



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA INGENIERÍA QUÍMICA**

TEMA:

**“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR
SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”.**

AUTORES:

**MERCHAN SORNOZA JONATHAN STALIN
TIGRE CHANGO JEAN CARLOS**

TUTOR:

ING. AUGUSTA JIMÉNEZ SÁNCHEZ, Msc.

GUAYAQUIL, SEPTIEMBRE 2019



Universidad de Guayaquil

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA INGENIERÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

INGENIERO QUÍMICO

TEMA:

**“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR
SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”.**

AUTORES:

**MERCHAN SORNOZA JONATHAN STALIN
TIGRE CHANGO JEAN CARLOS**

TUTOR:

ING. AUGUSTA JIMÉNEZ SÁNCHEZ, Msc.

GUAYAQUIL, SEPTIEMBRE 2019

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN		
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	"OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ"	
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Jonathan Stalin Merchan Sornoza Jean Carlos Tigre Chango	
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Ing. Augusta Jiménez Sánchez MSc	
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	
UNIDAD/FACULTAD:	INGENIERÍA QUÍMICA	
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:		
GRADO OBTENIDO:	INGENIERO QUÍMICO	
FECHA DE PUBLICACIÓN:	No. DE PÁGINAS: 109	
ÁREAS TEMÁTICAS:		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Kombucha, celulosa bacteriana, medios de cultivo, té negro, cáscara de café.	
RESUMEN/ABSTRACT: La presente investigación buscó obtener celulosa bacteriana por inoculación del hongo <i>Gluconacetobacter xylinus</i> presente en la bebida Kombucha mediante un cultivo estático y con la sustitución del té negro por una infusión de cáscara de café. Se evaluaron dos concentraciones de 20 y 10 % de azúcar y 5 tratamientos de 0, 25, 50, 75 y 100 % de sustitución del té de cáscaras de café. Los reactores rectangulares usados fueron de 1.5 L de capacidad. Estos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días hasta la cosecha de la celulosa. Tanto el líquido fermentado como la membrana fueron evaluados en las propiedades físicas, químicas, mecánicas y funcionales. Se realizó el análisis de varianza y los resultados indican que la mayor producción de celulosa fue con 10 % de azúcar y con una sustitución del 75 % de la infusión de cáscaras de café. Este tratamiento mostró un rendimiento quincenal de 25 % de producción de celulosa, con mejores propiedades de dureza y estructura firme respecto a los demás tratamientos		
ADJUNTO PDF:	SI x	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: Jonathan Merchan: 0939190369 Jean Tigre: 0968913033	E-mail: jonathanms14-1995@hotmail.com jeancarlos1884@hotmail.com
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL Teléfono: (04) 228-7072, 228-7258, 222-8695, 228-4505 E-mail: ugrector@ug.edu.ec	



**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR REVISOR

Habiendo sido nombrado **ING. CECILIA UZCA SORNOZA MSC**, tutor del trabajo de titulación **“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”** certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **JONATHAN STALIN MERCHAN SORNOZA, # CÉDULA 0951753953, JEAN CARLOS TIGRE CHANGO, #CÉDULA 092163723-7**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de **INGENIERO QUIMICO**, en la Carrera DE INGENIERÍA QUÍMICA/ FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

Ing. Cecilia Uzca Sornoza MSC
C.I. No. 0921160214



**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL
USO NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS**

Nosotros **Jonathan Stalin Merchan Sornoza**, con C.I No. **0951753953**, **Jean Carlos Tigre Chango**, con C.I No. **092163723-7**, certificamos que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”** son de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizamos el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

Jonathan Stalin Merchan Sornoza
C.I. No. 0921160214

Jean Carlos Tigre Chango
C.I. No. 0921637237

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN
(Registro Oficial n. 899 -

Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

**“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR
SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”**

Autores: Jonathan Stalin Merchan Sornoza
Jean Carlos Tigre Chango.

Tutor: Ing. Augusta Jiménez Sánchez MSc

RESUMEN

La presente investigación buscó obtener celulosa bacteriana por inoculación del hongo *Gluconacetobacter xylinus* presente en la bebida Kombucha mediante un cultivo estático y con la sustitución del té negro por una infusión de cáscara de café. Se evaluaron dos concentraciones de 20 y 10 % de azúcar y 5 tratamientos de 0, 25, 50, 75 y 100 % de sustitución del té de cáscaras de café. Los reactores rectangulares usados fueron de 1.5 L de capacidad. Estos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días hasta la cosecha de la celulosa. Tanto el líquido fermentado como la membrana fueron evaluados en las propiedades físicas, químicas, mecánicas y funcionales. Se realizó el análisis de varianza y los resultados indican que la mayor producción de celulosa fue con 10 % de azúcar y con una sustitución del 75 % de la infusión de cáscaras de café. Este tratamiento mostró un rendimiento quincenal de 25 % de producción de celulosa, con mejores propiedades de dureza y estructura firme respecto a los demás tratamientos.

Palabras claves: Kombucha, celulosa bacteriana, medios de cultivo, té negro, cáscara de café.

**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

**“OBTAINMENT OF BACTERIAL CELLULOSE THROUGH ON KOMBUCHA, BY
SUBSTITUTION OF BLACK TEA BY TEA OF COFFEE HUSK”**

Authors: Jonathan Stalin Merchan Sornoza

Jean Carlos Tigre Chango.

Advisor: Ing. Augusta Jiménez Sánchez MSc

ABSTRACT

The present investigation sought to obtain bacterial cellulose by inoculation of the *Gluconacetobacter xylinus* fungus present in the Kombucha drink by means of a static culture and with the replacement of black tea with an infusion of coffee husk. Two concentrations of 20 and 10 % sugar and 5 treatments of 0, 25, 50, 75 and 100 % substitution of coffee husk tea were evaluated. The rectangular reactors used were 1.5 L capacity. These were kept at room temperature for 15 days until the cellulose harvest. Both the fermented liquid and the membrane were evaluated for physical, chemical, mechanical and functional properties. The analysis of variance was carried out and the results indicate that the highest production of cellulose was with 10 % sugar and with a 75 % replacement of the coffee husk infusion. This treatment showed a biweekly yield of 25 % cellulose production, with better hardness properties and firm structure compared to the other treatments.

Keywords: Kombucha, bacterial cellulose, culture media, black tea, coffee husk.



**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado ING. AUGUSTA JIMÉNEZ SÁNCHEZ MSC, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por JONATHAN STALIN MERCHAN SORNOZA, # CÉDULA 0951753953, JEAN CARLOS TIGRE CHANGO, #CÉDULA 092163723-7, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de INGENIERO QUIMICO

Se informa que el trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ”** ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio Urkund quedando el 0 % de coincidencia.

Documento: Celulosa Bacteriana Urkund.pdf (D54821167)
Presentado: 2019-08-14 16:46 (-05:00)
Presentado por: Sandra Ronquillo Castro (sandra.ronquillo@ug.edu.ec)
Recibido: sandra.ronquillo.ug@analysis.urkund.com
0% de estas 22 páginas, se componen de texto presente en 0 fuentes.

Lista de fuentes: Bloques
Categoría: Enlace/nombre de archivo
Celulosa Bacteriana Urkund.pdf
Fuentes alternativas: http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v8n16/v8n16a12.pdf
Fuentes no usadas

1 Advertencias
Reiniciar Exportar Compartir

cáscara de café fue evaluada mediante 5 tratamientos con 3 repeticiones en cada uno, en donde se aumentó la concentración del café y simultáneamente se disminuyó la proporción del té, aplicándose los medios de cultivo HS y HB durante seis siembras experimentales a lo largo de la investigación. El resultado obtenido en el tratamiento 4 (75 % cáscara de café y 25 % té negro), usando el medio de cultivo HB, mostró un rendimiento quincenal del 25 % de producción de celulosa, una alta cristalinidad, dureza y estructura firme, respecto a los demás tratamientos. Se analizó estadísticamente los resultados mediante el software informático "SPSS", cuyo aporte permitió demostrar gráficamente y numéricamente la diferencia entre cada tratamiento y la óptima influencia de la cáscara de café en la producción de un polímero biológico. Palabras claves: Kombucha, celulosa bacteriana, medios de cultivo, té negro, cáscara de café.

2 ABSTRACT The purpose of this research is to obtain a bacterial cellulose using the inoculation of the fungus present in the Kombucha drink by means of a static culture. The substitution of black tea with an infusion of coffee husk was evaluated by 5 treatments with 3 repetitions in each one, where the coffee concentration was increased and the proportion of the tea was simultaneously decreased, with the HS and HB culture media being applied during six experimental sowings throughout.

<https://secure.urkund.com/view/53361395-139003-415634>

Ing. Augusta Jiménez Sánchez, MSc.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN
c.i. 1102444484



ANEXO 7

**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

Guayaquil, 30 de agosto del 2019

Sr.

Ing. Luis Alberto Bonilla
**DIRECTOR DE LA CARRERA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad.-**

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la **REVISIÓN FINAL** del Trabajo de Titulación

OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ de los estudiantes **JONATHAN STALIN MERCHAN SORNOZA, # CÉDULA 0951753953, JEAN CARLOS TIGRE CHANGO, #CÉDULA 092163723-7**. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

Cumplimiento de requisitos de forma:

- El título tiene un máximo de 19 palabras.
- La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.
- El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad.
- La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.
- Los soportes teóricos son de máximo 5 años.
- La propuesta presentada es pertinente.

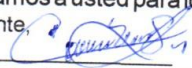
Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que los estudiantes **JONATHAN STALIN MERCHAN SORNOZA, # CÉDULA 0951753953, JEAN CARLOS TIGRE CHANGO, #CÉDULA 092163723-7**, están aptos para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,


Ing. Cecilia Uzca Sornoza.

C.I. 0921160214



ANEXO 4

**FACULTA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE TITULACIÓN**

Guayaquil, 15 de agosto del 2019

Sr.
Ing. Luis Alberto Bonilla
DIRECTOR DE LA CARRERA
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación **"OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ** de (los) estudiante, Jonathan Stalin Merchan Sornoza, con C.I. No. 0951753953 y Jean Carlos Tigre Chango, con C.I No. 092163723-7, indicando que han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que los estudiantes están aptos para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

Ing. Augusta Jiménez Sánchez, MSc.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN
c.i. 1102444484

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación con todo mi cariño y amor:

A Dios

Por ser ese amigo fiel, Padre, consejero, e inspirador y darme las fuerzas necesarias para continuar en este duro proceso de obtener una de las metas más deseadas. Gracias a su infinita misericordia bendice mi vida, me guía a seguir luchando y me da seguridad en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A mis padres

Cesar Merchan y Mirian Sornoza, por ser los principales promotores de mis sueños y aventuras, por confiar y creer en mis expectativas, por sus consejos, valores y principios que me inculcan cada día para ser una mejor persona. Por su amor, trabajos y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y convertirme en lo que soy, son los mejores padres.

A mis hermanas

Melissa y Stephanie por todo su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso. Por estar conmigo en cada momento, y sacar de mí siempre lo mejor a pesar de mi carácter.

A toda mi familia

Porque con sus oraciones, consejos, valores y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona, y están en cualquier momento para brindarme su ayuda y acompañarme en todos mis sueños y metas.

A mi Pastor y hermanos de Fe

Por ser esos instrumentos que DIOS utiliza para llegar a mi vida, a través de oraciones, palabra de aliento, y consejos que transforma mi vida y me ayuda a seguir peleando cada día más. Por ser esos amigos, hermanos que están en todo momento ayudándome a levantar y seguir en familia. Mil gracias, que DIOS siga bendiciendo sus vidas.

JONATHAN STALIN MERCHAN SORNOZA

DEDICATORIA

Con profundo amor les dedico este trabajo de titulación:

A Dios Padre, A Dios Hijo y a Dios Espíritu Santo por haberme fortalecido en mis debilidades durante esta etapa de formación, por darme la sabiduría de lo alto en cada reto que se me presentó, por amarme aún en mis errores y por permanecer fiel con su amor eterno en mi vida.

A mis amados Padres, Carlos y Ana, quienes han dejado en mi vida un legado de amor y sacrificio sin importar cada situación adversa. Que este escrito final sea símbolo de su fruto sembrado en mí teniendo como meta la paciencia, el cariño y el amor que solo un padre puede dar hacia un hijo.

A mi hermano Samir, cuya juventud me ha hecho recordar cada día de esta vida, la dicha de ser feliz sin necesidad del dinero, fama o gloria de este mundo. Teniendo como meta mostrarte el camino correcto bajo los principios de Dios y apoyándote en tu vida estudiantil y profesional a futuro.

A mi pastor Alejandro Vera y todos los hermanos de la congregación, quienes han sido mentores de conocimiento, disciplina, obediencia y pasión de Dios aquí en esta tierra. Enseñándome cada día de mi vida que el amor hacia el Padre celestial deberá siempre estar primero ante cualquier título o logro académico.

JEAN CARLOS TIGRE CHANGO

AGRADECIMIENTO

Primero que nada, queremos agradecer a DIOS por protegernos durante esta trayectoria y darnos el valor y las fuerzas necesarias para superar los obstáculos que se presentaba a través de este tiempo.

A nuestros padres por habernos brindado la confianza y el apoyo en el trayecto de este camino, demostrándonos su amor incondicional, corrigiendo nuestras faltas y celebrando nuestros triunfos, así mismo enseñándonos a no rendirnos ante nada y mirando siempre hacia adelante.

A nuestros hermanos quienes con su apoyo, alegría y cariño nos han hecho siempre sonreír.

A nuestra asesora MSc. Augusta Jiménez Sánchez, por la orientación, ayuda, paciencia y amistad que nos brindó, la cual nos permitió aprender mucho más de lo esperado en este proyecto.

A nuestros docentes Ing. Radium Avilés e Ing. Wilfrido Terán, por sus asesorías y apoyo para culminar este proyecto.

A la Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales Exactas, Campus Guanajuato, Laboratorio de materiales en los asesores Dr. David Contreras López, Dra. Rosario Galindo y Dra. Rosalba Fuentes por habernos brindado el material necesario y el uso de laboratorios para trabajar y realizar análisis de microscopía FTIR y fuerza de tracción, recibiéndonos siempre con una sonrisa.

JONATHAN MERCHAN & JEAN TIGRE

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	4
1. EL PROBLEMA	4
1.1 Tema.....	4
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Formulación y sistematización de la investigación	5
1.3.1 Formulación del problema de investigación.....	5
1.3.2 Sistematización de la investigación	6
1.4 Justificación.....	6
1.4.1 Justificación teórica.	6
1.4.2 Justificación metodológica.....	7
1.4.3 Justificación práctica.....	8
1.5 Objetivos de la investigación	8
1.5.1 Objetivo general.	8
1.5.2 Objetivo específico	9
1.6 Delimitación de la investigación	9
1.6.1 Delimitación temporal.	9
1.6.2 Delimitación espacial	9
1.6.3 Delimitación del contenido.....	11
1.7 Hipótesis	11
1.7.1 Variables independientes.	11
1.7.2 Variables dependientes.	11
1.7.3 Operacionalización de las variables	12
CAPÍTULO II	14
2. Marco referencial.....	14
2.1 Antecedentes de la investigación.....	14
2.2 Marco teórico.	16
2.2.1 La celulosa bacteriana.....	16
2.2.2 Propiedades de celulosa bacteriana.....	17
2.2.3 La kombucha	17
2.3 Sustratos	18
2.3.1 Té negro	18

2.3.2	Producción mundial de té negro	19
2.3.3	Producción nacional de té negro	20
2.3.4	Composición del té negro.	20
2.4	El café	22
2.4.1	Cáscara de café	23
2.4.2	Nutrientes de la cáscara de café.....	23
2.4.3	Variedad <i>Coffea Arábica Caturra</i>	24
2.4.4	Composición del café género <i>Coffea Arábica</i>	25
2.4.5	Producción a nivel mundial.....	26
2.4.6	Producción a nivel nacional.....	28
2.4.7	Precio del café en el mercado internacional y nacional	29
2.5	Medios de cultivos.....	30
2.6	Marco conceptual.....	35
2.6.1	Té negro	35
2.6.2	Café	35
2.6.3	Cáscara de café	35
2.6.4	La celulosa bacteriana.....	35
2.6.5	Kombucha	36
2.6.6	Medio HB.....	36
2.6.7	Fuentes de carbono.....	36
2.6.8	Sacarosa	36
2.6.9	Glucosa	37
2.6.10	Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	37
2.6.11	Tracción.....	37
2.6.12	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	37
2.7	Marco contextual.....	38
CAPÍTULO III		39
3.	MARCO METODOLÓGICO	39
3.1	Diseño de la investigación.....	39
3.2	Selección de materias primas.	39
3.2.1	Selección de materiales y equipos	40
3.3	Obtención del medio de cultivo	40
3.3.1	Obtención del té de kombucha	40
3.3.1.1	Microscopía óptica del té de kombucha.....	40
3.3.2	Obtención de muestra inicial para réplica.....	41

3.4	Fermentación del cultivo	42
3.4.1	Producción de celulosa en diferentes tratamientos	42
3.4.2	Cosecha y procesamiento de la celulosa	43
3.5	Planteamiento del diseño experimental.....	44
3.6	Evaluación analítica	45
3.6.1	Análisis de materia prima	45
3.7	Análisis de producto terminado	45
3.7.1	Determinación del pH	45
3.7.2	Determinación de sólidos solubles	45
3.7.3	Determinación de peso en la membrana húmeda.	45
3.7.4	Determinación de peso en la membrana seca.	46
3.7.5	Rendimientos diarios y quincenales.	46
3.7.6	Determinación de humedad.....	46
3.7.7	Determinación de cenizas	47
3.7.8	Determinación de espesor.....	48
3.7.9	Capacidad de absorción de agua	48
3.7.10	Determinación de porcentaje de celulosa.....	48
3.7.11	Determinación de la fuerza de tracción	50
3.7.12	Determinación de espectroscopía infrarrojo (FTIR).....	50
3.7.13	Microscopía de electrónica de barrido (MEB).....	50
3.8	Análisis estadísticos de los resultados	51
CAPÍTULO IV		52
4.1	Identificación morfológica de la bacteria <i>Acetobacter xylinum</i>	52
4.2	Resultados de materia prima	53
4.3	Análisis de producto terminado	53
4.4	Espectroscopía infrarroja. FTIR	64
4.5	Resultados de microscopía de electrónica de barrido (MEB).....	66
4.6	Resultados de propiedades mecánicas-tensión.....	67
4.7	Resultados de estimación de costos.....	69
CAPITULO V		71
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
Bibliografía		73
Anexos		81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de Variables.....	12
Tabla 2. Producción Mundial de Té Negro.....	19
Tabla 3. Composición química del té negro.....	21
Tabla 4. Composición física y química de la cáscara de café.....	23
Tabla 5. Composición química del <i>Coffea Arábica</i>	25
Tabla 6. Producción total de países exportadores de <i>Coffea Arábica</i>	27
Tabla 7. Producción de <i>Coffea Arábica</i> y <i>Coffea Robusta</i> en Ecuador.....	28
Tabla 8. Precios pagados a productores en países exportadores.	29
Tabla 9. Composición de medios de cultivo para celulosa bacteriana según sus autores	31
Tabla 10. Rendimiento de celulosa bacteriana según sus autores	32
Tabla 11. Condiciones de experimento 1. 20 % azúcar	44
Tabla 12. Condiciones del experimento 2. 10 % azúcar	44
Tabla 13. Resultado de humedad y cenizas del té negro y la cáscara de café. ..	53
Tabla 14. pH y sólidos solubles (ss) en ensayos E1 y E2.....	54
Tabla 15. Composición de las membranas de celulosa: humedad, cenizas y espesor de membranas secas.	55
Tabla 16. Resultado de producción de celulosa del experimento 1.	57
Tabla 17. Capacidad de absorción de películas de celulosa bacteriana.....	59
Tabla 18. Resultados de producción de celulosa del Experimento 2.....	60
Tabla 19. Anova de dos factores. Rendimiento quincenal.	61
Tabla 20. Evaluación comparativa de peso y rendimientos del E1 y E2	62
Tabla 21. Prueba T de medias.....	63
Tabla 22. Resultados de prueba de tracción de membranas de tercer cultivo en el experimento 1.....	67
Tabla 23. Determinación de costo de producción.	69
Tabla 24. Costo por unidad de membrana celulosa bacteriana.	69
Tabla 25. Determinación del precio de venta de la membrana de celulosa bacteriana.....	70

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Ubicación de Instituto de Investigación Tecnológica.	10
Ilustración 2. Ubicación de INSPI.	10
Ilustración 3. Ubicación de la Universidad de Guanajuato	10
Ilustración 4. Parte de un grano de café	22
Ilustración 5. microscopía óptica de la bacteria A. en aumento de 10x	52
Ilustración 6. microscopía óptica de la bacteria A. en aumento de 40x	52
Ilustración 7. Porcentaje de Celulosa	59

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Composición física del grano de café.	26
Gráfico 2. pH y solidos solubles (SS) de E 1 y E2.....	54
Gráfico 3. Humedad, cenizas y espesor de membranas	56
Gráfico 4. Experimento 1 utilizando 200 gramos de azúcar	58
Gráfico 5. Producción de celulosa. Experimento 2.....	61
Gráfico 6. Pruebas de tracción de películas de celulosa bacteriana.	68

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Diseño de la investigación del trabajo.	39
Diagrama 2. Procedimiento de obtención de cultivo iniciador de celulosa	41
Diagrama 3. Procedimiento de multiplicación del hongo	42
Diagrama 4. Procedimiento de la extracción y purificación de celulosa	43
Diagrama 5. Procedimiento para determinación de celulosa.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Evidencias del desarrollo de la tesis.	81
Anexo 2: Informe de resultados de MEB, realizados en el instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.....	87
Anexo 3 Resultados de tracción	88

RESUMEN

La presente investigación buscó obtener celulosa bacteriana por inoculación del hongo *Gluconacetobacter xylinus* presente en la bebida Kombucha mediante un cultivo estático y con la sustitución del té negro por una infusión de cáscara de café. Se evaluaron dos concentraciones de 20 y 10 % de azúcar y 5 tratamientos de 0, 25, 50, 75 y 100 % de sustitución del té de cáscaras de café. Los reactores rectangulares usados fueron de 1.5 L de capacidad. Estos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días hasta la cosecha de la celulosa. Tanto el líquido fermentado como la membrana fueron evaluados en las propiedades físico, químicas, mecánicas y funcionales. Se realizó el análisis de varianza y los resultados indican que la mayor producción de celulosa fue con 10 % de azúcar y con una sustitución del 75 % de la infusión de cáscaras de café. Este tratamiento mostró un rendimiento quincenal de 25 % de producción de celulosa, con mejores propiedades de dureza y estructura firme respecto a los demás tratamientos.

Palabras claves: Kombucha, celulosa bacteriana, medios de cultivo, té negro, cáscara de café.

ABSTRACT

The present investigation sought to obtain bacterial cellulose by inoculation of the *Gluconacetobacter xylinus* fungus present in the Kombucha drink by means of a static culture and with the replacement of black tea with an infusion of coffee husk. Two concentrations of 20 and 10 % sugar and 5 treatments of 0, 25, 50, 75 and 100 % substitution of coffee husk tea were evaluated. The rectangular reactors used were 1 L capacity. These were kept at room temperature for 15 days until the cellulose harvest. Both the fermented liquid and the membrane were evaluated for physical, chemical, mechanical and functional properties. The analysis of variance was carried out and the results indicate that the highest production of cellulose was with 10 % sugar and with a 75 % replacement of the coffee husk infusion. This treatment showed a biweekly yield of 25 % cellulose production, with better hardness properties and firm structure compared to the other treatments.

Keywords: Kombucha, bacterial cellulose, culture media, black tea, coffee husk.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros eran considerados como el mejor componente estructural para diversos usos y aplicaciones (Guerrero, 2011). Sin embargo, con el paso de los años, sus efectos tuvieron un gran impacto ambiental provocando un sin número de problemas económicos y demográficos (Billmeyer, 2015). Esto ha provocado la búsqueda de nuevos materiales amigables con el ambiente y que posean similares características de funcionamiento.

En los últimos años la producción de celulosa bacteriana ha sido objeto de estudio en diferentes ramas de la ciencia. En medicina, se ha aplicado la biocelulosa para el tratamiento de quemaduras de diferentes tipos, sustituyendo los costosos métodos convencionales (Batista-Cruzado, 2015). En ingeniería en alimentos se ha usado biopolímeros para el recubrimiento de comestibles dejando atrás el uso de materiales sintéticos y compuestos contaminantes (Caicedo, 2012).

Si bien existe un sin número de bacterias productoras de biopolímeros, el género *Acetobacter Xylinum* ha sido considerado como el mejor microorganismo para obtener celulosa (Miranda, 2014), ya que su comportamiento simbiote junto a otras bacterias y levaduras permite desarrollarse de excelente manera en cualquier medio de cultivo (Malamud, 2011).

