencias significativas son los que emplearon el bagazo de caña y las cepas DSM 2004 y PDC 21.

3.1.3. Caracterización de nano-celulosa obtenida mediante tratamientos químicos y mecánicos

3.1.3.1. Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier FTIR

La Figura 8, muestra los espectros de FT-IR de la nano-celulosa obtenida de los dos tratamientos de hidrólisis, así como la celulosa comercial (Avicel), estos presentaron bandas típicas de celulosa en las mismas longitudes de onda.

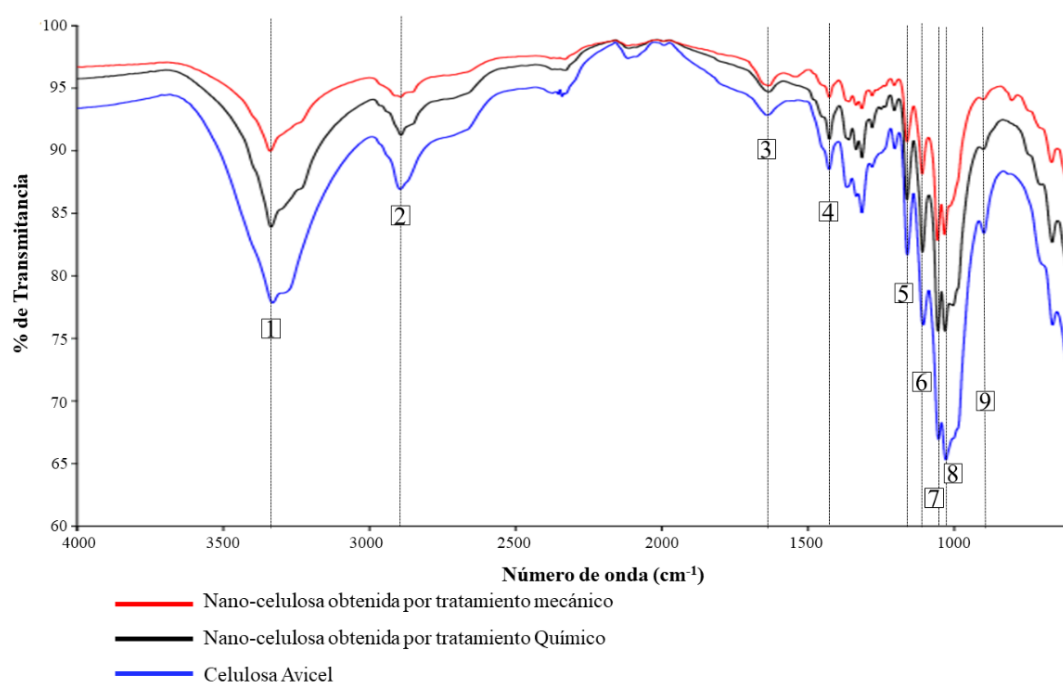


Figura 8. Espectros FTIR de celulosa comercial (Avicel) y nano-celulosa obtenida mediante tratamientos de hidrólisis química y mecánica

La celulosa bacteriana para estos tratamientos fue producida por *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004), en medio de cultivo mínimo, modificado con cáscara de cacao como fuente de carbono.

Si bien los espectros de celulosa se analizan en longitudes de ondas de entre 4000 y 400 cm⁻¹ (Revin et al., 2021). Existen dos regiones en las cuales se pueden analizar las bandas de los espectros de celulosa, el primero es de 3500 a 2800 cm⁻¹ (Hernández-Leal R et al., 2023). La segunda región o la región de huella dactilar de la celulosa, en donde se encuentran los grupos funcionales propios de la misma, se encuentran entre 1800 y 500 cm⁻¹ (Akintunde et al., 2022).

En la primera región, los tres espectros presentan bandas correspondientes al pico 1, la nano-celulosa obtenida por tratamientos químicos y mecánicos presentaron picos a una longitud de onda de 3338 y 3341 cm^{-1} respectivamente. Estos picos, en conjunto con el pico de la celulosa de comercial, están dentro del rango de 3352 y 3246 cm^{-1} (**Revin et al., 2021**). Las bandas en este pico se atribuyen a la presencia de los grupos hidroxilo (-OH) y enlaces de hidrogeno intra e intermoleculares, en los cuales los enlaces sufren una vibración de estiramiento al momento que interactúan con la luz infrarroja (**Salama et al., 2023**).

El pico 2 está dentro de la primera región, en este se puede encontrar a la celulosa comercial y la nano-celulosa obtenidas por los dos tratamientos. Según **Marín et al., (2019)** los picos en un rango de onda de 2900 y 2880 cm^{-1} corresponden a la energía de vibración del estiramiento del (CH). Sin embargo, **Chanabodeechalermrung et al., (2022)** menciona que el rango de detección del CH es de 2936 a 2855 cm^{-1} . Las bandas de la nano-celulosa resultado de tratamientos químicos y mecánicos presentan picos (2893 y 2896 cm^{-1} , respectivamente) de acuerdo con los rangos de longitud de onda mencionados anteriormente.

En la región de huella dactilar se encuentra los picos 3 y 4 correspondientes a bandas de 1650 y 1425 cm^{-1} , los cuales son característicos de la flexión del grupo (-OH) y (CH) respectivamente. Estas bandas, presentes en los tres espectros mencionados anteriormente, exhiben los picos característicos de celulosa (**Marín et al., 2019; Rahman et al., 2021**). Las bandas de los tres espectros presentes a 1160 y 1107 cm^{-1} (picos 5 y 6) son propios de la deformación y vibración de estiramiento de los enlaces (C-O-C) correspondientemente, los picos 7 y 8 presentes en las bandas a 1054 y 1030 cm^{-1} representan la vibración de estiramiento de los enlaces de (C-O-C) y (C-OH). Y finalmente, la banda a 897 cm^{-1} (pico 9), también es propio de la vibración de estiramiento de los enlaces (C-O-C).

En el proceso de hidrólisis de celulosa con ácido clorhídrico, se reporta la presencia de bandas a 1163 cm^{-1} , esta banda advierte de la presencia de grupo sulfato (**Chieng et al.,**

2017). Sin embargo, en el espectro de nano-celulosa obtenida por el tratamiento ácido no se identificó bandas a esa longitud de onda. Según **Wulandari et al., (2016)**, indica que al no presentarse nuevas bandas en los espectros no existe formación de nuevos enlaces durante el proceso de hidrólisis. Adicionalmente, menciona que los espectros de celulosa y nano-celulosa presentan las mismas bandas a longitudes de onda similares.

Al comparar bibliográficamente espectros de FTIR de celulosa, extraída de biomasa lignocelulósica y obtenida por fermentación bacteriana, no se observaron variaciones significativas en las bandas características de los grupos funcionales típicos de la celulosa (**Phanthong et al., 2018; Raiszadeh-Jahromi et al., 2020**). De la misma forma, estos grupos funcionales presentes en los espectros no varían al comparar celulosa y nano-celulosa, así mismo, la nano-celulosa obtenida por diferentes métodos de hidrólisis siguen presentando los mismo grupos funciones en los espectros de FTIR (**Huo et al., 2022**).

3.1.3.2. Microscopía electrónica de barrido SEM

Las imágenes SEM de nano-celulosa obtenida por dos tratamientos de hidrólisis (químico y mecánico) no mostraron diferencias en cuanto a la morfología de la nanopartícula. Ambos tratamientos generaron nanofibras de celulosa como resultado (Figuras 9 y 10).

