



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE PETROQUÍMICA

Obtención de celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas.

Autora:

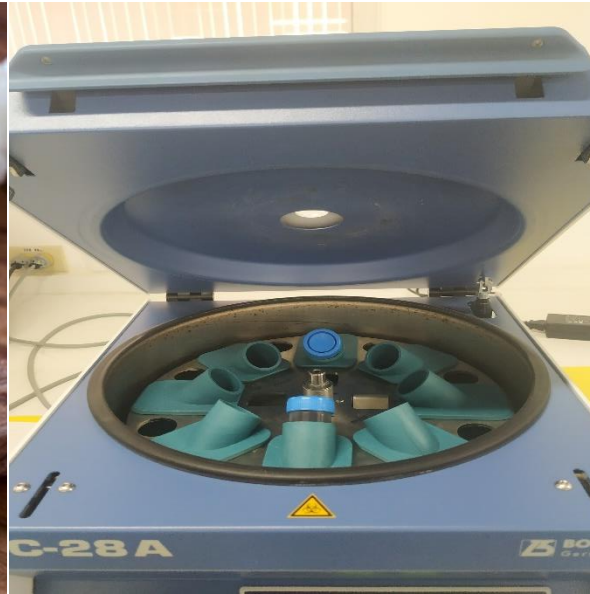
García Caicedo, Katherine Nicole

Director:

Msc . Sayavedra Delgado, Jonathan Javier

Latacunga





01 INTRODUCCIÓN

02 OBJETIVOS

03 METODOLOGÍA

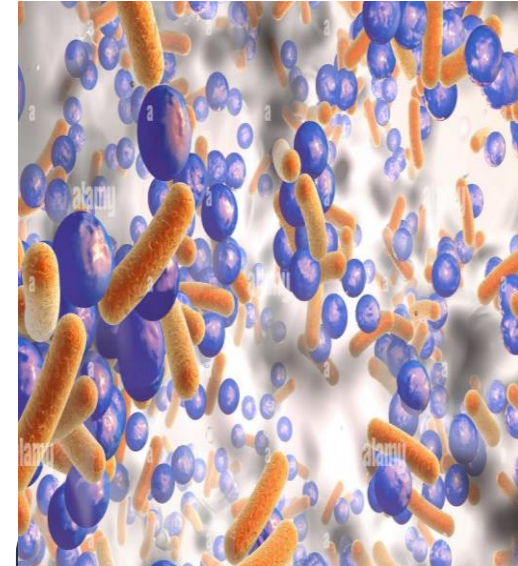
04 RESULTADOS

05 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES





Típicos de Hongo kéfir



Microorganismos en cultivo.

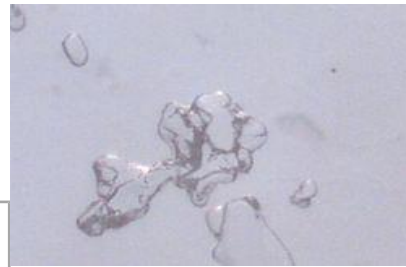
Fuente renovable

Kéfir considerado como biomasa.

Celulosa Microbiana

Es un polímero presenta cristalinidad e hidrofilia.

Típicos de Kéfir



Fermentación

Proceso donde se formará la matriz polimérica.

Fuente para obtener celulosa microbiana.

Desarrollo de Biomateriales

Aplicación nanotecnología, biomedicina e industria alimentaria.



Figura 1
Estructura química de la celulosa .

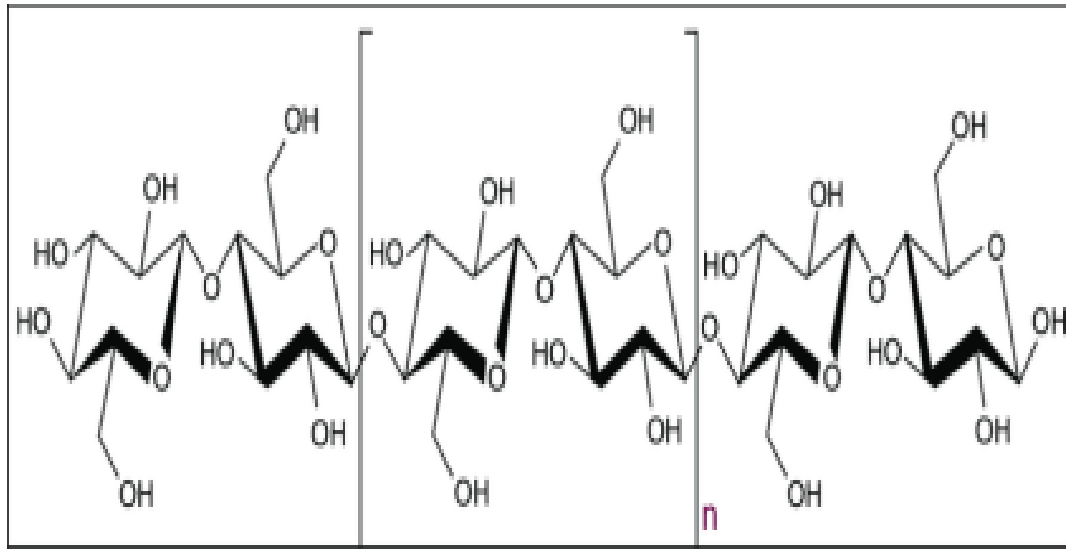
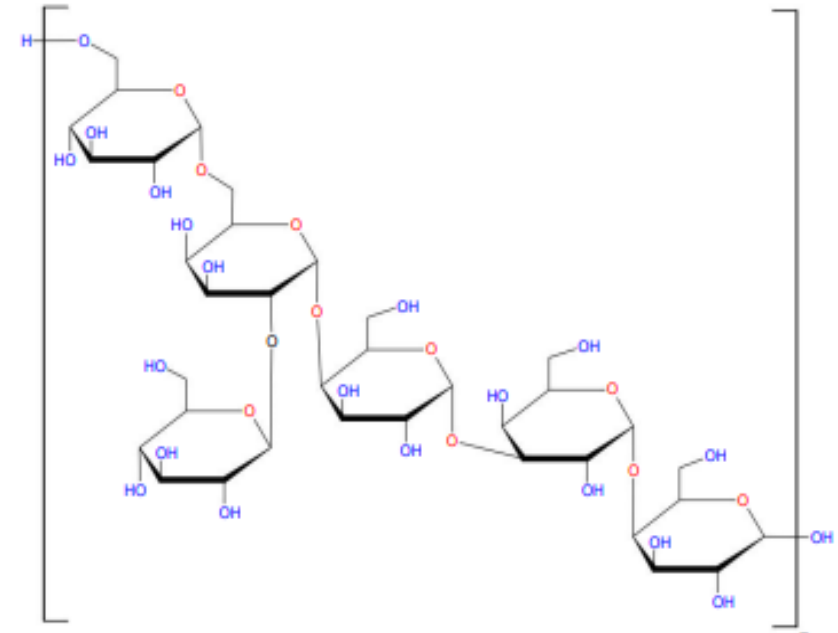
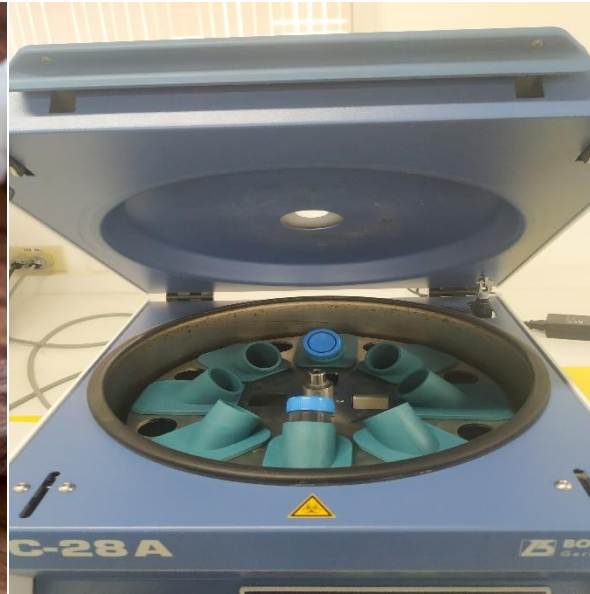


Figura 2
Estructura química del kéfir .



Nota. La gráfica muestra representa la estructura de la celulosa obtenida de forma natural. Tomado de *Producción de celulosa por Komagataeibacter sp. SU12 usando extracto de Mangifera indica (mango) para su potencial aplicación biotecnológica* (p.18), por Calderón, V.,2022, <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17780>





01 INTRODUCCIÓN

02 OBJETIVOS

03 METODOLOGÍA

04 RESULTADOS

05 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



**Objetivo
General**

Obtener celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas.

**Objetivo
Específicos**

1.

Optimizar el proceso para obtener celulosa microbiana, mediante revisión bibliográfica y experimentación; para obtener la mayor cantidad en peso de celulosa.

2.

Analizar las biopelículas, mediante pruebas estructurales y mecánicas.

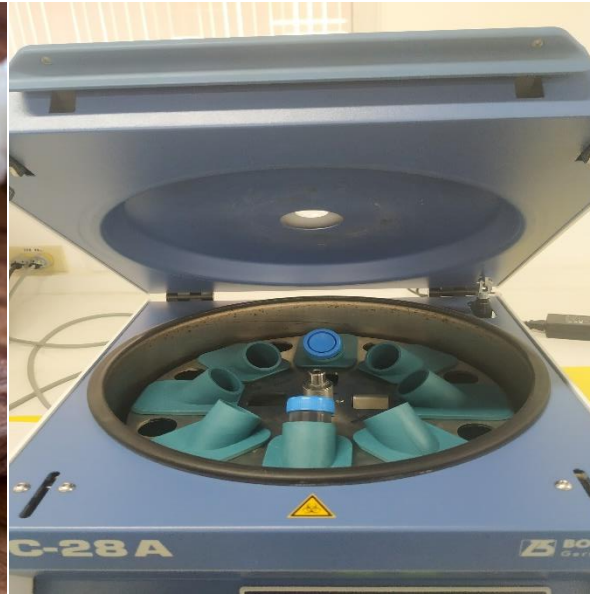
3.

Evaluar los efectos de la proporción de celulosa microbiana, estabilizante, y plastificante en propiedades fisicoquímicas de la biopelícula formada.

4.

Determinar una aplicación innovadora y potencial a partir del biomaterial obtenido para la evaluación potencial en el ámbito comercial.





01 INTRODUCCIÓN

02 OBJETIVOS

03 METODOLOGÍA

04 RESULTADOS

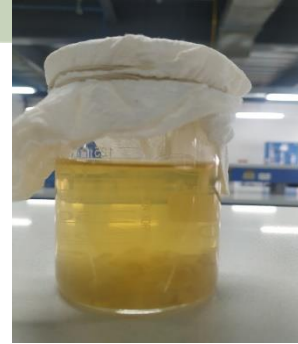
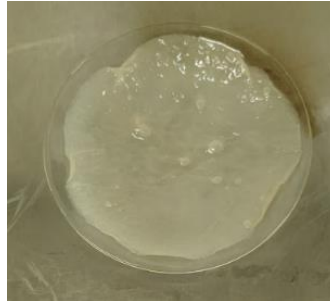
05 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



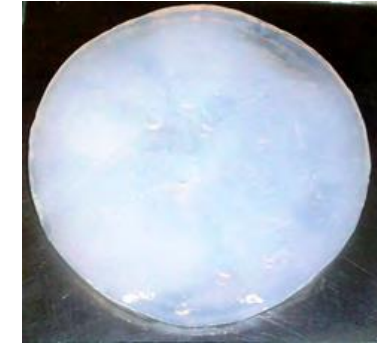
METODOLOGÍA

NaOH a 0.5M

Proceso obtención de celulosa.