La presente investigación tiene como fin sustituir el té de la cáscara de café por el té negro en la bebida Kombucha se espera una producción aceptable de celulosa y así abaratar costos en la preparación del medio de cultivo en donde se desarrolle la bacteria, dar un valor agregado a los residuos del café y contribuir con el medio ambiente.

CAPÍTULO I

1. EL PROBLEMA

1.1 Tema

Obtención de celulosa bacteriana a base de Kombucha por sustitución de té negro por té de cáscara de café.

1.2 Planteamiento del problema.

Actualmente se fabrica alrededor de 380 millones de toneladas de plástico cada año (PlasticEurope, 2018), donde el 9 % ha sido reutilizado, 12 % quemado y 79 % ha precipitado en rellenos o está afectando al medio ambiente (Geyer, 2017). Los altos costos, la disponibilidad y los desechos generados a partir de estos polímeros sintéticos son una problemática en las industrias alimentarias (Neira, 2016).

Para contrarrestar la contaminación de plásticos se ha empleado el uso de materiales biodegradables formados con celulosa vegetal, a fin de evitar la contaminación y extender la vida útil de los productos (Klemm, 2005). Con igual composición química que la celulosa bacteriana, pero diferentes en conformación estructural (González, 2017), la producción de celulosa bacteriana se presenta según Xu Liu (2018), como una alternativa al material de origen vegetal mejorando su composición física y química, ya que la celulosa bacteriana se produce en estado puro (libre de otros polímeros como lignina) y en forma cristalina; además de presentar una alta resistencia mecánica específica y una estructura de red muy fina (Nava, 2016).

La celulosa desarrollada a partir de bacterias se la obtiene como un producto adicional de la Kombucha o bebida de té negro fermentada, cuya demanda se ha incrementado en los últimos tiempos en Estados Unidos (Billmeyer, 2015). Sin embargo, para el 2023 se calcula una producción del 23 % en el mercado de la Kombucha (View Grand, 2018). Por lo que a nivel mundial se obtendrá un

precio elevado de \$ 570 millones desde un valor de \$ 250 millones (Reports, 2018). Se evidencia entonces el elevado costo que llegará a generar la producción de celulosa bacteriana a lo largo de los próximos años, en donde la demanda de obtención de biopolímeros deberá ser contestada con bajos precios de fabricación (Carreira, 2011).

Ante esta situación, se debe buscar materias primas alternativas de menor costo para la producción del medio de cultivo de las bacterias de interés. Una materia prima interesante constituye los residuos del café. Las industrias cafetaleras a nivel nacional, cada año producen más de 4800 t de residuos sólidos, entre ellos la cáscara de café, para una producción de 6000 t del grano, lo que representa un rubro alto para la contaminación (Cervantes, 2015). El aprovechamiento de este residuo orgánico posibilita una alternativa a esta problemática, minimizando así el impacto negativo generado al medio ambiente, es por eso que, al darle un valor agregado, por ser un residuo de café orgánico, se convertiría en una alternativa de negocio por el uso, aprovechamiento y tratamiento que se está aplicando (Agudelo, 2014).

En este contexto, se pretende obtener celulosa bacteriana mediante la fermentación en una infusión de cáscaras de café. se evaluará la inclusión o sustitución del té, rendimiento y características del producto, con el propósito de aprovechar los residuos de las industrias cafetaleras; disminuir costos de producción y contribuir con el medio ambiente. De esta forma se propone una materia prima alternativa para la obtención de celulosa bacteriana, la misma que será caracterizada a través de técnicas físicas, químicas y mecánicas.

1.3 Formulación y sistematización de la investigación

1.3.1 Formulación del problema de investigación.

¿El reemplazo del sustrato té negro por té de cáscara de café contribuirá en la obtención de celulosa bacteriana?

1.3.2 Sistematización de la investigación

- ¿El inóculo inicial servirá para la propagación y obtención de celulosa bacteriana?
- ¿A la temperatura ambiente se multiplicarán los microorganismos en forma suficiente que produzcan celulosa bacteriana?
- Las propiedades físicas, químicas, mecánicas y funcionales de la celulosa bacteriana, obtenida a partir de té negro, son iguales a las obtenidas a partir de cáscaras de café.
- El rendimiento de la celulosa bacteriana de cáscaras de café, al menos, será igual al obtenido de té negro.

1.4 Justificación

1.4.1 Justificación teórica.

La bebida formada por la infusión de té negro, azúcar, con una capa de celulosa, ácido acético y fermentada se llama kombucha (González, 2017). Esta bebida cuenta con hongos y levaduras conocidos por sus siglas en inglés como “*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*”, las cuales conviven por simbiosis y cuyo acrónimo es “SCOBY” Illana, (2007), que se ubica en la parte superior del líquido, ocupando toda el área posible de la interfase líquido-aire. Esta investigación contribuirá al conocimiento sobre los procesos de obtención de celulosa bacteriana y una posible nueva materia prima.

La obtención de polímeros naturales a partir de microorganismos ha sido tema de estudio en anteriores investigaciones, teniendo como resultados matrices de celulosa, a las cuales se las han denominado: “Sustancias poliméricas extracelulares”, las mismas que presentan características de alto peso molecular (Ramírez, 2012). Grenwalt (2000) y Caicedo (2012) recopilaron una serie de microorganismos, tanto bacterias como levaduras y generaron un consorcio de distintas especies, capaces de sintetizar azúcares en celulosa bacteriana, tal como el género *Acetobacter xylinum*, el cual es el principal microorganismo productor de películas (Miranda, 2014).

Para la preparación del “Hongo de Kombucha”, la sacarosa tiene gran importancia como sustrato para el crecimiento microbiano (Duarte, 2005). Illana (2007) sugiere dosificar 50 gramos de azúcar por litro de té durante 7 a 10 días para lograr un óptimo desarrollo del hongo. Ernest (2003) señala que es posible lograr una inoculación mediante granos, hojas de otras plantas y jugos de frutas y no solamente a través de la infusión de té negro o verde.

Las sustancias alcaloides presentes en el té y café, tales como: la teofilina, teobromina y cafeína conocidas como metilxantinas rigen esta investigación, ya que, debido a sus propiedades estimulantes, podrían ser materias primas de bajo costo para la producción de celulosa bacteriana, por lo que se desea saber si las cáscaras de café contribuyen a la producción de la celulosa, debido a la presencia de cafeína en las cáscaras de café (Mohamed, 2018). Para ello, se evaluará la inclusión desde cero hasta la sustitución total de cáscara de café por té.

1.4.2 Justificación metodológica

La metodología de investigación se basa en la accesibilidad que presentan las materias primas y los procesos cuantitativos para la determinación de las propiedades físicas, químicas y funcionales. Entre los análisis que se realizarán están: determinación de humedad, ceniza, espesor, tensión, rendimiento, pureza de celulosa, caracterización por espectrofotometría infrarroja (FTIR), caracterización por microscopía y electrónica de barrido (MEB).

Las propiedades funcionales de los microorganismos son el eje de estudio durante esta investigación ya que no interviene ninguna sustancia química nociva que altere las propiedades de la celulosa, mientras que los métodos convencionales implican técnicas de refinamiento y extracción usando reacciones tales como: hidrólisis ácida o neutralización con bases, las cuales se deben aplicar a altas concentraciones (Duarte, 2005).

La acción biológica estimulante por parte de las metilxantinas durante la obtención de la membrana permite producir celulosa de alto peso molecular (Nazar, 2017), es por eso que durante la formación del biopolímero, se necesita considerar caracterizaciones físico-químicas tales como: la capacidad de

absorción de agua y pureza de las películas de celulosa mediante técnicas de análisis como la Espectroscopía FTIR, método de Kushber y Hoofer y entre otras (Resquin, 2004).

1.4.3 Justificación práctica

En la actualidad la producción de celulosa proviene de diversas fuentes como algas, que tradicionalmente son aplicadas en áreas que requieren productos y compuestos sintéticos (Carreira, 2011).

La celulosa de origen biológico es muy requerida en la medicina como uso de tejido vivo en el tratamiento de quemadura. El tratamiento tecnológico de alimentos conlleva a obtener plásticos capaces de retener una gran cantidad de agua y humedad para evitar el deterioro comestible mediante la reducción de agua y oxígeno disponible necesarios para el crecimiento de microorganismos que reducen la vida útil de los alimentos.

Por tal razón, el propósito de este trabajo es la obtención de celulosa bacteriana sustituyendo el té negro por té de cascara de café, debido a que este último es más económico que el primero. Se determinará la mayor inclusión posible para la máxima obtención de celulosa bacteriana. La experimentación se realizará en el laboratorio de química analítica de la Universidad de Guayaquil durante los meses de abril y mayo del 2019.

1.5 Objetivos de la investigación

1.5.1 Objetivo general.

Obtener celulosa bacteriana a partir de la producción de Kombucha por sustitución del té negro por infusión de té de cáscara de café.

1.5.2 Objetivo específico

- Evaluar el efecto de la sustitución del té negro por té de cáscara de café para la producción de celulosa bacteriana.
- Caracterizar las propiedades físicas, químicas y mecánicas de la celulosa bacteriana obtenida a través de análisis cuantitativos y cualitativos.
- Estimar los costos de producción de celulosa bacteriana para su posible comercialización.

1.6 Delimitación de la investigación

1.6.1 Delimitación temporal.

Tres meses tomó la investigación experimental y dos meses la redacción del trabajo. Se realizaron ensayos, pruebas e investigaciones teóricas necesarias. En el periodo de experimentación se realizaron 6 cultivos diferentes, cosechando las membranas de celulosa después de quince días de su siembra. Posteriormente se dio lugar al acondicionamiento de las membranas durante 10 días, registrando los parámetros experimentales obtenidos para la caracterización de las películas de celulosa.

1.6.2 Delimitación espacial.

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Química Analítica de la facultad de Ingeniería Química, en el campus de la Universidad de Guayaquil, ubicado en la ciudadela Salvador Allende, donde se realizaron la mayor parte de los estudios gravimétricos y en laboratorio de investigaciones tecnológicas de la mencionada facultad de Ingeniería como se muestra en la ilustración 1. El análisis estructural con microscopía electrónica de barrido se realizó en la empresa pública INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública) como se muestra en la ilustración 2. El análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y la prueba de tensión se realizaron en el laboratorio de materiales de la División de ciencias naturales exactas de la Universidad de Guanajuato, en la ciudad de Guanajuato-México, como se muestra en la ilustración 3.

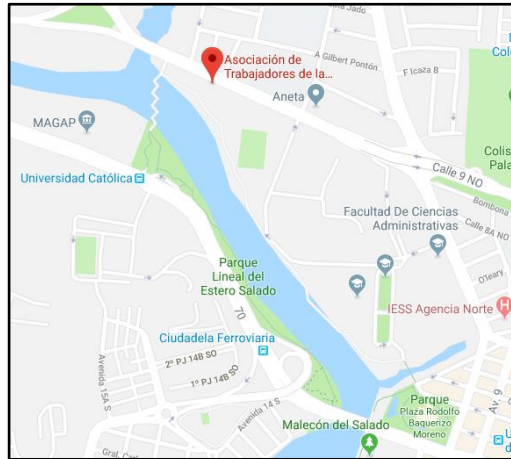


Ilustración 1. Ubicación de Instituto de Investigación Tecnológica.

Fuente: (Google Maps, 2019)

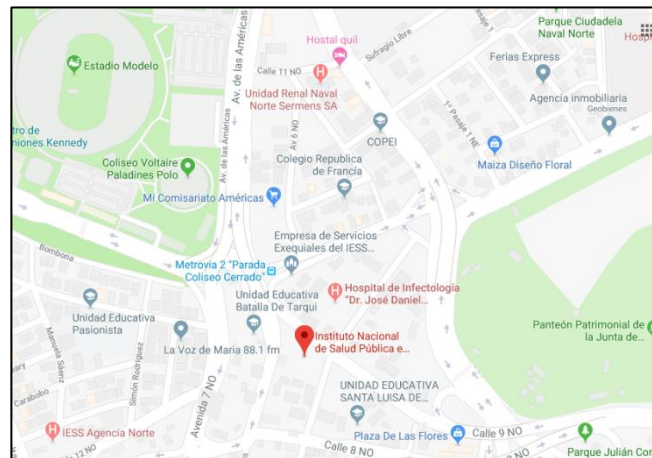


Ilustración 2. Ubicación de INSPI.

Fuente: (Google Maps, 2019)

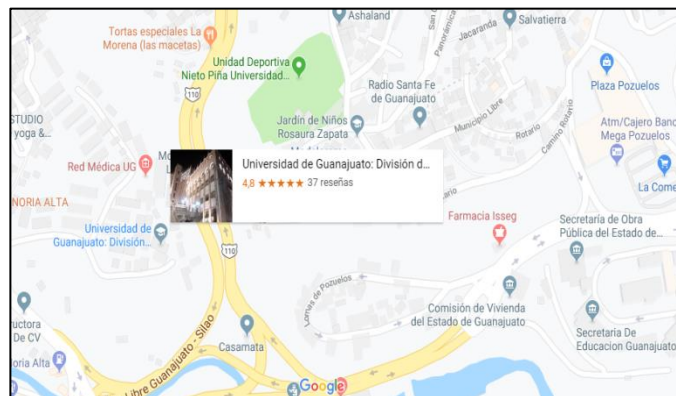


Ilustración 3. Ubicación de la Universidad de Guanajuato

Fuente: (Google Maps, 2019)

1.6.3 Delimitación del contenido.

El cultivo estático se escogió para el desarrollo microbiano usando los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* como principales productores de membranas. El método y los medios de cultivo fueron considerados por el rendimiento de celulosa y el aporte de sustancias químicas para el óptimo crecimiento bacteriano, tomando como referencia a los avances tecnológicos publicados en los últimos años en revistas, artículos científicos y trabajos de tesis.

1.7 Hipótesis

La obtención de celulosa bacteriana a partir de la infusión de té de cáscaras de café permitirá producir un biopolímero con iguales o mejores características físicas, químicas, funcionales y propiedades mecánicas que las de una celulosa elaborada a partir de la infusión de té negro.

1.7.1 Variables independientes.

Porcentaje de sustitución de té negro, porcentaje de sustitución de té cáscara de café y porcentaje de azúcar.

1.7.2 Variables dependientes.

Rendimiento obtenido de producción de celulosa bacteriana y características del medio fermentado.

1.7.3 Operacionalización de las variables

Tabla 1. Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Definición operacional	Unidad	Medición	Método/ Equipo
Independiente	Porcentaje de té cascara café	Porcentaje de sustitución.	Porcentaje de sustitución del té. 0, 25, 50, 75, 100	%	Volumen del té	-----
		Componentes químicos	Sólidos solubles	Grados Brix.	Contenido de sólidos solubles	Refractómetro
			Potencial hidrógeno	pH	Acidez	Test universal
			Humedad	%	Contenido de humedad / g de muestra	Por estufa
	Porcentaje de té negro	Porcentaje de sustitución	Porcentaje de sustitución del té. 100, 75, 50, 25, 0	%	Volumen del té	-----
		Componentes químicos	Sólidos solubles	Grados Brix	Contenido de sólidos solubles	Refractómetro
			Potencial hidrógeno	pH	Acidez	Test universal
			Humedad	%	Contenido de humedad / g de muestra	Por estufa
	Porcentaje de azúcar	Cantidad de azúcar	Contenido de azúcar	Grados Brix	Contenido de sólidos solubles	Refractómetro

Dependiente	Producción de celulosa	Rendimiento de celulosa.	Gramos de celulosa obtenida por un volumen determinado y en un tiempo determinado (diario-quincenal).	%	Contenido de celulosa por masa y por tiempo de fermentación	Balanza
		Caracterización química	Características que determinan las mediciones, calidad y pureza de las películas de celulosa.	%	Humedad	Estufa
				mm	Espesor	Micrómetro
				%	Determinación de Celulosa	Kushner y Hoofer
				%	Determinación de Cenizas.	Mufla
		Propiedades funcionales	Capacidad de absorción del agua.	%	Capacidad de absorción del agua.	Balanza
		Propiedades mecánicas.	Medición de fuerza	N	Tensión	Texturómetro
		Propiedades ópticas.	Espectroscopía infrarroja	$1/\lambda \text{ cm}^{-1}$	Identificación de la celulosa.	Espectro FTIR
			MEB	μm	Estructura morfológicos de las fibras	Microscopía
	Características del medio fermentado.	Componentes químicos	Solidos solubles	Grados Brix.	- Contenido de solidos solubles	Refractómetro
			Potencial hidrógeno	pH	Acidez	Test universal

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019).

CAPÍTULO II

2. Marco referencial

2.1 Antecedentes de la investigación.

La obtención de celulosa, en las últimas décadas ha sido un proceso muy empírico que tuvo como fin, la producción de polímeros estructurales a partir de plantas, cuya demanda incrementó exponencialmente con el paso del tiempo (Billmeyer, 2015).

El efecto invernadero, la contaminación medio ambiental, la reducción del oxígeno disponible y la falta de recursos económicos y demográficos fueron las consecuencias que hicieron la búsqueda de un polímero, el cual fue la celulosa sintética, para contrarrestar estos inconvenientes, y sustituir a los plásticos de forma parcial o en determinadas aplicaciones. Si bien la demanda y las aplicaciones de los polímeros obtenidos a partir de la celulosa no podían ser reducidas, se comenzó a reestructurar las investigaciones en busca de otras fuentes biodisponibles en la naturaleza (Saizar, 2010).

La fabricación de plásticos, los altos costos y la disponibilidad de la celulosa sintética también se volvió una problemática para las industrias debido al uso de sustancias químicas y al desgaste que presentaban en su estructura. Fue entonces que para contrarrestar los problemas que se estaban presentando, se realizó la búsqueda de un nuevo material que sea de mayor eficacia, libre de procesos químicos y de contaminantes que pueda afectar al medio ambiente (Orellana, 2015).

En 1953, los doctores Hestrim y Schramm realizaron investigaciones acerca de la obtención de celulosa a partir de la bacteria *Acetobacter Xylinum*. Estos principios fueron sustentados bajo los estudios propuestos por Hestrim, Aschner y Mager seis años antes, los cuales indicaron que las bacterias de este género, en presencia de oxígeno, lograban sintetizar celulosa a partir de células no proliferativas usando un sustrato de carbono, fue entonces que Hestrim y Schramm elaboraron un medio de cultivo ideal para este tipo de bacteria, en donde la glucosa se definió como fuente de carbono básico para el crecimiento microbiano. Además, los investigadores postularon en sus estudios el uso de

nitratos, fosfatos y extracto de levadura como nutrientes para la bacteria, además del uso de compuestos de bajo pH para acondicionar el medio de cultivo, cuyo acrónimo fue establecido como “HS” (Hestrin, 1954).

Posteriormente, las investigaciones buscaron aumentar el rendimiento de la producción de celulosa manejando las proporciones del sustrato y nutrientes. Los doctores Hassid y Barker por su parte propusieron el uso de sacarosa dentro del medio de cultivo ya que, de acuerdo con sus investigaciones, este azúcar es químicamente más estable respecto a la glucosa. Sin embargo, los nutrientes no fueron modificados (Lestari, 2013).

Zhou (2007) consideró el uso de glucosa y sacarosa variando sus proporciones entre sí, además de usar el licor de maíz y compuestos sulfatados como nutrientes.

Por su parte, Son propuso usar etanol en bajas concentraciones manteniendo el medio de cultivo creado por Zhou (Son, 2001).

De acuerdo a los estudios de Cakar (2014), Gomes (2012) y Pacheco (2017) se propuso sustituir la fuente de carbono básica usando desechos agrícolas, con la finalidad de aumentar rendimientos de producción de celulosa sin necesidad de recurrir a nutrientes externos.

La consideración de la cáscara de café conlleva a ser sustituto del té negro, ya que, al ser un desecho de bajo valor económico, aporta con alcaloides de igual aplicación funcional dentro de la bebida tales como: la cafeína, teobromina y entre otros (Rani, 2011).

A partir de este último principio, las investigaciones se enfocaron en evaluar sustratos de carbono y nutrientes propios de una sola fuente. De acuerdo con Illana (2007), la bebida de Kombucha creada a partir del té negro es considerada como un buen medio de cultivo, ya que cuenta con un óptimo sustrato y alcaloides presentes en el té, tales como la teína que le ayudan al desarrollo de la membrana de celulosa durante la incubación.

2.2 Marco teórico.

Actualmente existe un sin número de ejemplos de sociedades microbianas con gran importancia biotecnológica, lo cual se ha denominado *Kombucha*, que es una asociación simbiótica principalmente de varios tipos de bacterias y levaduras (Neil Stevens, 2018). Esta sociedad microbiana se desarrolla en medio líquido azucarado, como es el caso del té chino, cuyo consumo ha llegado a varios países europeos como Rusia, Alemania, y Francia volviéndose muy popular (Gordillo, 2018).

Se ha encontrado que la Kombucha posee una acción como antibiótico natural y mantiene la capacidad para reparar el daño causado por contaminantes ambientales como el tricloroetileno y a su vez presenta efectos hipocolesterolémico y antioxidantes. Aparte de estas características, el consorcio microbiano presente en la Kombucha es capaz de sintetizar membranas de celulosa con la finalidad de proteger el medio de cultivo de agentes externos tanto físicos como químicos (Lescano, 2015).

2.2.1 La celulosa bacteriana

Es un polímero extracelular sintetizado por la fermentación de microorganismos conformados principalmente por bacterias del género *Acetobacter*. Este microorganismo fue descubierto por primera vez en 1886 por Adrian J. Brown denominándolo como “una membrana gelatinosa traslúcida que crece en la superficie del medio de cultivo”. Sin embargo, también existen otras bacterias capaces de producir celulosas pertenecientes al género *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*. La razón por la cual los microorganismos producen biopolímeros ha sido discutida en diversos reportes (Higuchi, 1990). Un postulado señala que los microorganismos aerobios producen una membrana para mantener su posición cerca de la interfase aire-medio de cultivo. Otro postulado propone que los microorganismos generan celulosa para evitar su contacto directo con los rayos UV, y una última teoría indica que las bacterias forman un “armazón” para protegerse de agentes externos como iones de metales pesados, en tanto que los nutrientes pueden ser asimilados de mejor manera por difusión (González, 2017).

Esta celulosa de origen bacteriano es similar en composición química, a la celulosa vegetal, aunque presenta diferencias significativas respecto a su conformación estructural (Adnan, 2015). La característica más importante que diferencia a ambas celulosas, es el grado de pureza que presenta el biopolímero microbiano ya que no se encuentra asociado a la hemicelulosa y lignina como ocurre en la celulosa vegetal (Gomes, 2012). La estructura de la celulosa bacteriana se encuentra formando cristales de celulosa I α y I β (González, 2017).

2.2.2 Propiedades de celulosa bacteriana

Otras propiedades que caracterizan a las membranas de celulosa son: La alta capacidad para retener agua, una óptima estabilidad mecánica y térmica, su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Vinita, 2002). Estas propiedades hacen de la celulosa bacteriana un biopolímero de suma importancia para distintas aplicaciones en industrias papeleras, textiles, alimentarias y de biomateriales para la medicina y cosmética. Las membranas bacterianas no tienen únicamente propiedades en condiciones normales sino también al incluirle componentes al medio de cultivo donde puede modificarlas y potenciarlas. Derivados de la celulosa, sulfatos, fosfatos de alquilo y otros polisacáridos son elementos que, incluidos en el medio cultivo, alteran la morfología macroscópica, la resistencia a tracción, la densidad óptica y sus propiedades de absorción. Simultáneamente, la combinación con otras sustancias es posible, tal como celulosa seca, obteniendo compuestos con propiedades fisicoquímicas particulares (Jaramillo, 2012).

2.2.3 La kombucha

La bebida de Kombucha se prepara tradicionalmente al fermentar té negro, endulzado con sacarosa, con una capa de celulosa donde existe una simbiosis de levaduras y bacterias del ácido acético, y un 10 % de inóculo del hongo de Kombucha ya preparado. Durante la fermentación se produce una nueva capa de celulosa sobre la anterior, donde las levaduras transforman la sacarosa en fructosa, glucosa y etanol (Reiss, 2008). Luego las bacterias del ácido acético

convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético (Sievers, 2014). El té negro y la azúcar blanca son los mejores sustratos para la preparación de kombucha, aunque también se puede utilizar té verde (Reiss, 2008). Por otro lado, la cafeína y las xantinas relacionadas de la infusión de té favorecen a la síntesis de celulosa por la bacteria. El ácido acético estimula a las levaduras a producir etanol, y el etanol por su parte ayuda a las bacterias del género *Acetobacter* a crecer y producir ácido acético (Liu, 2002).