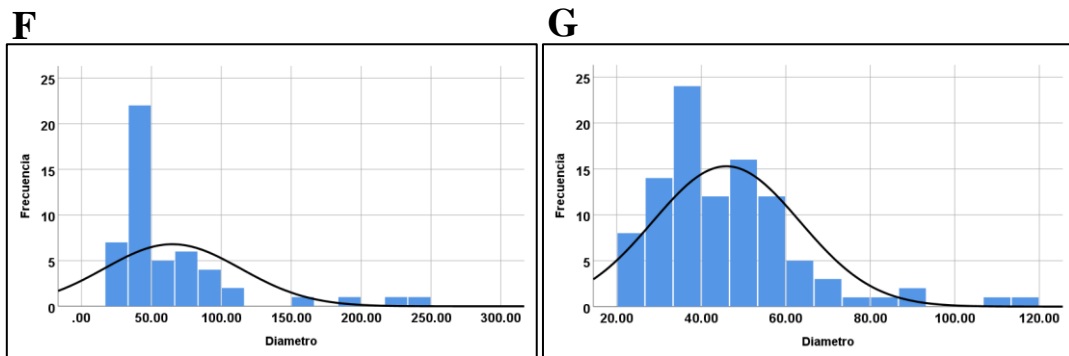
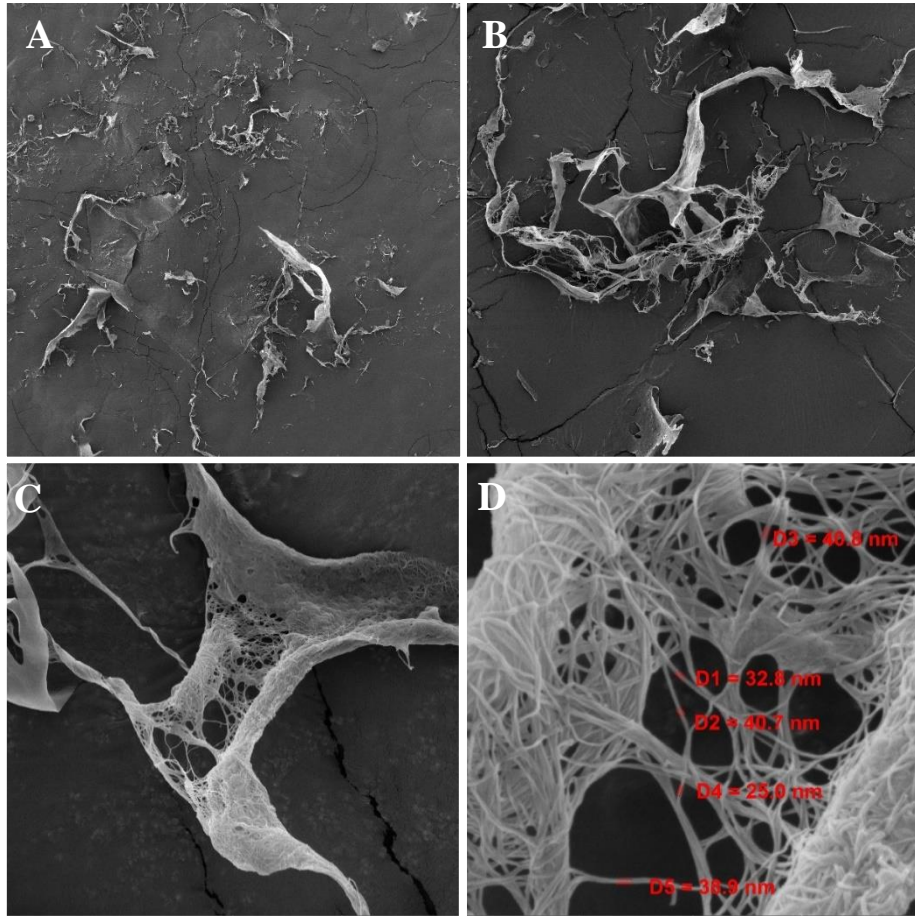


Figura 9. SEM de nano-celulosa bacteriana resultante del tratamiento ácido

A. Vista de campo completo de la muestra a una escala de 200 μm . B. Enfoque aleatorio a la muestra a una escala de 50 μm . C. Enfoque a una escala de 5 μm . D. Enfoque a una escala de 1 μm . E. Diagrama de distribución de la imagen C. F. Diagrama de distribución de la imagen D.

La Figura 9 muestra las imágenes SEM de la nano-celulosa bacteriana después del tratamiento con HCl 5M. Las imágenes revelan una morfología alargada y filamentosa característica de las nanofibras. No se observan estructuras redondeadas o esféricas que indicarían la presencia de nanoesferas. Esto refuerza la conclusión de que el tratamiento ácido en estas condiciones específicas resulta en la formación de nanofibras **Reiniati et al., 2017**).

El histograma de la vista de 1 μm en la Figura 9F presenta la distribución de los diámetros de estas nanofibras. Se observa una amplia variabilidad en los tamaños, con un diámetro mínimo de 21,62 nm y un máximo de 119,82 nm. La media y la mediana de los diámetros son de 45,93 nm y 42,09 nm, respectivamente, lo que sugiere una ligera tendencia hacia tamaños de fibras más pequeñas. Sin embargo, la desviación estándar de 17,41 nm refleja una gran dispersión en los tamaños de las fibras.

La moda de la distribución es 35,55 nm, pero se menciona la existencia de múltiples modas. Esto sugiere que la distribución del tamaño de las fibras puede ser multimodal, lo que indica la posible existencia de distintas poblaciones de fibras con diferentes diámetros dentro de la muestra. En cuanto a la comparación con otros estudios, los resultados de las mediciones de diámetro obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los rangos típicos reportados para nanofibras de celulosa bacteriana producidas mediante tratamientos ácidos dado que la morfología presentada puede variar tanto por el tratamiento como con la CB tratada (**Hernández-Leal R et al., 2023**).