Empleo de Cl al 5%



Secado a 45°C por 24h .

01

- Tíbcos de kéfir.
- Medio (agua)
- Fuente de C.
- Fuente de N.

02

- Activar tíbcos.
- Agregar medio
- Agregar fuentes.
- Cubrir cultivo.
- Etapa de fermentación

03

- Luego de fermentación de 7 a 15 días .
- Extraer de cultivo CM.

04

Obtención de Celulosa

Materia prima.

Preparación de cultivo.

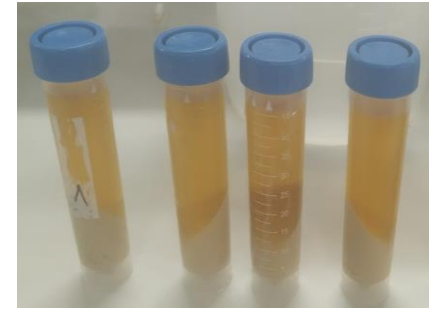
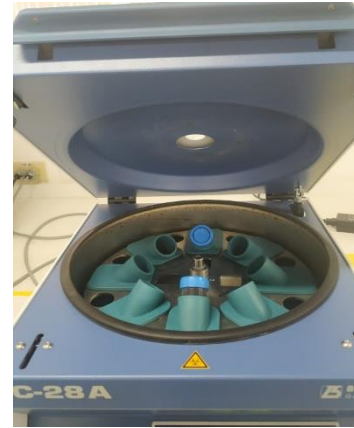
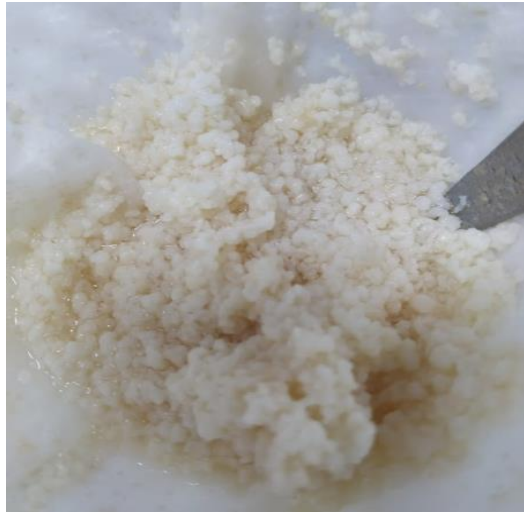
Extracción de celulosa.

Purificación, blanqueamiento y secado.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Proceso obtención kefirán.



01

- Tíbcos de kéfir
- Medio (leche)
- Fuente de C
- Fuente de N

02

- Activar tíbcos.
- Agregar medio
- Agregar fuentes.
- Cubrir cultivo.
- Etapa de fermentación.

03

- Centrifugar el caldo a 4000 rpm por 40 min.
- Recoger sobrenadante.

04

Obtención de kefirán.

Materia prima.

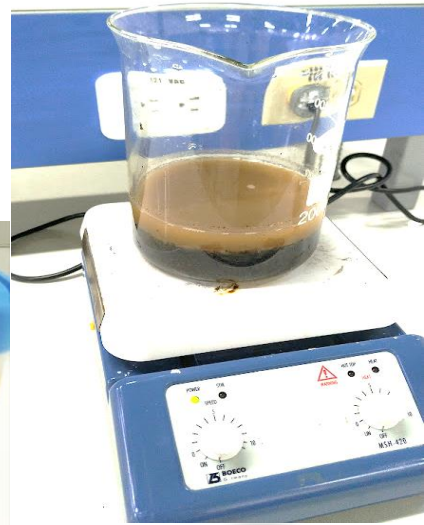
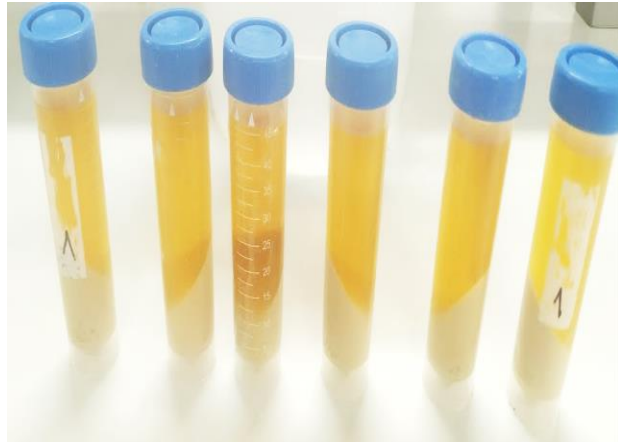
Preparación de cultivo.

Centrifugación.

Precipitación.



Proceso obtención kefirán.



Polisacárido en polvo.

- Centrifugar el refrigerado.
- Recoger el precipitado.

05

- Disolver precipitado con agua a 80°C .
- Precipitar con etanol
- Realizar nuevamente
- Paso 4 y 3 .

06

07

- Secado a 45°C por 48 h.

Obtención de kefirán.

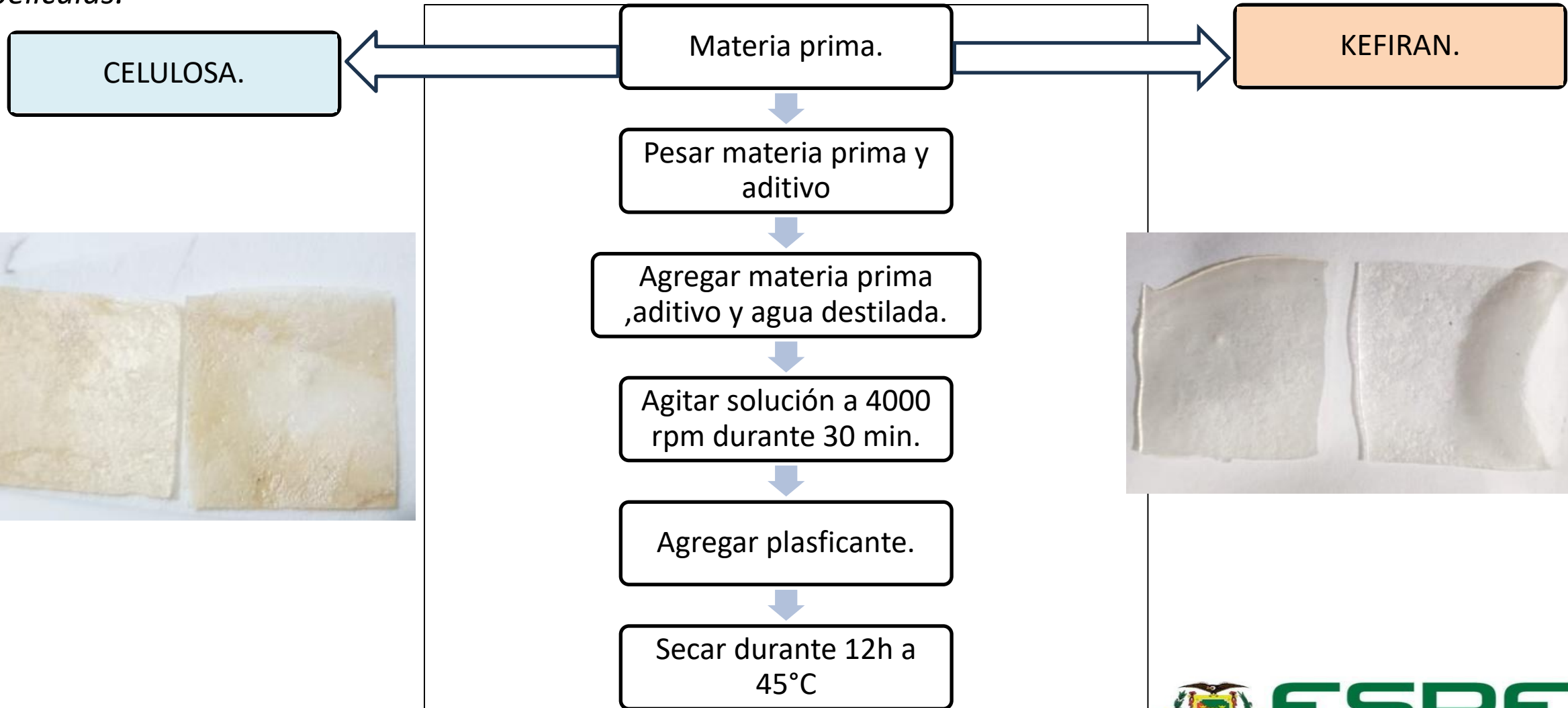
Centrifugación.

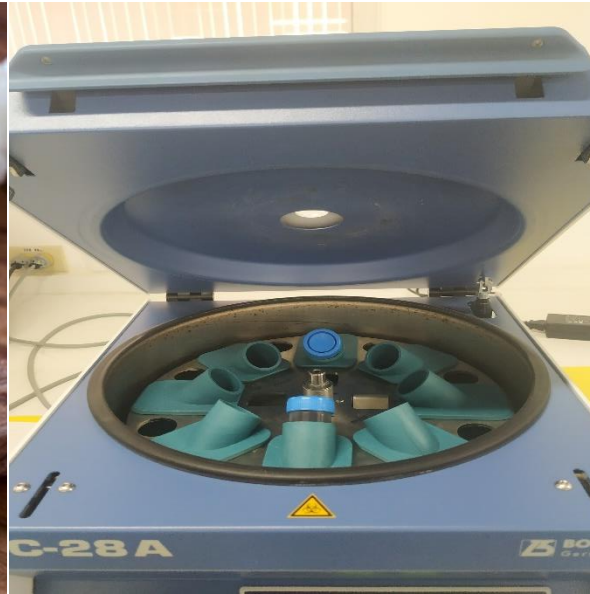
Disolución.

Secado.



Proceso formación de Biopelículas.





01 INTRODUCCIÓN

02 OBJETIVOS

03 METODOLOGÍA

04 RESULTADOS

05 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



Diseño experimental- Cultivo de celulosa.

Tabla 1
Diseño de factores y niveles de estudio utilizados.

Factores	Niveles de estudio		
	-1	0	+1
Cantidad de Endulzante (gr).	40	60	80
Cantidad de fuente de N (gr).	5	15	25

Figura 3
Cultivo de hongo kéfir



Tabla 2
Rendimiento de celulosa y polisacárido kefiran.

Rendimiento	Porcentaje
Celulosa microbiana	2,31%
Kefiran	90%

Nota. Se realizó varios cultivos para obtener mayor cantidad de celulosa

Gráfica de Contorno

Figura 4

Diagrama de Pareto sobre las variables de cultivo.