Se ha reportado que el etanol y el ácido acético tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patogénicas y consecuentemente proveen protección contra la contaminación de la kombucha (Teoh, 2004). Los mayores metabolitos que se obtienen de la fermentación de la kombucha incluyen: monosacáridos, varios tipos de ácidos orgánicos y vitaminas. En la preparación tradicional de kombucha los únicos nutrientes provienen del té y de la sacarosa, que están compuesto de polifenoles, cafeína, aminoácidos, carbohidratos, ceniza, vitaminas, minerales, y compuestos insolubles como proteínas (Ruiz, 2018).

El cultivo se lleva a cabo en condiciones estáticas, manejando parámetros ideales para las bacterias procedentes de la kombucha, a una temperatura de 28-30°C. Sin embargo, algunos autores han observado que la máxima producción de celulosa tanto para glucosa como para sacarosa se logra a 30°C. A 25°C y 35°C los rendimientos son similares entre sí, pero menores que a 30°C, mientras a 40°C no existe crecimiento del microorganismo y consecuentemente no se obtiene el biopolímero (Tadao, 2017) y (Pineda, 2012).

2.3 Sustratos

2.3.1 Té negro

La planta de té es un arbusto frondoso perteneciente a la familia de las teáceas. Primordialmente se denomina “Té” al fruto capsular que lo caracteriza, siendo de amplias variedades tales como: té negro, té verde o té rojo (Castro, 2017). Sus hojas proceden de la planta *Camellia Sinensis* y su diversidad radica en los tipos de oxidación procedentes de las fermentaciones, provocando en la

mayoría de ellas un alto contenido de cafeína y otorgándoles tonalidades oscuras con sabores fuertes (Casalins, 2017). Sin embargo, no todos los brotes de té tienen la misma relación en cuanto a rendimientos tras las cosechas, ya que inicialmente se obtienen brotes verdes que posteriormente pasan a una etapa de marchitado, en donde el contenido de materia se reduce a un 65 o 70 % de su etapa inicial y posteriormente van hacia un proceso de fermentación, lo cual provoca un pardeamiento enzimático que origina las distintas tonalidades del té. La producción del té negro conlleva precisamente una alta etapa de oxidación, en donde las enzimas polifenoloxidasas incurren en el color oscuro del mismo, además de concentrar los alcaloides presentes (Bernardi, 2017).

En Sudamérica, la provincia de Misiones, en la República de Argentina, con el 95.2 % de zona es el principal productor y comerciante de esta planta llegando a alcanzar 81.279,3 toneladas/hectáreas/año; lo cual es destinado en exportaciones hacia países vecinos (Quiñones, 2013).

2.3.2 Producción mundial de té negro

Para el año 2017 mundialmente se obtuvo una producción de 4.7 millones de toneladas, donde el 75 % de la cosecha fue la variedad de té negro, indicando una alta demanda de exportaciones y consumos. Si bien existe 40 países que tienen un alto índice de cultivo, India y China son líderes mundiales como productores de té con el 53 % de elaboración (Buryaile, 2017).

Tabla 2. Producción Mundial de Té Negro

Ciudad	Producción (%)	Ciudad	Producción (%)
China	28	Vietnam	5
India	25	Argentina	4
Kenia	10	Indonesia	4
Sri Lanka	9	Irán	3
Turquía	6	Japón	2
El 4 % restante corresponde a los demás países			

Fuente: UPASI Tea Research Foundation, 2018

No obstante, estos porcentajes cambian de acuerdo con el tipo de agricultura que se maneje y a las condiciones climáticas en donde se desarrolle (Bernardi, 2017).

2.3.3 Producción nacional de té negro

Como infusión el té sigue siendo la bebida más consumida después del agua con 5.3 millones de toneladas métricas. En sudamérica, Ecuador se ubica como penúltimo consumidor con tan solo 3 gramos de té por habitante al año y su demanda es muy baja teniendo en cuenta que existen zonas propicias para su desarrollo acompañado de variedades climáticas (Lobsang, 2003). La provincia de Pichincha cuenta con el mayor número de agricultores que destinan la hoja hacia proveedores que procesan este producto. Tal es el caso de compañías como: Compañía Ecuatoriana del Té C.A. (CETCA) y Ecuatoriana del Té ubicados en Morona Santiago y Quito respectivamente. No obstante, CETCA cultiva su materia prima como tal, teniendo en cuenta que el crecimiento del té es propio en climas tropicales y subtropicales (Silva, 2017).

Referente a los productores nacionales, “Casa Cayambe - Asociación de campesinos de Olmedo”, ubicado en Quito, logra anualmente 437.000 kg en 115 hectáreas, de lo cual solo el 10 % es destinado al mercado internacional mientras que, el 90 % tiene destino al mercado local (Castro, 2017).

Existen empresas dedicadas a la producción de bolsas de té con carácter medicinal, tal es el caso de “La Sureñita S.A” e “Hierbas Pusiquí S.A.” ubicadas en la provincia de Loja y Quito respectivamente, teniendo costos entre los \$1.05 hasta los \$ 2.50 por caja de 30 unidades de bolsas de té (Bernardi, 2017).

Sin embargo, estos valores van en aumento, ya que nuestros principales importadores son China y Argentina, este último país con un destino del 1.2% de 74.9 mil toneladas promedio (Bernardi, 2017).

2.3.4 Composición del té negro.

Como antes se había mencionado, una de las propiedades que hace característico el té negro, es su alto grado de oxidación, lo cual favorece a la

liberación de la teína durante la infusión. Además, es propio dentro de su composición el hierro, fósforo, flúor, zinc, manganeso y algunos minerales. Si bien la cafeína tiene altas concentraciones como tonificante y estimulante, la teofilina y teobromina se conjugan como los principales alcaloides y catalizadores biológicos dentro del mismo (Clark, 2015).

Tabla 3. Composición química del té negro

Elementos	Unidades	Producción
Teaflavinas	%	0,78
Tearubiginas	%	8,02
Sustancias altamente polimerizadas	%	11,19
Polifenoles totales	%	20
Cafeína	%	3,51
Aminoácidos	%	1
Proteínas	%	20,60
Lípidos	%	2,50
Carbohidratos	%	32,10
Humedad	%	6
Calcio	(mg/100 gr.)	470
Fósforo	(mg/100 gr)	320
Hierro	(mg/100 gr)	17,40
Sodio	(mg/100 gr)	3
Potasio	(mg/100 gr)	2000
Vitmana A		900
Vitamina B1		0,10
Vitamina B2		0,80
Niacina	(mg/100 gr)	10
Acido Gálico	%	0,15
Epigalato de Catequina	%	0,57
(+) Catequina	%	0,18
Galato de epicalocatequin	%	2,86
Galato de epicatequina	%	0,30

Fuente: UPASI Tea Research Foundation, 2018

Es muy importante entender las funciones de las teaflavinas y tearubiginas dentro del té negro, las cuales dan el sabor y aroma característico. Este hecho se da cuando los polifenoles oxidados entran en contacto con los flavonoides en la etapa de enrulado de las hojas. El 30 % de los brotes secos del té lo conforman también ácidos fenólicos y glucósidos, quienes varían en porcentaje según sea la oxidación (Santander, 2015).

Por otra parte, las catequinas generalmente se encuentran en un 80 – 90 % en hojas verdes que no han pasado procesos posteriores. Sin embargo, en el té negro estas proporciones se reducen de 20 a 30 % debido a las altas temperaturas a las que fue sometida la materia prima inicial (Luis, 2008).

De acuerdo con González (2003), los polifenoles presentes en el té tienen una buena interacción con proteínas ricas en prolina tales como la caseína, extractos de levaduras y cualquier componente que presente aminoácidos.

2.4 El café

La planta de café conocida como cafeto, es un arbusto frondoso del género *Coffea*, perteneciente a las familias de los rubiáceos. Como tal, su óptimo crecimiento se da en climas tropicales y subtropicales principalmente en zonas ecuatoriales. Su composición física está dada por un fruto carnoso denominado cereza de café en donde se concentra altos porcentajes de alcaloides (Alulima, 2012). Las cascaras o envolturas que contienen a la semilla se las conoce como pergamino y mucílago, las cuales contienen altas concentraciones de azúcares, y ligeras concentraciones de metilxantinas en comparación con la cereza. La pulpa se halla en mayor proporción y es quien determinará las distintas variedades de esta planta a través de su estructura química (Arcila, 2010).



Ilustración 4. Parte de un grano de café

Tomado de (Manals, 2017)

2.4.1 Cáscara de café

En la actualidad grandes cadenas de EEUU, tales como Starbucks, Nestle y Stumptown coffee se encuentra introduciendo una variedad de productos con la cáscara secada del *Coffea Arábica* (Romero, 2018).

Como la cáscara del *Coffea Arábica* comúnmente se desecha hasta ahora o se le daba poco uso como fertilizante barato, las grandes cadenas de cafeterías en EE. UU. Se encuentran comercializando o introduciendo productos con nuevos sabores y características diferentes al tradicional café, como bebidas endulzadas con jarabe de cáscara, té y bebida carbonatada (Romero, 2018).

2.4.2 Nutrientes de la cáscara de café

Dentro de los beneficios y propiedades que tiene la infusión de cáscara de café, presentan un contenido bajo de cafeína, una capacidad antioxidante relacionada con los flavonoides, una concentración total de compuestos fenólicos similar a la de otro té. Presenta una elevada actividad prebiótica y antioxidante, incluso mayor a la de la vitamina c (Gómez, 2004).

La cascarilla del café representa aproximadamente el 12 % del grano de café en base seca, está constituida como una excelente fuente de celulosa, lignina, pentosanos, sílice, cenizas y otros compuestos en menor proporción (Rathinavelu, 2005).

Dentro de la composición física y química de la cáscara de café según Fonseca (2011) se encuentra:

Tabla 4. Composición física y química de la cáscara de café.

Biomasa	Humedad (%)	Volátiles (%)	Ceniza (%)	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)
Cáscara de café	10,1	82	1,2	50,3	5,3	43,8	0,39

Tomado de Fonseca (2011)

2.4.3 Variedad *Coffea Arábica Caturra*

A pesar de la amplia diversidad del *Coffea*, solo dos géneros se usan en infusiones o bebidas. Uno de ellos es la especie *Coffea Arábica* quien predomina con un 75 % la producción de café en el mundo, mientras que el *Coffea Canephora* junto a otras variedades complementan la producción restante con un amplio consumo. Históricamente se conoce que sus orígenes predominan en Asia y todo el mediterráneo como cultivos silvestres (Aguilar, 2018). Más tarde los franceses asentaron las primeras plantaciones de *Coffea Arábica* atribuyéndose como pionero de la agricultura del café. A partir de los primeros cultivos de *Coffea Arábica*, se originaron otras variedades de café dándose a notar el café *Bourbon* o Borbón conocido típicamente de esa manera por el lugar en donde se desarrolló Quintero (2012). Dicho cultivo de café fue predominante en zonas altas mejorando su composición química en comparación con su predecesor. Más tarde fue llevado a África y América Latina debido a las características geográficas que presentan ambos continentes para lograr buenas cosechas y producciones de este género de café (Santander, 2015).

No obstante, cuando el café se introdujo por las colonias españolas, se lograron buenos asentamientos de cultivos desde centro América hasta Sudamérica (Areny, 2012). Sin embargo, en una provincia de Brasil, se logró desarrollar una mutación del gen de la variedad de Bourbon, teniendo como resultado el grupo *Caturra* dentro del cual se puede obtener cerezas más pequeñas de lo normal, con una amplia demanda nutricional para su crecimiento, pero conservando su diseño de cultivo similar al de sus predecesores (García, 2012). Además, esta variedad, en comparación con el *Coffea Arábica*, presenta una mejor concentración de cafeína y otros alcaloides comunes en los cafés, logrando ser el género con mayor índice de producción en América Latina gracias a sus propiedades características (Casalins, 2017).

2.4.4 Composición del café género *Coffea Arábica*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la variedad *Caturra* proveniente del género Bourbon conserva la mayoría de sus características químicas de su predecesor, *Coffea Arábica* (Carriel, 2012). Por otra parte, en el tostado de café se originan más de cien compuestos volátiles que aportan al aroma y sabor durante las infusiones, tales como: ácido acético, ácido cafeico, acetaldehídos, cetonas, compuestos provenientes del furfural, furanos y ésteres que en su mayoría desaparecen debido a las altas temperaturas, a los cuales se someten normalmente los granos de café (Balcàzar, 2011). Por otra parte, las bebidas del café alcanzan un pH óptimo que oscila entre los 4.9 y 5.2 haciéndolas ligeramente acidas.

La siguiente tabla muestra la información nutricional del café arábica como infusión:

Valor nutricional por cada 100g de infusión de café.

Tabla 5. Composición química del *Coffea Arábica*

Nutriente	Valor	Unidades
Carbohidratos	0	
Grasas	0,02	g
Proteínas	0,12	g
Agua	99,40	g
Cafeína	40	mg
Tiamina (vit. B1)	0,014	mg
Riboflavina (vit. B2)	0,076	mg
Niacina (vit. B3)	0,191	mg
Ácido pantoténico (vit. B5)	0,254	mg
Vitamina B6	0,001	mg
Vitamina E	0,01	mg
Calcio	2	mg
Magnesio	3	mg
Manganeso	0.023	mg
Fósforo	3	mg
Potasio	49	mg
Zinc	0,02	mg

Fuente: Tomado de USDA, 2018

Aunque la mayoría de estos componentes se concentran en la pulpa, la cascarilla aporta con un porcentaje de 14,76 % de furfural y lo restante lo complementa la lignina con un 41,86 % además de grasas y pentosas en la misma. Además, se puede encontrar concentraciones de nitrógeno y fósforo de 0,39 % y 28 mg respectivamente (Jiménez, 2014).

Por cada 100 g de cereza de café en fresco se tiene la siguiente composición (Arcila, 2010), donde el 6 % corresponde a la cáscara.

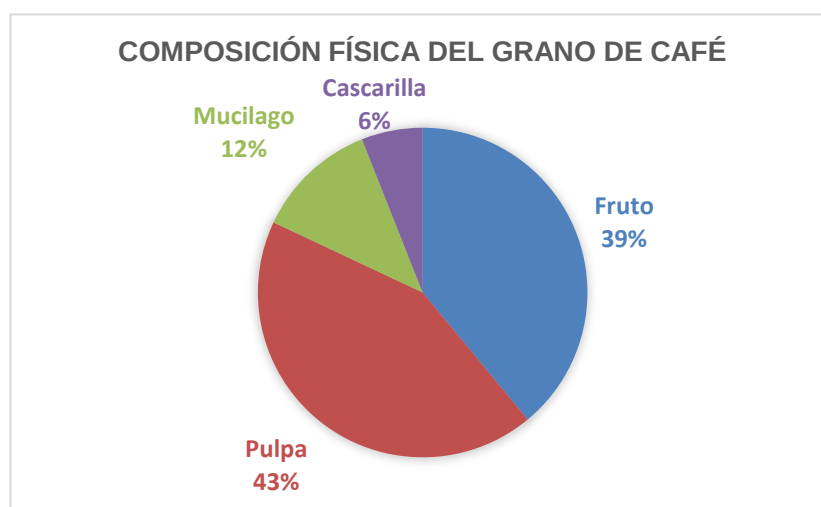


Gráfico 1. Composición física del grano de café.

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019).

2.4.5 Producción a nivel mundial

Como antes se ha mencionado, más del 70 % de la producción mundial de café lo ocupa el género *Coffea Arabica* y en menor proporción lo complementa la variedad *Coffea Robusta*. En general cada año se producen aproximadamente 7,7 millones de toneladas de café ocupando un área de 10,5 millones de hectáreas, distribuidas en más de 50 países (Hernandes, 2014). En América Latina, el principal productor es Brasil con 2,2 millones de toneladas anuales mientras que Colombia y México suplen la producción restante. Por otra parte, el cultivo de la especie *Coffea Robusta* se refleja el 10 % en Asia y el 5 % en África, destacándose Vietnam e Indonesia principalmente, produciendo entre 0,6 -1 millón de toneladas (Arcila, 2010)

Sin embargo, estos valores pueden verse afectados debido a los constantes cambios climáticos que presentan las distintas zonas de cultivo. Las latitudes de Vietnam hacen favorable la producción del café robusta gracias los cambios de humedad que se dan en dicho continente, posesionándolo como segundo productor a nivel mundial con el 16.8 % (Greenwalt, 2000).

A continuación, se reflejan datos históricos de producción de *Coffea Arábica* en los últimos años en base de los principales cafeteros del mundo.

Tabla 6. Producción total de países exportadores de *Coffea Arábica*

Producción total de Países exportadores								
En mil bolsas de 60 kg.								
Año de Cosecha	2010/ 11	2011/ 12	2012/ 13	2013/ 14	2014/ 15	2015/ 16	2016/ 17	2017/ 18
Bolivia	130	143	115	128	106	89	81	85
Brasil	53.428	50.592	55.420	54.698	52.299	52.426	56.764	51.000
Ecuador	854	825	828	666	644	644	645	624
Paraguay	20	20	20	20	20	20	20	20
Perú	4.069	5.373	4.450	4.106	2.883	3.304	4.223	4.280
Cuba	108	100	88	107	101	100	103	100
Haití	350	349	350	345	343	341	342	340
Colombia	8.523	7.652	9.927	12.163	13.339	14.009	14.634	14.000
Costa Rica	1.614	1.831	1.823	1.552	1.475	1.440	1.372	1.560
El Salvador	1.873	1.164	1.240	515	665	565	610	740
Guatemala	3.950	3.850	3.763	3.189	3.310	3.410	3.684	3.800
Guyana	9	10	10	2	9	11	10	10
Honduras	4.331	5.882	4.686	4.583	5.268	5.786	7.457	8.349
Jamaica	21	24	24	20	21	20	18	17
Panamá	114	106	116	113	106	127	120	106
Venezuela	1.202	902	952	804	650	500	525	550

Tomado © International Coffee Organization, 2018

La especie *Caturra*, producida a partir del género Bourbon, es insignia cafetera en dicho país, debido a las bajas latitudes que presentan las zonas brasileras y temperaturas que oscilan entre los 20 – 27 °C, eventualmente estas condiciones se aplican de igual manera en los demás países de Latinoamérica en donde su rendimiento oscila los 1500 a 3000 kg de café por hectárea (Escamilla, 2017).

2.4.6 Producción a nivel nacional

A continuación, se presentan las superficies cafetaleras en el Ecuador distribuidas por los géneros *Coffea Arábica* y *Coffea Robusta*. Además, cabe destacar que el género *Caturra* comprende más del 90 % de las variedades existentes en el país (Gutiérrez, 2008).

Tabla 7. Producción de *Coffea Arábica* y *Coffea Robusta* en Ecuador

Provincias	Coffea arábica (ha)	Coffea robusta (ha)
Manabí	70.050	0
Santa Elena	1.800	0
Guayas	11.195	425
Los Ríos	4.770	6.610
El Oro	9.730	0
Carchi	195	0
Imbabura	300	0
Pichincha	1.300	1.300
Santo Domingo	0	5.300
Cotopaxi	2.000	1.600
Tungurahua	0	0
Bolívar	3.410	3.780
Chimborazo	880	0
Cañar	370	0
Azuay	420	0
Loja	29.345	0
Sucumbíos	0	17.320
Orellana	0	20.000
Napo	120	4.800
Pastaza	150	0
Morona Santiago	290	120
Zamora Chinchipe	6.350	0
Galápagos	1.100	0

Adaptado de Aguilar (2018)

En el 2016 los cultivos del género *Coffea Arábica* descendieron en comparación al año 2015, teniendo 3.905 toneladas. Sin embargo, la producción de café en el año 2017 incrementó en un 12 % debido al ingreso de cafetales nuevos con el “Proyecto de Reactivación de la Caficultura Ecuatoriana”, donde la variedad de este producto antes nombrada fue ingresada a provincias cuyas condiciones climáticas eran óptimas para su desarrollo, destacándose Loja y

Manabí. En datos históricos, el Ecuador era quinto productor y exportador a nivel mundial de café hasta el año 2015; sin embargo, en la actualidad se ubica en el puesto 28 (Carreño, 2011).

2.4.7 Precio del café en el mercado internacional y nacional

A continuación, se muestran los precios pagados por café arábico en los principales países exportadores

Tabla 8. Precios pagados a productores en países exportadores.

Precios pagados a productores en países exportadores. En centavos (US/lb)							
Calendario anual	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Costa Rica	180,22	160,73	124,65	130,77	145,84	129,11	138,09
Cuba	70,71	70,71	221,96	235,71	235,71	235,71	235,71
Dominican R	191,07	147,81	140,98	183,53	170,98	177,13	173,19
Ecuador	227,21	183,90	122,24	100,45	120,45	123,23	121,40
El Salvador	186,74	120,12	95,28	117,01	87,45	89,53	87,62
Guatemala	212,41	165,98	127,06	152,83	139,22	135,47	134,12
Honduras	200,02	141,15	101,80	118,94	110,97	93,17	90,77
India	228,46	161,98	117,06	175,65	157,10	132,21	135,75
Uganda	147,03	93,68	70,03	103,70	81,27	71,09	77,00
Brasil	224,26	152,29	102,14	134,70	104,49	107,83	110,47
Ethiopia	145,46	102,79	73,30	83,24	76,03	87,31	84,38
Colombia	8.523	7.652	9.927	12.163	13.339	14.009	14.634
Ghana	18,43	17,72	21,36	15,94	24,12	38,48	40,89

Tomado © International Coffee Organization, 2018

Como cultivo de alta demanda en el mundo, el café ocupa el segundo lugar como mercancía sobrevalorada en exportaciones e importaciones. Los precios del *Coffea Arábica* dependen anualmente de la bolsa de valores de New York, además de otros factores (Quintero, 2014). No obstante, el año 2011 fue el período que obtuvo el mayor precio del café arábico de la última década, alcanzando los 299,35 dólares americanos por quintal en el mes de abril (Uraga, 2014)

En el Ecuador, el valor mínimo de un quintal de café está en los 27 \$ promedio, cuyo precio varía de igual manera por la bolsa de valores de New York. Sin embargo, en el año 2013 se registró un precio de 2.81 \$ por kilogramo de café arábigo, lo cual marcó el punto más bajo del valor nominal. A pesar de ello, para el 2016 el precio ascendió a 3,87 \$ el kilo, aumentando su demanda de producción en comparación con el café robusta (Cifuentes, 2016).

2.5 Medios de cultivos

Uno de los Medio de cultivo empleados es el denominado Hassid – Barker (HB) desarrollado inicialmente por el Dr. William Hassid, quien en colaboración con Horace Barker dedicó sus estudios a la síntesis química de la sacarosa. En 1965 lograron desarrollar un cultivo microbiano aislando la bacteria *Acetobacter Xylinum* en un medio rico en carbono y mejoraron aún más al emplear el ácido acético dentro de su composición variando los porcentajes de sacarosa en el cultivo (Ballou, 1979).

Luego de varias investigaciones se plantea con óptimos resultados un porcentaje de sacarosa del 10 %, extracto levadura 0,25 %, sulfato de calcio 0,25 % y fosfato de potasio 0.5 %. Eventualmente, dichas proporciones lograron un mejor acondicionamiento del medio para el crecimiento óptimo de la bacteria ya que no altera su estructura celular a diferencia de los elementos empleados en el método Hestrin and Schram (HS) convencional. El sulfato de Magnesio y el sulfato de amonio con porcentajes del 0.2 % y 0.6 % respectivamente, complementan el cultivo desarrollado ya que logran sintetizarse en el mismo gracias a los iones sulfatos (Lestari, 2013).

La Tabla 9 muestran las diversas formulaciones empleadas en la obtención de celulosa bacteriana y el autor correspondiente, mientras que la Tabla 10 muestra el tipo de microorganismo seleccionado y el rendimiento obtenido en la producción de celulosa bacteriana.