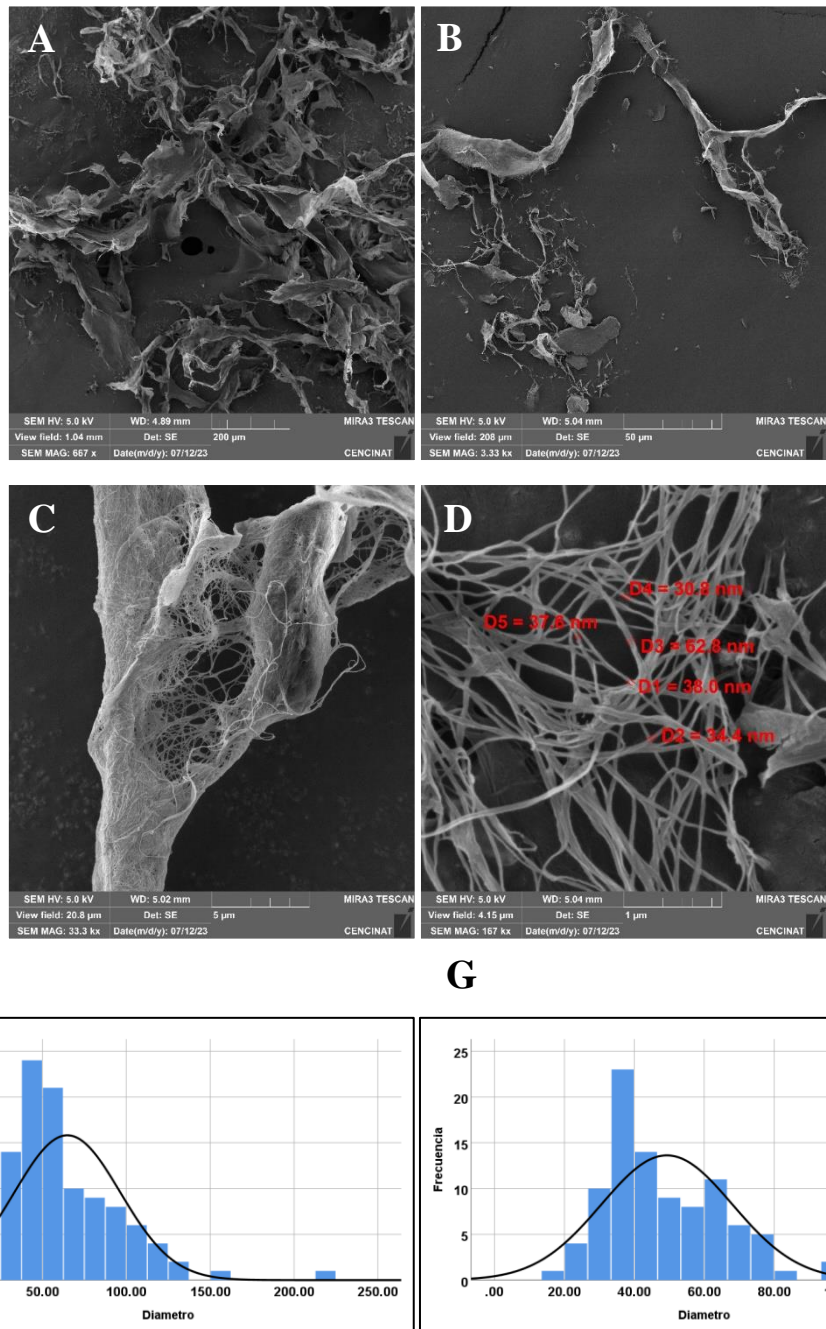


Figura 10. SEM de nano-celulosa bacteriana resultante del tratamiento ácido

A. Vista de campo completo de la muestra a una escala de 200 μm. B. Enfoque aleatorio a la muestra a una escala de 50 μm. C. Enfoque a una escala de 5 μm. D. Enfoque a una escala de 1 μm. E. Diagrama de distribución de la imagen C. F. Diagrama de distribución de la imagen D.

La Figura 10 presenta imágenes SEM de la nano-celulosa bacteriana (NCB) resultante de un tratamiento mecánico con un homogeneizador de alta velocidad. Este método de tratamiento es notablemente diferente del tratamiento ácido descrito anteriormente, y como tal, es esperable que produzca diferencias en las características de las nanofibras resultantes.

La Figura 10A ofrece una vista a campo completo de la muestra a una escala de 200 μm , proporcionando una visión general de la muestra y permitiendo la observación de la distribución general y el patrón de las nanofibras. La Figura 10B, con una escala de 50 μm , permite un enfoque más detallado en áreas aleatorias de la muestra. Este nivel de detalle ofrece una visión más cercana de las nanofibras, aunque sigue siendo demasiado amplio para la observación detallada de las fibras individuales. Las Figuras 2C y 2D, con escalas de 5 μm y 1 μm respectivamente, ofrecen una visión más cercana y detallada de las nanofibras individuales. Estas imágenes permiten la observación y medición del diámetro de las fibras individuales (**Zhaoyi et al., 2021**).

Los diagramas de distribución correspondientes a estas dos últimas imágenes se muestran en las Figuras 10E y 10F. Estos diagramas proporcionan un desglose cuantitativo de los diámetros de las nanofibras presentes en las áreas observadas en las Figuras 10C y 10D. Las estadísticas obtenidas de la Figura 10D, en la escala de 1 μm , revelan que el tratamiento mecánico con el homogeneizador de alta velocidad resulta en nanofibras con una media de diámetro de 49,31 nm, una mediana de 44,12 nm y una moda de 33,41 nm. La desviación estándar es de 18,74 nm, indicando una variabilidad de tamaño similar a la observada en las fibras tratadas con ácido (**Theivasanthi et al., 2018**).

El mínimo y máximo de diámetros registrados fueron de 18,12 nm y 116,20 nm respectivamente, indicando un rango de tamaños de fibras amplio. Al igual que en el caso anterior, la existencia de múltiples modas sugiere la posible presencia de diferentes poblaciones de fibras dentro de la muestra. En resumen, estas imágenes y datos estadísticos demuestran que el tratamiento mecánico con un homogeneizador de alta

velocidad produce nanofibras con características de tamaño algo similares a las producidas por el tratamiento con ácido. Sin embargo, la media y mediana de los diámetros son ligeramente mayores en este caso, lo que sugiere que este método de tratamiento podría resultar en la producción de fibras algo más grandes en promedio. Esta observación podría tener implicaciones significativas para la elección del método de tratamiento en función de la aplicación deseada de estas nanofibras (**He et al., 2022**).

3.2.Verificación de la hipótesis

Se contrasto los resultados del rendimiento en la producción de celulosa bacteriana al utilizar diferentes tipos de residuos agroindustriales y diferentes cepas acéticas.

- Se rechaza la hipótesis nula
- Se acepta la hipótesis alternativa, en consecuencia, se determinó que los diferentes tipos de residuos agroindustriales (cáscara de cacao y bagazo de caña), así como las cepas acéticas influyen en el rendimiento de la producción de celulosa bacteriana

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

El tratamiento de hidrólisis con H_2SO_4 al 2.0 % v/v más un ciclo de autoclave, presentó las mayores concentraciones de azúcares reductores por cada 100 mg de cáscara de cacao y bagazo de caña. Esto debido a las altas concentraciones celulosa y hemicelulosas presentes en cada residuo, los cuales son hidrolizados para obtener moléculas de D-glucosa. Adicionalmente, se determinó que la concentración de azúcares reductores presentes de forma natural en cada residuo agroindustrial puede presentar variaciones dependiendo de características como el tiempo de cosecha y condiciones ambientales de cultivo.

Los mayores rendimientos de celulosa (g/L), se produjeron al emplear hidrolizados de cáscara de cacao y bagazo de caña como la principal fuente de carbono en un medio mínimo. Esto se respalda en investigaciones previas que indican que el aumento del rendimiento se debe a los componentes nutricionales presentes en los hidrolizados. Por otra parte, se determinó que la concentración de azúcares reductores en medios de cultivo mínimos tiene una relación inversamente proporcional con el rendimiento de celulosa. Ya que los medios mínimos con bajas concentraciones de azúcares reductores (hidrolizados de cáscara de cacao y bagazo de caña) presentaron mayores rendimientos en comparación con el medio de cultivo con una concentración de 20 g/L de glucosa.

Los espectros de FTIR, mostraron que la nano-celulosa obtenida mediante tratamiento ácido y mecánico presentaron bandas características de celulosa a longitudes de onda similares. Los grupos funcionales característicos de la celulosa son (-OH); (CH); (C-O-C) y (C-OH), los cuales se presentaron en la primera región del espectro y en la región de huella dactilar. Adicionalmente, se determinó que los espectros de FTIR son iguales al analizar celulosa vegetal pura, celulosa bacteriana y nano-celulosa.

Las imágenes SEM mostraron que los tratamientos de hidrólisis mecánica e hidrólisis ácida generaron nanofibras de celulosa de diámetros variados. Sin embargo, la

diferencia en la media y mediana sugieren que este método podría producir nanofibras ligeramente más grandes.