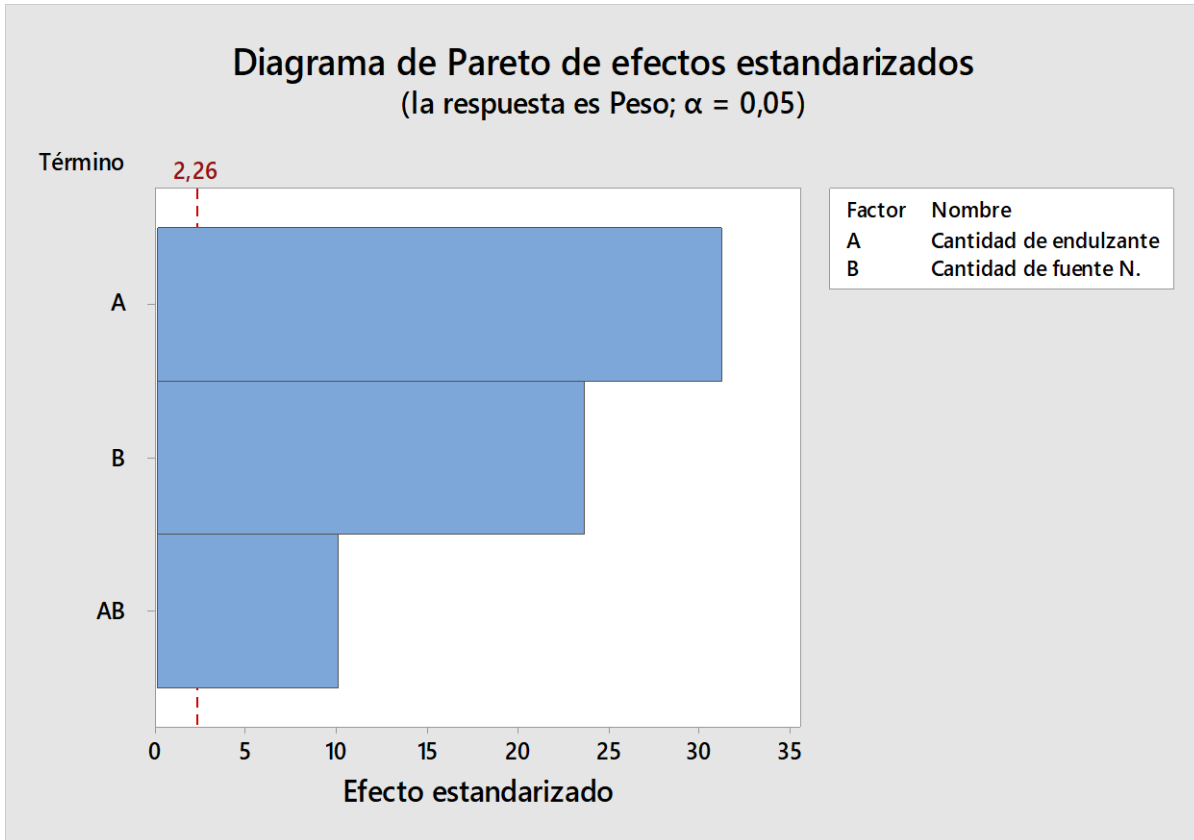
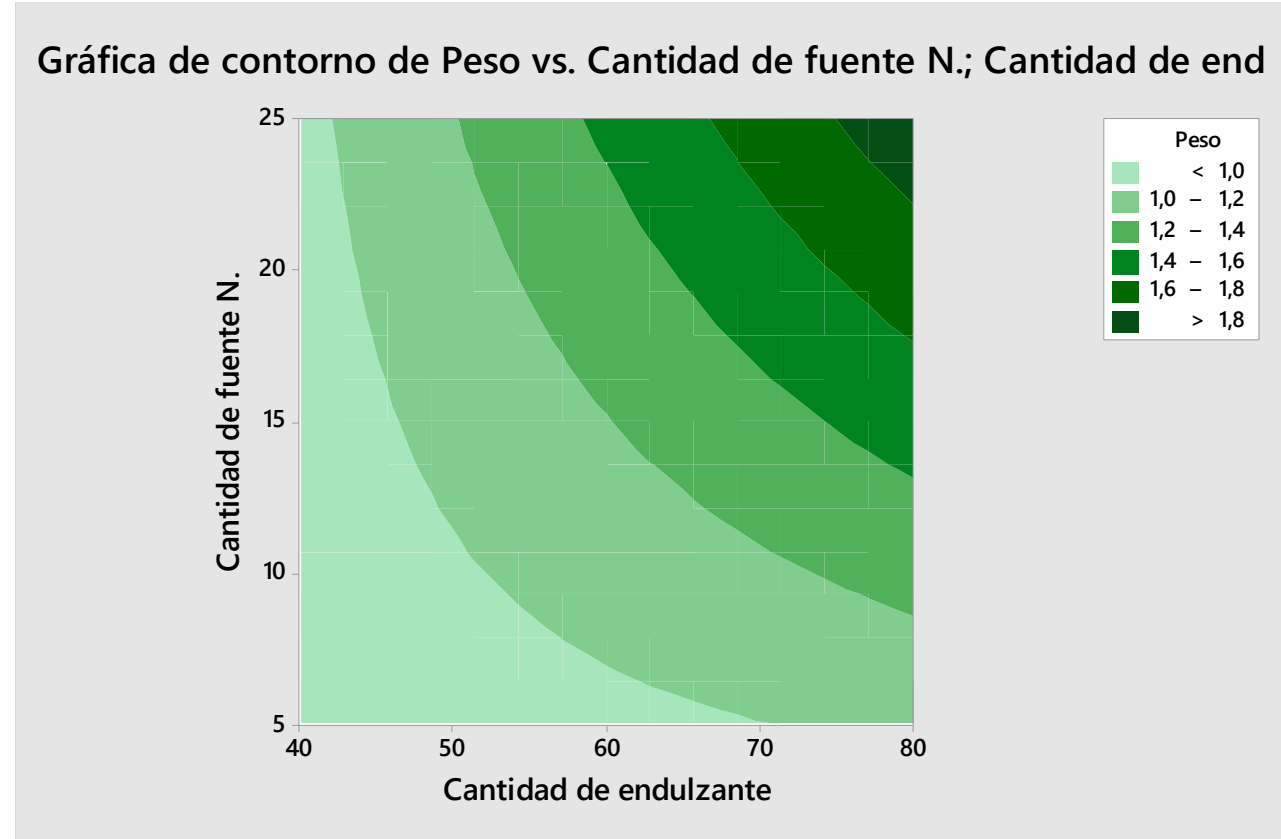


Figura 5

Gráfica de contorno peso en seco de celulosa en relación a los factores de cultivo.



Nota. El gráfico de Pareto las variables significativas y su interacción en el estudio.

Nota. El gráfico de contorno muestra la relación de factores con la variable de respuesta

Figura 6

Diagrama de barras del contenido de humedad en la película de celulosa microbiana.

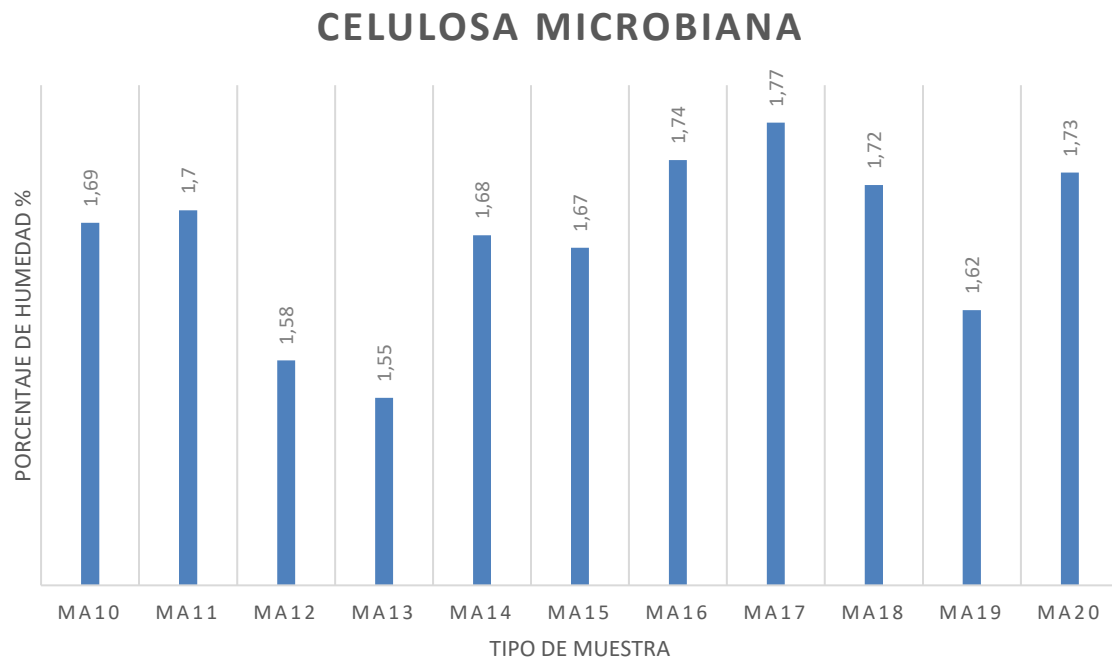
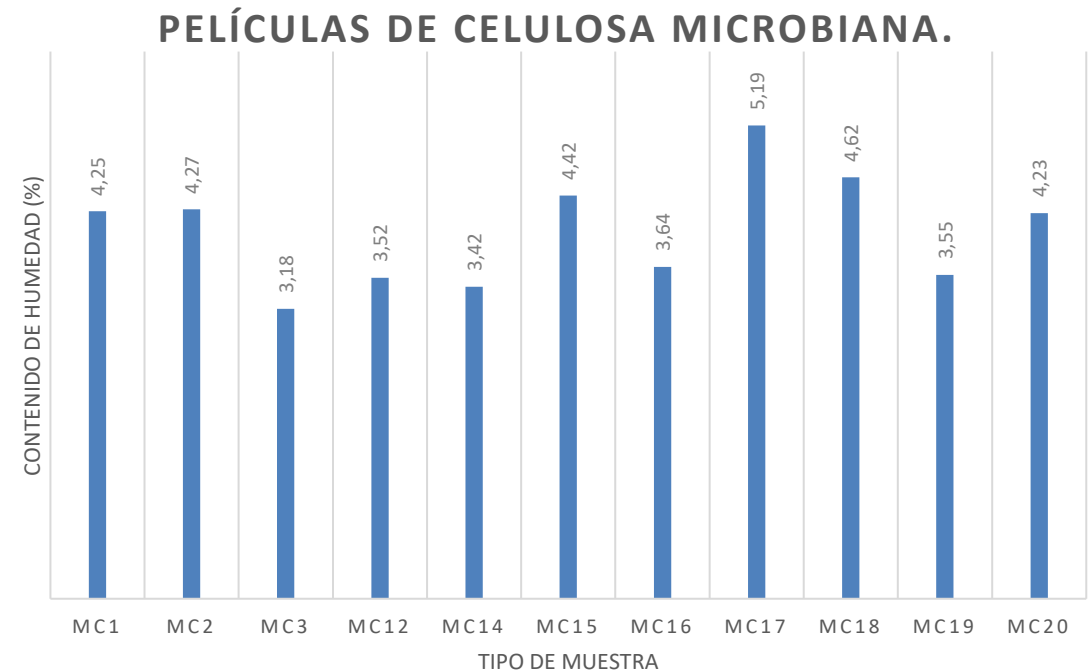


Figura 7

Diagrama de barras del contenido de humedad en la película de celulosa microbiana.



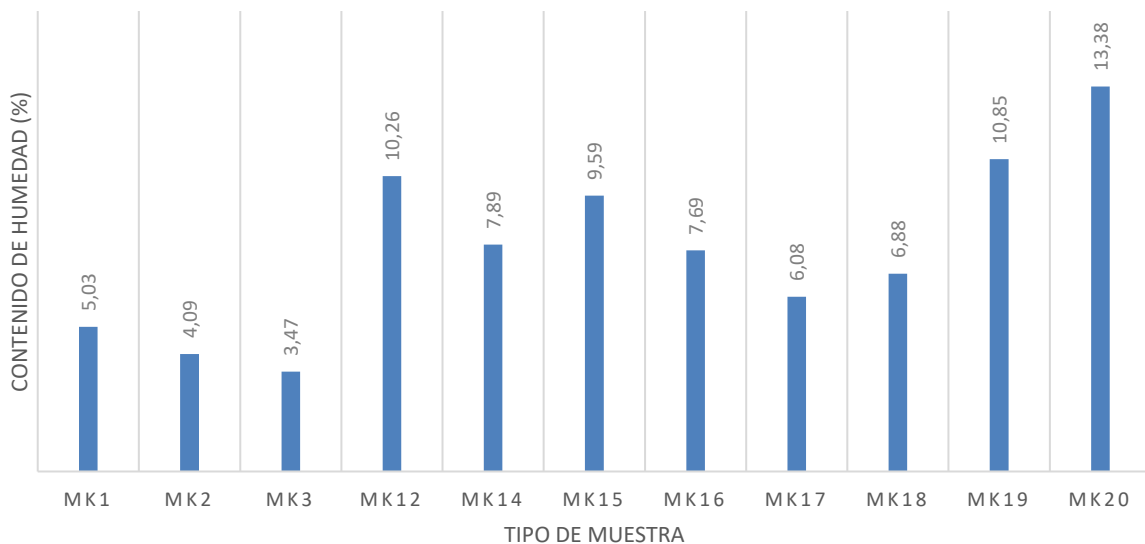
Nota. El gráfico respecto al contenido de humedad de películas de celulosa microbiana.