Tabla 9. Composición de medios de cultivo para celulosa bacteriana según sus autores

Tipo de medio	Composición						
HS	Glucosa (20 g/L)	Extracto de levadura (5 g/L)	Peptona (5 g/L)	Fosfato de Sodio (2.7 g/L)	Ácido Cítrico (1.115 g/L)		(Hestrin M. S., 1954)
HAS	Glucosa (20 g/L)	Extracto de levadura (5 g/L)	Peptona (5 g/L)	Fosfato de Sodio (2.7 g/L)	Ácido cítrico (1.115 g/L)	Vitamina C (5 g/L)	
HB	Sacarosa (100 g/L)	Extracto de levadura (2.5 g/L)	Sulfato de amonio (8.25 g/L)	Fosfato de Potasio (5 g/L)	Sulfato de Magnesio (2 g/L)	Sulfato de Calcio (2.5 g/L)	(Lestari, 2013)
Yamnaka	Sacarosa (50 g/L)	Extracto de levadura (5 g/L)	Sulfato de amonio (5 g/L)	Fosfato de Potasio (3 g/L)	Sulfato de Magnesio Heptahidratado (0.05 g/L)		(Yamanaka, 2000)
Zhou	Glucosa (18 g/L)	Sacarosa (21 g/L)	Sulfato de amonio (4 g/L)	Licor de maíz (20 g/L)	Fosfato de Potasio (2 g/L)	Sulfato de Magnesio Heptahidratado (0.4 g/L)	(Zhou, 2007)
SON	Glucosa } (15 g/L)	Etanol (6ml/L)	Sulfato de amonio (2 g/L)	Fosfato de Potasio (3 g/L)	Fosfato de Sodio dodecahidratado (3g/L)	Sulfato de Magnesio Heptahidratado (0.8 g/L)	Nicotinamida (0.0005 g/L) (Son, 2001)
Park	Glucosa (10 g/L)	Extracto de Levadura (7 g/L)	Peptona (10 g/L)	Ácido acético (1.5 ml/L)	Acido Succínico (2 g/L)		(Park, 2003)
SOC	Glucosa (3.6 g/L)	Medio LB (20 g/L)	Cloruro de Sodio (0.5 g/L)	Cloruro de Potasio (0.18 g/L)	Cloruro de Magnesio (0.95 g/L)	Sulfato de Magnesio (2.5 g/L)	(Lin, 2014)

FM	Glucosa (15 g/L)	Extracto de carne (3g/L)	Peptona (5 g/L)	Cloruro de Sodio (5 g/L)			(Okiyama, 1992)
YPD	Glucosa (20 g/L)	Extracto de levadura (5 g/L)	Peptona (5 g/L)				(Ramírez, 2012)
GYB	Glucosa (20 g/L)	Extracto de levadura (5 g/L)					(Cakar, 2014)
AB	Glucosa (20 -60 g/L)	Extracto de Levadura (5 g/L)	Peptona (5 g/L)	Acetato de Sodio (5.772 g/L)	Ácido Acético (1.778 g/L)		(Xu Liu, 2018)
MHS	Glucosa (20 g/L)	Licor de maíz (10 g/L)	Fosfato de Sodio (2.7 g/L)	Ácido Cítrico (1.5 g/L)			(Carreira, 2011)
Joseph	Fructuosa (20 g/L)	Licor de maíz (80 ml/L)	Sulfato de amonio (3.3 g/L)	Fosfato de Potasio (1 g/L)	Sulfato de Magnesio heptahidratado (0.8 g/L)	Poliacrilamida - ácido acrílico (10 g/L)	(Joseph, 2003)
AHS	Glucosa (50 g/L)	Extracto de Levadura (4 g /L)	Etanol (2 g/L)	Fosfato de Potasio (2 g/L)	Sulfato de Magnesio heptahidratado (0.73 g/L)		(González, 2017)

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019).

Tabla 10 Rendimiento de celulosa bacteriana según sus autores

Autor	Microrganismo	Rendimiento	Condiciones	Comentarios	Referencia
Hestrin and Schram(HS)	Acetobacter xylinum	18 g/L por semana	El pH optimo está en 4.5 a 5. Temperatura de incubación del medio 30 C. Mejora el rendimiento en cultivos estáticos.		(Hestrin M. S., 1954)
Joseph	Acetobacter xylinum	2.7 g/L por semana	Se ajusta el pH a 5. Su tiempo de cultivo es de 7 días. Su temperatura optima es de 28 C.	Modifica el medio HS por fructuosa como fuente de carbono y adicionalmente añade acido acrílico (1%V/V)	(Joseph, 2003)
Park	Gluconacetobacter hansenii	2.31 g/L por 5 días	Se ajusta el pH a 5 con solución de NaOH La temperatura ideal son los 30 grados.	Parte del medio de cultivo HS adicionando únicamente etanol (1 % V/V)	(Park, 2003)
Zhou	Acetobacter xylinum	6 g/L por semana	Tiene como propósito de añadir alginato de sodio para aumentar la viscosidad e impedir la coagulación de la BC para promover la transferencia de oxígeno y nutrientes hacia las células.	Compara sus resultados con los del medio HS	(Zhou, 2007)
SON*	Acetobacter xylinum	15.2 g/L por semana	La temperatura optima de crecimiento son los 30 C, pero al llegar a los 35 la producción de celulosa decrece. Maneja un pH de 4. Sugiere el uso de etanol (0.2 %V/V).		(Son, 2001)
Carreira	Gluconacetobacter sacchari. Proveniente del SCOBY	2.7 g/L durante las 96 h de cultivo	Maneja una temperatura optima de 30 C. Ajusta un pH óptimo de 4.5 en su medio de cultivo. El lavado de las membranas de celulosa lo realiza con una solución de 0.5 M de NaOH a 90 C por 30 min.	Modifica el medio HS por la sustitución de la glucosa por galactosa, xilosa, lactosa y glicerol manteniendo la concentración de 20 g/L. El secado de las membranas purificadas lo realiza a 105 C	(Carreira, 2011)
Lin	Gluconacetobacter hansenii	7.02 g/L en una semana	El lavado de la membrana de celulosa lo realizan con una solución de 0.1 M de NaOH a 50 C cada 6 horas.	Maneja concentraciones de 5,10, 15 y 20 % de residuos de levadura como único nutriente.	(Lin, 2014)
Cakar	Gluconacetobacter xylinus	0.406 g/L por semana	Temperatura óptima de crecimiento de cultivo:30 C. La melaza fue tratada con una concentración de 6 M de H2SO4 y posteriormente calentada a 60 C por una hora hasta ajustar un pH de 3.	Modifica el medio de cultivo propuesto por Zhou, añadiendo melaza como fuente de carbono menos costosa.	(Cakar, 2014)
Trovatti	Gluconacetobacter sacchari	2.7 g/L durante las 96 h de cultivo	Sugiere el uso de etanol dentro del cultivo (20 g/L).	Maneja el medio de cultivo HS	(Trovatti, 2011)

Gomes	Gluconacetobacter sacchari	1,34 g/L por semana	El Medio de cultivo HS se mantiene respetando sus concentraciones de fuentes de carbono, sin embargo, considera otros azúcares tales como la galactosa, fructuosa o sacarosa según un medio de cultivo estático.	Recomiendo el uso de desechos de aceite de oliva como fuentes de nitrógeno y fósforo para el medio de cultivo	(Gomes, 2012)
Adnan	Gluconacetobacter xylinus	10,01 g/L por semana	Sustituye la fuente de carbono convencional del medio de cultivo de Zhou por distintas concentraciones de glicerol (10,20,30,40 y 50 g/L). El pH del medio se ajusta a 6.8 con NaOH a 6 M.	Considera otras concentraciones de fuentes de nutrientes para el cultivo	(Adnan, 2015)
Rani	Gluconacetobacter hansenii	8.2 g/L por semana	Ajusta un pH de 4.5. Temperatura óptima: 27 C. Añade etanol (1.0, 1.5 and 2.0 % v/v) y ácido acético (0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 % v/v).	Considera el medio de cultivo HS por dos semanas	(Rani, 2011)
Pacheco	Komagataeibacter rhaeticus	6 g/L por semana	La Temperatura óptima está en los 28 C. Sugiere añadir al cultivo 20 g/L de etanol	Usa el medio de cultivo HS sustituyendo total o parcialmente la fuente de carbono común por los residuos de árboles de anacardo (25 g/L de glucosa más 25 g/L de cualquier residuo). Estima un costo de \$18.90 para la producción de este cultivo.	(Pacheco G. , 2017)
Keshk	Gluconacetobacter xylinus	6.35 g/L por semana	Temperatura óptima de 28 C. Se ajusta un pH de 6	Se añade una concentración de 0.5 % de ácido ascórbico.	(Keshk, 2013)
Castro	Gluconacetobacter swingsii	5.9 g/L por semana	Las películas de celulosa son lavadas con KOH a 5 M. Varía el medio de cultivo HS con desechos de frutas cítricas como fuentes de carbono	El medio se cultiva después de 13 días de incubación	(Castro C. , 2010)

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

2.6 Marco conceptual

2.6.1 Té negro

La planta de té es un arbusto frondoso perteneciente a la familia de las teáceas. Primordialmente se denomina “Té” al fruto capsular que lo caracteriza, siendo de amplias variedades tales como: té negro, té verde o té rojo (Castro, 2017). Sus hojas proceden de la planta *Camellia Sinensis* y su diversidad radica en los tipos de oxidación procedentes de las fermentaciones, provocando en la mayoría de ellas un alto contenido de cafeína y otorgándoles tonalidades oscuras con sabores fuertes (Casalins, 2017).

2.6.2 Café

La planta de café conocida como cafeto, es un arbusto frondoso del género *Coffea*, perteneciente a las familias de los rubiáceos. Como tal, su óptimo crecimiento se da en climas tropicales y subtropicales principalmente en zonas ecuatoriales. Su composición física está dada por un fruto carnoso denominado cereza de café en donde se concentra altos porcentajes de alcaloides (Alulima, 2012).

2.6.3 Cáscara de café

Las cascaras o envolturas que contienen a la semilla se las conoce como pergamino y mucílago, las cuales contiene altas concentraciones de azúcares, y ligeras concentraciones de metilxantinas en comparación con la cereza. La cascarilla del café representa aproximadamente el 12 % del grano de café en base seca, está constituida como una excelente fuente de celulosa, lignina, pentosanos, sílice, cenizas y otros compuestos en menor proporción (Rathinavelu, 2005).

2.6.4 La celulosa bacteriana

Es un polímero extracelular sintetizado por la fermentación de microorganismos conformados principalmente por bacterias del género *Acetobacter*. Este microorganismo fue descubierto por primera vez en 1886 por Adrian J. Brown denominándolo como “una membrana gelatinosa traslúcida que

crece en la superficie del medio de cultivo”. Sin embargo, también existen otras bacterias capaces de producir celulosas pertenecientes al género *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* (González, 2017).

2.6.5 Kombucha

La bebida de Kombucha se prepara tradicionalmente al fermentar té negro, endulzado con sacarosa, con una capa de celulosa donde existe una simbiosis de levaduras y bacterias del ácido acético, y un 10 % de inóculo del hongo de Kombucha ya preparado (Reiss, 2008).

2.6.6 Medio HB

Uno de los Medio de cultivo empleados es el denominado Hassid – Barker (HB) desarrollado inicialmente por el Dr. William Hassid, quien en colaboración con Horace Barker dedicó sus estudios a la síntesis química de la sacarosa (Ballou, 1979).

Luego de varias investigaciones, se plantea con óptimos resultados un porcentaje de sacarosa del 10 %, extracto levadura 0,25 %, sulfato de calcio 0,25 % y fosfato de potasio 0.5 %. Eventualmente, dichas proporciones lograron un mejor acondicionamiento del medio para el crecimiento óptimo de la bacteria ya que no altera su estructura celular a diferencia de los elementos empleados en el método Hestrin and Schram (HS) convencional (Lestari, 2013).

2.6.7 Fuentes de carbono

La fuente de carbono es el carbohidrato o sacárido utilizado como nutriente principal en un medio. Los carbohidratos son bloques de construcción para macromoléculas. Estos se pueden dividir en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos. Los monosacáridos y disacáridos que tiene menor peso molecular son conocidos como azúcares (Carriel, 2012).

2.6.8 Sacarosa

La sacarosa es un disacárido compuesto de dos monosacáridos, glucosa y fructosa. La glucosa y la fructosa están enlazadas por medio de un enlace entre C1 de la glucosa y C2 de la fructosa. Este es un enlace glicosídico. Una hidrolisis puede romper el enlace glicosídico, separando la glucosa y fructosa. Por acción de las levaduras presentes en la Kombucha, la sacarosa es hidrolizada en

glucosa y fructosa (Barreto, 2018).

2.6.9 Glucosa

La glucosa es un monosacárido. Tiene seis átomos de carbono por lo que es clasificada como una hexosa. Es el monosacárido más abundante. La glucosa se puede obtener como hidrólisis de varios carbohidratos, como la lactosa, sacarosa, maltosa, celulosa, glucógeno, etc. Por acción de las bacterias del ácido acético en la Kombucha, la glucosa es convertida en ácido glucónico (Adnan, 2015).

2.6.10 Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

La espectrofotometría infrarroja provee vibraciones fundamentalmente características que sirven para elucidar la composición química y estructural de una membrana mediante espectros infrarrojos. Se mide a través de movimiento que presentan las partículas al recibir una carga eléctrica. La vibración es activada cuando las moléculas generan una absorción de la energía. Dicha radiación se identifica en función de su longitud de onda característica y es una técnica excelente para una cuantificación rápida y exacta (Contreras, 2010).

2.6.11 Tracción

Método o ensayo que permite medir el máximo de fuerza que resiste un material, cuando el material es sometido a dos fuerzas estáticas en dirección opuesta en sus extremos. Siguiendo el procedimiento de la norma ASTM D882 (Pacheco, 2002).

2.6.12 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Procedimiento o técnica que permite el análisis con mayor facilidad de los cambios morfológicos de las fibras, se realiza por medio de un microscopio de barrido, en donde su principal característica es la comunicación biunívoca entre la muestra y la imagen formada (Ruka, 2012).

2.7 Marco contextual

El proyecto es parte del proyecto de investigación de fondos competitivos de la universidad de Guayaquil denominado “Elaboración de recubrimientos comestibles con inclusión de aceites esenciales”. Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Química Analítica de la facultad de Ingeniería Química en el campus de la Universidad de Guayaquil, ubicado en la ciudadela Salvador Allende, donde se realizaron la mayor parte de los estudios gravimétricos y en laboratorio de investigaciones tecnológicas de la mencionada facultad de Ingeniería.

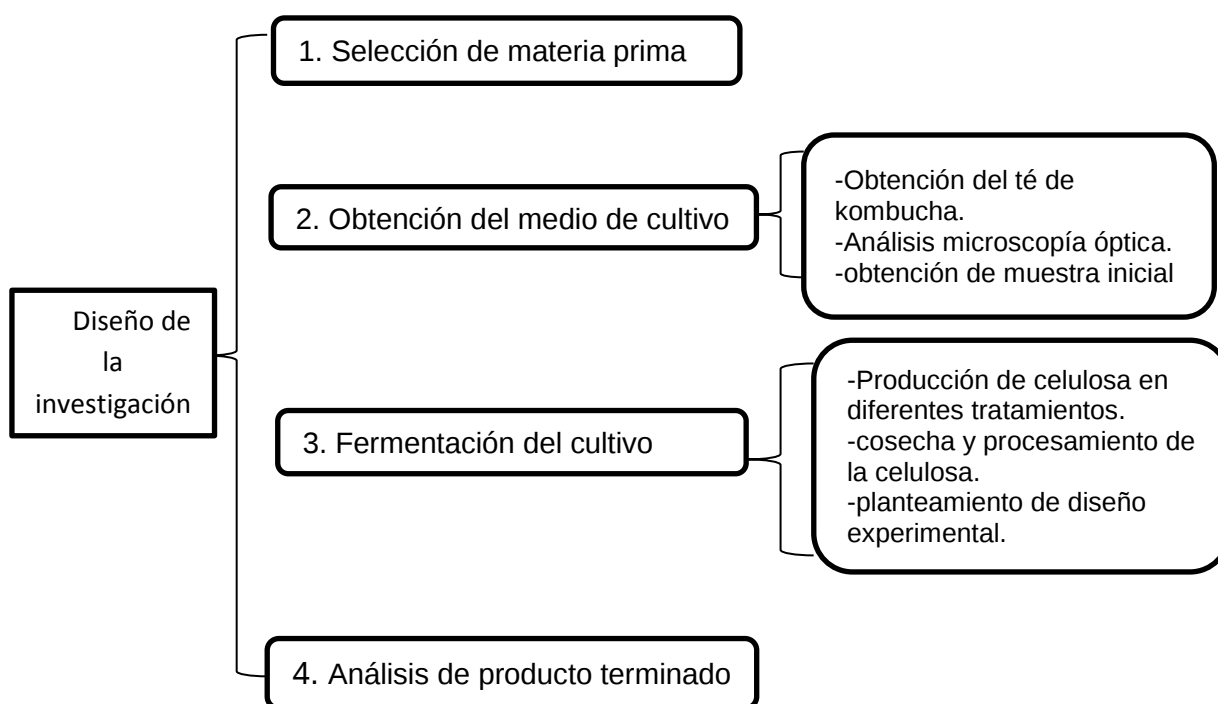
CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Diseño de la investigación

Se llevó a cabo mediante el siguiente plan de trabajo: Ver diagrama 1

Diagrama 1. Diseño de la investigación del trabajo.



Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

3.2 Selección de materias primas.

La cáscara de café se la obtuvo de café orgánico *Caturra* de sembríos de la ciudad de Loja-Ecuador. El azúcar y el té negro provinieron del mercado local de la ciudad de Guayaquil. Los reactivos para los análisis químicos fueron de grado reactivo, facilitados por los laboratorios de Química Analítica y de biotecnología de la Universidad de Guayaquil.

3.2.1 Selección de materiales y equipos

Como reactores se emplearon recipientes plásticos sin tapa de capacidad de 1500 mL. Se usaron gasas esterilizadas de uso médico, tela lienzo de venta local y ligas plásticas para el cierre. Además, se usaron varios equipos como calentador eléctrico, papel indicador universal pH 0-14, balanza analítica Sartorius cp224s, balanza gramera, refractómetro, autoclave, estufa, mufla, desecador, medidor de espesor digital rango 0.001 mm hasta 12.7 mm, espectrofotómetro infrarrojo Perkin-Elmer Septum 100, microscopio electrónico de Barrido Jeol, modelo JSM y materiales de laboratorio. Los reactivos usados fueron grado analítico, tales como: agua destilada, hidróxido de sodio al 0.1 N, ácido nítrico, etanol 96 %, extracto de levadura, sacarosa, sulfato de amonio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y sulfato de potasio.

3.3 Obtención del medio de cultivo

3.3.1 Obtención del té de kombucha

El té de kombucha con una muestra de celulosa bacteriana provino de una muestra de un trabajo de investigación anterior desarrollada por Aguilar y Espín. El medio a recibir fue preparado con 1 litro de agua, 10 gramos de té negro y 200 gramos de azúcar de acuerdo a medio de Hestrin and Schram(HS). Se dejó fermentar en un lugar con poca iluminación y con acceso al oxígeno, durante 15 días a temperatura ambiente, hasta observar la presencia de la membrana. La presencia de *Acetobacter xylinum* se verificó a través de microscopía óptica.

3.3.1.1 Microscopia óptica del té de kombucha.

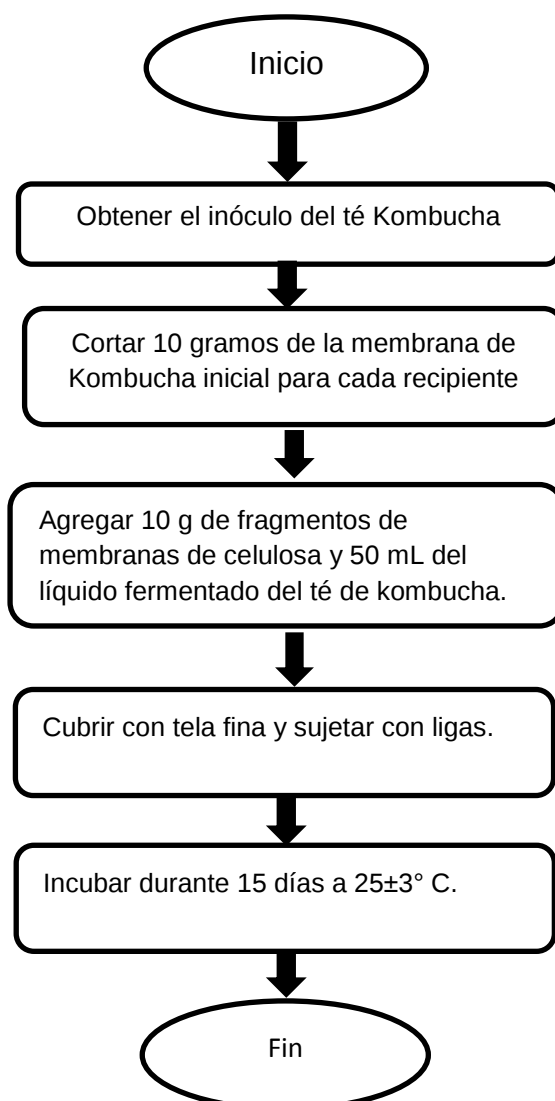
Se tomó una muestra de 2 mL del medio de cultivo del tratamiento 1 (100 % té negro) perteneciente al experimento 1. Posteriormente se realizó un análisis morfológico a través de una tinción de Gram, en donde se identificó el tipo de microorganismo a través de su coloración específica. De acuerdo a Mirabal (2012), las bacterias pertenecientes al género "*Acetobacter*" son Gram negativa adquiriendo un color violeta – fucsia tras la tinción, y cuyas características

morfológicas van desde formas ovoides hasta varillas rectas o curvadas formando parejas en cadenas cortas (Kowser, 2016).

3.3.2 Obtención de muestra inicial para réplica

El medió de cultivo inicial consistió en la infusión de 4 g/L de té negro con 200 g de sacarosa. Diez gramos de celulosa obtenida del té de kombucha se introdujo en el reactor con el medio preparado. Mediante un lienzo y ligas se taparon los recipientes y se mantuvieron al ambiente a una temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 15 días para que se produzca la fermentación y así obtener cinco películas de celulosa bacteriana, una para cada tratamiento. Ver diagrama 2.

Diagrama 2. Procedimiento de obtención de cultivo iniciador de celulosa

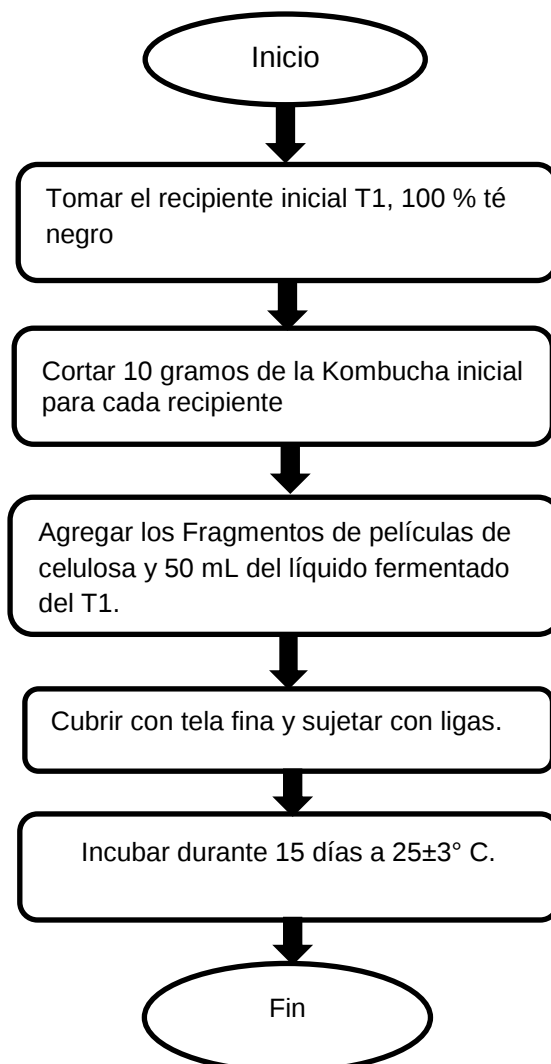


3.4 Fermentación del cultivo

3.4.1 Producción de celulosa en diferentes tratamientos

Para la síntesis de kombucha se tomó del recipiente inicial T1 (100 % de infusión de té negro) la membrana de celulosa. De dicha película de celulosa se procedió a cortar aproximadamente 10 gramos de membrana, con un volumen de 50 mL del líquido fermentado y se colocaron en cada recipiente de 1500 ml. La infusión correspondiente se realizó en recipientes limpios previamente desinfectados con alcohol y agua caliente. La mezcla de la infusiones y sacarosa se realizó en caliente. La fermentación se realizó a temperatura ambiente durante 15 días. El ensayo se realizó por triplicado para evaluar repetibilidad. Ver diagrama 3.