4.2.Recomendaciones

El proceso de obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida es un proceso contaminante, por tal motivo una posible solución es utilizar tratamientos alternos o combinados. Los tratamientos que han tenido relevancia en la actualidad para la descomposición de residuos agroindustriales es la hidrólisis enzimática o la combinación de tratamientos (químicos, enzimáticos y térmicos).

El mayor rendimiento de celulosa bacteriana se consiguió al utilizar cáscara de cacao como fuente de carbono en medios mínimos en condiciones estáticas, ya que son las condiciones ideales, sin embargo, producir celulosa en biorreactores es una opción que debe ser considerada para fines industriales.

Disminuir la concentración de glucosa y de otros componentes en medios de cultivos como el H-S sería beneficioso para bajar costos en la producción industrial de celulosa. Por tal motivo, se plantea utilizar medios de cultivos mínimos alternativos compuestos por (KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en combinación con otros residuos agroindustriales.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Abdelhamid, H. N., & Mathew, A. P. (2021). Cellulose-Based Materials for Water Remediation: Adsorption, Catalysis, and Antifouling. *Frontiers in Chemical Engineering*, 3. <https://doi.org/10.3389/fceng.2021.790314>
- Akintunde, M. O., Adebayo-Tayo, B. C., Ishola, M. M., Zamani, A., & Horváth, I. S. (2022). Bacterial Cellulose Production from agricultural Residues by two *Komagataeibacter* sp. Strains. *Bioengineered*, 13(4), 10010–10025. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2062970>
- Álava, F. T., Guerrero, F., Maenza, C. V., & Barros, T. S. (2022). Circular economy vision for local development focused on waste derived from two agricultural crops in Ecuador. *Journal of Business and Entrepreneurial Studie*, 6(4). <https://doi.org/10.37956/JBES.V6I4.318>
- Almeida, I. F., Pereira, T., Silva, N. H. C. S., Gomes, F. P., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., Sousa Lobo, J. M., & Costa, P. C. (2014). Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(3), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.008>
- Altesor, A., Eguren, G., Mazzeo, N., Panario, D., Rodríguez, C., & Aequo, E. X. (2008). La industria de la celulosa y sus efectos: certezas e incertidumbres. *Ecología Austral*, 18(3), 291–303. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2008000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Angulo, A., Galindo, A., Avendaño, R., & Pérez, C. (2012). *Biología Celular* (Primera, Vol. 1). Universidad Autónoma de Sinaloa. https://dgep.uas.edu.mx/librosdigitales/6to_SEMESTRE/59_Biologia_Celular.pdf
- Anguluri, K., La China, S., Brugnoli, M., Cassanelli, S., & Gullo, M. (2022). Better under stress: Improving bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (UMCC 2756) using adaptive laboratory evolution. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994097/FULL>
- Ayala, J. R., Montero, G., Coronado, M. A., García, C., Curiel-Alvarez, M. A., León, J. A., Sagaste, C. A., & Montes, D. G. (2021). Characterization of Orange Peel

- Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. *Molecules*, 26(5).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26051348>
- Aydın, Y. A., & Aksoy, N. D. (2014). Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1065–1075.
<https://doi.org/10.1007/S00253-013-5296-9/FIGURES/6>
- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B. R., Risberg, B., & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9), 2141–2149.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>
- Berna, F. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, 285–286. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4409-0_15/COVER
- CARR, K. E., TONER, P. G., & SALEH, K. M. (1982). Scanning electron microscopy. *Histopathology*, 6(1), 3–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1982.tb02698.x>
- Cerda, L., & Dávalos, P. (2022). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos [Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34967/1/BQ%20308.pdf>
- Chai, Y. D., Pang, Y. L., Lim, S., Chong, W. C., Lai, C. W., & Abdullah, A. Z. (2022). Recent Progress on Tailoring the Biomass-Derived Cellulose Hybrid Composite Photocatalysts. *Polymers*, 14(23), 5244. <https://doi.org/10.3390/polym14235244>
- Chanabodeechalermrung, B., Chaiwarit, T., Sommano, S. R., Rachtanapun, P., Kantrong, N., Chittasupho, C., & Jantrawut, P. (2022). Dual Crosslinked Ion-Based Bacterial Cellulose Composite Hydrogel Containing Polyhexamethylene Biguanide. *Membranes*, 12(9), 825.
<https://doi.org/10.3390/membranes12090825>
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., Cateryna, Y., Mazzarri, A., & Básicas, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *MULTICIENCIAS*, 12, 245–253.
- Cheng, Y. S., Wu, Z. Y., & Sriariyanun, M. (2019). Evaluation of *Macaranga tanarius* as a biomass feedstock for fermentable sugars production. *Bioresource Technology*, 294. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122195>

- Cheng, Z., Yang, R., & Liu, X. (2016). Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter xylinum* through Utilizing Acetic Acid Hydrolysate of Bagasse as Low-cost Carbon Source. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 26(11), 1190–1200. <https://doi.org/10.15376/BIORES.12.1.1190-1200>
- Cheong, C. W., Lee, Y. S., Ahmad, S. A., Ooi, P. T., & Phang, L. Y. (2018). Chicken feather valorization by thermal alkaline pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for protein-rich hydrolysate production. *Waste Management*, 79, 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.029>
- Chiang, B., Lee, S., Ibrahim, N., Then, Y., & Loo, Y. (2017). Isolation and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Oil Palm Mesocarp Fiber. *Polymers*, 9(12), 355. <https://doi.org/10.3390/polym9080355>
- Choi, S. M., Rao, K. M., Zo, S. M., Shin, E. J., & Han, S. S. (2022). Bacterial Cellulose and Its Applications. *Polymers*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/POLYM14061080>
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1021/BM060620D>
- Dahmen, T., Engstler, M., Pauly, C., Trampert, P., de Jonge, N., Mücklich, F., & Slusallek, P. (2016). Feature Adaptive Sampling for Scanning Electron Microscopy. *Scientific Reports*, 6(1), 25350. <https://doi.org/10.1038/srep25350>
- Dávalos P, & Liliana C. (2022). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Komagataeibacter xylinus* y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos. Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería En Alimentos y Biotecnología. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/34967>
- 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>
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M., & Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15572–15577. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706569104>

- Devanthi, P. V. P., Kho, K., Nurdiansyah, R., Briot, A., Taherzadeh, M. J., & Aslanzadeh, S. (2021). Do Kombucha Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeast Affect Bacterial Cellulose Yield in Molasses? *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/JOF7090705>
- Díaz-Oviedo, A. F., Ramón-Valencia, B. A., Moreno-Contreras, G. G., Díaz-Oviedo, A. F., Ramón-Valencia, B. A., & Moreno-Contreras, G. G. (2022). Caracterización físico-química de la cáscara de mazorca de cacao como posible uso en la elaboración de tableros aglomerados. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 12(1), 97–106. <https://doi.org/10.19053/20278306.V12.N1.2022.14211>
- Dinçel Kasapoğlu, E., Kahraman, S., & Tornuk, F. (2023). Extraction Optimization and Characterization of Cellulose Nanocrystals from Apricot Pomace. *Foods*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/FOODS12040746>
- Dunlop, M. J., Clemons, C., Reiner, R., Sabo, R., Agarwal, U. P., Bissessur, R., Sojoudiasli, H., Carreau, P. J., & Acharya, B. (2020). Towards the scalable isolation of cellulose nanocrystals from tunicates. *Scientific Reports*, 10(1), 19090. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76144-9>
- 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>
- Ferrer, J., Paez, G., Arenas de Moreno, L., Chandler, C., Mármol, Z., & Sandoval, L. (2002). Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Revista de La Facultad de Agronomía*. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182002000100003
- Francisco, W., & Moreno, Q. (2007). *Guía Técnica de Agroindustria Panelera*.
- Gao, H., Sun, Q., Han, Z., Li, J., Liao, B., Hu, L., Huang, J., Zou, C., Jia, C., Huang, J., Chang, Z., Jiang, D., & Jin, M. (2020). Comparison of bacterial nanocellulose produced by different strains under static and agitated culture conditions. *Carbohydrate Polymers*, 227. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115323>
- Gao, M., Li, J., Bao, Z., Hu, M., Nian, R., Feng, D., An, D., Li, X., Xian, M., & Zhang, H. (2019). A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose

- using a microorganism. *Nature Communications*, 10(1).
<https://doi.org/10.1038/S41467-018-07879-3>
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: classical cases and new models. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Ha, J. H., Shehzad, O., Khan, S., Lee, S. Y., Park, J. W., Khan, T., & Park, J. K. (2008). Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(4), 812–815.
<https://doi.org/10.1007/S11814-008-0134-Y/METRICS>
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3479–3500.
https://doi.org/10.1021/CR900339W/ASSET/CR900339W.FP.PNG_V03
- He, Q., Yang, Y., Liu, Z., Shao, D., Jiang, D., Xing, L., Pan, Q., & Shan, H. (2022). Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from spent edible fungus substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(7), 2761–2772. <https://doi.org/10.1002/JSFA.11617>
- Heo, M.-S., & Son, H.-J. (2002). Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36(1), 41.
<https://doi.org/10.1042/BA20020018>
- Hernández-Leal R, Brachetti-Sibaja S B, Torres-Huerta A M, & Domínguez-Crespo, M. A. (2023). Isolation and characterization of nanocellulose from different agroindustrial wastes. *Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability*, 7, 111–124. <https://doi.org/10.19136/Jeeos.a7n2.5680>
- Hirai, A., Tsuji, M., & Horii, F. (2002). TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. *Cellulose*, 9(2), 105–113.
<https://doi.org/10.1023/A:1020195205030/METRICS>
- Huo, Y., Liu, Y., Xia, M., Du, H., Lin, Z., Li, B., & Liu, H. (2022). Nanocellulose-Based Composite Materials Used in Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(13).
<https://doi.org/10.3390/POLYM14132648>
- 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>
- Jiang, L., Zheng, A., Zhao, Z., He, F., Li, H., & Liu, W. (2015). Obtaining fermentable sugars by dilute acid hydrolysis of hemicellulose and fast pyrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, 182, 364–367. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.01.032>
- Kallos, E., & Apostolopoulou, T. (2007). Cellulosic Ethanol and the future of Biofuels: From carbohydrates to hydrocarbons.
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. M. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 317–344. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9/COVER
- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(7), 803–807. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0812-8>
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- Lee, H., Hamid, S., & Zain, S. (2014). Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Lee, J., Lee, K. H., Kim, S., Son, H., Chun, Y., Park, C., & Yoo, H. Y. (2022). Microbial Production of Bacterial Cellulose Using Chestnut Shell Hydrolysates by *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1479. <https://doi.org/10.4014/JMB.2208.08022>
- Li, Z., Chen, S. Q., Cao, X., Li, L., Zhu, J., & Yu, H. (2021). Effect of pH Buffer and Carbon Metabolism on the Yield and Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 429. <https://doi.org/10.4014/JMB.2010.10054>
- Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S., & Yang, X. (2020a). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of*

- Biological Macromolecules, 158, 1007–1019.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.230>
- Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S., & Yang, X. (2020b). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1007–1019.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.230>
- Lin, N., & Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302–325.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>
- Liu, M., Li, S., Xie, Y., Jia, S., Hou, Y., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and oxygen tension regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1155–1165. <https://doi.org/10.1007/S00253-017-8680-Z>
- Liu, Y., Liu, H., Guo, S., Qi, J., Zhang, R., Liu, X., Sun, L., Zong, M., Cheng, H., Wu, X., & Li, B. (2023). Applications of Bacterial Cellulose-Based Composite Materials in Hard Tissue Regenerative Medicine. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 20(7), 1017–1039. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00575-4>
- Ma, Y., Luo, J., & Xu, Y. (2019). Co-preparation of pectin and cellulose from apple pomace by a sequential process. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4091. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-03877-5>
- MAG. (2022). Luego de siete años aumenta el precio de la tonelada de caña de azúcar – Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.agricultura.gob.ec/luego-de-siete-anos-aumenta-el-precio-de-la-tonelada-de-cana-de-azucar/>
- Maldonado, J. (2018). Cuantificación de azúcares fermentables obtenidos mediante hidrólisis de la cáscara de la vaina de cacao.
- Mani Pujitha, I., Khandelwal, M., Shekhar Sharma -, C., Ali Ahmed, S., Abdalnabi Ahmed, A., Hassan Abdul Latif -, M., Zhao, H., Li, J., & Zhu, K. (2018). Bacterial Cellulose Production from Waste products and Fermentation conditions optimization. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 394(2), 022041. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/394/2/022041>
- Marín, P., Martirani-Von Abercron, S. M., Urbina, L., Pacheco-Sánchez, D., Castañeda-Cataña, M. A., Retegi, A., Eceiza, A., & Marqués, S. (2019).

- Bacterial nanocellulose production from naphthalene. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 662–676. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13399>
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18–22. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90171-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90171-4)
- Melo Ruiz, Virginia., & Cuamatzi Tapia, O. (2004). Bioquímica de los procesos metabólicos.
- Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. *PLOS ONE*, 17(10), e0276040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
- Morgan, J. L. W., Strumillo, J., & Zimmer, J. (2012). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 2012 493:7431, 493(7431), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature11744>
- Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2022). An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. *Polymers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/POLYM14030421>
- Norizan, M. N., Shazleen, S. S., Alias, A. H., Sabaruddin, F. A., Asyraf, M. R. M., Zainudin, E. S., Abdullah, N., Samsudin, M. S., Kamarudin, S. H., & Norrahim, M. N. F. (2022). Nanocellulose-Based Nanocomposites for Sustainable Applications: A Review. *Nanomaterials*, 12(19), 3483. <https://doi.org/10.3390/NANO12193483>
- Pereyra, V. (2021). Visiones sobre riesgo, naturaleza y desarrollo. La producción de pasta de celulosa en Uruguay. *Revista de Ciencias Sociales*, 34(48), 93–114. <https://doi.org/10.26489/RVS.V34I48.4>
- Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., & Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*, 1(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.CRCON.2018.05.004>
- Rahman, S. S. A., Vaishnavi, T., Vidyasri, G. S., Sathya, K., Priyanka, P., Venkatachalam, P., & Karuppiyah, S. (2021). Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support. *Scientific Reports*, 11(1), 2912. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82596-4>
- Raiszadeh-Jahromi, Y., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2020). Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. *Journal of*

- Food Science and Technology, 57(7), 2524–2533.
<https://doi.org/10.1007/S13197-020-04289-6/METRICS>
- Rangaswamy, B. E., Vanitha, K. P., & Hungund, B. S. (2015). Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. *International Journal of Polymer Science*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/280784>
- Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A. (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 510–524.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871>
- Resano, D., Guillen, O. W., Ubillús, F. D. R., Barranzuela, J. L., Resano, D., Guillen, O. W., Ubillús, F. D. R., & Barranzuela, J. L. (2022). Caracterización fisicoquímica del bagazo de caña de azúcar industrial y artesanal como material de construcción. *Información Tecnológica*, 33(2), 247–258.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642022000200247>
- Revin, V. V., Dolganov, A. V., Liyaskina, E. V., Nazarova, N. B., Balandina, A. V., Devyataeva, A. A., & Revin, V. D. (2021). Characterizing Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride. *Polymers*, 13(9), 1422. <https://doi.org/10.3390/polym13091422>
- Riaño, S., Morales, G., Muñoz Hernández, & Barrero, R. (2012). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos.
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35.
<https://doi.org/10.1128/MR.55.1.35-58.1991>
- Saiki, K., Urano-Tashiro, Y., Konishi, K., & Takahashi, Y. (2019). A screening system using minimal media identifies a flavin-competing inhibitor of *Porphyromonas gingivalis* growth. *FEMS Microbiology Letters*, 366(16).
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz204>
- Salama, A., Saleh, A. K., Cruz-Maya, I., & Guarino, V. (2023). Bacterial Cellulose/Cellulose Imidazolium Bio-Hybrid Membranes for In Vitro and Antimicrobial Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(2), 60.
<https://doi.org/10.3390/jfb14020060>

- Sánchez-Cortez, J. L. (2019). Conservation of geoheritage in Ecuador: Situation and perspectives. *International Journal of Geoheritage and Parks*, 7(2), 91–101. <https://doi.org/10.1016/J.IJGEO.2019.06.002>
- Shida, Y., Furukawa, T., & Ogasawara, W. (2016). Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hypercellulolytic filamentous fungus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9), 1712–1729. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1171701>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Tsai, M. L., Chen, C. W., & Di Dong, C. (2021). Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications. *Bioengineered*, 12(1), 6793. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1968989>
- 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)
- Steven, S., Fauza, A. N., Mardiyati, Y., Santosa, S. P., & Shoimah, S. M. (2022). Facile Preparation of Cellulose Bioplastic from *Cladophora* sp. Algae via Hydrogel Method. *Polymers*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/POLYM14214699>
- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M. (2015). Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 316, 111–158. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Syed Abdullah, S. S., Faisal Aris, F. A., Said Azmi, S. N. N., Anak John, J. H. S., Khairul Anuar, N. N., & Mohd Asnawi, A. S. F. (2022). Development and evaluation of ciprofloxacin-bacterial cellulose composites produced through in situ incorporation method. *Biotechnology Reports*, 34, e00726. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2022.E00726>
- Szustak, M., & Gendaszewska-Darmach, E. (2021). Nanocellulose-Based Scaffolds for Chondrogenic Differentiation and Expansion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.736213>
- Szymczak, I., Pietrzyk-Brzezińska, A. J., Duszyński, K., & Ryngajłło, M. (2022). Characterization of the Putative Acylated Cellulose Synthase Operon in *Komagataeibacter xylinus* E25. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14). <https://doi.org/10.3390/IJMS23147851/S1>
- Teneda, W., Guamán, M., & Oyaque, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) como infusión: caso

- Tungurahua-Ecuador*. Cuadernos de Contabilidad, 20(50), 1–14.
<https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.CC20-50.EICC>
- Theivasanthi, T., Anne Christma, F. L., Toyin, A. J., Gopinath, S. C. B., & Ravichandran, R. (2018). Synthesis and characterization of cotton fiber-based nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 832–836. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.054>
- Thermo Fisher Scientific. (2023). FTIR | Academia de espectroscopía FTIR | Thermo Fisher Scientific - CE.
<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fourier-transform-infrared-spectroscopy/resources/ftir-spectroscopy-academy.html>
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V., & Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14832. <https://doi.org/10.3390/IJMS160714832>
- Ullah, M. W., Subhan, F., Manan, S., Ul-Islam, M., Alabbosh, K. F., Kamal, T., Khan, K. A., Liu, J., Yang, G., & Sun, J. (2023). Impact of structural features of acetylated bacterial cellulose on cell-scaffold and scaffold-blood interactions in vitro. *Cellulose*, 30(16), 10373–10399. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05518-9>
- Uranchimeg, K., Jargalsaikhan, B., Bor, A., Yoon, K., & Choi, H. (2022). Comparative Study of the Morphology of Cellulose Nanofiber Fabricated Using Two Kinds of Grinding Method. *Materials*, 15(20). <https://doi.org/10.3390/MA15207048>
- 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/TABLES/2>
- Volova, T. G., Prudnikova, S. V., Sukovaty, 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/METRICS>
- Wang, T., & Zhao, Y. (2021). Optimization of bleaching process for cellulose extraction from apple and kale pomace and evaluation of their potentials as film forming

- materials. Carbohydrate Polymers, 253.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117225>
- Wulandari, W. T., Rochliadi, A., & Arcana, I. M. (2016). Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 107(1), 012045.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012045>
- Yang, J., Yue, H.-R., Pan, L.-Y., Feng, J.-X., Zhao, S., Suwannarangsee, S., Champreda, V., Liu, C.-G., & Zhao, X.-Q. (2023). Fungal strain improvement for efficient cellulase production and lignocellulosic biorefinery: Current status and future prospects. Bioresource Technology, 385, 129449.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129449>
- Yaya, O. L., Kouadio Appiah, K. E., Doudjo, S., Mahamane Nassirou, A. K., Didier, F. G., Benjamin, Y. K., Drogui, A. P., & Tyagi, D. R. (2023). Multi-response and multi-criteria optimization of acid hydrolyzate detoxification of cocoa pod husks: Effect on the content of phenolic compounds and fermentable sugars. Heliyon, 9(4). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E15409>
- Zanchetta, E., Damergi, E., Patel, B., Borgmeyer, T., Pick, H., Pulgarin, A., & Ludwig, C. (2021). Algal cellulose, production and potential use in plastics: Challenges and opportunities. Algal Research, 56, 102288.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102288>
- Zergane, H., Abdi, S., Xu, H., Hemming, J., Wang, X., Willför, S., & Habibi, Y. (2020). Ampelodesmos mauritanicus a new sustainable source for nanocellulose substrates. Industrial Crops and Products, 144, 112044.
<https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.112044>
- Zhai, X., Lin, D., Zhao, Y., Li, W., & Yang, X. (2018). Enhanced anti-obesity effects of bacterial cellulose combined with konjac glucomannan in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. Food & Function, 9(10), 5260–5272.
<https://doi.org/10.1039/C8FO01211C>
- Zhaoyi, Z., Ying, L., & Wei, Z. (2021). The progress of nanocellulose in types and preparation methods. Journal of Physics: Conference Series.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/2021/1/012042>

Anexos

Anexo A. Hidrólisis de residuos

Anexo A 1. Concentración de azúcares reductores presentes en los residuos agroindustriales (cáscara de cacao y bagazo de caña)

Muestra	mg Glucosa/ 100 mg de cáscara de cacao	mg Glucosa/ 100 mg de bagazo de caña
Control	13.01 ± 2.45	2.05 ± 0.30
(Agua + ciclo de autoclave)	15.87 ± 2.20	2.62 ± 1.06
(H₂SO₄ al 2.0 % v/v + ciclo de autoclave)	32.14 ± 3.65	55.14 ± 1.29

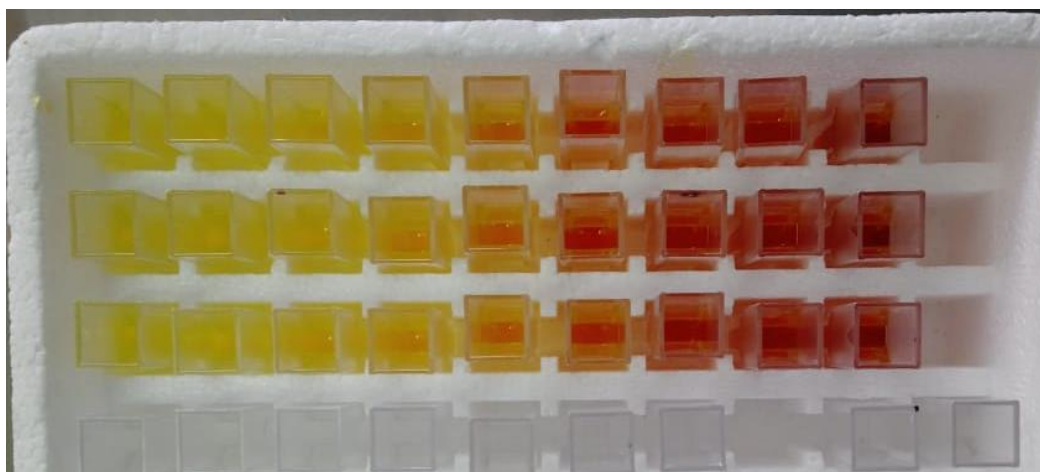
Anexo A 2. Análisis de varianza de los tratamientos de hidrólisis de cáscara de cacao para la obtención azúcares reductores

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	639,34	2 319,67	39,74	0,0003
Intra grupos	48,2627	6 8,04378		
Total (Corr.)	687,603	8		

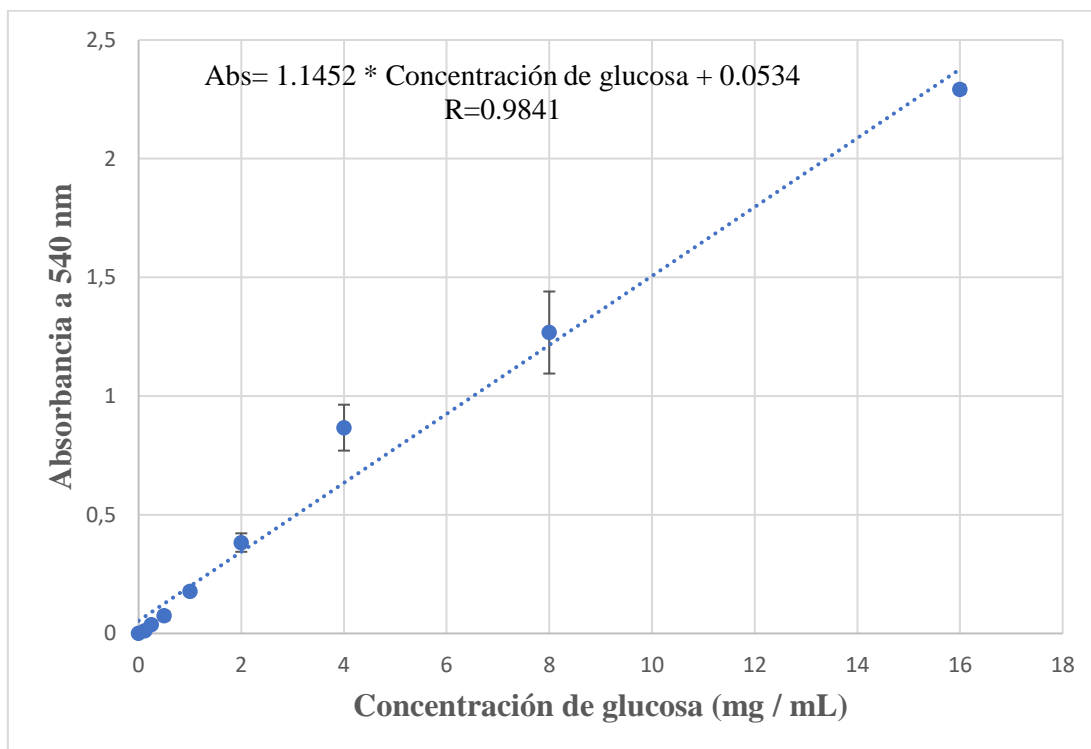
Anexo A 3. Análisis de varianza de los tratamientos de hidrólisis de bagazo de caña para la obtención de azúcares reductores

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5577,89	2 2788,95	2923,27	0,0000
Intra grupos	5,72429	6 0,954049		
Total (Corr.)	5583,62	8		

Anexo A 4. Estandarización de una curva de concentración de glucosa mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)



Anexo A 5. Curva estándar de glucosa



La curva para la determinación de azúcares reductores fue construida a partir de una regresión lineal, donde se presenta la absorbancia a 540 nm vs. concentración de glucosa (mg/ml). Las líneas en cada punto representan la desviación estándar respecto a la media.

Anexo B. Obtención de celulosa bacteriana

Anexo B 1. Rendimientos de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (de cacao y bagazo de caña)

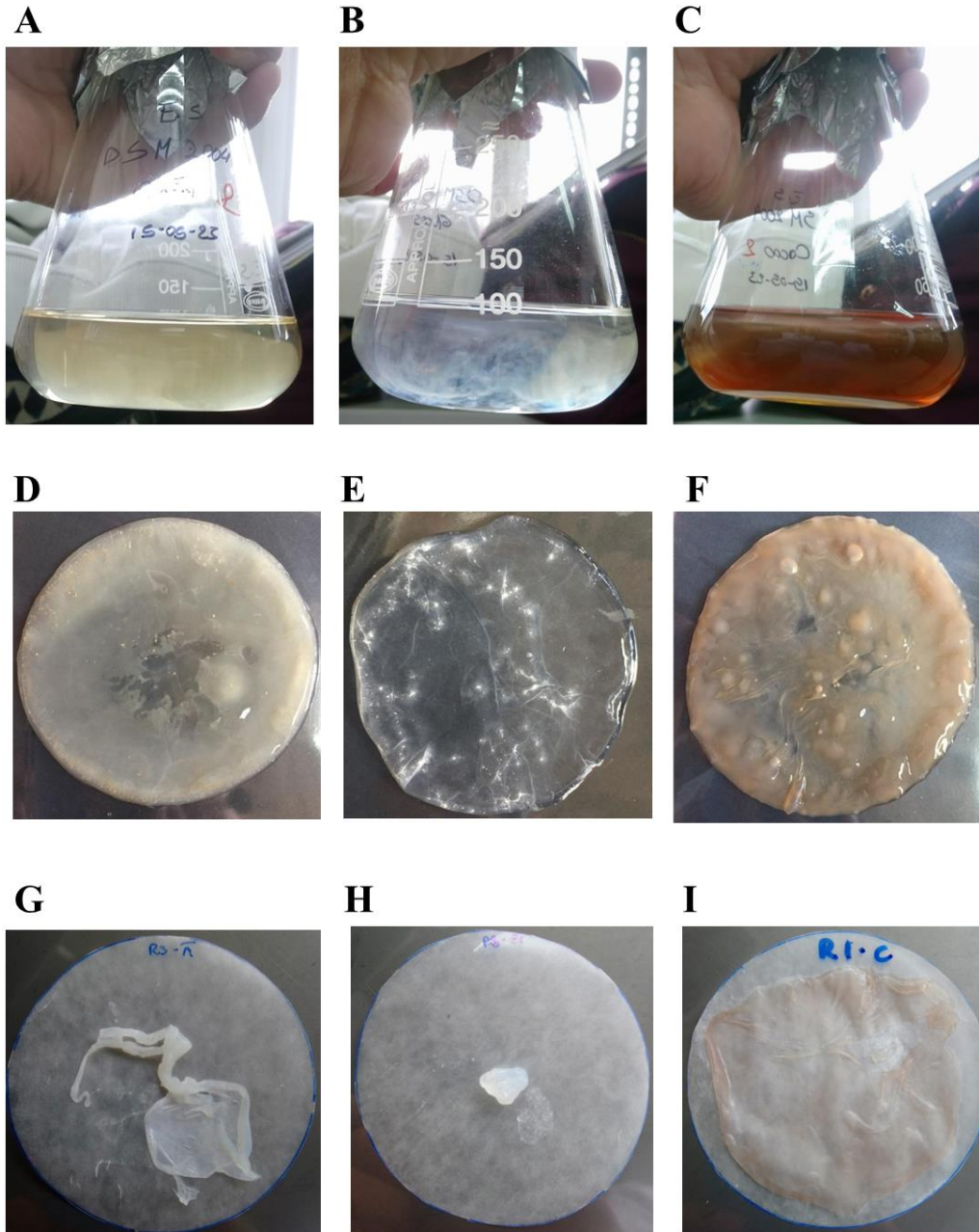
	PDC 21	DSM 2004	PDC 25
Cáscara de cacao	0.50 ± 0.03	0.86 ± 0.06	0.42 ± 0.03
Bagazo de caña	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.07	0.07 ± 0.01
Glucosa	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01

Anexo B 2. Análisis de varianza del rendimiento de celulosa (g/L), producida por dos cepas acéticas (PDC21 y PDC 25) y *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 (DSM 2004), en presencia de diferentes fuentes de carbono (cáscara de cacao y bagazo de caña)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,88071	8	0,235089	194,90	0,0000
Intra grupos	0,021712	18	0,00120622		
Total (Corr.)	1,90242	26			

Anexo C. Caracterización de nano-celulosa obtenida mediante tratamientos químicos y mecánicos

Anexo C 1. Proceso de producción de celulosa bacteriana

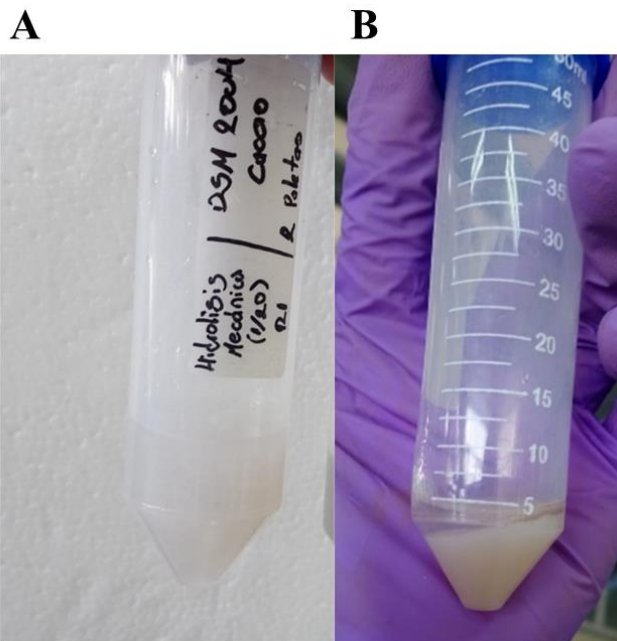


Las letras (A, B y C), corresponden a medios de cultivos mínimos con bagazo de caña, glucosa y cáscara de cacao, respetivamente. Las letras (D, E y F), corresponden a celulosa bacteriana obtenido en medios de cultivo mínimos con bagazo de caña, glucosa y cáscara de cacao. Y finalmente, las letras (G, H e I), corresponden a celulosa purificada obtenido en los medios de cultivos ya mencionados.

Anexo C 2. Celulosa bacteriana purificada almacenada en acético

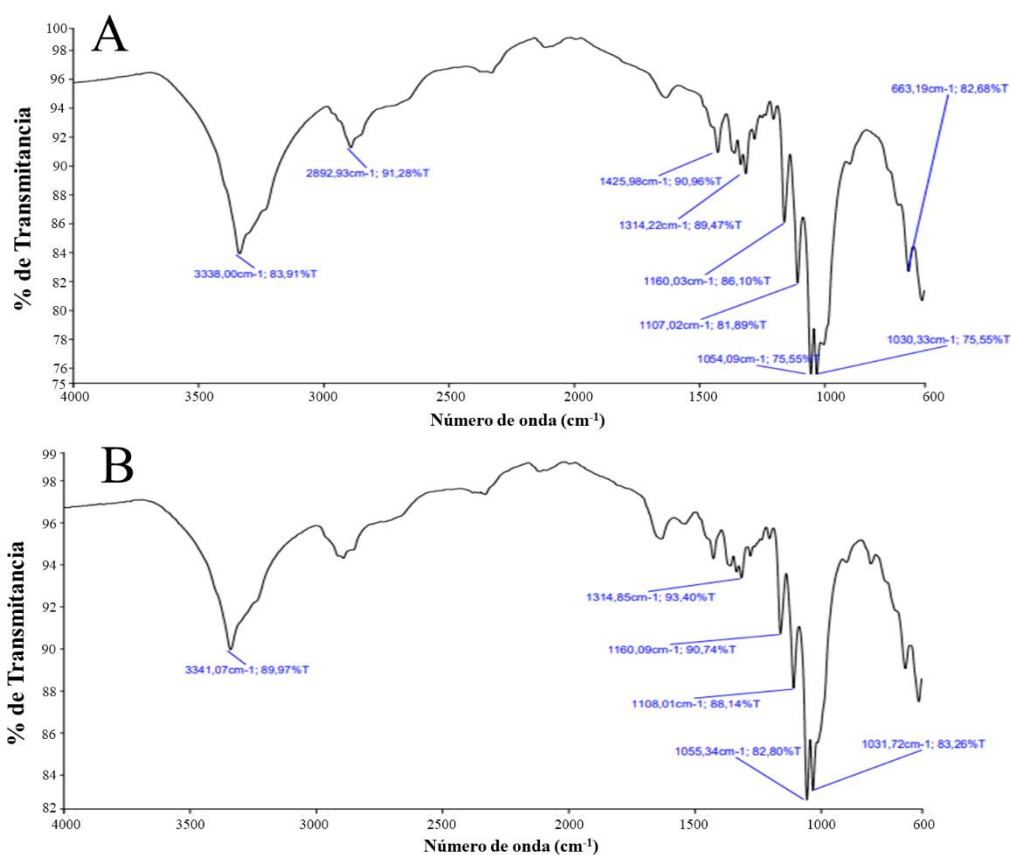


Anexo C 3. Nano-celulosa obtenida por los dos procesos de hidrólisis



A. Nano-celulosa obtenida por el proceso de hidrólisis mecánica. B. Nano-celulosa obtenida por el proceso de hidrólisis química

Anexo C 4. Espectro de FTIR de nano-celulosa con sus respectivas etiquetas en cada pico



A. Espectro FTIR de nano-celulosa obtenida por hidrolisis ácida. B. Espectro FTIR de nano-celulosa obtenida por hidrolisis mecánica.