Nota. El gráfico respecto al contenido de humedad de biopelículas de celulosa microbiana.

Figura 8

Diagrama de barras del contenido de humedad en la película kefiran.

PELÍCULAS DE POLISACÁRIDO KEFIRAN.



Nota. El gráfico respecto al contenido de humedad de película kefiran.

Tabla 3

Análisis de humedad de muestras de celulosa, película de celulosa y kefiran.

Muestra	Contenido %
MA1_0	1,69
MA1_2	1,58
MA1_3	1,55
MC14	5,689540E-09
MC15	5,74895E-09
MC19	6,739540E-09
MK14	6,891120E-09
MK15	7,289420E-09
MK19	7,995120E-09

Análisis de permeabilidad al vapor de agua.

Figura 9

Diagrama de barras del análisis de permeabilidad al vapor de agua

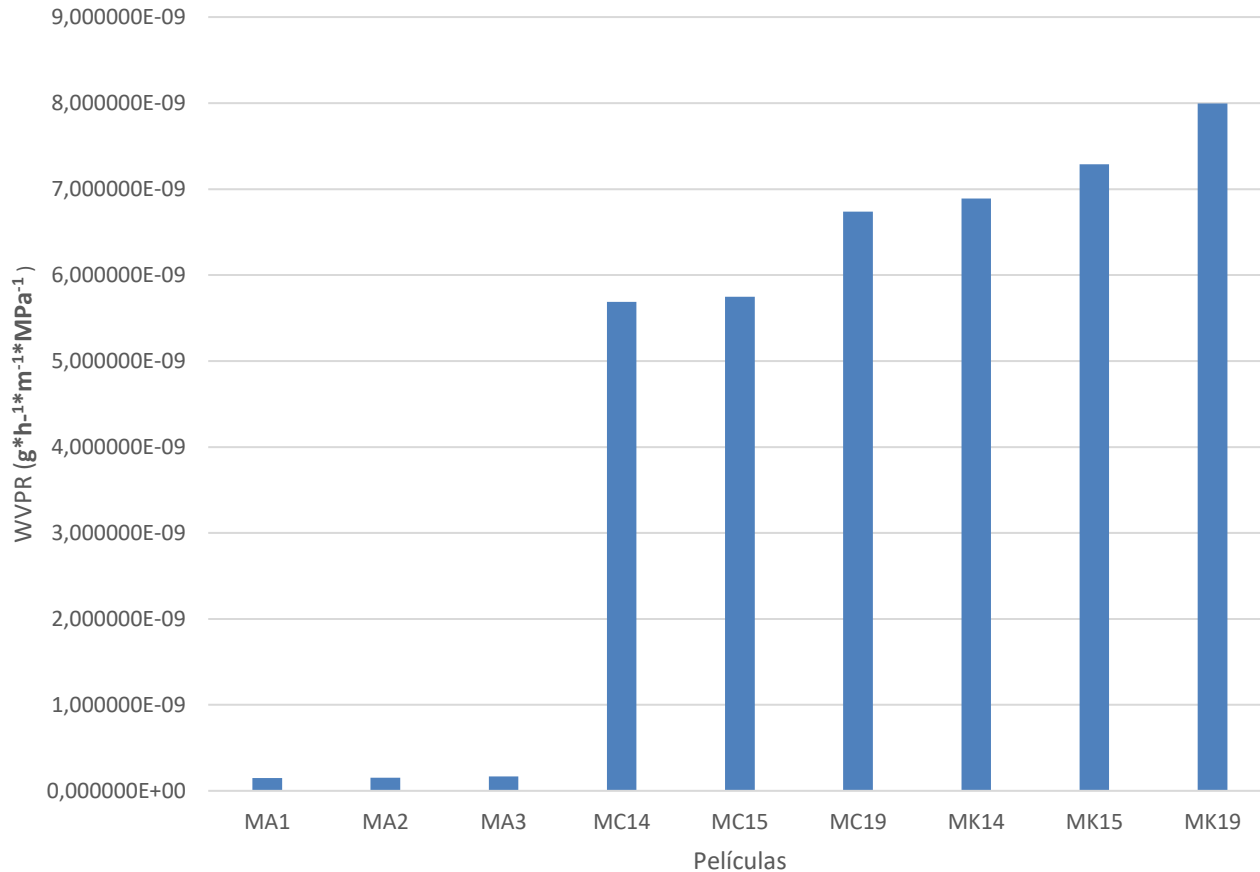


Tabla 4

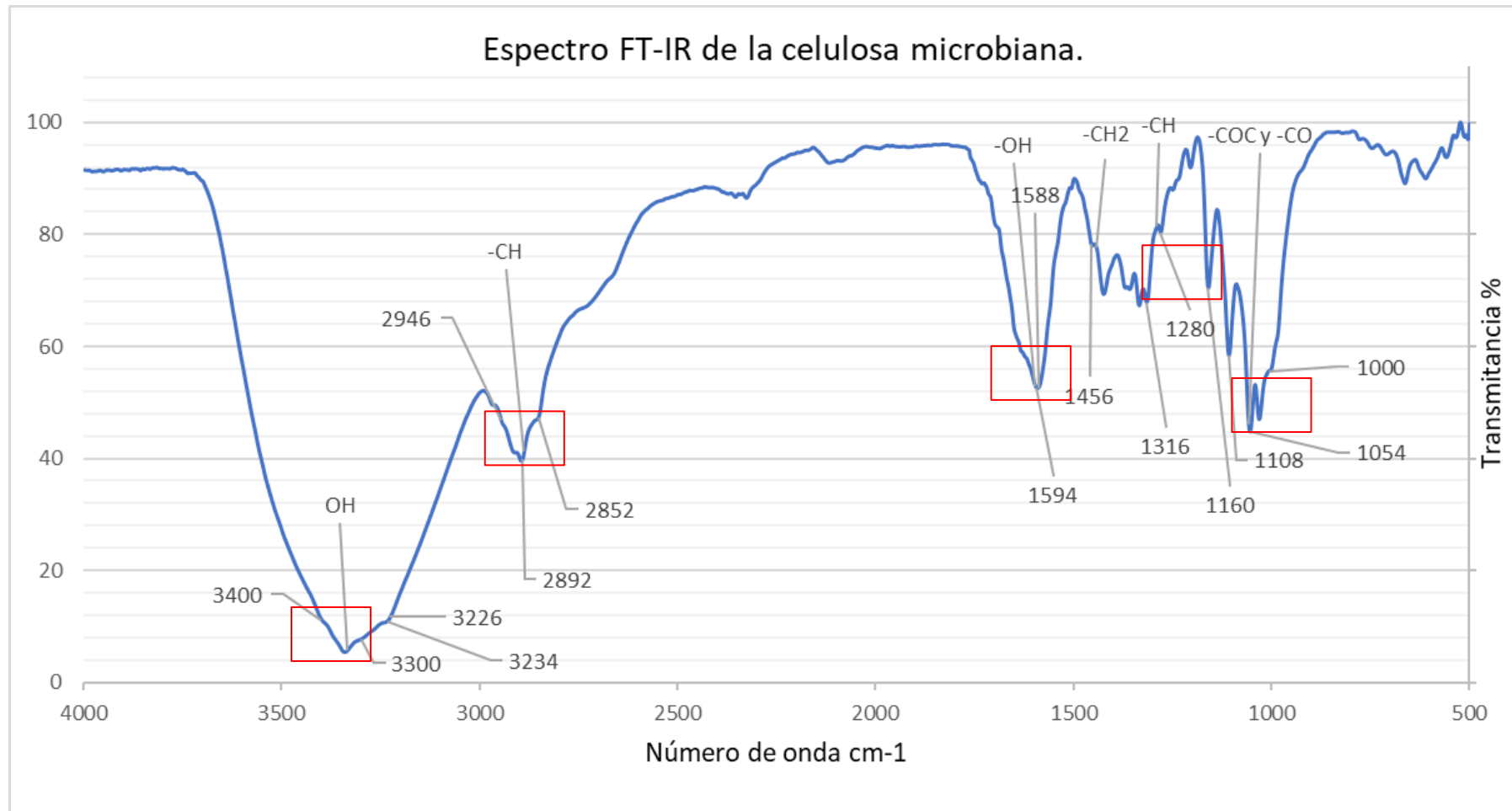
Datos de las diferentes películas , con su valor de permeabilidad.

Muestra	WVPR (g*h ⁻¹ *m ⁻¹ *MPa ⁻¹)
MA1	1,506780E-10
MA2	1,53680E-10
MA3	1,663685E-10
MC14	5,689540E-09
MC15	5,74895E-09
MC19	6,739540E-09
MK14	6,891120E-09
MK15	7,289420E-09
MK19	7,995120E-09

Nota. El gráfico respecto a la cantidad de absorción de agua de las películas

FTIR – Película de celulosa MA

Figura 12
FTIR de celulosa microbiana.



Nota. Resultado del análisis por espectroscopía FT-IR de película de celulosa CMA.