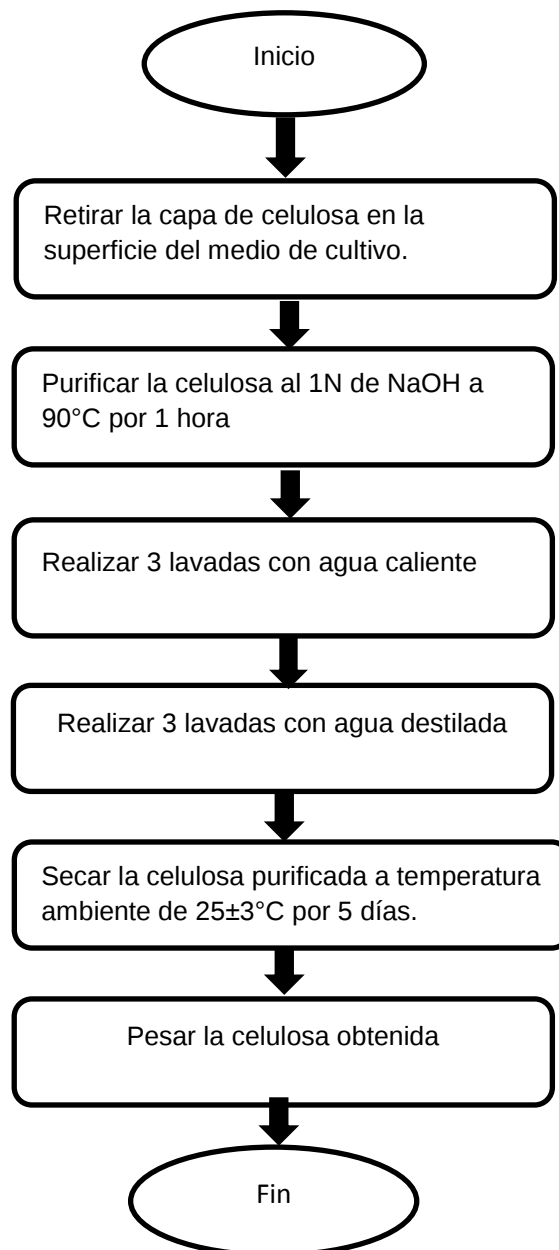
Diagrama 3. Procedimiento de multiplicación del hongo



3.4.2 Cosecha y procesamiento de la celulosa

Después de los 15 días de fermentación, se retiró la capa de celulosa formada en la superficie del medio de cultivo. Se realizó un lavado con hidróxido de sodio al 1N para purificar la celulosa, es decir para lavar o blanquear la membrana. Para esto la celulosa cubierta de NaOH al 1N se calentó por 1 hora a 90°C. Posteriormente se realizó 3 lavados con agua caliente y 3 con agua destilada para llegar a un pH neutro. La celulosa purificada se secó a temperatura ambiente de 25±3° C por 5 días y se pesó la celulosa obtenida. Ver diagrama 4.

Diagrama 4. Procedimiento de la extracción y purificación de celulosa



3.5 Planteamiento del diseño experimental.

La evaluación de la sustitución del té se realizó a través de los siguientes experimentos: En el primer experimento se varió el porcentaje de sustitución de té negro por el té de cáscara de café, siendo los valores de 25, 50, 75 y 100 %. Se usaron 200 g de sacarosa según Aguilar y Espín (2019), modificándose en el segundo experimento la concentración de sacarosa y se añadió como control la formulación del medio HB (extracto levadura 0,25 %, sulfato de calcio 0,25 %, fosfato de potasio 0.5 %, Sulfato de amonio 0,83 % y sulfato de magnesio 0.2 %) porque presenta un mejor acondicionamiento del medio para el crecimiento óptimo de la bacteria ya que no altera su estructura celular. Las variables que se mantuvieron constantes en los dos experimentos fueron las siguientes: tiempo de incubación 15 días, temperatura de incubación $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, pH inicial 3.5, y cantidad de inóculo. El contenedor fue igual para cada tratamiento tanto en forma, volumen y material. El primer experimento se realizó en cinco cultivos, de los cuales hubieron 5 tratamientos con tres repeticiones cada uno (Ver tabla 11) y el segundo experimento se realizó en dos cultivos, con cinco tratamientos diferentes manejando tres repeticiones en cada uno. (Ver tabla 12).

Tabla 11. Condiciones de experimento 1. 20 % azúcar

Identificaciones E1	Sustitución de infusión de té (%)				
Denominación del tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5
Concentración de té negro (%)	100	75	50	25	0
Concentración de infusión de cáscaras de café (%)	0	25	50	75	100

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

Los reactivos usados para el control del segundo experimento fueron grado reactivo y su formulación se efectuó según el contenido del medio HB. La Tabla 12 muestra las condiciones planteadas.

Tabla 12. Condiciones del experimento 2. 10 % azúcar

Identificaciones E2	Sustitución de infusión de té (%)					
Denominación del tratamiento	Control (HB)	T1	T2	T3	T4	T5
Concentración de té negro (%)	0	100	75	50	25	0
Concentración de infusión de cáscaras de café (%)	0	0	25	50	75	100
Concentración del medio HB	100	0	0	0	0	0

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

3.6 Evaluación analítica

3.6.1 Análisis de materia prima

Las materias primas café y té fueron evaluadas en su contenido de humedad según la norma NTE INEN 1114 y cenizas a través de gravimetría mediante la norma TAPPI T 211 para celulosa en la prueba de ceniza. Se realizó por 3 repeticiones.

3.7 Análisis de producto terminado

Como producto terminado se considera al líquido fermentado y a la membrana de celulosa. El líquido fue evaluado en el contenido de: pH y sólidos solubles. Mientras que la celulosa fue evaluada en: peso en base húmeda, peso en base seca, rendimientos diarios y quincenales, humedad, cenizas, espesor, tensión, permeabilidad, absorción, determinación de porcentaje de celulosa, caracterización de espectros FTIR, microscopía de electrónica de barrido (MEB).

3.7.1 Determinación del pH

Se realizó a través de la lectura directa del papel universal indicador de potencial H^+ humedecido en el líquido fermentado de la kombucha. Este parámetro se midió al inicio y luego de 15 días una vez que se dio por terminado el proceso de fermentación.

3.7.2 Determinación de sólidos solubles

Los sólidos solubles fueron medidos con ayuda del refractómetro óptico grado alimenticio, cuyos rangos de medición oscilan entre 0-99 °Brix, a una temperatura de 25 °C.

3.7.3 Determinación de peso en la membrana húmeda.

Transcurrido los 15 días de cultivo se retiró cuidadosamente la membrana húmeda de celulosa bacteriana para tomar la medición de peso en una balanza gramera.

3.7.4 Determinación de peso en la membrana seca.

Cada una de las membranas se secaron a temperatura ambiente durante 5 días, según Barreto (2018) porque en ese tiempo dejo de existir diferencia significativa en los pesos de la membrana. Con una balanza analítica (Sartorius) se midió el peso correspondiente a la membrana seca.

3.7.5 Rendimientos diarios y quincenales.

Para el cálculo de rendimiento quincenal, se tomó el peso en gramos de la membrana de celulosa seca y se lo dividió por la cantidad de sustrato añadido en un litro. Dicho sustrato varió en peso de acuerdo con el experimento 1 y experimento 2. Se usó la siguiente fórmula.

$$\text{Rendimiento quincenal} = \frac{\text{Masa de celulosa en membrana seca (g)}}{\text{Masa de sacarosa (g)}} * 100\% \quad (\text{Ec. 1})$$

El rendimiento diario del medio de cultivo se calculó a través de dividir el resultado de la Ec. 1 para el número de días de siembra (15 d).

$$\text{Rendimiento diario} = \frac{\text{Rendimiento quincenal}}{\text{días siembra}} * 100\% \quad (\text{Ec. 2})$$

3.7.6 Determinación de humedad

Se realizó a través del método gravimétrico por diferencia de peso, según la norma NTE INEN 1114 (Ecuatoriana, 2010). Consistió en secar un recipiente con su tapa durante 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto. Empleando pinzas, se trasladó la cápsula tapada al desecador y se dejó enfriar durante 5 a 10 minutos. Se pesó el recipiente con tapa (m_1). Se colocó la muestra en el recipiente de aluminio y se registró (m_2). La muestra con el recipiente destapado y tapa se colocaron en la estufa a 105°C durante 4 horas. Luego de este tiempo, la muestra tapada se retiró de la estufa y enfrió en un desecador durante 5 a 10 minutos. Se repitió el procedimiento de secado hasta

que las variaciones entre dos pesadas sucesivas sean constantes. Se registra (m3). La determinación se realizó por triplicado. La humedad del producto se expresó en porcentaje con la Ec 3:

$$\% H = \frac{[m2] - [m3]}{[m2] - [m1]} \times 100 \text{ (Ec. 3)}$$

Donde:

H = Humedad

[m1]= peso del recipiente vacío con tapa.

[m2]= masa del recipiente tapado con la muestra antes del secado.

[m3] = masa del recipiente con tapa más la muestra después del secado.

3.7.7 Determinación de cenizas

Se utilizó el procedimiento de la norma TAPPI T 211 para celulosa en la prueba de ceniza (TAPPI, 2002). Por ello, se tomó un gramo de muestra seca de las películas en un crisol previamente pesado, se midió su peso inicial y se procedió a calcinar en una mufla a 525 °C. El crisol con la muestra de cenizas se dejó enfriar en un desecador para luego apuntar su peso final.

El porcentaje de ceniza se calculó mediante la Ec 4:

$$\% \text{cenizas} = \frac{[(C_r + C_e) - C_r]}{(C_r + M_u) - C_r} \times 100 \text{ (Ec. 4)}$$

Donde:

[C_r]=masa del crisol

[C_e]=masa de cenizas (final)

[M_u]=masa de muestra (inicial)

3.7.8 Determinación de espesor

El espesor se determinó con la ayuda de un micrómetro digital marca Mitutoyo TPM-H-2781, que posee un rango de medición de 0.001 mm. hasta 12.7 mm. En las membranas secas y de forma directa se midió la superficie lisa y rugosa de cada película por diferentes lugares hasta un total de 10 mediciones y determinar promedio.

3.7.9 Capacidad de absorción de agua

El ensayo fue realizado según el método descrito por Joaquín (2014). Láminas de celulosa de 2 cm x 2cm fueron evaluadas durante 30 min, a fin de determinar cuánta agua absorben. Para ello, se registró el peso de cada lámina de celulosa (M1) con ayuda de balanza analítica. En un vaso de precipitación con 50 ml de agua destilada se colocó la lámina y en agitación constante se mantuvieron durante 3 horas. Con pinza se retiró la lámina a un vidrio de reloj. Se registró el nuevo peso (M2). Se analizaron por triplicado.

$$\text{Capacidad de absorción de agua} = \frac{M2 - M1}{M1} \times 100\% \quad (\text{Ec. 6})$$

En donde:

M2 = Peso de muestra húmeda.

M1 = Peso inicial de la muestra seca.

3.7.10 Determinación de porcentaje de celulosa

La cuantificación de celulosa se realizó mediante el método Kurschner y Hoffer (Hernao, 2009). Que consiste en pesar 0.1 g de material seco libre de extractos en una balanza analítica y colocarlo en un matraz, se le adiciona 20 ml de la mezcla ácido nítrico-etanol (1:4) es decir 4ml de ácido nítrico en 16 ml de alcohol. Se acopló el matraz a un tubo refrigerante para reflujo y se calentó durante 1 hora. Se retiró la muestra, se enfrió y se dejó que se decante. Posteriormente se retiró el líquido y se le volvió añadir nuevamente 20 ml de la mezcla ácida y se dejó hervir por 1 hora más. La muestra es filtrada en un crisol Gooch y lavada con alcohol caliente realizando varias repeticiones y finalmente

se lava con agua destilada caliente por 4 veces. La muestra se secó a 105°C por 4 horas para ser enfriada en un desecador y luego pesada. Ver diagrama 5.

El porcentaje de celulosa se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Celulosa (\%)} = \frac{\text{Peso residuo seco}}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100 \quad \text{Ec.7}$$

Diagrama 5. Procedimiento para determinación de celulosa.



3.7.11 Determinación de la fuerza de tracción

En esta prueba se utilizaron 3 probetas por cada muestra, cuyas condiciones corresponden a la norma estándar ASTM D-882. La resistencia a tracción máxima se determinó con una maquina universal de ensayo SHIMADZU modelo AGS-J, utilizando celda de carga de 200 N, a una velocidad de 5 mm/min y una distancia entre mordaza de 22 mm. Se elaboraron películas con dimensiones de 2,5 cm de largo por 0.5 cm de ancho en forma de hueso para que sea más fácil sostener por medio de las mordazas, las cuales fueron cargadas al equipo.

Los resultados se obtuvieron directamente mediante el uso del software Trapezium 2.24. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.7.12 Determinación de espectroscopía infrarrojo (FTIR)

La caracterización estructural de celulosa bacteriana se realizó en el laboratorio de la División de Ciencias Naturales Exactas en la Universidad de Guanajuato, usando un espectrofotómetro infrarrojo FTIR de la marca PerkinElmer Spectrum 100, aplicándose una espectroscopía de absorción ATR de diamante en un ancho de banda de 4000 a 400 cm^{-1} a cada tratamiento del Experimento 1. Los resultados obtenidos fueron comparados con otros análisis realizados, y se realizó una lectura de los números de las bandas de alargamientos para determinar los grupos funcionales y enlaces presentes en la muestra para cada tratamiento.

3.7.13 Microscopía de electrónica de barrido (MEB)

Se utilizó microscopía electrónica de barrido para observar la presencia de los microorganismos, su distribución en la membrana y la estructura física de la membrana. Las películas fueron removidas del medio, deshidratándolas a temperatura ambiente. Las secciones fueron cortadas usando un micrótomo

rotatorio hasta que se obtuvo una lámina fina. Posteriormente la muestra fue recubierta con oro con ayuda de un recubridor de muestras, marca JEOL, modelo JF-12000 y modelo JSM operado a 20 kV para observar, finalmente, la estructura microscópica de las membranas.

3.8 Análisis estadísticos de los resultados

El promedio de tres repeticiones de rendimiento de celulosa, contenido de sólidos solubles, humedad, y cenizas fueron reportados. Los resultados de los experimentos E1 y E2 fueron evaluados a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías usando el software estadístico SPSS. El análisis de cada parámetro físico, químico y mecánico por tratamiento, fue realizado a través de un (ANOVA) de una vía o de un factor mediante el test de Tukey a fin de conocer las diferencias significativas entre los tratamientos.

El valor mayor de medias estadísticas del rendimiento del experimento 1 (E1) será evaluado frente al valor mayor de medias estadísticas del experimento 2 (E2), a través de una prueba T de medias usando un alfa de 0,5 % que nos indique la diferencia significativa de los datos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Identificación morfológica de la bacteria *Acetobacter xylinum*.

De acuerdo con la ilustración 5 y 6, se observa varias colonias de bacilos alargados con diversas estructuras. En ambas imágenes se puede apreciar una coloración violeta – fucsia, lo cual nos permite inferir que dichas bacterias son Gram negativas pertenecientes al género “*Acetobacter*”, cuyas agrupaciones están dadas por medio de cadenas largas y de forma ovoide.

En la ilustración 5, se realizó un acercamiento 10X usando el microscopio óptico con una baja intensidad de luz. La ilustración 6 presenta un acercamiento 40x, en donde se puede apreciar de mejor manera la morfología estructurada del género bacteriano.



Ilustración 5. Microscopía óptica de la bacteria *Acetobacter xylinum* en aumento de 10x.



Ilustración 6. Microscopía óptica de la bacteria *Acetobacter xylinum* en aumento de 40x

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

4.2 Resultados de materia prima

Los resultados de humedad y cenizas están presentados en la Tabla 13, se observa que los valores de cenizas de la cáscara de café son similares a los obtenidos por Manals (2017). El valor de humedad presenta una materia prima seca libre de posibilidad de contaminación por crecimiento de hongos.

Tabla 13. Resultado de humedad y cenizas del té negro y la cáscara de café.

	Humedad (%) y cenizas (%) de la materia prima							Promedio
	*CC1	CC2	CC3	X±S	**TN1	TN2	TN3	
%Humedad	10.08 ^a ±	10,07 ^a ±	10.39 ^a ±	10,075±	6,14 ^a ±	6,13 ^a ±	6,12 ^a ±	6,13±
	0.13	0.06	0.61	0,007	0.04	0.04	0.024	0,009
% Cenizas	1,37 ^a ±	1,71 ^b ±	2,04 ^c ±	1,706±	4,56 ^a ±	4,67 ^a ±	4.70 ^a ±	4,685±
	0.467	0.418	0.1621	0,335	0.15	0.03	0.04	0,067

*CC representa a cascara de café, ** TN representa a té negro

**Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre ellas a un nivel de significancia del 0,05.*

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

4.3 Análisis de producto terminado

Se obtuvieron dos productos como resultado de la fermentación de la Kombucha, uno es el líquido fermentado y otro es la membrana de celulosa.

El gráfico 2 muestra la variación de los resultados en referencia al pH y sólidos solubles del jarabe fermentado de Kombucha. El valor del pH entre los tratamientos del experimento 1 es constante, al igual que los valores del pH del experimento 2. El valor menor de pH es igual a $2,20 \pm 0,50$, mismo que corresponde al control del experimento 2, mientras que el valor mayor de pH es de $3,25 \pm 0,27$ y corresponde al tratamiento T3 del E1. De acuerdo con Lestari (2013) los valores de un pH óptimo para el crecimiento de bacterias productora de celulosa se encuentran entre 2.0-3.0, indicando que, en estas condiciones, los microorganismos se desarrollan de mejor manera. La tabla 14 muestra un pH constante en todos los tratamientos, pero que difiere entre cada experimento. En el experimento 1, el pH supera el intervalo óptimo antes mencionado, volviendo al medio de cultivo menos ácido. Por otra parte, en el experimento 2, la media de acidez es óptima en todos los tratamientos.

De acuerdo al gráfico 2, el valor de sólidos solubles del T1 es mayor que los valores de T2, T3, T4 y T5 del experimento 1; mientras que los valores de los tratamientos del Experimento 2 no son significativamente diferentes. El valor de los sólidos solubles (SS) del T1E1 es mayor que el de los otros tratamientos del E1, el cual no contiene la infusión de la cáscara de café. Por tanto, mientras mayor sea el valor de sólidos disueltos significa, mayor presencia de sacarosa y menor consumo por parte de los microorganismos y con ello menor producción de celulosa. Es decir, la fuente de carbono o sacarosa es asimilada de mejor forma en los tratamientos donde existe la presencia de la cáscara de café.

Tabla 14. pH y sólidos solubles (ss) en ensayos E1 y E2

No	Parámetro	T1	T2	T3	T4	T5	Control
E1	SS	20,03 ^a ±	18,03 ^b ±	17,73 ^b ±	17,94 ^b ±	17,17 ^b ±	-----
	(°Brix)	1,09	1,59	1,35	0,17	0,15	-----
	pH	3,08 ^a ±	3,08 ^a	3,25 ^a	3,17 ^a	3,08 ^a	-----
		0,20	±0,20	±0,27	±0,26	±0,20	-----
E2	SS	10,17 ^{ab}	11,33 ^b ±	15,33 ^c ±	9,00 ^a	8,83 ^a	12,50 ^b
	(°Brix)	±0,76	0,38	0,58	±0,50	±0,29	±0,50
	pH	2,33 ^a ±	2,33 ^a ±	2,50 ^a	2,33 ^a	2,33 ^a	2,20 ^a ±
		0,58	0,29	±0,50	±0,61	±0,62	0,50

**Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre ellas a un nivel de significancia del 0,05.*

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

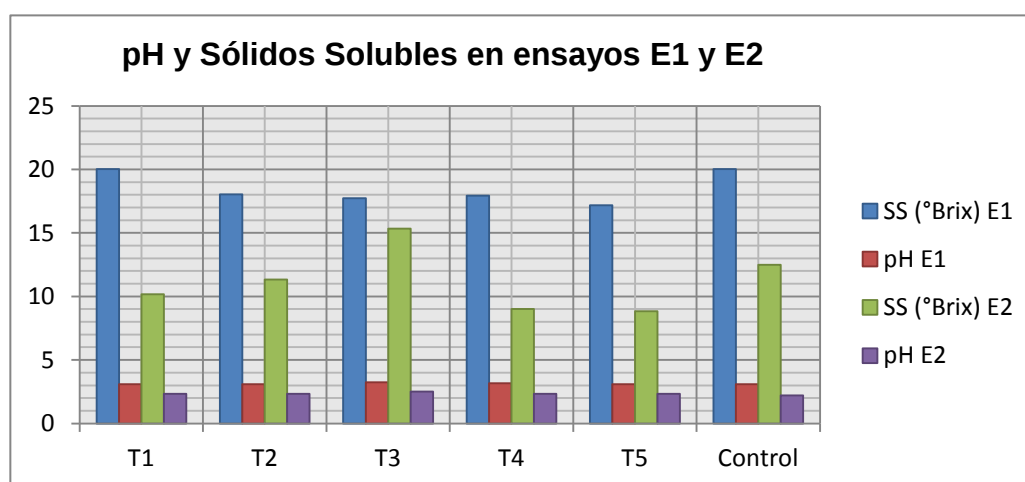


Gráfico 2. pH y sólidos solubles (SS) de E 1 y E2

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

La Tabla 15 muestra la media de resultados de las tres repeticiones de todos los cultivos, tras el análisis de la membrana de celulosa una vez que ésta fue cosechada, lavada y secada. Estos resultados corresponden al experimento 1 y 2, con sus respectivos tratamientos. En ésta se observa que el T5 de ambos experimentos, que contiene una infusión solamente de cáscara de café, exhibe el mayor contenido de cenizas de 7,56 % mientras que el valor menor de cenizas de 3,23 % corresponde al T1 solo infusión de té negro, existiendo diferencia significativa entre estos tratamientos. Este resultado permite inferir que una mayor concentración de café produce membranas de celulosa con más altos contenidos de minerales y componentes inorgánicos.

Tabla 15. Composición de las membranas de celulosa: humedad, cenizas y espesor de membranas secas.

Experimentos (E)	Parámetros	Tratamientos				
		T1	T2	T3	T4	T5
1	Humedad (%)	17,21 ^a ± 0,87	10,38 ^b ± 0,21	10,41 ^b ± 0,76	18,11 ^a ± 2,33	10,14 ^b ± 0,68
	Cenizas (%)	3,23 ^a ± 1,49	5,72 ^{ab} ± 2,31	6,34 ^{ab} ± 1,95	4,81 ^{ab} ± 0,84	7,56 ^b ± 0,57
	Espesor (mm)	0,16 ^a ± 0,02	0,26 ^b ± 0,01	0,26 ^b ± 0,001	0,73 ^c ± 0,04	0,38 ^d ± 0,02
2	Humedad (%)	12,614 ^a ± 0,47	17,65 ^b ± 0,189	14,044 ^b ± 0,306	17,02 ^a ± 0,284	18,648 ^b ± 0,289
	Cenizas (%)	3,098 ^a ± 0,75	5,992 ^{ab} ± 0,75	4,616 ^{ab} ± 1,30	4,214 ^{ab} ± 0,635	7,56 ^b ± 0,883
	Espesor (mm)	0,694 ^a ± 0,15	0,766 ^b ± 0,29	0,533 ^b ± 0,076	0,733 ^c ± 0,12	0,493 ^d ± 0,15

**Letras iguales determina que no existe diferencia significativa entre ellas*

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

Respecto al espesor, la Tabla 15 muestra que no existe diferencia significativa entre T2 y T3, mientras que frente y entre T1, T4 y T5 si existe diferencia. El espesor de cada membrana le permite comportarse de una manera específica, siendo menos flexible mientras el espesor es mayor. El T4 presenta una

estructura más firme y sólida en donde se puede inferir que hubo un mayor grado de polimerización por parte de la celulosa.

El gráfico 3 muestra las redes de humedad, cenizas y espesor de las membranas terminadas tanto del E1 como de E2, en cada tratamiento. El contenido de humedad en el E1 de los tratamientos T1 y T4 no varía de manera significativa entre sí, sin embargo, es significativamente diferente a los valores de los tratamientos T2, T3 y T5. Las membranas fueron sometidas al mismo tratamiento de secado, sin embargo; el valor mayor de humedad de la membrana del T4 con 18,11 % indica que debe ser secada adicionalmente ya que de lo contrario sería vulnerable para el crecimiento de levaduras y hongos

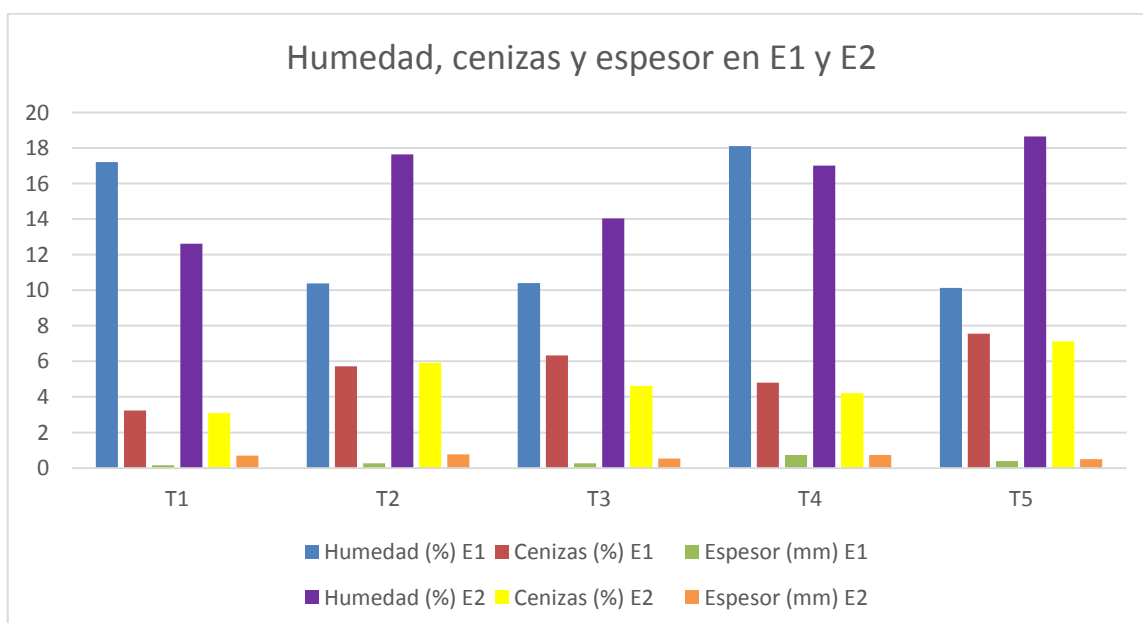


Gráfico 3. Humedad, cenizas y espesor de membranas

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

En la Tabla 16, se presentan los valores del E1 en relación a: Rendimiento diario de la membrana una vez que se secó (RDMS), Rendimiento diario de la membrana recién cosechada o húmeda (RDMH), Rendimiento quincenal de la membrana una vez seca (RQMS) y Rendimiento quincenal de la membrana recién cosechada (RQMH), peso de la membrana seca (PMS), peso de la membrana seca (PMS),

Tabla 16. Resultado de producción de celulosa del experimento 1.