FTIR – Celulosa microbiana

Tabla 6

Números de onda obtenidos en el espectro FT-IR de la celulosa microbiana MA

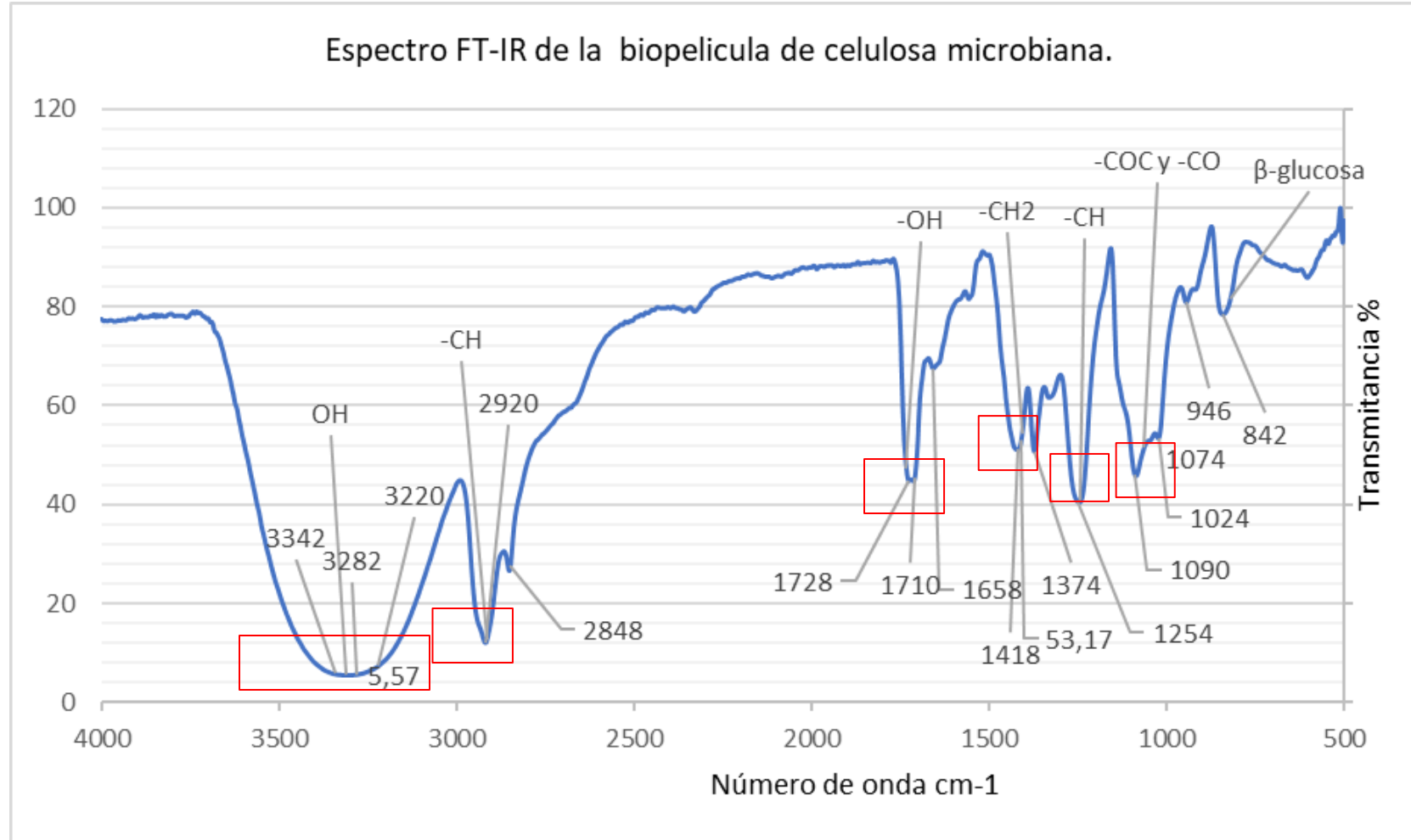
Apariencia	Referencia (cm-1)	Experimental (cm-1)	Grupos principales celulosa
Fuerte, amplia	3400 – 3200	3400	Identifica vibraciones de tensión de grupos O – H
Fuerte	2950–2850	2892	Identifica vibraciones de tensión asimétrica . C –H
Media y alta	1750–1650	1594	Identifica vibraciones de flexión O – H y agua.
Débil y alta	1456 – 1300	1456	Identifica la flexión –CH ₂
Débil y media	1300 – 1280	1280	Identifica la flexión –CH
Débil y media	1160 – 980	1054	Bandas de estiramiento C-O-C y CO

Nota. Bandas características para los principales grupos funcionales de la celulosa obtenidos de (Avcioglu et al., 2021)

FTIR – Película de biopelícula de celulosa

Figura 13

FTIR de biopelícula celulosa microbiana MC15



Nota. Resultado del análisis por espectroscopía FT-IR de biopelícula de celulosa.



Tabla 7
Números de onda obtenidos en el espectro FT-IR de la biopelícula de celulosa MC15

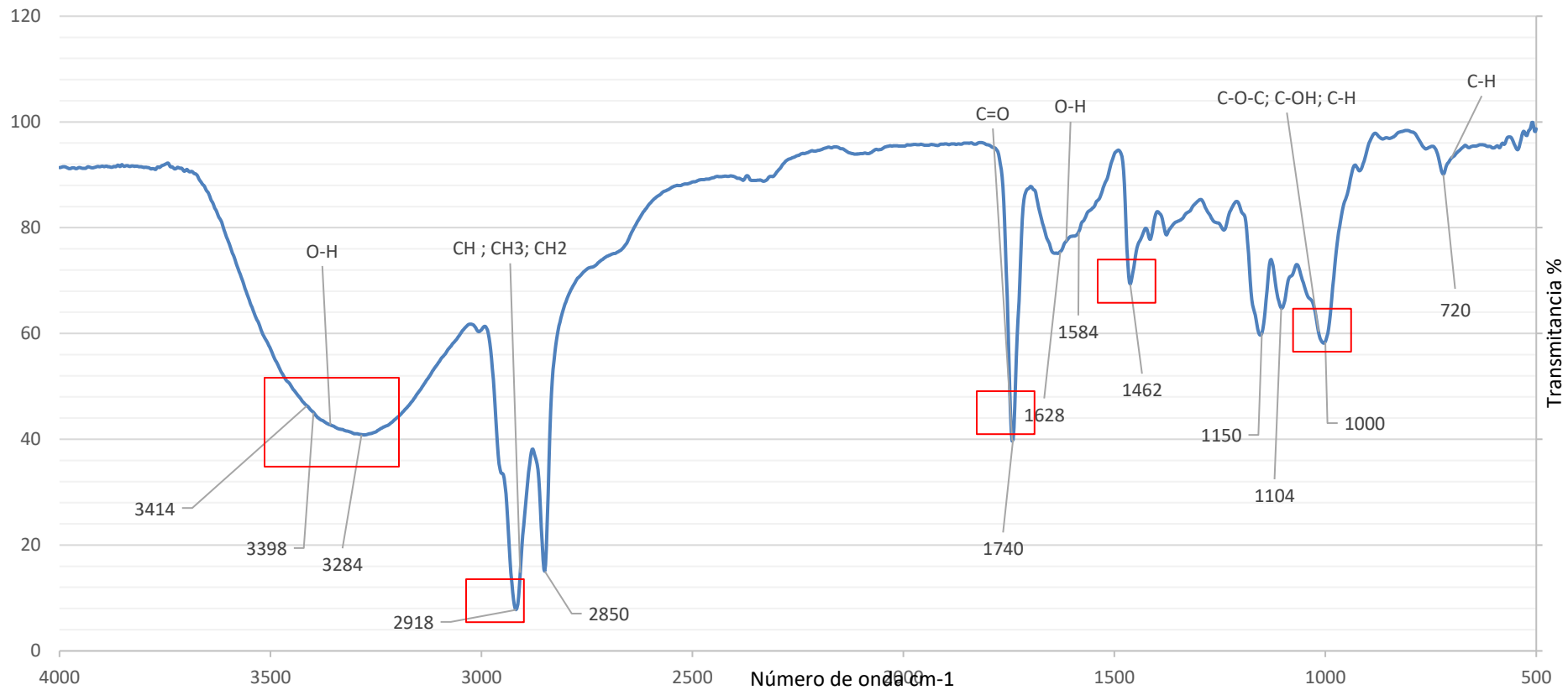
Apariencia	Referencia (cm-1)	Experimental (cm-1)	Grupos principales celulosa
Fuerte, amplia	3400 – 3200	3342	Identifica vibraciones de tensión de grupos O – H
Media, débil	2950–2850	2920	Identifica vibraciones de tensión asimétrica . C –H
Alta y media	1645–1450	1728	Identifica vibraciones de flexión O – H y agua.
Débil y alta	1456 – 1300	1418	Identifica la flexión –CH ₂
Débil y alta	1300 – 1280	1254	Identifica la flexión –CH
Media	1160 – 980	1090	Bandas de estiramiento C-O-C y CO

Nota. Bandas características para los principales grupos funcionales de biopelícula de celulosa obtenidos de (Avcioglu et al., 2021)

FTIR – de polisacárido Kefiran

Figura 14
FTIR de kefiran

Espectro FT-IR del polisacárido kefiran.



Nota. Resultado del análisis por espectroscopía FT-IR de polisacárido de kefiran



FTIR –Biopelícula de kefiran

Tabla 15

Números de onda obtenidos en el espectro FT-IR de polisacárido de kefiran MK15.

Apariencia	Referencia (cm-1)	Experimental (cm-1)	Grupos principales celulosa
Media, amplia	3000 – 3600	3398	Identifica vibraciones intramolecular de modos de estiramiento. O – H
Fuerte	3000–2800	2918	Identifica modos de estiramiento simétrico y antisimétrico. C –H
Fuerte, alta	1750–1580	1740	Identifica modo de flexión (agua). O–H
Débil y alta	1500 – 1300	1462	Identifica la flexión –CH
Débil y alta	1200 – 900	1000	Bandas de estiramiento C-O-C , CO y CH

Nota. Bandas características para los principales grupos funcionales kefiran obtenidos de (Marangoni Júnior et al., 2020)

Figura 12

Análisis termogravimétrico TGA de la muestra MCA1

TGA – Pelicula Celulosa (CMA1)

TGA Celulosa Microbiana A

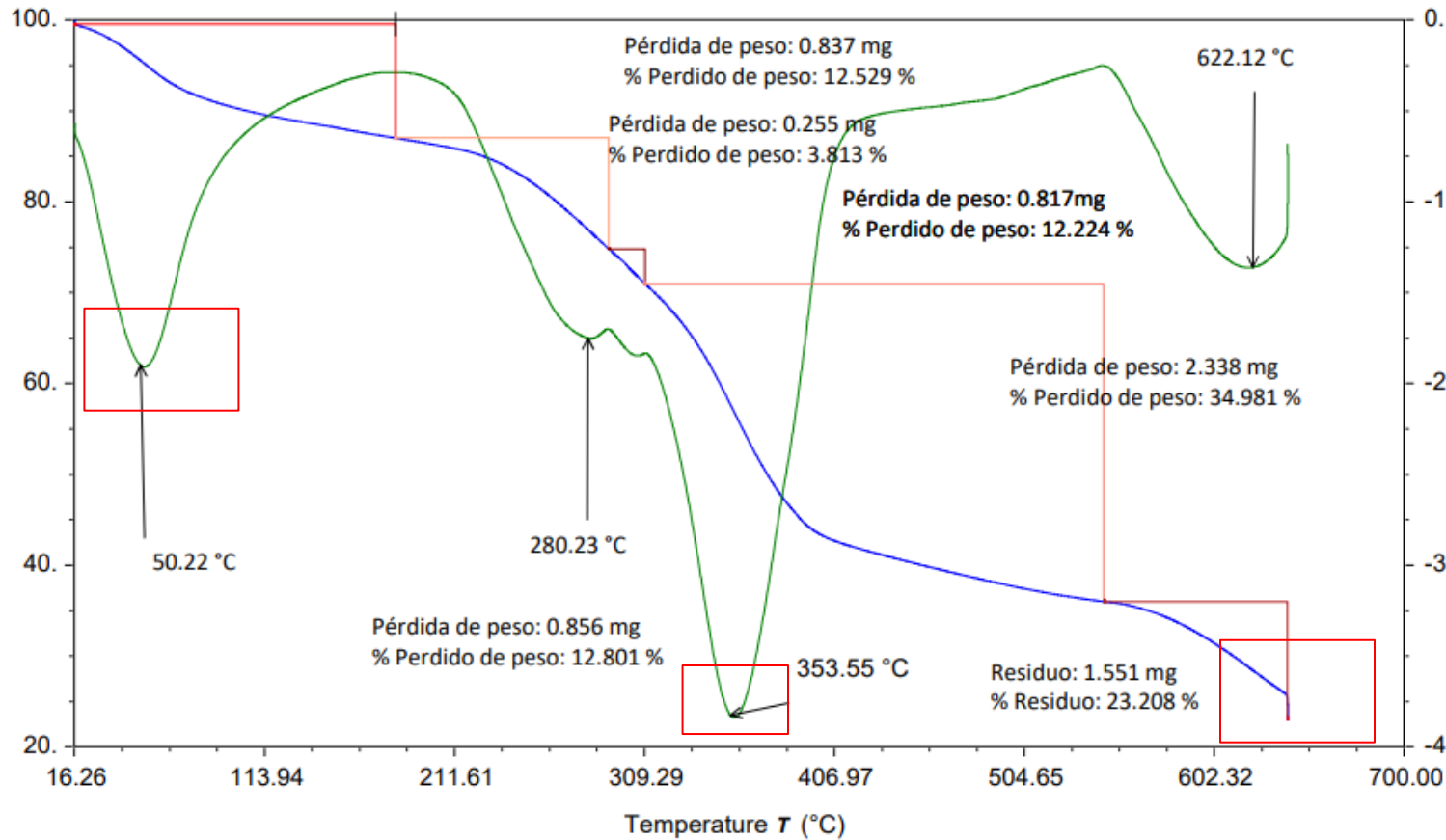
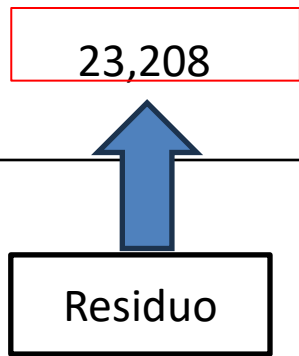


Tabla 9

Resumen de IR-celulosa microbiana.

Etapa	Rango (°C)	Pérdida %w
1,2 y 3	16.26 – 309.29	12,529%, 3,813% 12,224%
4	309.29 – 553.49	34,981%
5	553.49 – 650	23,208



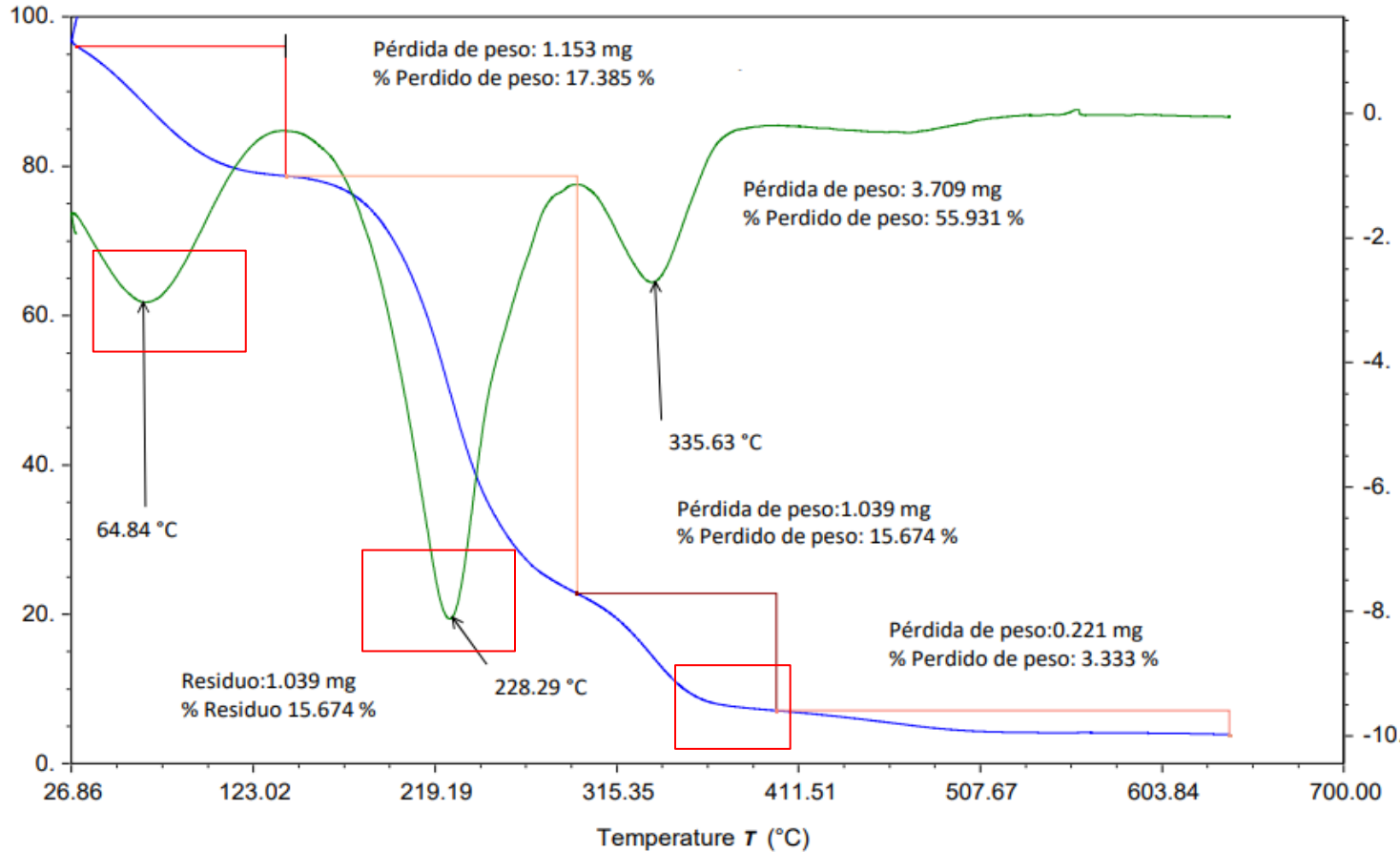
Nota. La imagen presenta los resultados obtenidos para los puntos de degradación la película de celulosa.



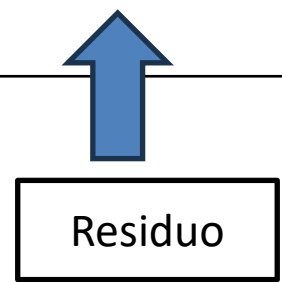
Figura 16
Análisis termogravimétrico TGA de la muestra MC15

TGA de Biopelícula (MC15)

Tabla 10
Resumen de análisis IR-MC15



Etapa	Rango (°C)	Pérdida %w
1 y 2	16,26 – 309,29	17,385% y 15,674 %
3	309.29 – 400	55,931%
4	400 a 650	3,333



Nota. La imagen presenta los resultados obtenidos para los puntos de degradación de la película de celulosa.

Figura 17

Análisis termogravimétrico TGA de la muestra

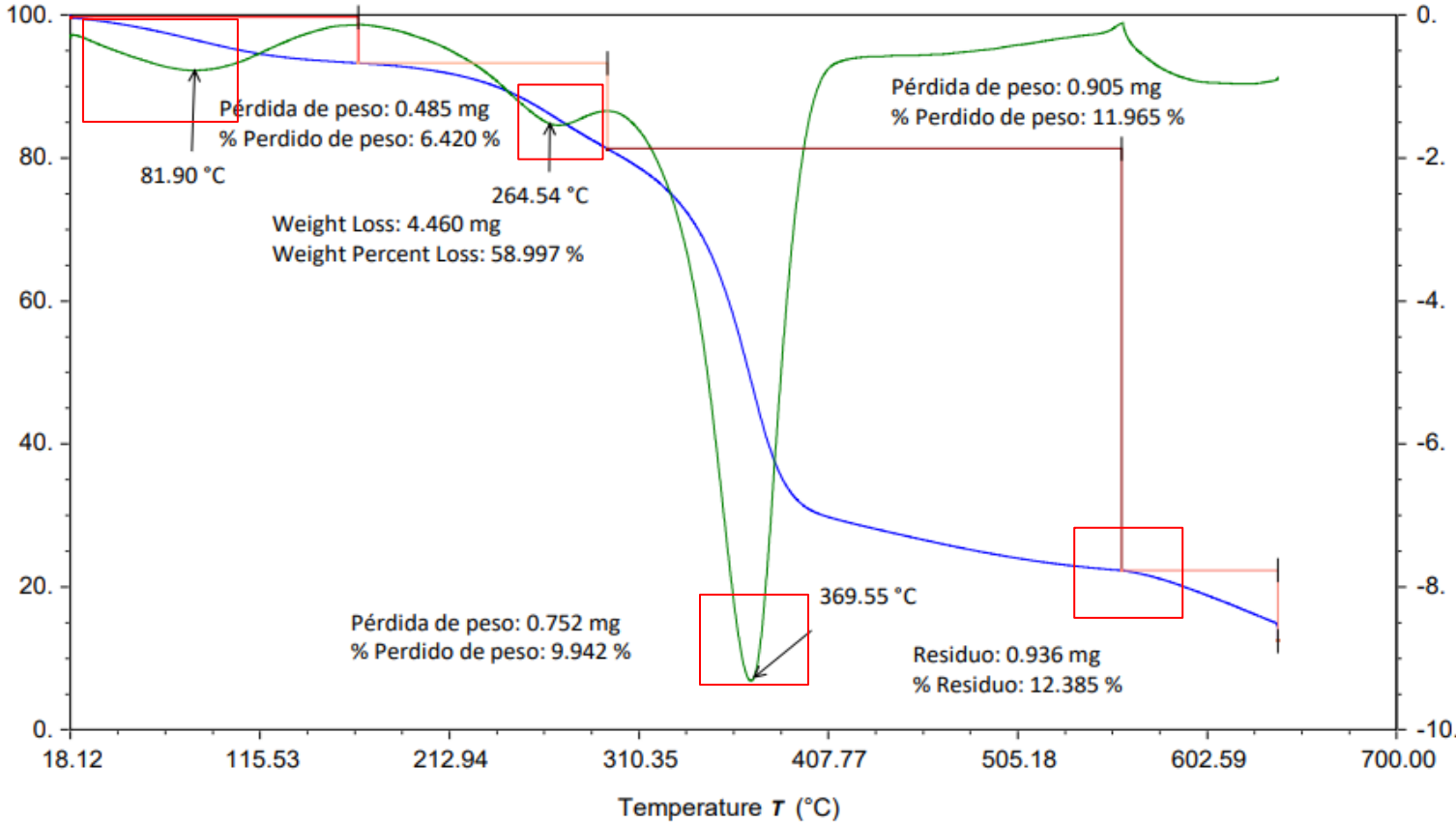
MK15

TGA – Película Kefiran

Película de kefiran

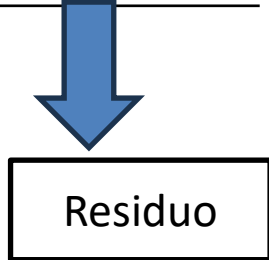
Tabla 11

Resumen de análisis IR-kefiran 15.