Producción de celulosa cultivo de 200 gramos					
	T1	T2	T3	T4	T5
RDMS (%)	0,19 ^a ± 0,01	0,20 ^a ±0,01	0,25 ^{ca} ±0,01	0,53 ^b ±0,003	0,29 ^c ±0,003
RDMH (%)	4,78 ^a ±0,13	5,01 ^a ±0,13	7,12 ^{ac} ±0,10	9,93 ^b ±0,17	7,87 ^c ±0,55
RQMS (%)	2,88 ^a ±0,61	2,98 ^a ± 1,43	3,67 ^{ac} ±0,73	8 ^b ±1,22	4,31 ^c ±0,38
RQMH (%)	71,67 ^a ±1,89	75,17 ^a ±1,89	106,83 ^{ac} ±1,44	149,00 ^b ±2,60	118,00 ^c ±8,26
PMS (g)	5,75 ^a ±0,41	5,95 ^a ±0,40	7,33 ^{ac} ±0,34	15,99 ^b ±0,11	8,62 ^c ±0,09
PMH (g)	143,33 ^a ±3,79	150,33 ^a ±3,79	213,67 ^{ac} ±2,89	298,00 ^b ±5,20	236,00 ^c ± 16,52

**Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre ellas a un nivel de significancia del 0,05.*

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

La Tabla 16 muestra los valores de producción de celulosa, ya sea en forma de rendimiento diario, quincenal, peso en húmedo o en seco del E1. Esta tabla indica que la producción de celulosa del T1, T2 y T3 no difieren entre ellos, mientras que con respecto a los tratamientos T4 y T5 si existe diferencia significativa entre estos tratamientos.

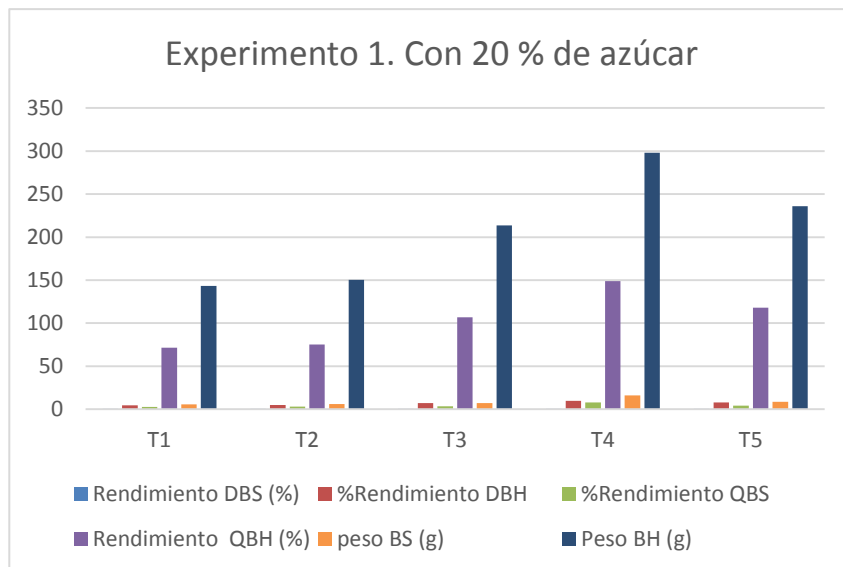


Gráfico 4. Experimento 1 utilizando 200 gramos de azúcar

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

El tratamiento 4 exhibe los mayores resultados de producción de celulosa, mientras que el resultado del tratamiento 3 es similar al del tratamiento 5.

La producción de T1 y T2 son similares y a pesar de que T2 y T3 no presenten diferencias significativas, se observa el incremento de la producción quincenal y diaria debido a la inclusión de mayor contenido de infusión de café. El efecto positivo de la infusión de cáscaras de café en la kombucha se empieza a analizar desde la sustitución del 50%, sin embargo, se observa que al sustituirse al 100 % el valor resultante de celulosa disminuye, por lo cual conviene mantener un porcentaje entre 50 a 75 % de infusión de té negro para obtener mejores resultados. El valor medio de rendimiento de T4 es superior al valor de 6 % de rendimiento presentado según Zhou (2007), mientras que las demás pruebas superan al 3 % de rendimiento obtenido por Joseph (2003).

A pesar de que el análisis estadístico general fue realizado por un (ANOVA) de dos vías, el análisis del porcentaje de celulosa comprende un (ANOVA) de solo un factor, el cual es el porcentaje de celulosa por cada tratamiento realizado. A través del Test de Tukey se conoce que en el tercer cultivo del experimento 1, el porcentaje de celulosa de los tratamientos T1 ($62,83 \pm 0,31$), T3 y T5 expresan que T1 es significativamente diferente de T3 y T5 (Ilustración 7). Sin embargo, entre T3 y T5 no existe deferencia significativa, lo cual permite inferir que con respecto a T4 no habría diferencia significativa en este parámetro,

ya que su valor estará comprendido entre ambos tratamientos. Los valores altos de pureza de celulosa en los tratamientos con la inclusión del té de cáscara de café indica el efecto favorable de la adición con respecto al que no tiene.

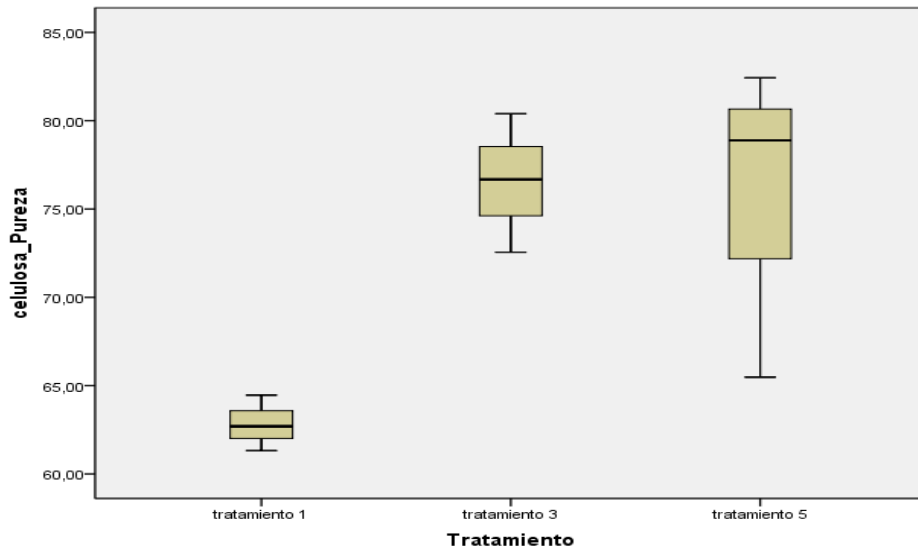


Ilustración 7. Porcentaje de Celulosa

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

Se podría indicar además que a medida que se incluye una mayor proporción de cascara de café en el medio de cultivo como infusión, las membranas de celulosa presentan una mejor pureza.

Tabla 17. Capacidad de absorción de películas de celulosa bacteriana.

	Propiedades Funcionales				
	T1	T2	T3	T4	T5
Capacidad de absorción (%)	86,87 ^a ± 0,82	89,79 ^b ± 0,86	85,75 ^a ± 2,37	90,58 ^b ± 1,68	82,43 ^a ± 2,87

**Letras diferentes determinan una diferencia significativa para un nivel de significación del 0,05.*

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

La capacidad de absorción de agua fue independiente del contenido de infusión de té o de cáscaras de café, sin embargo; el valor de las películas de T4 y T2 son similares, por lo que se afirma que estas membranas tienen una mayor capacidad para receptar y contener fluidos externos como el agua. Este valor es recíproco al peso de las membranas húmedas del tratamiento 4, indicado en la

tabla. De acuerdo con Costa (2015) un biopolímero tiene una capacidad de absorción de agua del 80 a 85 %, valores similares a los obtenidos en esta investigación.

La Tabla 18 muestra los resultados de producción de celulosa en sus diferentes ´presentaciones.

Tabla 18. Resultados de producción de celulosa del Experimento 2

Producción de celulosa cultivo de 100 gramos						
	T1	T2	T3	T4	T5	control
RDMS (%)	1,19 ^a ± 0,11	0,79 ^c ± 0,30	1,44 ^{ab} ± 0,10	1,64 ^b ± 0,05	0,58 ^c ± 0,01	0,1466 ^d ± 0,045
RDMH (%)	22,05 ^a ± 0,37	16,82 ^c ± 0,24	8,13 ^{ab} ± 0,112	26,18 ^b ± 0,33	9,60 ^c ± 0,20	8,51 ^d ± 0,19
RQMS (%)	17,85 ^a ±0,84	12,06 ^c ±2,23	21,65 ^{ab} ±1,57	25,02 ^b ± 0,79	8,77 ^c ± 0,15	2,20 ^d ± 0,09
RQMH (%)	330,67 ^a ± 5,51	252,33 ^c ± 3,51	123,00 ^a ^b ± 1,73	392,67 ^b ± 5,03	144,0 ⁰ ± 3,00	127,67 ^d ± 2,08
PMS	17,85 ^a ±1,68	12,06 ^c ±4,29	21,65 ^{ab} ±1,57	25,03 ^b ± 0,87	8,77 ^c ± 0,15	2,20 ^d ± 0,09
PMH	330,67 ^a ± 5,51	252,33 ^c ± 3,51	122,00 ^a ^b ± 1,73	392,67 ^b ± 5,03	144,0 ⁰ ± 3,00	127,67 ^d ± 2,08

**Letras diferentes determinan una diferencia significativa para un nivel de significación del 0,05.*

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

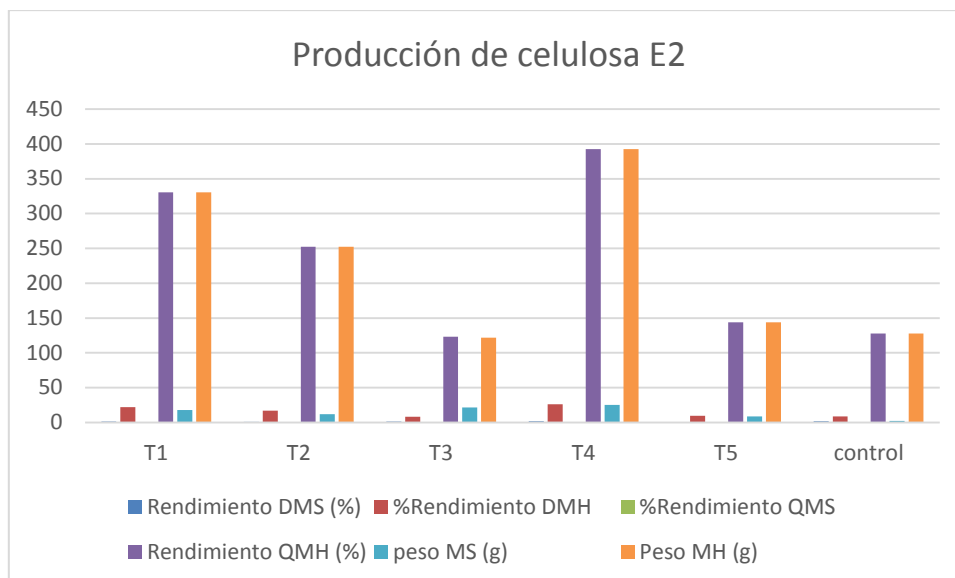


Gráfico 5. Producción de celulosa. Experimento 2

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

La producción de celulosa en E2 o con 10 % de azúcar varía con respecto a E1. De acuerdo con el análisis de varianza de dos factores que se indica en la Tabla 19, existe diferencia significativa entre E1 y E2 en el rendimiento a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 19. Anova de dos factores. Rendimiento quincenal.

Variable dependiente: Rendimiento Quincenal					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	1998,452 ^a	10	199,845	675,090	,000
Interceptación	2594,795	1	2594,795	8765,390	,000
Experimento	1210,847	1	1210,847	4090,323	,000
Tratamiento	943,764	5	188,753	637,619	,000
Experimento * Tratamiento	198,718	4	49,679	167,821	,000
Error	6,513	22	,296		
Total	5271,993	33			
Total corregido	2004,964	32			

a. R al cuadrado = ,997 (R al cuadrado ajustada = ,995)

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

Al realizar un ANOVA en el experimento (E2), en relación a producción de celulosa, se observa que existe diferencia significativa entre los diversos tratamientos. El test de Tukey indica la diferencia entre los diversos tratamientos, lo cual está indicado en la Tabla 17. Sin embargo, el tratamiento 4 se mantiene con la mayor media de rendimientos, ajustándose al valor quincenal del 30 % de

producción de celulosa descrito según Son (2001). Este tratamiento T4 supera los rendimientos presentados por Illana (2007) con un medio de cultivo que tiene como único sustrato a la infusión del té negro.

A través del ANOVA de dos factores se observó que en la producción de celulosa existe diferencia significativa entre los experimentos E1 y E2 a un nivel de confianza del 95 %. El análisis de resultados observado de las tablas 15 y 17 demuestra que los tratamientos T4 (75 % cáscara de café – 25 % té negro) son los que presentaron una mayor producción en cada experimento. Con el afán de verificar la similitud o diferencia de tratamientos, se realizó la prueba de significancia de T de student a nivel de significancia del 95 % para establecer el mejor tratamiento – experimento.

Se seleccionaron como variables de comparación al peso de las membranas y el rendimiento quincenal de la membrana seca. En la Tabla 20 se muestran los valores de análisis.

Tabla 20. Evaluación comparativa de peso y rendimientos del E1 y E2

Evaluación comparativa de peso y rendimiento del E1 y E2					
	E1 y E2	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Peso	Con 200 azúcar E2	3	15,9939	,06355	,03669
	con 100 azúcar E1	3	25,0330	,87413	,50468
RQMH	Con 200 azúcar E2	3	7,9970	,03176	,01834
	con 100 azúcar E1	3	25,0330	,87413	,50468

Elaborado por: (Merchan & Tigre, 2019)

De acuerdo a la Tabla 20, los valores máximos de peso y rendimiento corresponden al tratamiento T4 experimento 2 y a través de la prueba T se verifica que existe una diferencia significativa frente al tratamiento T4 del experimento 1. A través de esto se rechaza la hipótesis nula planteada y se acepta la alternativa, en el sentido de que si existe diferencia significativa en el rendimiento de producción de celulosa al incluir la infusión de cáscaras de café.

De acuerdo a la Tabla 21, el valor de F de la prueba de Levene indica que el valor p (probabilidad) es menor del valor de la significancia 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis de varianzas iguales y se analiza según varianzas desiguales. Al ser el valor de p obtenido menor que 0,05 se rechaza la igualdad de la hipótesis o igualdad de tratamientos en los experimentos E1 y E2.

Tabla 21. Prueba T de medias.

Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					
		F	Sig.	T	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia Inferior Superior
Peso	Se asumen varianzas iguales	13,397	,022	-17,863	4	,000	-9,03913	,50601	-10,44405 -7,63422
	No se asumen varianzas iguales			-17,863	2,021	,003	-9,03913	,50601	-11,19465 -6,88362
RQMH	Se asumen varianzas iguales	14,522	,019	-33,734	4	,000	-17,03603	,50501	-18,43817 -15,63389
	No se asumen varianzas iguales			-33,734	2,005	,001	-17,03603	,50501	-19,20345 -14,86861

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

4.4 Espectroscopía infrarroja. FTIR

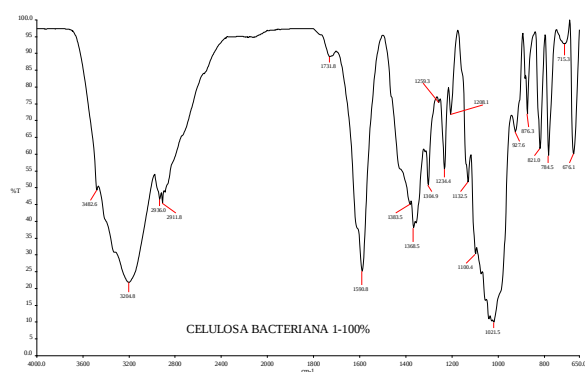


Ilustración 8. Microscopía FTIR muestra 1, 100 % té negro del E1.

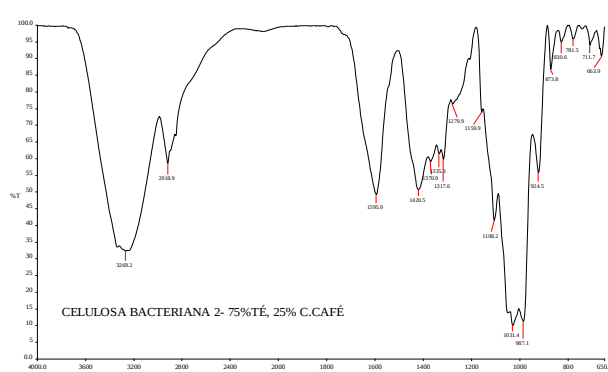


Ilustración 9. Microscopía FTIR muestra 2, 75 % té negro-25 % té casc. Café del E1.

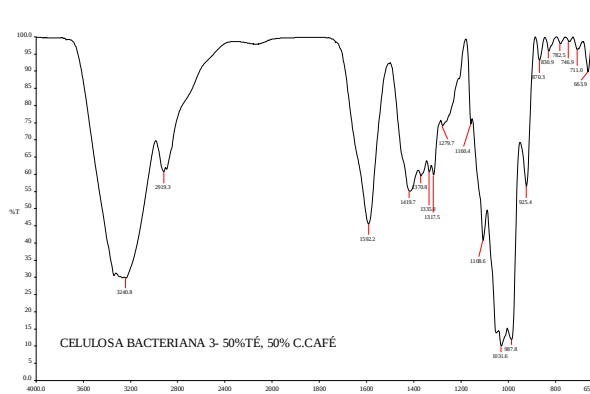


Ilustración 10. Microscopía FTIR muestra 3, 50 % té negro-50 % té casc. Café del E1.

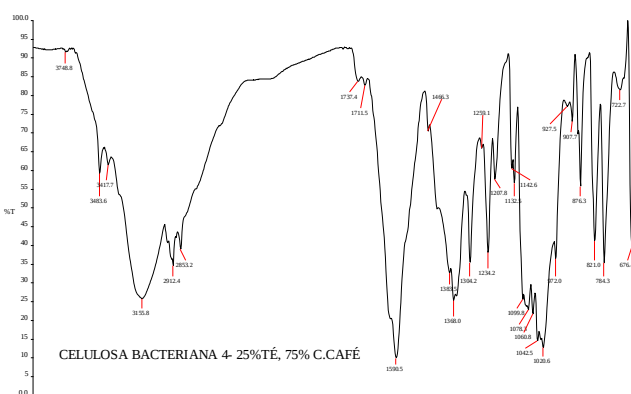


Ilustración 11. Microscopía FTIR muestra 4, 25 % té negro-75 % té casc. Café del E1.

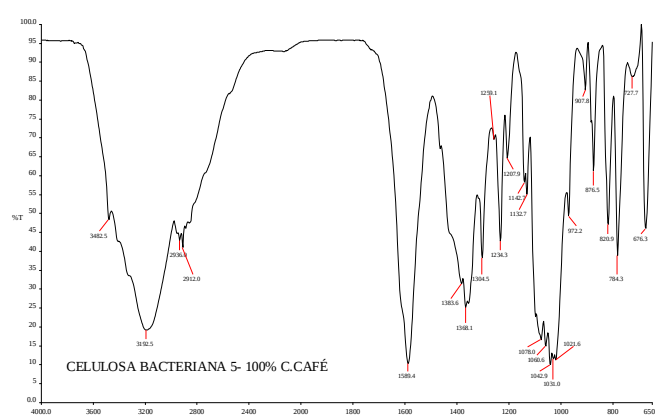


Ilustración 12.. Microscopía FTIR muestra 5, 100 % té casc. Café del E1.

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

La caracterización FTIR de las muestras de celulosa demostró espectros típicos de una celulosa vegetal.

Si se traza una perpendicular en el número de onda correspondiente a 1500 cm^{-1} , se obtiene dos regiones en el plano de espectros infrarrojos correspondientes a la zona de diagnóstico en el lado izquierdo, y la zona de huella dactilar en el lado derecho.

Dentro de la espectroscopía FTIR, la banda de onda que caracteriza a una celulosa está comprendida entre los 3335 y 3290 cm^{-1} (Contreras, 2010). En todos los tratamientos analizados se observan picos comprendidos en esos valores, lo cual muestra que todas las membranas tienen una estructura igual a la celulosa vegetal pero libre de lignina. Además, existen picos comprendidos entre $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$, lo cual demuestra la presencia de enlaces C-O-C, y cuyos compuestos forman las moléculas beta glucosa que dan lugar a la celulosa (Mondragón, 2017).

Además, todas las películas de celulosa presentan espectros en una longitud de banda de 1630 cm^{-1} , lo que es muy característico en celulosas con un alto porcentaje de humedad, contenidas en la pulpa del papel (Contreras, 2010).

De acuerdo con Rosma (2012), la estructura de la celulosa bacteriana a base de Kombucha comprende bandas desde $891.59 - 1424.18\text{ cm}^{-1}$ comparándola con una micro celulosa comercial y corroborando los picos obtenidos en todas las muestras.

La zona de huella dactilar permite diferenciar la estructura de cada membrana, en donde los tratamientos 4 y 5 son los únicos resultados que muestran espectros comprendidos entre 1227 , 1159 y 1028 cm^{-1} , y cuyas vibraciones pertenecen a los enlaces C-O-C, C-OH y β -glucopiranososa de celulosa. Sin embargo, este hecho no se cumple en los demás tratamientos, lo cual permite afirmar que las altas concentraciones de la infusión de cáscara de café en la composición de la celulosa, aumenta la cristalinidad y dureza de las membranas (Zara, 2017).

Analizando nuevamente la zona de diagnóstico se puede observar que no existe ningún pico entre las bandas de absorción de $1740 - 1850 \text{ cm}^{-1}$, descartando la presencia de anhídridos de ácidos y cloruros de acilo y cuyas vibraciones están comprendidas en dichas longitudes de bandas (Mondragón, 2017). Por otra parte, el número de onda promedio correspondiente a las cetonas y ácidos carboxílicos es 1715 cm^{-1} , por lo cual se descarta de igual forma su presencia dentro de las muestras al no existir ningún pico que corrobore su composición (Rosma, 2012).

La ausencia de estos compuestos demuestra que se llevó acabo un buen tratamiento de las membranas al realizar el lavado con hidróxido de sodio al 0,1 N y agua destilada a 80°C , principio por el cual fue eliminar la presencia de dichos componentes orgánicos (Soriano, 2018).

4.5 Resultados de microscopía de electrónica de barrido (MEB)

Actuales investigaciones indican que un parámetro que afecta a la producción de celulosa bacteriana es la temperatura, teniendo valores óptimos para el crecimiento entre 28 y 30°C (Ruka, 2012), logrando producciones de celulosa de hasta 1 cm de espesor y $20 \times 20 \text{ cm}$ de área, por lo cual, para la realización de la microscopía fue necesario cortar láminas muy finas con el micrótopo.

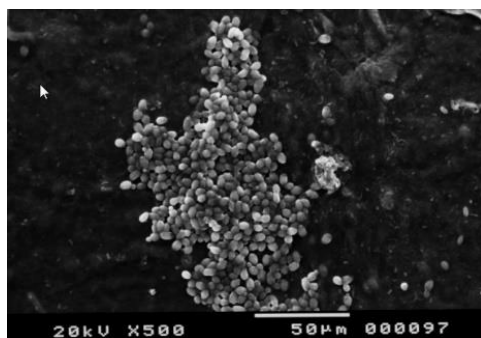


Ilustración 13. . *Bacterias xylinum*

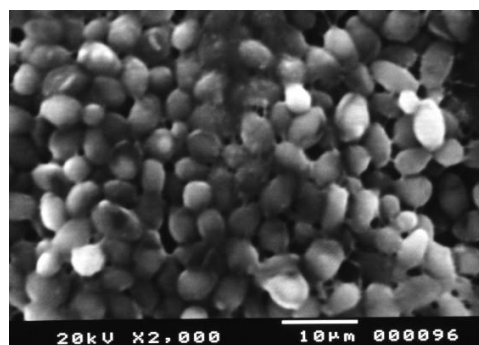


Ilustración 14, *Bacterias xylinum*,
ovaladas y cilíndricas

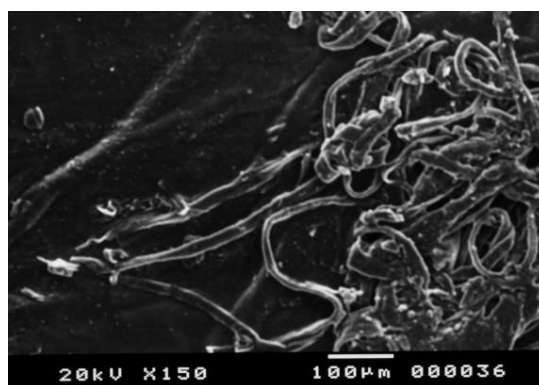


Ilustración 15. . Fibras de celulosa

Las micrografías MEB de las Ilustraciones 13 y 14 presentan las bacterias *Gluconacetobacter xylinum*, de tamaño menor a 10 µm con una morfología ovalada, cilíndrica y similar a un grano de arroz. La caracterización estructural morfológica de las fibras de celulosa se muestra en la micrografía MEB 15, donde se observa una red fina de fibras de celulosa con una morfología similar a hilos, alargada, tamaño variable, diámetro de 20 µm y una longitud de 100 a 1.200 µm.

4.6 Resultados de propiedades mecánicas-tensión

Tabla 22. Resultados de prueba de tracción de membranas de tercer cultivo en el experimento 1.

Propiedades mecánicas					
E1	T1	T2	T3	T4	T5
Fuerza de tracción (N)	12,6000 ^a ± 2,68	26,4166 ^b ± 6,27	15,1333 ^{ab} ± 0,71	83,5333 ^c ± 0,68	48,4000 ^d ± 7,69

*Letras diferentes determinan una diferencia significativa para un nivel de significación del 0,05.

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

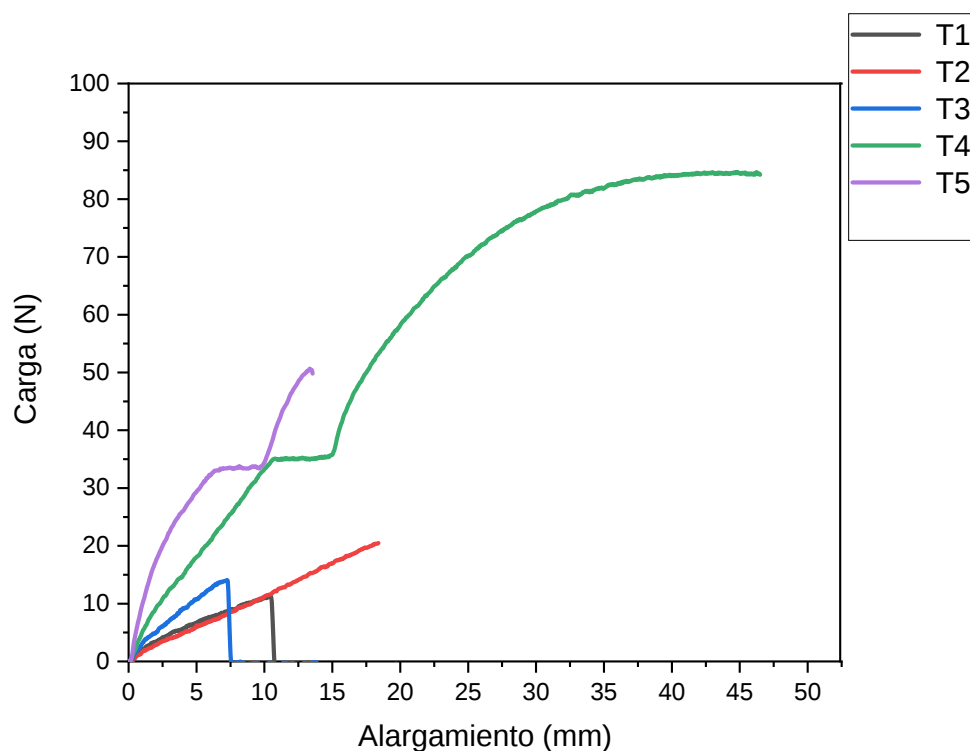


Gráfico 6. Pruebas de tracción de películas de celulosa bacteriana.

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

De acuerdo con Pacheco (2002), los índices de tracción máximo que pueden llegar a alcanzar las pastas de una celulosa vegetal fluctúan entre los 50 y 60 N. Sin embargo, el tratamiento 4 logra obtener una carga de resistencia de 85 N, lo que indica que estas membranas son más resistentes al desplazamiento de la tracción.

4.7 Resultados de estimación de costos.

Tabla 23. Determinación de costo de producción.

Determinación del costo de producción					
Producto	Celulosa bacteriana				
Unidades producidas	15 membrana de celulosa de 22 cm largo x 11 cm de ancho.				
Cantidad	Unidad de medida	Elementos del Costo	Precio total (\$)	Costo Fijo (\$)	Costo Variable (\$)
3	Kilogramos	Sacarosa (Azúcar de mesa)	3,15		3,15
1	Kilogramos	Hidróxido de Sodio grado reactivo	6,00		6,00
1	Kilogramos	Hongo de Kombucha	4,50		4,50
4	Galón	Agua destilada	8,00		8,00
15	Unidad	Envases plásticos para medio de cultivo	17,25		17,25
1	Paquete	Ligas	1,50		1,50
5	metros	Tela de recubrimiento	10,00		10,00
2	m ³	Agua Potable	1,10		1,10
4	Unidades	Mascarillas y Guantes	5,00		5,00
300	Gramos	Té negro	11,00		11,00
600	Gramos	Cáscara de Café	-		-
18	Horas	Energía Eléctrica	0,93	0,93	
		Totales	68,43	0,93	67,50

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

Tabla 24. Costo por unidad de membrana celulosa bacteriana.

Costo por unidad	Costo (\$)
Costo fijo unitario =	0,06
Costo variable unitario =	4,50
Costo total de venta =	4,56

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

Tabla 25. Determinación del precio de venta de la membrana de celulosa bacteriana.

Determinación del Precio de Venta por membrana de celulosa				
Producto	Cto. Total de Venta (CTV) (\$)	Utilidad (\$)	Precio de Venta Sin IVA (\$)	Precio de Venta Con IVA (\$)
Membrana de Celulosa	\$ 5,86	\$ 1,75	\$ 7,61	\$ 8,53
Porcentaje de utilidad	30%			
IVA	12%			

Elaborado por: (Merchán & Tigre, 2019)

De acuerdo a Hernández (2016), los costos de producción de la membrana de celulosa a partir del hongo de Kombucha están en 14,50 \$ por unidad, teniendo en cuenta que dichas celulosas contienen reactivos adicionales que se asemejan a los porcentajes de rendimientos de producción obtenidos (25 %). Sin embargo los costos para obtener la membranas, sustituyendo el té negro por el té de cáscara de café, se reduce a \$ 7,05 , lo cual favorece a la posible comercialización del producto obtenido teniendo en cuenta el beneficio que aporta la cáscara de café como desecho sin valor agregado.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

De acuerdo al análisis de resultados, la sustitución de té negro por la infusión de cáscara de café influye positivamente en la producción de celulosa bacteriana. El T4 (75 % cáscara de café y 25 % té negro) mostró los mejores rendimientos de producción, con un polímero de mejores características mecánicas que los otros tratamientos, en donde la resistencia a la tracción de dicho tratamiento fue 85 N por un alargamiento de 45 mm., presentó un espesor de 0,788 mm, y los espectros infrarrojos variaron desde 3400 a 1750 cm^{-1} lo cual es propio de una membrana de celulosa. Sin embargo a pesar que el análisis de ceniza fue 4 % y su humedad 17 %, la sustitución con la infusión de cáscaras de café fue más efectiva aún con el experimento 2 que permitió la obtención del rendimiento más alto (25 %) y de mayor pureza (87 %) de todos los tratamientos.

Por otra parte, la ausencia total de éste afecta en el rendimiento de producción de celulosa. Esto fue demostrado en el tratamiento 5 (100 % Cáscara de café), cuyo valor promedio fue el 11 %.

La variación del consumo de sustrato expresado en grados Brix y el nivel de acidez dado en pH por cada experimento presenta diferencia significativa, sin embargo, sus valores se mantienen constantes entre tratamientos. Los valores del pH fluctúan entre los 2 – 2.5, volviendo al medio de cultivo óptimo para el desarrollo del género *Acetobacter*.

Los costos de producción para desarrollar la membrana de celulosa están por debajo de los 9 \$ por película incluyendo el IVA actual. De acuerdo con Nava (2016), el costo de una membrana fluctúa los 11 \$ considerando el elevado costo del inóculo de Kombucha y los sustratos del medio de cultivo. El precio bajo de la cáscara de café proporciona una disminución proporcional al valor agregado en la obtención de la celulosa.

El uso de la cáscara de café en la producción de celulosa bacteriana permitirá darle un valor agregado a este subproducto y adicionalmente disminuir los costos de producción del polímero.

Recomendaciones.

El Ecuador es rico en variedades de café, por lo que sería conveniente investigar si habría mejores resultados según las distintas variedades de café que se produce.

La ausencia total del té negro en la producción de las membranas de celulosa provoca que los rendimientos disminuyan drásticamente. Se sugiere investigar si existe un componente químico propio del té que influye al crecimiento microbiano.

Evaluar el rendimiento de producción de membranas de celulosa disminuyendo los porcentajes de sustrato de carbono hasta su mínimo valor.

Sustituir el uso del hidróxido de sodio por una sal para el lavado para incrementar la dureza de las membranas de celulosa

Modificar y evaluar el color de las membranas de celulosa.

Bibliografía

- Adnan, a. (2015). Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose production by gluconacetobacter xylinus. *Malaysian journal of analytical sciences*, 1132-1135.
- Agudelo, j. M. (2014). Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de betania antioquia: usos y aplicaciones . Corporacion universitaria lasallista facultad de ingenierias , 13.
- Aguilar, e. (2018). *Café arabica coffea arabica*. Springer, 39-62.
- Ai leng teoh, g. H. (2004). Ecología de la levadura de la fermentación de kombucha. Researchgate, https://www.researchgate.net/publication/8428104_yeast_ecology_of_kombucha_fermentation.
- Alulima, m. (2012). Alternativas agroecológicas para el manejo del café (coffea arabica). Universidad de cuenca, 19-20.
- Arcila, j. (2010). Sistema de produccion de café. *Cenicafé*, 49-50.
- Balcàzar, y. (2011). Extracción del aroma de café, por arrastre de vapor utilizando destilación. Universidad de guayaquil, 4-6.
- Ballou, c. (1979). William zev hassid. Washington d.c: national academy of sciences.
- Barreto, s. &. (2018). "síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida de piña y banano, inoculados con kombucha. Repositorio universidad de guayaquil, <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/27913/1/tesis-celulosa-bacteriana-pi%C3%B1a-banano.pdf>.
- Batista-cruzado, a. (2015). Efecto en la regeneración ósea guiada de una membrana de plga modificada a nivel microtopográfico con plasma de oxígeno y funcionalizada con una capa inorgánica de óxido de silicio. Universidad de sevilla. Departamento de estomatología, 27-30.
- Bernardi, l. D. (2017). Perfil del té. Ministerio de agroindustria presidencia de la nación, 12-14.
- Billmeyer, f. (2015). *Ciencia de los polímeros*. Reverte.
- Buryaile, r. (2017). Cadena del té. Ministerio de agricultura , 8-10.
- C.-h. Liu, w.-h. H.-l.-c. (2002). El aislamiento e identificación de microbios de una bebida de té fermentada, haipao, y sus interacciones durante la fermentación de haipao. Researchgate, https://www.researchgate.net/publication/229266523_the_isolation_and_identification_of_microbes_from_a_fermented_tea_beverage_haipao_and_their_interactions_during_haipao_fermentation.
- Caicedo, l. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de celulosa bacteriana. *Ingeniería y ciencia*, 315-318.

- Cakar, f. (2014). Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate polymers*, 7-12.
- Carreira, p. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource technology*, 7355 - 7359.
- Carreño, I. D. (2011). Efecto de las condiciones de cultivo y purificación. Universidad nacional de colombia, 18-29.
- Carriel, b. (2012). Detección y caracterización de bacterias endofíticas en árboles de cafeto (*coffea arabica* l.) Y de sombra en puerto rico . *Proquest dissertations* , 1-2.
- Casalins, a. (2017). Índice de producción de té en américa latina . 23-24.
- Castro, c. (2010). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *gluconacetobacter swingsii* sp. From colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate polymers*, 96-101.
- Castro, I. (2017). Industrializacion del té negro al mercado colombiano. Quito.
- Cervantes, r. (2015). Efecto de la pulpa de *coffea arabica* l. Sobre la microflora de tres unidades de suelos. *Universidad agraria de la habana*, 3.
- Cifuentes, j. C. (2016). El precio mundial del café y su efecto en el precio minorista para las cinco principales . *Universidad icesi*, 383.
- Clark, v. (2015). *Botanica segunda edición*. Madrid: océano editores s.a.
- Contreras, h. (2010). Espectroscopia atr-ftir de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. *E-gnosis*.
- Costa, s. (2015). Sugarcane straw and its cellulose fraction as raw materials for obtainment of textile fibers and other bioproducts. *Springer*.
- D'areny, á. (2012). El café en sudamérica. *Zonas productoras del café*, 27.
- De luis, d. (2008). Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. Madrid: *anales de medicina interna*.
- Delgado, m. (2015). Aplicación de celulosa nanofibrilada, en masa y superficie, a la pulpa mecánica de muela de piedra: una sólida alternativa al tratamiento clásico de refinado. *Scielo*.
- Deogratijs jaganyi, r. D. (1999). Cinética de la infusión de té: el efecto del proceso de fabricación en la tasa de extracción de cafeína. *Reasearchgate*,
https://www.researchgate.net/publication/261849543_kinetics_of_tea_infusion_the_effect_of_the_manufacturing_process_on_the_rate_of_extraction_of_caffeine.
- Deogratijs, j. R. (1999). Cinética de la infusión de té: el efecto del proceso de fabricación en la tasa de extracción de cafeína. *Reasearchgate*,
https://www.researchgate.net/publication/261849543_kinetics_of_tea_infusion_the_effect_of_the_manufacturing_process_on_the_rate_of_extraction_of_caffeine.

- Duarte, s. (2005). Obtención y caracterización de materiales compuestos de fibras de la “piña” de henequén y polipropileno. Unidad de materiales, centro de investigación científica de yucatán, 40 - 42.
- Ecuadoriana, n. T. (2010). Café soluble. Determinación de pérdida por calentamiento . Nte inen 1114.
- Ernst, e. (2003). Kombucha: a systematicreview of the clinical evidence. Forsch komplementärmed klass naturheilkd, 85-87.
- Escamilla, m. (2017). Panorama internacional del café. Coordinación general de administración de riesgos de precios, 15-16.
- Fonseca, f. (2011). Biomass briquetting and its perspectives in brazil. Elsevier, 239.
- García, g. B. (2012). Agua, agricultura y seguridad alimentaria. Acción contra el hambre (acf), 143-144.
- Gomes, f. (2012). Production of bacterial cellulose by gluconacetobacter sacchari. Biomass&bioenergy, 1-6.
- Gómez, a. (2004). Transformación termoquímica de la biomasa residual del proceso de extracción del aceite de palma: tecnologías y perspectivas. Revista palma, 390.
- González, a. G. (2017). Optimización de la biosíntesis de nanocelulosa bacteriana por fermentación. Cataluña .
- González, a. G. (2017). Optimización de la biosíntesis de nanocelulosa bacteriana por fermentación. Universidad politecnica de cataluña, 11-12.
- González, a. G. (2017). Optimización de la biosíntesis de nanocelulosa bacteriana por fermentación. Universitat politecnica de catalunya, <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/115472/tfm.pdf?sequence=1&isallowed=y>.
- González, e. (2003). El efecto quimioprotector del té y sus compuestos. Caracas.
- Gordillo, m. (2018). Aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado kombucha. Universidad tecnica de loja, <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/22715/1/gordillo%20herrera%2c%20melania%20elizabeth.pdf>.
- Greenwalt, s. &. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. Journal of food protection, <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028x-63.7.976>.
- Guerrero, v. H. (2011). Nuevos materiales:aplicaciones estructurales e industriales. 33-46.
- Gutiérrez, a. D. (2008). Caracterización de genes de poligalacturonasas de fusarium oxysporum f.sp. Y su análisis en sistemas. Universidad complutense de madrid, 22-23.
- Hernandes, e. F. (2014). La producción y el consumo del café. 23-25.

- Hernao, I. (2009). Cuantificación de celulosa proveniente de residuos de la industria del mueble. Ingeniería de recursos naturales y del ambiente, 23-28.
- Hestrin. (1954). Synthesis of cellulose by acetobacter xylinum. Hebrew university, 346-350.
- Hestrin, m. S. (1954). Synthesis of cellulose by acetobacter xylinum. Hebrew university-, 346-350.
- Higuchi, t. (1990). Bioquímica de la lignina: biosíntesis y biodegradación. Springer link, <https://link.springer.com/article/10.1007/bf00225306>.
- Illana, c. (2007). El hongo kombucha. Boletín de la sociedad micológica de madrid, 269 -272.
- Jaramillo, I. R. (2012). Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. Universidad nacional autónoma de México, <file:///c:/users/jonathan/downloads/476-texto%20del%20art%3%adculo-1217-1-10-20170112.pdf>.
- Jiménez, e. R. (2014). Café i (g. Coffea). Universidad complutense de madrid, 116-117.
- Joaquii, d. F. (2014). Propiedades ópticas y permeabilidad de vapor de agua en películas . Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 63.
- Joseph, g. (2003). Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by acetobacter xylinum. Journal of chemical technology and biotechnology, 964-969.
- Keshk, s. (2013). Vitamin c enhances bacterial cellulose production in gluconacetobacter xylinus. Carbohydrate polymers, 98-100.
- Klemm dieter, h. B. (2005). Celulosa: biopolímero fascinante y materia prima sostenible. Angewandte chemie, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200460587>.
- Klemm, d. (2011). Nanocelulosas: una nueva familia de materiales basados en la naturaleza. Angewandte chemie, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201001273>.
- Kowser, j. (2016). Isolation and characterization of acetobacter aceti from rotten papaya. Semantic scholar.
- Lescano, a. D. (2015). Características físico-químicas y capacidad antioxidantes de kombucha. Universidad nacional de trujillo, <http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/unitru/8783/lescano%20jim%3%a9nez%2c%20ary%20daniel.pdf?sequence=1&isallowed=y>.
- Lestari, p. (2013). Study on the production of bacterial cellulose from acetobacter xylinum. Jordan journal of biological sciences , 75-80.
- Lin, d. (2014). Production of bacterial cellulose by gluconacetobacter hansenii using only waste beer yeast as nutrient source. Elsevier, 114-119.
- Lobsang, c. (2003). Producción de té negro como una nueva alternativa para el Ecuador . Escuela superior politecnica , 58-59.

- M. Schramm, z. G. (1957). Síntesis de celulosa por acetobacter xylinum . 3. Sustratos e inhibidores . Ncbi, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1200212/>.
- Malamud, f. (2011). Bases moleculares del desarrollo de biofilms en xanthomonas axonopodis pv citri y su rol en el proceso infectivo. Universidad de buenos aires, 13-15.
- Manals, e. (2017). Caracterización de la biomasa vegetal “cascarilla de café” . Universidad de oriente santiagao de cuba, 171.
- Martínez, c. (2015). Evaluación del efecto de inductores en la producción de celulosa bacteriana empleando gluconacetobacter medellinensis. Universidad pontificia bolivariana, 12-13.
- Mirabal, I. (2012). Método efectivo para la desinfección total de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (hma): aislamiento y caracterización de bacterias endospóricas. Redalyc.
- Miranda, I. (2014). Propiedades antagónicas de kombucha a , fitopatogenos fungosos en condiciones "in vitro". Universidad nacional de cajamarca , 22 - 27.
- Mohamed a., m. S. (2018). Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose. Cellulose & paper dept., national research centre, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.095>.
- Mondragón, p. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos. Jalisco: unidad de tecnología alimentaria.
- Nava, m. (2016). Diseño de planta piloto para producción de celulosa bacteriana. Barcelona.
- Nava, m. G. (2016). Diseño de planta piloto para producción de celulosa bacteriana. Universidad politecnica de cataluña, 50.
- Nazar, j. (2017). Biofilms bacterianos. Revista de otorrinolaringología, https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0718-48162007000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Neil stevens, c. N. (2018). Kombucha: los secretos de esta bebida fermentada probiótica. Málaga: sirio s.a.
- Neira, a. (2016). El mundo de los polímeros y biomateriales poliméricos y su aplicación médica. Centro para la investigación interdisciplinaria avanzada en ciencia de materiales, 12- 14.
- Neira, j. I. (1997). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la. https://books.google.com.ec/books?id=ydkqjzwnsruc&pg=pa68&lpg=pa68&dq=balentine,+wiseman,+%26+bouwens,+1997&source=bl&ots=99vux_qdf5&sig=acfu3u3jtzg9nxpcdjz2y_jhrvc8xlutg&hl=es&sa=x&ved=2ahukewjd8nncqi_hahucxvkhrbkabgq6aewanoecagqaq#v=onepage&q=balentin.
- Neira, j. I. (1997). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la. Santiago,españa.

- Okiyama, a. (1992). Bacterial cellulose i. Two-stage fermentation process for cellulose production by acetobacter. Sciencedirect, 471-477.
- Orellana, n. (2015). Reutilización de polímetros como alternativa socio ambiental y económica en la elaboración de eco bloques. Cuenca.
- Pacheco, b. (2002). Síntesis de carboximetilcelulosa (cmc) a partir de pastas de plantas anuales.
- Pacheco, g. (2017). Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. Industrial crops & products, 14-18.
- Park, j. K. (2003). Cellulose production by gluconacetobacter hansenii in a medium containing ethanol. Biotechnology letters, 2055-2058.
- Pineda, l. D. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. Scielo, <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v8n16/v8n16a12.pdf>.
- Plasticeurope. (2018). Productores de materiales plásticos. Datos del mercado, 5.
- Quintero, g. l. (2012). Calidad en taza de las variedades de coffea arabica l. Cenicafé, 265-266.
- Quintero, m. (2014). El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad. Visión general, 293-295.
- Quiñones, a. (2013). Una experiencia en la industria del té. Centro de investigación en tecnologías de la información y comunicaciones , 164-165.
- Ramírez, f. Y. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. Universidad autónoma de aguascalientes, 51 - 55.
- Rani, m. U. (2011). Production of bacterial cellulose by gluconacetobacter hansenii uac09 using coffee cherry husk. Association of food scientists & technologists, 755-760.
- Rathinavelu, r. (2005). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café . Organización mundial del café, 2.
- Reiss, j. (1994). Influencia de diferentes azúcares en el metabolismo del hongo del té. Investigación y tecnología de alimentos europeos, https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1050872782?and_facet_journal=jour.1151480.
- Reiss, j. (2008). Influencia de diferentes azúcares en el metabolismo del hongo del té. Investigación y tecnología de alimentos europeos, https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1050872782?and_facet_journal=jour.1151480.
- Reports, m. R. (2018). Mercado de kombucha - análisis de crecimiento, tendencias, progreso y desafíos (2019 - 2024). Market research reports, https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/kombucha-market?gclid=eaiaiqobchmiq7brzpip4qivsgogch1eqabxeaayasaagijjpd_bwe.

- Resquin, f. (2004). Caracterización de la celulosa de especies del género. Instituto nacional de innovación agraria tacuarembó, 12- 16.
- Roland geyer, j. R. (2017). Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados. Science advances, <http://advances.sciencemag.org/content/3/7/e1700782>.
- Romero, s. P. (2018). La cáscara del café, una nueva fuente de ingresos para los cafeteros. El campesino, 1-3.
- Rosma, a. (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth. Penang.
- Ruiz, I. (2018). Determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de kombucha. Universidad rafael landívar, 39-40.
- Ruiz, I. S. (2018). "determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de kombucha". Universidad rafael landívar, <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/hernandez-lisbeth.pdf>.
- Ruiz, I. S. (2018). "determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de kombucha". Universidad rafael landívar, <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/hernandez-lisbeth.pdf>.
- Ruka, d. (2012). Altering the growth conditions of gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose. Carbohydrate polymers, 613-622.
- Saizar, c. (2010). Línea de base para evaluar el impacto de una planta de celulosa en el río uruguay. Innotec.
- Salama, a. (2018). Cellulose/calcium phosphate hybrids: new materials for biomedical and environmental applications. Cellulose and paper department, national research centre, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.130> .
- Santander, g. (2015). Viabilidad de la exportación de té amazónico con maracuyá y naranjilla hacia el mercado internacional. Quito.
- Sievers, m. C.-s. (2014). Microbiología y balance de fermentación en una bebida de kombucha obtenida de una fermentación de hongo de té. Researchgate, https://www.researchgate.net/publication/251592843_microbiology_and_fermentation_balance_in_a_kombucha_beverage_obtained_from_a_tea_fungus_fermentation.
- Silva, g. (2017). Exportaciones e importaciones de té en america latina.
- Son, h. J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated acetobacter sp. A9. Miryang national university, 1-4.
- Soriano, m. J. (2018). "síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida de piña y banano, inoculados con kombucha. Repositorio universidad de guayaquil, <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/27913/1/tesis-celulosa-bacteriana-pi%C3%B1a-banano.pdf>.

- Tadao, o. T. (2017). Producción de celulosa a partir de d-manitol por acetobacter xylinum ku-1. Researchgate, https://www.researchgate.net/publication/247820927_production_of_cellulose_from_d-mannitol_by_acetobacter_xylinum_ku-1.
- Tappi. (2002). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. T 211 om-02 .
- Trovatti, e. (2011). Gluconacetobacter sacchari: an efficient bacterial cellulose cell-factory. Carbohydrate polymers, 1418-1419.
- Uraga, c. (2014). Algunos principios activos del té, café y cacao. Quimesca, 17-18.
- View grand, r. (2018). Tamaño del mercado de kombucha por valor de \$ 5.45 mil millones para 2025. Grand view research, <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-kombucha-market>.
- Vinita dubey, c. S. (2002). Pervaporación de mezclas binarias de agua y etanol a través de membrana de celulosa bacteriana. Researchgate, https://www.researchgate.net/publication/257561623_pervaporation_of_binary_water-ethanol_mixtures_through_bacterial_cellulose_membrane.
- Xu liu, y. W. (2018). Nano-sized fibrils dispersed from bacterial cellulose grafted with chitosan. Carbohydratepolymers, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.055>.
- Yamanaka, s. (2000). Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts. Springer, 261-270.
- Zara, j. (2017). Mpleo de la espectroscopia infrarroja (ft-ir-atr) como herramienta para la caracterización del bagazo de caña proveniente de la sierra falconiana . Química viva .
- Zhou, l. (2007). Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by acetobacter xylinum. Society for industrial microbiology, 484 - 487.

Anexos

Anexo 1: Evidencias del desarrollo de la tesis.

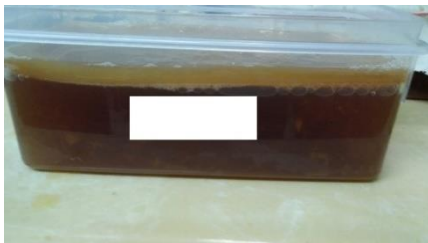
Obtención del cultivo iniciador a diferentes porcentajes de sustitución.



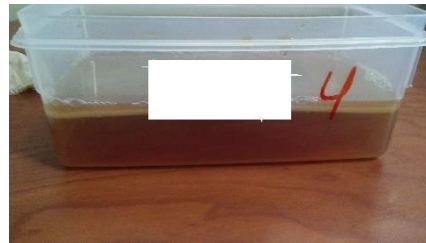
Infusión 1 100 % té negro



Infusión 2 ,75 % té negro-25 % té cásc. Café



Infusión 3, 50 % té negro-50 % té cásc. Café.



Infusión 4, 75 % té cásc. Café-25 % té negro



Infusión 5, 100 % té cásc.café

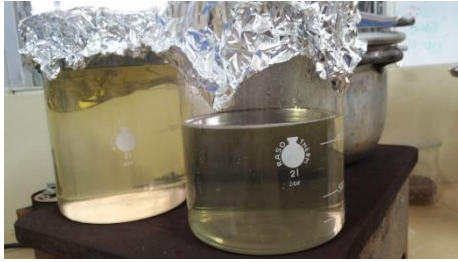
Estandarización del proceso de producción de celulosa



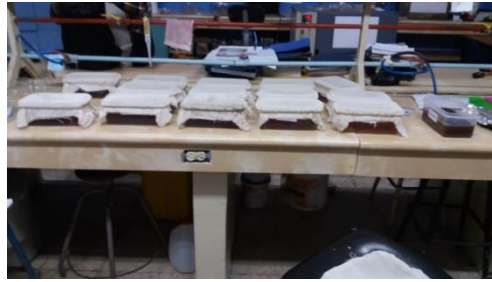
Pesaje de la materia prima.



Hervir el agua hasta que exista ebullición



Agregar el té negro, la cáscara de café y la sacarosa indicada.



Dejar enfriar y agregar en cada recipiente de 1 L según su porcentaje de sustitución



Cultivar a temperatura ambiente por 15 días.

Cosecha y procesamiento de la celulosa



Colocar los recipientes en una aérea despejada.



Retirar las membranas de celulosa formada en cada medio de cultivo.



Pesar y anotar cada peso de las membranas en base húmeda.



Colocar cuidadosamente las membranas en un lugar despejado.



Lavar las membranas de celulosa con hidroxido de soido al 1% N por 1 hora.



Realizar diferentes lavados con agua caliente y agua destilada.



Colocar cuidadosamente a secar cada membrana por 3 días.



Pesar después de 3 días para obtener los datos de las membranas en base seca.

Membranas de celulosa bacterianas retiradas después de 15 días de cultivo.



Obtención del cultivo de 200 gramos a diferentes porcentajes de sustitución



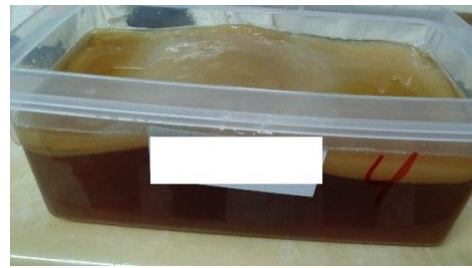
Infusión 1 100 % té negro



Infusión 2 ,75% té negro-25 % té
cásc. Café



Infusión 3, 50 % té negro-50 % té
cásc. Café.



Infusión 4, 75 % té cásc. Café-25 % té
negro



Infusión 5, 100 % té cásc.café.

Análisis físico-químicos del producto terminado



Determinación de humedad



Membranas de celulosas seca para medir el espesor



Montaje del equipo para determinar celulosa por el método kurschner y Hoffer.



Determinación de cenizas a 500° C.



Preparación de la muestra para analisis de FTIR.



Análisis en espectrofotómetro infrarrojo FTIR de la marca PerkinElmer Spectrum 100

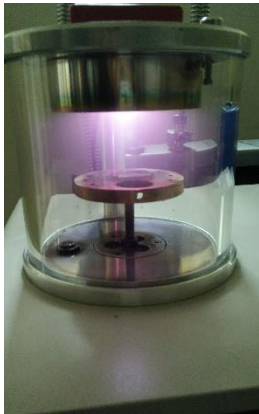
Análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB)



Preparación de la muestra



Acondicionamiento de la muestra

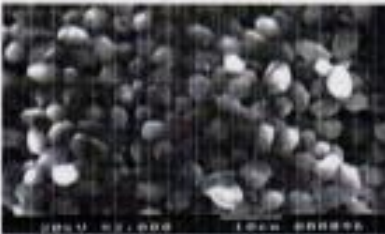


Recubrimiento con oro



Observación en el microscopio marca JEOL.

Anexo 2: Informe de resultados de MEB, realizados en el instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

INFORME DE RESULTADOS			
 Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI	Macro-Proceso: Plataformas Compartidas	Proceso Interno: Microscopia Electrónica y Confocal	Código: F-MEC-009
	Av. Julián Coronel 905 entre Esmeraldas y José Mascote Teléfono: 593-4 2288097 - 2287428 - 2280405 Ext: 237 Guayaquil - Ecuador		
Tipo de Muestra:	Celulosa bacteriana	Fecha y Hora Toma de Muestra:	No aplica
Código de Muestra:	3082 y 3085	Fecha y Hora Recepción de Muestra Primaria:	15/04/16
Solicitado Por:	Ing. Augusta Jimenez	Nombre Análisis Solicitado:	Análisis-Investigación en Microscopia Electrónica de Barrido
Identificador Unico del Solicitante:	C.I. 1102444484	Motivo de Análisis:	Observación del tamaño de las fibras de celulosa y la formación de las películas comestibles elaboradas.
Nombre de Paciente y/o Solicitante	Jonathan Merchán Jean Tigre	Método de Análisis Utilizado:	Microscopia Electrónica de Barrido
Contacto del Solicitante:		Fecha y Hora Informe:	25/04/19
Observaciones: Se evidencia en la muestra # 3082 con 32 microfotografías electrónicas y muestra # 3085 con 31 microfotografías. Total de microfotografías trabajadas y entregadas # 63.			
RESULTADOS DE INVESTIGACION: CARACTERIZACION ESTRUCTURAL MORFOLOGICA DE BACTERIAS Y FIBRAS DE CELULOSA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) JEOL-JSM 5310. Recubrimiento en Oro 20°. Microfotografías Electrónicas: De Izquierda a derecha: Fotos 1 y 2 BACTERIAS XIYLINUM. Morfología ovalada, cilíndrica, como granos de arroz. Tamaño variable de longitud 5um y diámetro 4um. Foto 3. FIBRAS DE CELULOSA. Morfología en barra alargada. Tamaño variable: encontrándose diámetro 20um y longitud 100um, 500um hasta 1.200um.			
 <i>Dr. Wellington Espinoza</i> Med. Wellington Espinoza Médico de Plataforma  <i>Dr. Yasuji Amano</i> Dr. Yasuji Amano, PhD. Asesor Científico  <i>Dra. Linda Díaz</i> Dra. LINDA DÍAZ CEVALLOS MSc Responsable de Plataforma de Microscopia Electrónica Analista 3 Aprobado			

Anexo 3 Resultados de tracción

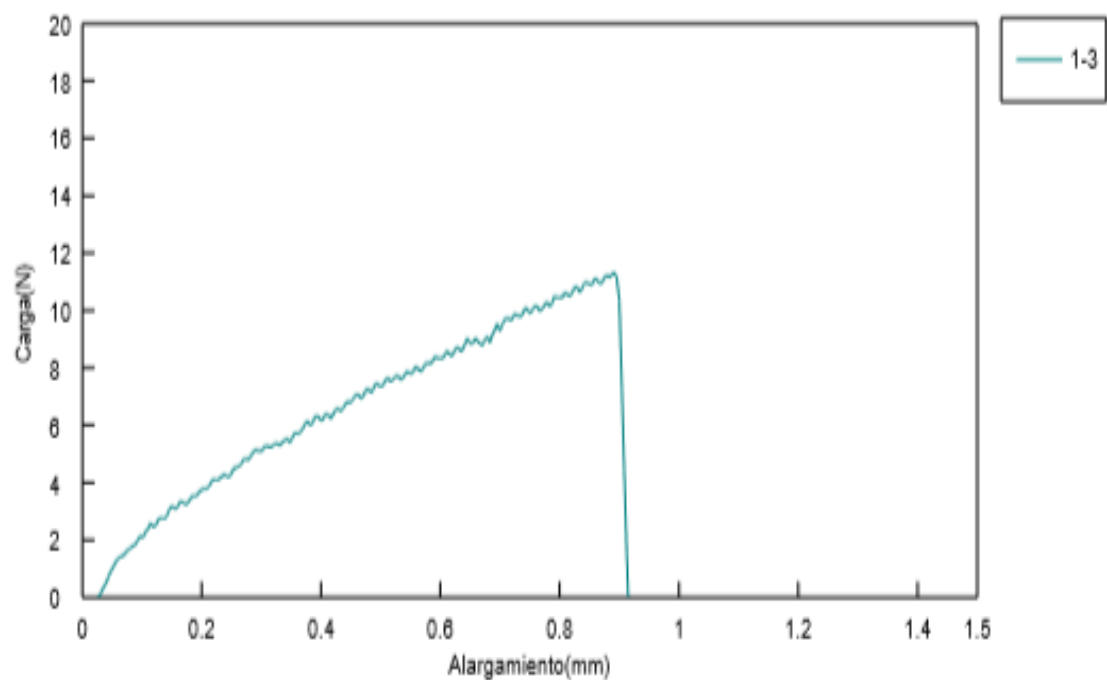
te negro

Forma: Plana

	Espesor	Anchura	Longitud calibrada
Unidades	mm	mm	mm
1-3	0.0010	0.2500	10.0000

Nombre	Break Force	Elastic	EACS1 Despl	PSF Carga	PSF Despl
Parametro		10000, 20000 N	1 N	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N	N/mm2	mm	N	mm
1-3	--	--	0.05011	--	--
Desviación Estandar	--	--	0.00000	--	--
Maximo	--	--	0.05011	--	--
Mínimo	--	--	0.05011	--	--
Mediana	--	--	0.05011	--	--

Nombre	PSF Esfuerzo	PSF Deformacion
Parametro	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N/mm2	%
1-3	--	--
Desviación Estandar	--	--
Maximo	--	--
Mínimo	--	--
Mediana	--	--



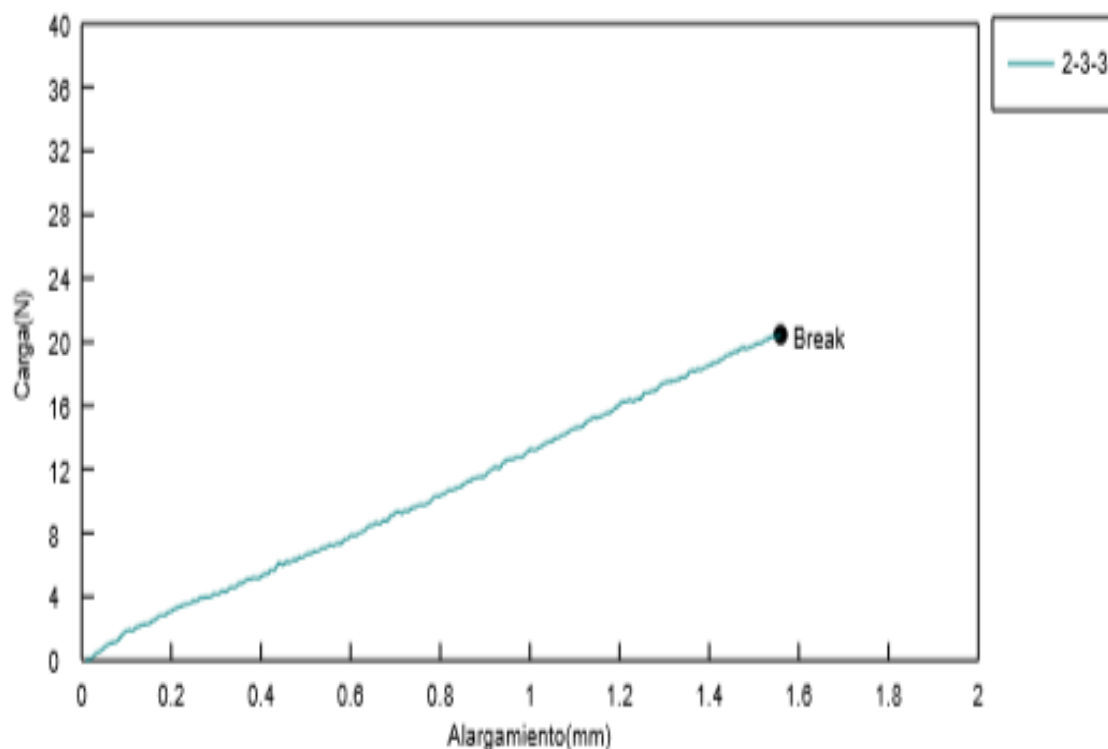
75% té negro 25% té cas. café

Forma: Plana

	Espesor	Anchura	Longitud calibrada
Unidades	mm	mm	mm
2-3-3	0.4400	5.0000	10.0000

Nombre	Break Force	Elastic	EACS1 Despl	PSF Carga	PSF Despl
Parametro		10000, 20000 N	1 N	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N	N/mm2	mm	N	mm
2-3-3	20.4500	-.-	0.05800	-.-	-.-
Desviación Estandar	0.00000	-.-	0.00000	-.-	-.-
Maximo	20.4500	-.-	0.05800	-.-	-.-
Mínimo	20.4500	-.-	0.05800	-.-	-.-
Mediana	20.4500	-.-	0.05800	-.-	-.-

Nombre	PSF Esfuerzo	PSF Deformacion
Parametro	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N/mm2	%
2-3-3	-.-	-.-
Desviación Estandar	-.-	-.-
Maximo	-.-	-.-
Mínimo	-.-	-.-
Mediana	-.-	-.-



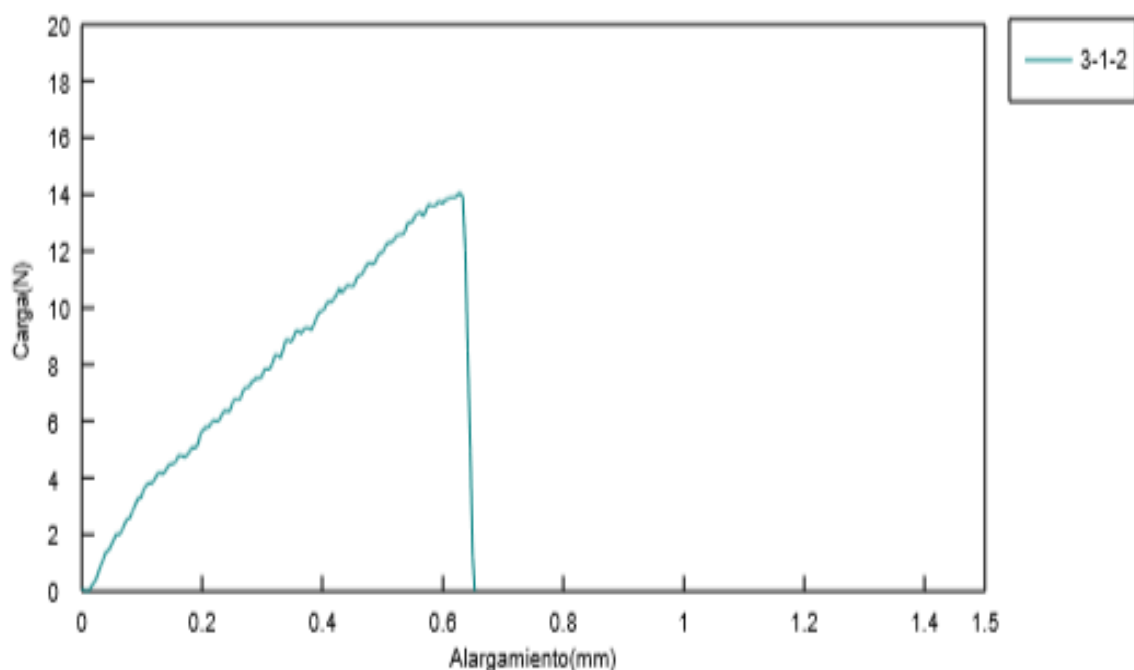
50% té negro 50% té casc. café

Forma: Plana

	Espesor	Anchura	Longitud calibrada
Unidades	mm	mm	mm
3-1-2	0.3200	5.0000	10.0000

Nombre	Break Force	Elastic	EACS1 Despl	PSF Carga	PSF Despl
Parametro		10000, 20000 N	1 N	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N	N/mm2	mm	N	mm
3-1-2	--	--	0.03350	--	--
Desviación Estandar	--	--	0.00000	--	--
Maximo	--	--	0.03350	--	--
Minimo	--	--	0.03350	--	--
Mediana	--	--	0.03350	--	--

Nombre	PSF Esfuerzo	PSF Deformacion
Parametro	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N/mm2	%
3-1-2	--	--
Desviación Estandar	--	--
Maximo	--	--
Minimo	--	--
Mediana	--	--



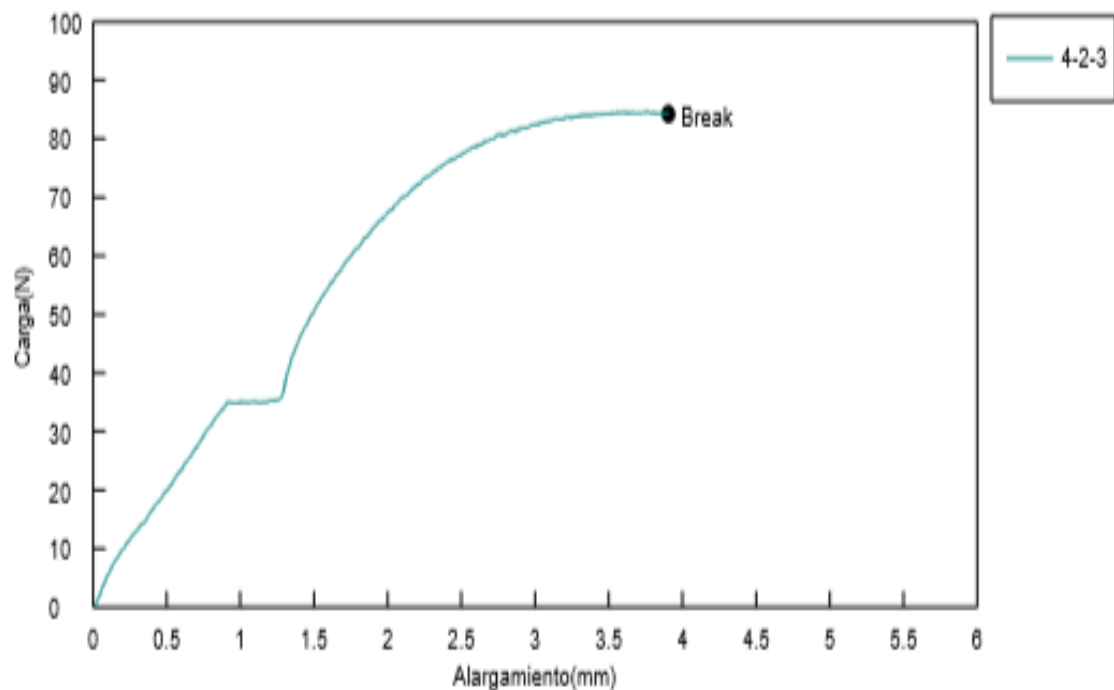
75% té casc. café 25% té negro

Forma: Plana

	Espesor	Anchura	Longitud calibrada
Unidades	mm	mm	mm
4-2-3	0.5990	5.0000	10.0000

Nombre	Break Force	Elastic	EACS1 Despl	PSF Carga	PSF Despl
Parametro		10000, 20000 N	1 N	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N	N/mm2	mm	N	mm
4-2-3	84.2000	--	0.02594	--	--
Desviación Estandar	0.00000	--	0.00000	--	--
Maximo	84.2000	--	0.02594	--	--
Mínimo	84.2000	--	0.02594	--	--
Mediana	84.2000	--	0.02594	--	--

Nombre	PSF Esfuerzo	PSF Deformacion
Parametro	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N/mm2	%
4-2-3	--	--
Desviación Estandar	--	--
Maximo	--	--
Mínimo	--	--
Mediana	--	--



100% té casc. café 5-1-2

Forma: Plana

	Espesor	Anchura	Longitud calibrada
Unidades	mm	mm	mm
5-1-2	0.4670	5.0000	10.0000

Nombre	Break Force	Elastic	EACS1 Despl	PSF Carga	PSF Despl
Parametro		10000, 20000 N	1 N	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N	N/mm2	mm	N	mm
5-1-2	49.8000	--	0.02153	--	--
Desviación Estandar	0.00000	--	0.00000	--	--
Maximo	49.8000	--	0.02153	--	--
Minimo	49.8000	--	0.02153	--	--
Mediana	49.8000	--	0.02153	--	--

Nombre	PSF Esfuerzo	PSF Deformacion
Parametro	0.1 %/FS	0.1 %/FS
Unidades	N/mm2	%
5-1-2	--	--
Desviación Estandar	--	--
Maximo	--	--
Minimo	--	--
Mediana	--	--