Etapa	Rango (°C)	Pérdida %w
1	18,1 – 147,7	6,420%
2	147,7 – 245,6	11,965%
3	245,6– 537,7	58,997%
4	537,7 – 650	12,385%

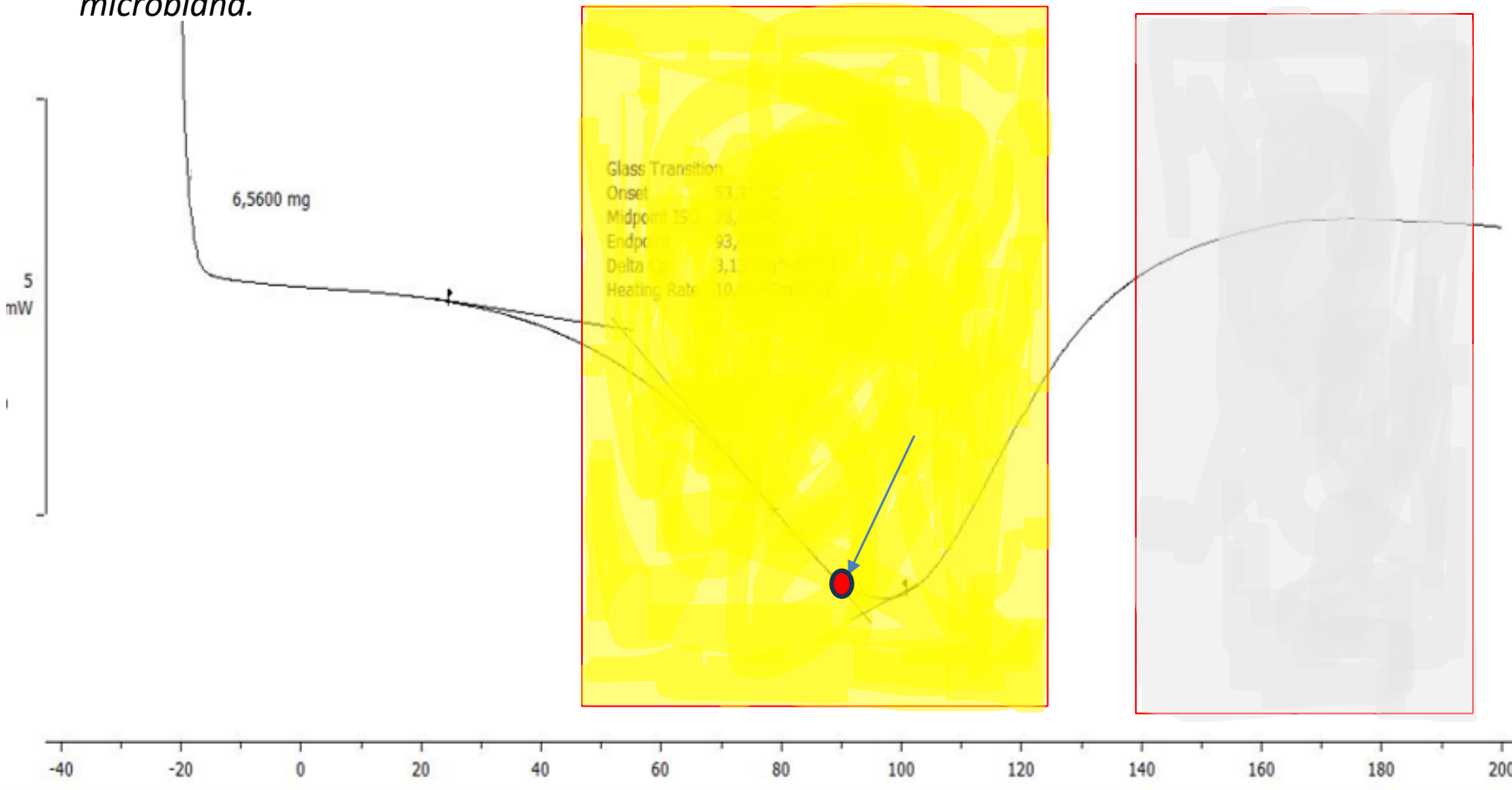
Película	Ceniza
CMA	23,208
CM15	3,33
CK15	12,385



Nota. La imagen presenta los resultados obtenidos para los puntos degradación la película de celulosa.

(Moradi et al., 2019).

Figura 9
 Termograma de la película de celulosa microbiana.



- Temperatura de transición vítrea
- Temperatura de degradación.

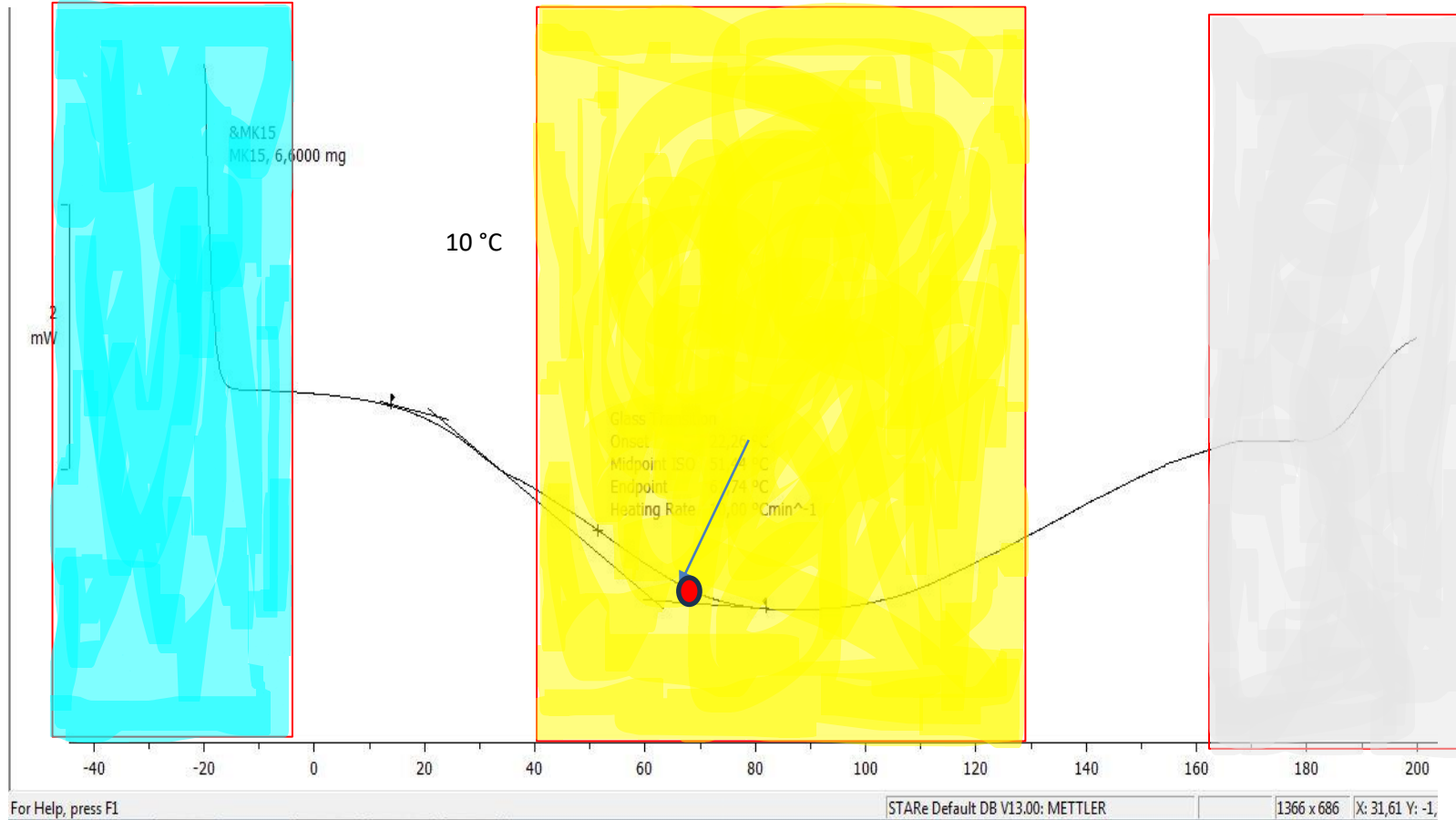
Tabla 12
 Resumen de análisis termogravimétrico.

Etapa	Temperatura (°C)	
1	78,5	●
2	220	●

Nota. La figura muestra los resultados del análisis DSC con respecto a la celulosa microbiana.

Figura 18

Termograma de la película de celulosa MC15.



- Temperatura de transición vítrea.
- Temperatura de degradación.

Tabla 13

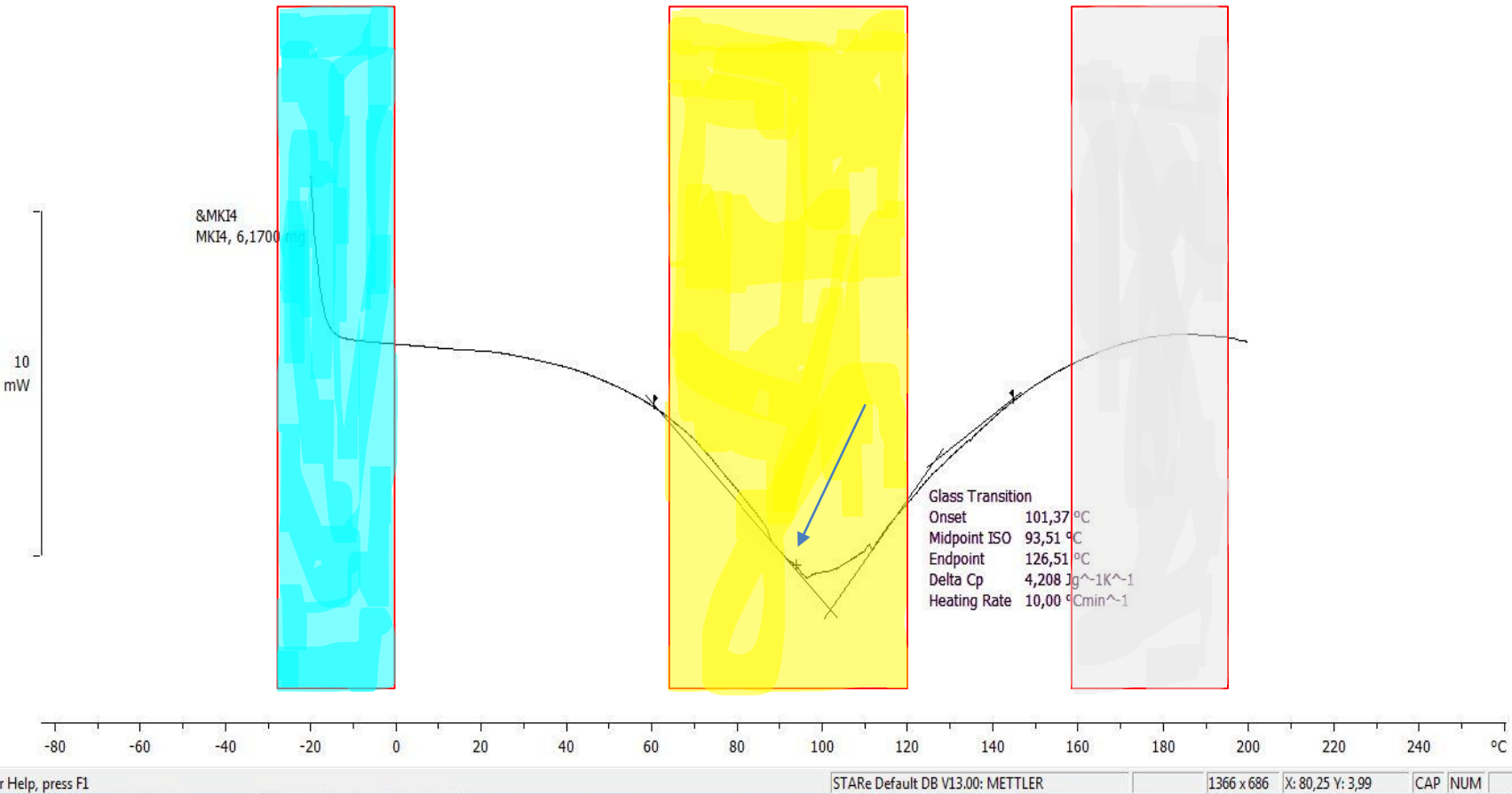
Resumen de análisis termogravimétrico

Etapa	Temperatura (°C)	
1	53,44	●
2	220	○

Nota. La figura muestra los resultados del análisis DSC con respecto a la biopelícula de celulosa microbiana.

Figura 19

Termograma de la película de celulosa MK15.



- Temperatura de transición vítrea
- Temperatura de degradación.

Tabla 14

Resumen de análisis termogravimétrico

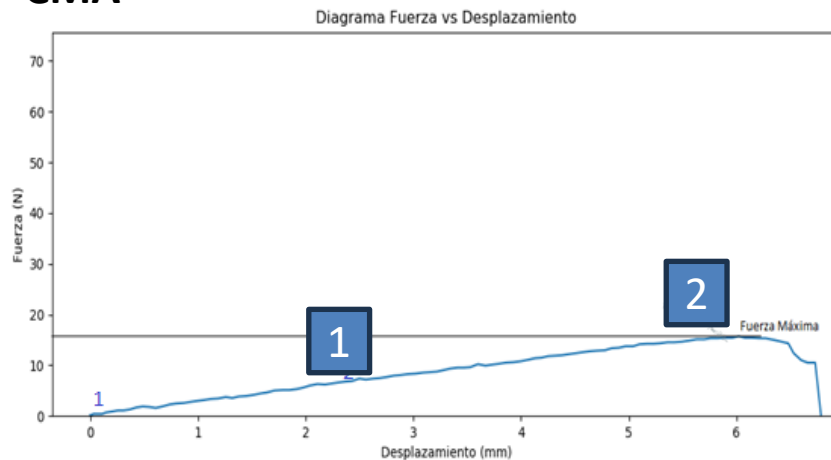
Etapa	Temperatura (°C)	
2	93,51- 126,51	●
3	200	●

Nota. La figura muestra los resultados del análisis DSC con respecto a la película de kéfir.

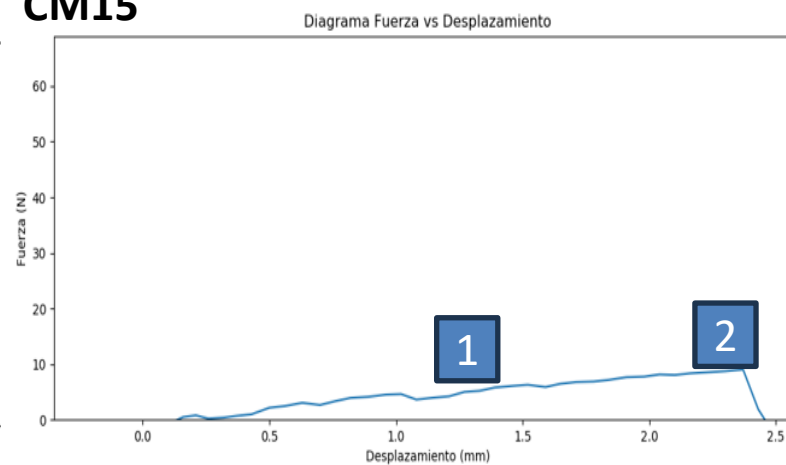
Figura 15
Gráfica de resistencia a la tracción de la películas..

Muestra	Espesor(mm)	Área (mm ²)	Fuerza (N)	Elongación (%)	Esfuerzo (Mpa) Máximo.
MCA	0,19	2	14,57	5,20	7,3 Mpa
MC15	0,33	4,2	10,17	12,77	2,4 Mpa
MK15	0,38	4	55,53	35	14 Mpa

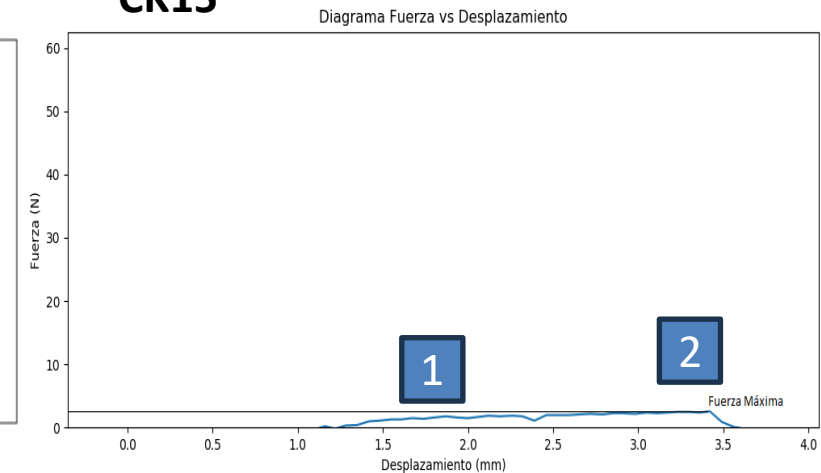
CMA



CM15



CK15



Nota. La figura muestra los resultados del ensayo de tracción en función de la fuerza aplicada y desplazamiento de las muestras de ensayo.

Tabla 5

Factores y variables significativas evaluadas para el desarrollo de biopelículas.

Factores	Niveles de estudio		
	-1	0	+1
Cantidad de celulosa (gr)			
Cantidad de CMC (gr)			
Cantidad de glicerol (mL)			

Figura 10

Gráficos de Contorno película celulosa MC15.

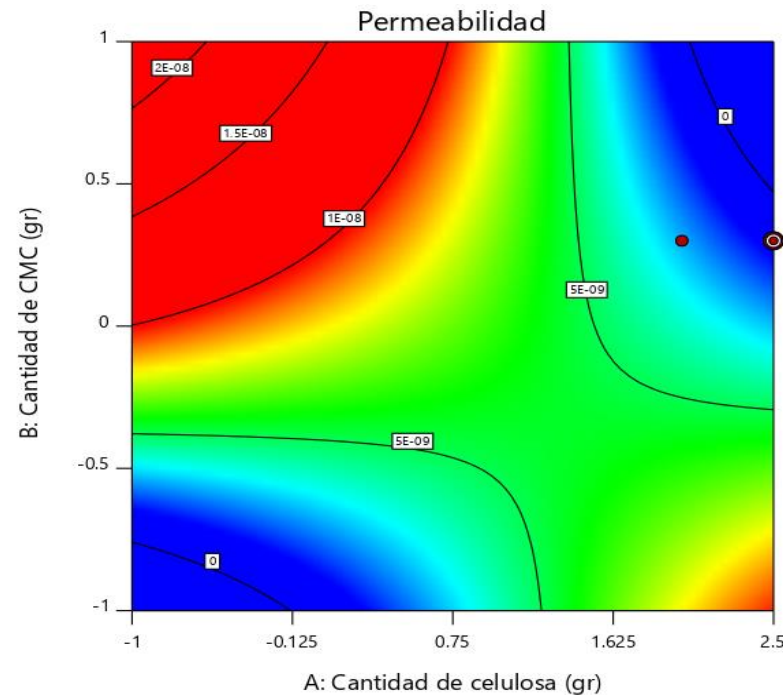
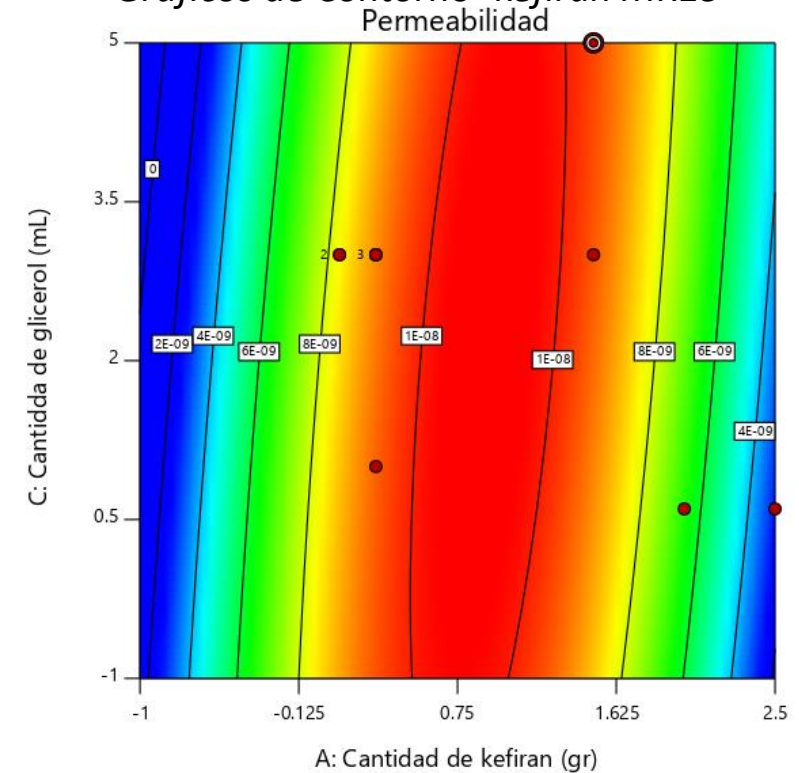
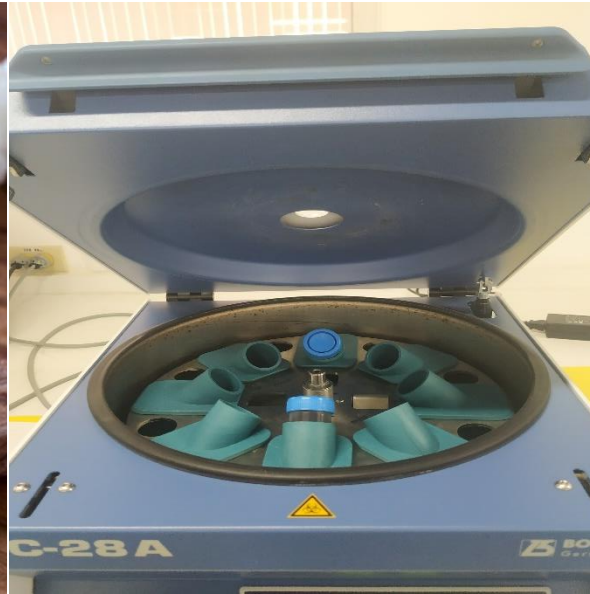


Figura 11

Gráficos de Contorno- kefiran MK15



Nota. El gráfico de contorno muestra la relación de factores con la variable de respuesta



01 INTRODUCCIÓN

02 OBJETIVOS

03 METODOLOGÍA

04 RESULTADOS

05 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



CONCLUSIONES

- Los **cultivos realizados a una temperatura de 25°C con 80 gr de sacarosa** en un medio de 800 mL y 25 gr cáscaras de piña que fue la fuente nitrógeno, se obtuvo **valores mayores en peso de celulosa microbiana** seca con un valor promedio de 1,85 g y un rendimiento total **de proceso de 2,3125 %**, revelando una producción **baja** en función al tiempo de fermentación del caldo de cultivo ; por tanto en este trabajo se realizó de forma alternativa un polisacárido que revela altos rendimientos 85% y gran potencial.
- En el análisis de espectroscopia infrarroja **IR**, permitió **identificar los picos característicos de los componentes conformacionales de la estructura** de CM evidenciando **bandas típicas** de absorción infrarroja a 3400 cm⁻¹ , 3300 cm⁻¹ y 3234 cm⁻¹ indican picos característicos de la celulosa microbiana e indican vibraciones de estiramiento OH .Las bandas a 2846 cm⁻¹ , 2892 cm⁻¹ y 2945.74 cm⁻¹ corresponde a la presencia de CH de estiramiento; además de que los valores obtenidos son similares a los revisados por bibliografía.
- **El diseño experimental** desarrollado en función del **análisis de varianza y gráfica de contorno** para el proceso de obtención de celulosa **microbiana y biopelículas**, **posibilita la identificación de los tratamientos deseables** en función a los valores comparativos de pruebas físicas, mecánicas y estructurales.
- La búsqueda de fuentes alternativas marca una necesidad regente de la **demanda de biomateriales**, a partir de ello se desglosan una **variedad de aplicaciones** entre las más interesantes y viables partiendo de la celulosa microbiana es en el **área alimenticia en el empaque de alimentos**.

- Se recomienda activar los inóculos de kéfir, para que el cultivo inicie con éxito y se logre la secreción de la celulosa microbiana en la superficie del caldo de fermentación.
- Realizar el cultivo a una temperatura constante de 30°C, debido a que a tal temperatura el proceso de fermentación se acelera permitiendo la formación de celulosa microbiana en menor tiempo.
- Especificar las cantidades de fuente de carbono y fuente de nitrógeno para asegurar un mayor rendimiento en peso de celulosa.
- Es aconsejable realizar pruebas de microscopía electrónica de barrido, con el fin de evidenciar y analizar las cualidades estructurales de la estructura de la celulosa microbiana.

¡Gracias!



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA