



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA TECNOLÓGICA Y DE
NEGOCIO PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA
BACTERIANA EN UN BIORREACTOR DE DISCO ROTATORIO**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y
Bioingeniería

Profesor Guía: Dr. Patricio Oyarzún Cayo
Profesor Cotutor: Dra. Dariela Núñez Bernal
Estudiante: Juan Pablo Vargas Montalba

© (Juan Pablo Vargas Montalba). Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.

Concepción, Chile
2022

CALIFICACIÓN

En _____, el ___ de _____ de _____, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante _____, de la carrera de _____ ha aprobado la tesis para optar al título de _____ con nota de _____.

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

DEDICATORIA

Este trabajo es para quienes me acompañaron en este largo camino, los cuales me han motivado a no bajar los brazos, fomentar la búsqueda del desarrollo tecnológico y creer en la innovación como el motor del cambio;

.....mis seres queridos.

¡Muchas gracias!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su infinito amor y soporte que me brindaron incondicionalmente durante mi formación profesional.

Agradezco a mis padres, mi hermana y mis abuelos por acompañarme con preocupación y cariño durante toda mi vida y entregarme todas aquellas herramientas necesarias para enfrentar los desafíos futuros.

A mi amada Javiera por escucharme y apoyarme durante este camino. Gracias por tener siempre las palabras indicadas para no rendirme y poder seguir adelante.

A mis amigos de la vida y mis amigos que he conocido en el camino por su aguante, risas y apoyo desde un inicio. Gracias por las vivencias, tallas memorables y recuerdos inolvidables.

A los profesores y compañeros de laboratorio que me brindaron su conocimiento y apoyo en mi proceso formativo y personal. Me llevo conmigo todo ese conocimiento de excelencia.

A la Universidad San Sebastián y la Universidad Católica de la Santísima Concepción por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A todos quienes de alguna manera aportaron al cumplimiento de mis metas y al éxito de esta última etapa.

A todos ustedes ¡Muchísimas gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
CAPITULO 1	16
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
CAPITULO 2.....	22
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Producción Industrial y mercado de celulosa bacteriana	22
2.2 Aplicaciones de CB con potencial de mercado.....	25
2.2.1 Industria de alimentos.....	25
2.2.2 Biomedicina	29
2.2.3 Industria textil.....	34
2.3 Métodos de producción de CB.....	36
2.3.1 Cultivo estático.....	37
2.3.2 Cultivo agitado	38
2.4 Microbiología de la producción de CB	39
2.4.1 <i>Komagateibacter xylinus</i>	41
2.5 Biorreactor de disco rotatorio como tecnología de producción de celulosa bacteriana	44
2.6 Modelación de la fermentación de <i>K. xylinus</i> en BDR	49
CAPITULO 3.....	52
MATERIALES Y METODOLOGÍA	52
3.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio.	52
3.1.1 Diseño y construcción del prototipo experimental.....	52
3.1.2 Diseño del proceso de producción de CB en el sistema BDR.	54
3.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.	54
3.2.1 Definición de una estrategia de vigilancia tecnológica.....	54
3.2.2 Estudio de patentes y evaluación del potencial de protección intelectual	57
3.2.3 Análisis estratégico	57

3.2.4 Modelo de negocio.....	57
3.3 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.	58
3.3.1 Materiales y equipamiento.	58
3.3.2 Propagación de <i>K. xylinus</i> y cepa del vinagre.....	59
3.3.3 Cuantificación de la biomasa	61
3.3.4..... Cuantificación del consumo de glucosa	62
3.3.5 Purificación y cuantificación de celulosa bacteriana	63
3.3.6 Determinación de rendimientos productivos	63
3.3.7 Simulación matemática del bioproceso de producción de CB	64
CAPITULO 4	68
RESULTADOS	68
4.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio.	68
4.1.1 Diseño BDR.	68
4.1.2 Diagrama de flujo para las etapas productivas <i>upstream</i> y <i>downstream</i> . 71	
4.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.	76
4.2.1 Estudio de patentes y tendencias productivas actuales.....	76
4.3 Análisis del Entorno Interno y Externo	86
4.3.1 Análisis PESTEL del uso de celulosa bacteriana.....	86
4.3.2 Análisis FODA.....	95
4.3.3 Modelo de negocios.....	96
4.4 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.	98
4.4.1 Determinación de biomasa	98
4.4.2 Determinación del consumo de glucosa	99
4.4.3 Cuantificación de la celulosa bacteriana.....	101
4.4.4 Rendimiento productivo y selección de cepa	102
4.4.5 Simulación de la producción de CB	103
CAPITULO 5	105
DISCUSIÓN.....	105
5.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio	105

5.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.	107
5.3 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.	111
CAPITULO 6	114
CONCLUSIÓN	114
CAPITULO 7	116
BIBLIOGRAFÍA.....	116
CAPITULO 8	146
ANEXOS	146
8.1 ANEXO 1	146
8.1.1 Niveles Jerárquicos de codificación de patentes CIP 2022.....	146
8.2 ANEXO 2	148
8.3 ANEXO 3:	148
8.3.1 Cuantificación de la biomasa seca.....	148
8.4 Anexo 4.....	156
8.4.1 Curva de calibración de glucosa método DNS.....	156

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructural supramolecular de CB con elevada presencia de enlaces de hidrógeno responsable de sus propiedades.

Figura 2. Producción industrial de CB mediante fermentación estática.

Figura 3. Productos alimentarios que utilizan celulosa bacteriana como aditivos.

Figura 4. Apósitos de CB utilizados en cara y torso para el tratamiento de heridas crónicas y quemaduras.

Figura 5. Producción industrial de celulosa bacteriana mediante fermentación estática y agitada.

Figura 6. Esquema general de la biosíntesis intracelular de moléculas de CB y autoensamblaje extracelular de cadenas de CB en nanofibras.

Figura 7. *K. xylinus* bajo microscopio electrónico.

Figura 8. Esquema general de sistemas BDR.

Figura 9. Planilla de diseño del borrador del prototipo del sistema BDR mediante software AutoCAD 360 versión 2022.

Figura 10. Ciclo de vigilancia tecnológica implementado en el presente estudio.

Figura 11: Ensayo de cuantificación del consumo de glucosa en cultivos de *K. xylinus* y cepa del vinagre en microplacas y mediante espectrofotometría a 540 nm.

Figura 12. Vista frontal del BDR. A: Estanque de acero inoxidable, B: Soporte de acero inoxidable.

Figura 13. Vista lateral del BDR. A: Mirilla lateral izquierda, B: Mirilla lateral derecha.

Figura 14. Vista superior del BDR y localización de componentes de medición e inoculación.

Figura 15: Vista interna lateral izquierda del BDR y detalle de puertos móviles para sensores y específicos de inoculación.

Figura 16: Vista longitudinal del BDR. A: 10 discos montados en el eje horizontal, B: Motor eléctrico externo.

Figura 17. Diagrama de proceso de producción de celulosa bacteriana mediante un sistema BDR, destacando las etapas upstream y downstream.

Figura 18. Diagrama de lógica de control de proceso de producción de celulosa bacteriana mediante un sistema PLC.

Figura 19. Refinamiento de ecuaciones de búsqueda jerarquizados por clasificación tipo CIP.

Figura 20. Clasificación IPC y su aporte de patentes asociadas a métodos y productos en base a CB (Generado a partir de base de datos WIPO, 2022).

Figura 21: Evolución del número de patentes asociadas a CB en el periodo comprendido entre los años 1987 y 2022.

Figura 21: Distribución del número y tipo de patentes asociadas a CB entre 1987 y 2022 según tipo de clasificación CIP.

Figura 22. Número de patentes relacionadas a la producción y uso de CB publicadas por país.

Figura 23. Diseño de biorreactor de disco rotatorio patentado por Bungay et al. 1999 (patente US5955326).

Figura 24. Comparación del comportamiento del Producto Interno Bruto (PIB) latinoamericano y países OCDE entre 2021 - 2023 (Obtenido desde OCDE, 2022).

Figura 25. Comportamiento del PIB nacional y variación anual para el periodo entre 1999 y 2022.

Figura 26. Comparación de las cinéticas de crecimiento K. oboediens y cepa del vinagre en un periodo de cultivo de 8 días.

Figura 27. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del cultivo de K. oboediens en matraces en un periodo de 8 días.

Figura 28. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del cultivo de cepa del vinagre en matraces en un periodo de 8 días.

Figura 29. Comparación del consumo de glucosa entre K. oboediens y cepa del vinagre.

Figura 30. Cinética de producción de CB entre K. oboediens y cepa del vinagre en un periodo de cultivo de 8 días.

Figura 31. Simulación de la producción de CB en función para 4 valores de rotación (rpm) en la fermentación de *K. oboediens* en un sistema BDR durante un periodo de cultivo de 16 días.

Figura 32. Aporte de patentes según tipo de cesionario con respecto al total de patentes de estudio.

Figura 33: Curva de calibración de glucosa para el cálculo de la concentración de glucosa mediante el método DNS.

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Comparación de las propiedades mecánicas de CB y celulosa vegetal.
- Tabla 2. Producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos y agitados en diversas cepas del género *Komagateibacter* spp.
- Tabla 3. Resumen de estudios previos en BDR.
- Tabla 4. Producción de celulosa bacteriana y características operacionales en sistemas BDR.
- Tabla 5. Modelos propuestos para la caracterización del coeficiente de transferencia de oxígeno K_La en sistemas BDR.
- Tabla 6. Ventajas de diseño del modelo BDR propuesto.
- Tabla 7. Material de laboratorio, equipos, reactivos y software utilizados en la investigación.
- Tabla 8: Composición y cantidad de componentes del medio HS.
- Tabla 9: Descripción de equipos y procesos involucrados en etapas *upstream* y *downstream*.
- Tabla 10. Número de iteraciones realizadas, patentes publicadas según el tipo de sección CIP y categorización de relevancia para el estudio entre 1987 y 2022.
- Tabla 11: Tendencia productiva realizadas a partir de la clasificación por clase y categorización de relevancia.
- Tabla 12. Principales enfoques productivos asociados a bioproductos en base a CB y tecnologías productivas.
- Tabla 13. Variación anual del PIB para el periodo entre 2019 y 2023 a nivel global, países desarrollados y países en vías de desarrollo.
- Tabla 14. Identificación de las características internas de la propuesta de bionegocios.
- Tabla 15. Modelo de negocios para la comercialización del sistema experimental BDR.
- Tabla 16. Parámetros de rendimiento determinados en base a datos cinéticos obtenidos experimentalmente.
- Tabla 17. Productividades volumétricas simuladas para la producción de CB seca en velocidades crecientes de rotación para sistemas BDR.

Tabla 18. Nomenclatura universal de países WIPO.

Tabla 19. p-valores de Shapiro-Wilks.

RESUMEN

La celulosa bacteriana (CB) es un nanomaterial de especial interés debido a sus excelentes propiedades mecánicas, capacidad de retención de agua y biocompatibilidad sumado a la posibilidad de ser obtenida con una mayor pureza con respecto a la celulosa de origen vegetal. Estas características confieren un elevado potencial de aplicaciones tecnológicas en áreas como la industria de alimentos, biomedicina, cosméticos, textiles, entre otras. No obstante, subsisten brechas que deben ser abordadas para potenciar la transferencia tecnológica y promover el desarrollo de nuevos negocios a partir de este material. En particular, cabe destacar los bajos rendimientos productivos que se obtienen mediante métodos convencionales, lo que representa el principal desafío para su explotación industrial. Para hacer frente a estas limitaciones, se han realizado esfuerzos para el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la producción de CB y mejorar sus propiedades. Lo anterior, mediante la búsqueda de nuevos métodos productivos y el uso de herramientas de optimizar parámetros operacionales del bioproceso.

La investigación realizada en esta tesis se enfocó en proponer una estrategia innovadora y de alto rendimiento para producir CB mediante un biorreactor de disco rotatorio (BDR). Este tipo de reactores proveen de condiciones favorables para aumentar la formación de biopelículas y la producción de CB respecto a otras tecnologías. La investigación abordó una etapa experimental para obtener parámetros cinéticos de crecimiento microbiano y producción de CB a escala de matraces. Posteriormente, se trabajó en el diseño de un BDR con la capacidad de monitorear múltiples variables operacionales y facilitar la investigación de parámetros críticos de fermentación tales como temperatura, pH, distancia entre discos, velocidad de agitación, entre otros. El análisis matemático realizado en base a modelos previamente reportados y datos obtenidos experimentalmente permitió simular el comportamiento cinético y obtener parámetros de productividad máxima. Finalmente, el análisis de patentes señaló que los

principales enfoques productivos para la inserción de CB en el mercado para el modelo de negocio propuesto debe orientarse a la industria de los alimentos, biomedicina, cosméticos e industria textil.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, biorreactor de disco rotatorio, rendimiento productivo, modelación cinética.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a nanomaterial of special interest due to its excellent mechanical properties, water retention capacity and biocompatibility, in addition to the possibility of being obtained with greater purity than cellulose of plant origin. These characteristics confer a high potential for technological applications in areas such as the food industry, biomedicine, cosmetics, textiles, among others. However, there are still gaps that need to be addressed to promote technology transfer and the development of new businesses based on this material. It is worth noting the low production yields obtained by conventional methods, which represents the main challenge for its industrial exploitation. To address these limitations, efforts have been made to develop strategies to increase BC production and improve its properties. This has been done through the search for new production methods and the use of tools to optimize operational parameters of the bioprocess.

The research conducted in this thesis focused on proposing an innovative and high-performance strategy to produce BC using a rotating disk bioreactor (BDR). This type of reactor provides favorable conditions to increase biofilm formation and BC production with respect to other technologies. The research addressed an experimental stage to obtain kinetic parameters of microbial growth and BC production at flask scale. Subsequently, work was carried out on the design of a BDR with the capacity to monitor multiple operational variables and facilitate the investigation of critical fermentation parameters such as temperature, pH, distance between disks, agitation speed, among others. Mathematical analysis based on previously reported models and experimentally obtained data allowed simulating the kinetic behavior and obtaining maximum productivity parameters. Finally, the patent analysis pointed out that the main productive approaches for the insertion of BC in the market for the proposed business model should be oriented to the food industry, biomedicine, cosmetics and textile industry.

Keywords: Bacterial cellulose, rotary disk bioreactor, production yield, kinetic modeling.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La celulosa es el biopolímero más abundante del planeta, siendo el principal componente de la biomasa vegetal y que se produce en una escala de miles de millones de toneladas a partir de fuentes de origen vegetal (Kumar et al., 2019). Las propiedades mecánicas de este biopolímero incluyen una elevada estabilidad estructural, rigidez, insolubilidad al agua y termorresistencia, es ampliamente demandado por la industria del papel, textil, alimenticia, farmacéutica, entre otros (Hinterstoisser & Salmén, 2000; Holtzapfle, 2003; Brigham, 2017). La producción mundial de pulpa de celulosa es de 180 millones de toneladas anuales y la demanda de este producto crece continuamente. Sin embargo, la purificación de celulosa vegetal presenta varias desventajas debido a la lenta producción y a la dificultad de extraer grandes cantidades de biopolímero puro. Un ejemplo es la industria papelera, la cual genera un impacto ambiental al producir papel y otros subproductos derivados de fibra vegetal mediante un proceso de refinamiento químico con disolventes tóxicos que se utilizan para eliminar interferentes como hemicelulosas, lignina, aceites, otros (Heinze et al., 2018).

La celulosa puede ser sintetizada por diversos tipos de organismos dentro de los diversos reinos existentes en la naturaleza tales como bacterias, hongos y animales. Por esta razón, el desarrollo biotecnológico y las actuales estrategias de producción buscan aprovechar nuevas fuentes productoras de celulosa como alternativa para la generación de celulosa de forma sustentable y con potencial de inserción en el mercado de biomateriales (Lakshmi, et al., 2017; Kimura et al., 2001; Imran et al., 2016; Kumar et al., 2019).

La celulosa bacteriana (CB) es un polímero extracelular con fórmula molecular idéntica a la celulosa vegetal $(C_6H_{10}O_5)_n$ y producida naturalmente por una gran variedad de bacterias aeróbicas. En presencia de oxígeno, estos microorganismos

transforman varias fuentes de carbono en una matriz polimérica de celulosa que confiere a los microorganismos protección mecánica, química y biológica ante agentes externos y facilita la obtención de nutrientes (Raghavendran et al., 2020).

Estructuralmente es un homopolímero lineal no ramificado compuesto por unidades repetidas de β -D-glucopiranososa y unidas por enlaces β -1,4-glucosídico. La alta presencia de grupos hidroxilos a lo largo del biopolímero generan una gran cantidad de enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno de las unidades de anhidroglucosa. Los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals permiten un apilamiento paralelo de moléculas de celulosa en forma de nanofibras cristalinas, que luego se ensambla en microfibrillas de celulosa (Figura 1) (Pogorelova et al. 2020). La estructura supramolecular confiere una gran estabilidad, resistencia a la tracción, insolubilidad al agua y termorresistencia (Hinterstoisser & Salmén, 2000; Holtzapfle, 2003; Brigham, 2017).

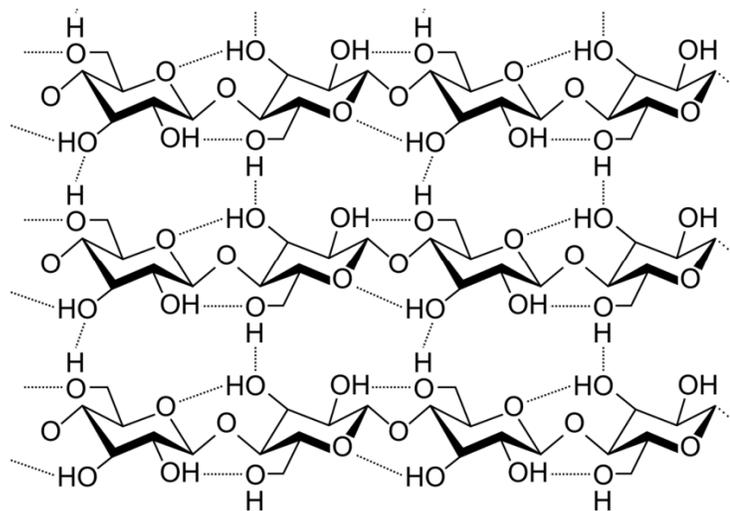


Figura 1. Esquema estructural supramolecular de CB con elevada presencia de enlaces de hidrógeno responsable de sus propiedades (Obtenido de Pogorelova et al., 2020).

La CB se caracteriza por su alta pureza, alto grado de cristalinidad, biodegradabilidad, capacidad de retención de agua, biocompatibilidad y ausencia de interferentes tales como lignina y hemicelulosas (Betlej et al., 2021).

Numerosas investigaciones demuestran que BC posee mejores propiedades mecánicas respecto a la celulosa de origen vegetal, las cuales se resumen en la tabla 1. El potencial tecnológico de este biomaterial ha generado un crecimiento anual significativo en el número de publicaciones y patentes relacionadas con la producción de CB como bioproducto con aplicaciones en la industria de alimentos, biomedicina, cosmética, papelera y otros nichos de mercado (Jagannath et al., 2010; Liu et al., 2020; Drozd et al., 2019).

Tabla 1. Comparación de las propiedades mecánicas de CB y celulosa vegetal (Obtenido de Wang et al., 2019).

Propiedades	Celulosa bacteriana	Celulosa vegetal	Referencia
Resistencia a la tracción (Mpa)	20 – 300	25 – 200	Feng et al., 2015
Módulo de Young (Mpa)	20.000 – 130.000	2,5 – 0,17	Lynd et al., 2002
Retención de agua (%)	>95	25 – 35	Islam et al., 2012
Tamaño de fibra (nm)	20 – 100	25 – 35	Monika et al., 2013
Cristalinidad (%)	74 – 96	40 – 85	Park et al., 2010
Hidrofilia relativa (%)	40 – 50	20 – 30	Bishop, 2007
Pureza (%)	> 90	< 80	Klemm et al., 2005
Polimerización	14.000 – 16.000	300 – 10.000	Tahara et al., 1997
Área superficial total (m ² /g)	> 150	> 10	Islam et al., 2012

Sin embargo, las bajas productividades y elevados costos de los métodos de producción convencionales representan la principal brecha para hacer viable el uso de la celulosa bacteriana como alternativa a la celulosa de origen vegetal. Un factor clave para el desarrollo de estrategias efectivas y menos costosas es diseñar sistemas de producción eficientes que aumenten los rendimientos productivos y/o mejoren sus propiedades mecánicas (Behera & Ray, 2016).

Un método alternativo para la producción eficiente de CB es el uso de reactores de biopelícula, los cuales permiten la generación de una biopelícula cohesiva de

microorganismos adheridos a la superficie de un sustrato. Estos métodos permiten lograr una alta densidad celular de los microorganismos de interés e inmovilizarlos en un sistema controlado bajo condiciones adecuadas para la generación y viabilidad de las biopelículas (Reza & Cuenca, 2019). En este sentido, los biorreactores de disco rotatorio (BDR) han generado un amplio interés de estudio para la producción de películas de celulosa bacteriana. Al respecto, diversas investigaciones reportan un mejoramiento en la eficiencia de la transferencia de oxígeno y, por consiguiente, un aumento en la producción de biopelículas microbianas (Reza & Cuenca, 2019). Históricamente, estos sistemas han sido utilizados con éxito en el sector ambiental, incluyendo el tratamiento secundario alternativo de aguas residuales domésticas, nitrificación, oxidación de carbono, remoción de compuestos organoclorados y eliminación de fósforo en diferentes tipos de efluentes industriales. Los BDR ofrecen soluciones de bajo costo, facilidad de operación, elevada densidad celular y eficiencia productiva, otros (Cortez et al., 2008). Sin embargo, la ausencia de procedimientos operativos y de diseño estándar ha sido identificado como una de las principales razones que dificultan el escalamiento de BDR (Behera & Ray, 2016).

En cuanto a la modelación de estos sistemas, si bien se han reportado ecuaciones empíricas que permiten caracterizar algunos sistemas BDR, existe una necesidad de profundizar la investigación en esta área para mejorar las capacidades de escalar este tipo de reactores a sistemas productivos. Lo anterior, debido a que los modelos propuestos actuales no logran representar certeramente los fenómenos biológicos que ocurren en la producción de CB en sistemas BDR. En consecuencia, es fundamental un estudio en mayor profundidad para una mejor comprensión del proceso basado en datos de estudios obtenidos a pequeña escala y la aplicación de ecuaciones de diseño apropiadas que permitan viabilizar el uso de BDR para la producción eficiente de celulosa (Ghazimoradi & James, 2003).

Si bien es constatable la oportunidad de entrada al mercado de CB, existen brechas de información de tipo tecnológicas y de mercado que limitan el desarrollo comercial de la celulosa bacteriana a nivel de producción, escalamiento y transferencia tecnológica.

En este contexto, la investigación desarrollada abordó los criterios tecnológicos del bioproceso para la producción de CB en un BDR, utilizando como modelo de estudio la bacteria del género *Komagateibacter spp.* Además, se obtuvieron resultados experimentales preliminares, además de proponer una estrategia de negocio y una propuesta de simulación del bioproceso que entregue herramientas para predecir la producción de CB de manera que el proceso sea competitivo y con potencial escalamiento productivo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis

La tecnología de biorreactor de disco rotatorio es adecuada para la producción de celulosa bacteriana a escala industrial y permite diseñar un modelo de negocio que viabilice la comercialización de este biomaterial en diversos mercados.

1.2.2 Objetivo general

Proponer una estrategia tecnológica y de negocio para un bioproceso de alta productividad de celulosa bacteriana utilizando un biorreactor de disco rotatorio.

1.2.3 Objetivos específicos

- Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio.
- Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.
- Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.

CAPITULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Producción Industrial y mercado de celulosa bacteriana

El crecimiento industrial, la sobreexplotación de los recursos naturales y el deterioro del medio ambiente de las últimas décadas han sido base fundamental para la conformación de los acuerdos políticos internacionales sobre protección climática (Carranza, 2016). Estos corresponden principalmente al Acuerdo Climático de París (ONU, 2005) y el Acuerdo de Glasgow (ONU, 2021), exigiendo la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y la reducción del consumo de combustibles fósiles. A su vez, lo anterior se aplicó al Pacto Verde Europeo en su declaración sobre intensificar la ambición climática de Europa para el año 2030 (EC, 2020), incentivar aplicaciones biotecnológicas en la producción primaria, la salud y la industria (OCDE, 2009) y la transformación del conocimiento de las ciencias de la vida en productos nuevos, sostenibles, ecoeficientes y competitivos (Aguilar et al., 2010). Esto representa al motor de la bioeconomía, la que se define como “la producción, utilización y conservación de los recursos biológicos, incluidos los conocimientos, la ciencia, la tecnología e innovación, para proporcionar información, productos, procesos y servicios en todos los sectores económicos con foco en la economía sostenible” (Rodríguez et al., 2019). Por tanto, su finalidad es promover el desarrollo sostenible concediendo valor económico a aquellos recursos que son considerados como una alternativa sustentable para el mercado (Carranza, 2016).

Las tendencias mundiales actuales y la globalización de las dinámicas ambientales promueven acciones que incentivan la producción sostenible, favoreciendo en gran medida al comercio de los bienes y servicios derivados de la biodiversidad, así como la competitividad de quienes trabajen en esta línea. A nivel empresarial, el enfoque ambiental genera oportunidades para incrementar

la producción, así como las ventas de aquellos negocios (Torres & Zuluaga, 2009).

La CB ha sido ampliamente investigada en los últimos años y existen casos de éxito de producción industrial en diversas áreas. Al respecto, Donini et al., 2010 compararon las productividades entre CB y celulosa vegetal. Los autores utilizaron como base de análisis una hectárea de eucalipto con un Incremento Promedio Anual (IPA) de 50 m³ considerando una densidad aproximada de 500 kg/m³, obteniéndose un IPA equivalente a 25 ton/año*hectárea. Considerando una plantación de 7 años con un contenido de 45% de celulosa aproximadamente (Gomide et al., 2005), obtuvieron alrededor de 80 ton de celulosa vegetal después de 7 años de cultivo. De esta manera, estimaron que la misma producción de CB se obtiene en 22 días con un rendimiento hipotético de 15 g/L en 50 horas de cultivo para la fermentación en un biorreactor de 500 m². Además, el área de producción requerida para la fermentación de CB es mucho más pequeña que la necesaria para el crecimiento de la planta permite producir durante todo el año y la purificación de este biopolímero es menos contaminante en comparación con el método de extracción de celulosa vegetal (Donini et al., 2010; Hussain et al., 2019).

Actualmente, la producción a pequeña y gran escala de CB utilizan medios de cultivo sintéticos costosos que incurren hasta en un 30% del total de costos, siendo un aspecto relevante para considerar en cuanto a la capacidad de escalamiento (Revin et al., 2018). Específicamente, el medio Hestrin-Schramm (HS) es habitualmente utilizado en el cultivo de bacterias productoras de BC. Sin embargo, este medio es costoso ya requiere de productos adicionales tales, levadura, peptonas, sales, entre otros (Schramm & Hestrin, 1954; Costa et al., 2017). No obstante, diversos estudios reportan el uso de residuos agroindustriales como fuente alternativa de carbono para la producción de CB (Hussain et al., 2019). Al respecto, se ha reportado el uso de productos de desecho tales como residuos agroindustriales (Lima et al., 2017), zumo de frutas

(Kurosumi et al., 2009), frutas podridas (Jozala et al., 2015), melaza (Çakar et al., 2014), trigo (Chen et al., 2013) y desechos de la industria vinícola (Wu & Liu, 2012). Estos son descritos como fuentes de carbono, nitrógeno y cofactores de bajo costo siendo sustratos ideales para la producción de CB a mayor escala (Velásquez-Riaño & Bojacá, 2017) .

Según la empresa ResearchMoz, el mercado de CB ronda los US\$ 207.36 millones en 2016 y se espera que supere los US\$ 700 millones en 2026 (ResearchMoz & QYResearch, 2017). Existen diversos productos basados en CB, especialmente en las áreas de alimentos. Particularmente, la nata de coco es el principal producto generado a partir de la fermentación estática utilizando agua de coco como fuente de nutrientes y se vende en diversos formatos. El valor de la nata de coco varía entre US\$ 200 – 1000 por tonelada dependiendo del fabricante y pureza del producto final (UI-Islam et al., 2020). Dourado et al., 2016 realizaron un análisis técnico-económico de la fermentación a escala industrial de celulosa bacteriana requeriría una inversión US\$ 13 millones para la generación de una fábrica industrial que produzca 504 toneladas anuales. El costo de fabricación de CB se estimó en US\$ 7.4 millones anuales con una utilidad neta de US\$ 3.3 millones anuales. De acuerdo con este estudio, sería posible generar aproximadamente 46 % de utilidad anual respecto al costo sin considerar la inversión inicial. Aunque la producción de CB requiere de un gran capital inicial, diversos estudios buscan estrategias de producción que permitan reducir el costo mediante el uso de fuentes de nutrientes de bajo costo, aislamiento de cepas de alto rendimiento y optimización de los métodos de cultivo.

Un caso reciente de un bionegocio exitoso asociado a la producción de CB corresponde a Polybion™, empresa biotecnológica española recientemente financiada por Blue Horizon con US\$ 4.4 millones para escalar la primera planta de biofabricación de celulosa bacteriana a nivel mundial en 2023. A su máxima capacidad, Polybion™ tiene planificado escalar su producción a 102.193 m²

anualmente del biotextil Celium™ (Polybion, 2022). El método de producción industrial utilizado por esta empresa corresponde a fermentaciones estáticas (Figura 2), lo que da cuenta del alto potencial de este negocio si se considera las múltiples limitaciones de este tipo de tecnología de producción descritas posteriormente.



Figura 2. Producción industrial de CB mediante fermentación estática (Polybion™, 2022).

Un factor relevante es el alto costo de transporte y almacenamiento de CB debido al alto contenido de agua equivalente al 99% en peso aproximadamente (Yamanaka et al., 1989). No obstante, el contenido de agua se puede reducir a 10% en peso aproximadamente mediante un método de compresión de dos pasos seguido de un tratamiento de inmersión en ácido orgánico (Zhong, 2008). Esta estrategia evita la alteración de la estructura de la red reticulada de CB, mantiene su capacidad de rehidratación hasta un 95% y reduce el costo de almacenamiento y transporte. (Zhong, 2008).

2.2 Aplicaciones de CB con potencial de mercado

2.2.1 Industria de alimentos

A partir de 1992, la FDA describe a la CB como un aditivo alimenticio “GRAS” (generalmente reconocido como seguro) (Shi et al., 2014). Es considerado un ingrediente alimentario, siendo catalogado como una fibra dietética con alto grado de pureza, bajo contenido de calorías y colesterol indigestible por los humanos (Iguchi et al., 2000; Mohite & Patil, 2014). Lo anterior, permite favorecer el tránsito

intestinal (Fontana et al., 2017). En consecuencia, se ha descrito su uso como materia primera para la confección de postres tradicionales e ingredientes alimenticios, dietas bajas en colesterol, carnes vegetarianas, empaques de alimentos, espesantes y aditivos, entre otros (Azeredo et al., 2019).

Particularmente, la nata de coco es el principal producto alimenticio generado a partir de la fermentación estática de bacterias acidófilas productoras de CB en agua de coco enriquecido con jarabes de azúcar (Iguchi et al., 2000). Se pueden utilizar adaptaciones del proceso para producir productos diferentes, como la adición de diferentes jarabes de frutas, siendo el sabor y color del producto final dependiente de la fuente del medio de cultivo (Jozala et al., 2016). Inclusive, la textura puede ser modificada mediante técnicas de procesamiento adicionales, como el secado en horno convencional o la liofilización para producir productos espumosos o crujientes (Shi et al., 2014). Actualmente, la nata de coco puede ser encontrada incorporada en una variedad de alimentos tales como bebidas, yogur, pasteles, salchichas y ensaladas (Zhong, 2020).

La CB ha sido descrita como sustituto de la grasa, las cuales tienen un rol relevante en las propiedades físicas, reológicas y de textura de una variedad de alimentos (Rios et al., 2018). Sin embargo, su consumo elevado se ha relacionado con el desarrollo de afectaciones en la salud tales como obesidad, diabetes y enfermedades cardíacas (Guasch-Ferré et al., 2015). Según Azeredo et al., (2019), existe una creciente preocupación sobre los efectos nocivos de las dietas ricas en grasas y demanda por equivalentes de alimentos bajos en grasas. No obstante, los autores señalan una opinión muy arraigada de que los alimentos bajos en grasas son menos deseables, ya que con frecuencia tienen propiedades sensoriales inferiores en comparación con sus contrapartes altas en grasas. Por lo tanto, los objetivos del reemplazo de la grasa con sustitos es imitar su funcionalidad mientras se reduce el valor calórico y efectos adversos en la salud (Azeredo et al., (2019). En este sentido, Lin & Lin (2014) utilizaron CB como sustito de grasa en la fabricación de albóndigas reportando que la adición de un

10% de CB resultó en propiedades sensoriales y estabilidad en el almacenamiento similares a albóndigas regulares.

Se ha sugerido la preparación de productos análogos de carne utilizando CB producida a partir de la fermentación de bacterias acidófilas con extractos de *Monascus purpureus*, siendo un moho que produce pigmentos de policétido de coloración amarilla, naranja y/o rojo, así como agentes antihipercolesterolémicos como la monacolina y la lovastatina (Sheu et al., 2000; Ko et al., 2018). La fermentación con este moho resultó en productos de BC coloreados, siendo el color afectado por las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas para la fermentación (Sheu et al., 2000). El compuesto coloreado se ha presentado como materia prima para nuevos alimentos funcionales, principalmente análogos de la carne (Ochaikul et al., 2006; Purwadaria et al., 2010). El color del compuesto demostró resistencia al lavado, esterilización en autoclave, congelación o acidificación (Sheu et al., 2000). De esta manera, un análogo de la carne producido a partir del complejo *Monascus*-CB tendría una serie de atractivos comerciales, a saber, aquellos relacionados con la BC como fibra dietética, el efecto reductor del colesterol de *Monascus*, así como el origen no animal, lo que haría que el producto fuera un producto adecuado para el sustituto de productos cárnicos en consumidores con restricciones dietéticas (Ullah et al., 2016).

Por otro lado, existen diversos alimentos que contienen componentes particulados tales como las bebidas lácteas, café, leche de soja, entre otros y que requieren resuspensión mediante el uso de agentes espesantes y tensioactivos tales como goma xantana (XG), pectina, carboximetilcelulosa (CMC) y polisacáridos de soja (Dourado et al., 2016). No obstante, estas formulaciones comúnmente representan una estabilidad de suspensión deficiente y, a menudo, tienen problemas con las interferencias de transparencia y separación de fases (Swazey & Madison, 2010). En este sentido, Paximada et al., (2015) comparó la capacidad espesante y tensioactiva de CB con respecto a la goma xantana (XG) y goma de algarroba (LBG) comúnmente utilizadas en preparaciones

alimentarias. Los autores reportaron una concentración más baja de CB para alcanzar la viscosidad de cizallamiento o límite de elasticidad con respecto a XG y LBG con valores de 0.1%, 0.7% y 1.0 % respectivamente. Lo que indica que CB puede considerarse como una alternativa más económica para espesar aplicaciones alimentarias.

Los derivados de celulosa vegetal como la CMC son comúnmente utilizados en formulaciones de helados como estabilizadores al permitir retener el agua, aumentar la viscosidad de la mezcla, reducir el crecimiento de cristales de hielo y lactosa durante el almacenamiento y proporcionar resistencia a la fusión (Granger et al., 2005; Guo et al., 2018). No obstante, Okiyama et al., (1993) informaron que CB permitía conservar la forma de los helados durante 60 minutos a temperatura ambiente, mientras que el helado control sin CB se derritió completamente durante el mismo tiempo de estudio. Similarmente, Guo et al., (2018) evaluaron la influencia de compuestos de CB y proteínas de soja en el rango de proporciones entre 1:5 y 1:20 respectivamente como sustituto parcial o total de la grasa en un modelo de helado. Los autores reportaron que con un 20% del compuesto 1:20 añadido presentó una textura similar al helado regular con 30% de crema, así como también mejor resistencia al derretimiento.

En la actualidad existen diversas empresas en el mercado tales como *CPKelco*, *San-Ei Gen* y *Kusano Sakko Inc.* que generan alimentos en base a CB (Swazey et al., 2013). Originalmente, la empresa *CPKelco* produce comercialmente CB como agente espesante en forma de torta húmeda con una concentración de CB entre un 10-20% y co-agentes en forma de polvo compuestos por CB y XG, CMC, carragenina u otros agentes tensioactivos (Swazey, 2014). En consecuencia, pueden ser encontrados en mercado productos con el nombre comercial Axcel[®] PX, Axcel[®] CG-PX, Axcel[®] PG y Cellulon[™] PX (Swazey & Madison, 2010). Similarmente, la empresa *San-Ei Gen* produce comercialmente CB en forma líquida con el nombre comercial Sun Artist[®] aplicado como agente tensioactivo en diversas bebidas y alimentos líquidos (figura 3), demostrando una capacidad

de evitar la sedimentación de partículas durante un periodo prolongado como también resistencia al ácido, sal y calor (San Ei Gen, 2020). Finalmente, la empresa *Kusano Sakko Inc* se encuentran estudiando el uso de CB como agente espesante y estabilizador de emulsión en diferentes alimentos (Zhong, 2020).



Figura 3. Productos alimentarios que utilizan celulosa bacteriana como aditivos. (A): CB en forma de cubos obtenido mediante fermentación estática seguida de un proceso de corte; (B): CB comprimida obtenida mediante fermentación estática; (C): CB producida por Sun Artist® y utilizada para estabilizar la suspensión de diversos ingredientes alimenticios. (Obtenido de San-Ei Gen, 2022).

2.2.2 Biomedicina

La CB posee una elevada biocompatibilidad la cual es definida como la capacidad de un compuesto o sistema material para ser terapéuticamente activo una vez que se aplica a un receptor sin causar una respuesta adversa sistémica o local (Roman et al., 2019). En este sentido, CB ha sido señalado como un material apropiado para crear apósitos en el tratamiento de heridas debido a su elevada

efectividad en los ensayos de reducción de tetrazolio (MMT) utilizado para evaluar la citotoxicidad de un compuesto mediante la cuantificación de la actividad metabólica (Alavi, 2019). En particular, Calvacanti et al., (2017) demostraron que el uso *in vivo* de un apósito de CB para el tratamiento de úlceras venosas de la pierna durante 120 días no indujo ningún efecto adverso y disminuyó la profundidad general de la herida. Los autores infirieron que el apósito facilitó la remodelación de las capas dérmicas sin ninguna toxicidad en comparación con los apósitos de heridas convencionales. Si bien las biopelículas de CB no poseen propiedades antimicrobianas inherentes, la elevada porosidad y área superficial de la red reticulada 3D permiten su funcionalización con agentes antibacterianos, fármacos, y otros materiales biológicos funcionales (Buruaga-Ramiro et al., 2020). Lo anterior representa un factor diferenciador con respecto a los apósitos convencionales, siendo el 50% de las úlceras crónicas diabéticas son infectadas con agentes microbianos, lo que representa una de las causas más recurrentes en la prolongación del tiempo de cicatrización (Alevi et al., 2014). En este contexto, Vismara et al., (2019) reportaron un método de inmersión sencillo basado en la oxidación, esterificación y eterificación de los grupos hidroxilos activos C2, C3 y C6 presentes en la cadena de β -D-glucopiranososa de CB liofilizada para la incorporación de vancomicina y ciprofloxacina. De esta manera, se permite proporcionar bioactividad en apósitos para el tratamiento de heridas y andamios en ingeniería de tejidos. De igual manera, Volova et al., (2018) generaron materiales compuestos que contenían amikacina y ceftriaxona mediante la sumersión de películas secas de CB en diferentes concentraciones de antibióticos. Los autores reportaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Además, Lazarini et al., (2016) reportaron que las biopelículas CB sintetizadas en diferentes fuentes de carbono alternativo tales como melaza de caña de azúcar, jarabe y fructuosa, tenían la capacidad de retener y liberar lentamente el fármaco antimicrobiano ceftriaxona. Más aún, existen diversos estudios que utilizan compuestos de CB combinados con agentes inorgánicos tales como nanopartículas de metal tales como Ag (Ouay &

Stellacci, 2015; Pal et al., 2017), Au (Cui et al., 2012 ; Nisar et al., 2019), Cu (Bogdanovic et al., 2014; Shao et al., 2016) y Zn (Janpetch et al., 2017; Khalid et al., 2017) y óxidos de metal tales como TiO_2 (Khalid et al., 2017), ZnO (Luo et al., 2017) y Fe_3O_4 (Moniri et al., 2018) que reportan actividades antimicrobianas contra un amplio espectro de hongos, levaduras, bacterias gram negativas y gram positivas. Por otro lado, se reportan estudios del uso de nanomateriales de carbono en base al óxido de grafeno (OG) en donde Mohammadnejad et al., (2018) reportaron un nuevo compuesto de nanofibras de quitosano combinadas con CB y Ag a la cual fueron incorporadas nanoláminas de OG exhibiendo una elevada actividad antibacterial contra *E. coli* y *S. aureus* en dosis relativamente bajas. Existen diversos estudios que reportan la funcionalización de biopelículas de CB con otros compuestos tales como aquellos basados en nanosilicatos (Ul-Islam et al., 2013; Sajjad et al., 2019), polímeros naturales (Zhang et al., 2016; Li et al., 2020), curcumina (Gupta et al., 2020; Rojewska et al., 2017), aminoácidos (Fursatz et al., 2018) y compuestos sintéticos (De Mattos et al., 2020; Liu et al., 2020). En la figura 4 se evidencia el uso de CB como apósitos para el tratamiento de heridas crónicas por quemaduras (Islam et al., 2017).



Figura 4. Apósitos de CB utilizados en cara y torso para el tratamiento de heridas crónicas y quemaduras (Obtenido de Backdahl et al., 2006).

Por otro lado, las propiedades mecánicas de CB tales como su alta resistencia a la tracción, elasticidad y tasa de retención hídrica en conjunto con un bajo nivel de efectos citotóxicos e inducción de inflamación hacen de CB un material ideal para implantes quirúrgicos (Swingler et al., 2021). Un ejemplo de esto es el

desarrollo de corneas sintéticas en donde Han et al., (2020) demostraron que el compuesto de CB con acetato de polivinilo (PVA) exhibió propiedades ideales para su uso como estroma corneal al no presentar efectos citotóxicos contra líneas celulares de estroma corneal humano. Además, los autores reportaron que después de 4 semanas, los estudios *in vivo* posteriores al trasplante intraestromal en conejos demostraron permanecer transparentes, sin inflamación o sensibilización y con una mayor revascularización. Otro ejemplo es el desarrollo de injertos vasculares, donde Leitao et al., (2015) investigaron *in vivo* el uso de CB como injerto vascular de pequeño calibre mediante su aplicación en un bypass femoral homolateral porcina. Los autores confirmaron la presencia de vascularización con normalidad en el flujo sanguíneo, permeabilidad y células endoteliales CD31 tras la inserción del injerto después de un mes de estudio.

Por otro lado, la regeneración de tejidos es un campo de la medicina que se encuentra en la vanguardia de la investigación biotecnológica y se ha demostrado que la matriz intracelular de CB permite ser un soporte ideal para diversos tipos celulares (Swingler et al., 2021). Esta variedad de células cultivadas en matrices de CB incluyen tejido óseo, muscular, neuronal y cutáneo (Swingler et al., 2021). En este sentido, Roman et al., (2019) aprovecharon la alta porosidad de la matriz de CB para facilitar el crecimiento de cartílagos mediante la siembra de 1.6×10^5 células de condrocitos bovinos sobre CB en medio Eagle modificado de Dulbecco durante 12 horas a 37°C. Los autores reportaron mediante análisis con microscopio electrónico de barrido (SEM) la migración de los condrocitos hacia la matriz de CB, evidenciando diferenciación y fenotipos condrogénicos en las secreciones de la matriz cartilaginosa. Además, los estudios *in vivo* han demostrado que la suplementación de CB con alginato previo a la siembra con condrocitos nasoseptales humanos resultan en elevados niveles de crecimiento estable de células condrocitas (Torgbo & Sukyai, 2019). Dado el potencial de CB demostrado previamente, Mandour et al., (2019) desarrollaron un tratamiento novedoso para la reparación de la perforación de la membrana timpánica (MT) y la restauración del tímpano, utilizando parches de CB en reemplazo de la grasa

convencional o el injerto de membranas de *Fascia temporalis* (Rebelo et al., 2019). El estudio demostró que los parches de BC tuvieron éxito en el tratamiento de pacientes con perforación de TM, ya que hasta el 50% de los pacientes (n = 40) lograron una recuperación exitosa. Esto se puede atribuir a que el injerto de membrana CB tiene características similares a los injertos de grasa; en que se encontró que el espesor, la resistencia a la tracción y el módulo de Young de CB eran $10,33 \pm 0,58 \mu\text{m}$, $11,85 \pm 2,43 \text{ N/m}^2$ y $11,90 \pm 0,48 \text{ MPa}$ respectivamente (Kim et al., 2015). Estos valores coinciden con los requisitos y similitudes con los injertos convencionales, lo que destaca la implementación potencial para estandarizar el uso de CB en miringoplastias.

La CB bacteriana actualmente no se comercializa rutinariamente en el sector comercial de la salud como apósito de para heridas, a pesar de los diversos estudios que han demostrado con modificaciones apropiadas previas y posteriores a la biosíntesis, que mejoran las propiedades generales de la CB para cumplir con los requisitos específicos para esta aplicación tales como mayores propiedades antimicrobianas, la reepitelización de las heridas y tiempos de curación más cortos (Cielecka et al., 2019). Sin embargo, hay unos pocos fabricantes selectos, ubicados en Polonia, Brasil y Estados Unidos, que están explotando la celulosa bacteriana como material viable para vendajes para heridas (Cielecka et al., 2019). Lohmann & Rauscher han producido el único apósito para heridas de CB activado por fármacos mediante la incorporación de biguanida de polihexametileno (un desinfectante) en la estructura de celulosa con el nombre comercial Suprasorb® X+PHMB. Además, empresas como Biofill™ y Dermafill™ también han producido apósitos para heridas de CB como sustitutos temporales de la piel en el tratamiento de quemaduras y úlceras en pacientes, afirmando que, tras su aplicación, los apósitos proporcionaron el cese inmediato de algunos dolores y malestares. También se han desarrollado injertos/implantes dentales con propiedades bioactivas, por ejemplo, Gengiflex®, que reduce la inflamación y el dolor después de la cirugía dental y fomenta el crecimiento de los tejidos periodontales. Otros ejemplos de apósitos para heridas y sus

aplicaciones incluyen productos de la empresa Vuelo Pharma con su producto Membracel® destinado a ser utilizado como piel temporal en el tratamiento de úlceras y laceraciones venosas de las piernas. Otro ejemplo es la Corporación Xylos , la cual desarrolló el producto xCell® para el tratamiento de úlceras venosas de la pierna con la actividad añadida de acelerar la granulación y el desbridamiento autolítico del tejido necrótico. Innovatec produjo Nanoskin®, producto que es capaz de reemplazar vasos sanguíneos y linfáticos, tratar abrasiones y epidermólisis ampollosa (Chiaoprakobkij et al., 2019). Finalmente, la empresa sueca S2Medical AB comenzó con la producción a gran escala de apósitos para heridas de CB bajo la marca EpiProtect®. El objetivo principal de este apósito era para el tratamiento de heridas por quemaduras demostrando que la curación completa de las quemaduras de primer y segundo grado se completaban después de 28 días de vendaje continuo con el producto, en comparación con los 32 días con sulfadiazina de plata y gasa (Cielecka et al., 2019).

2.2.3 Industria textil

En la actualidad, la industria textil representa una de las más contaminantes y que mayor cantidad recursos consume globalmente (Pal, 2017). Los principales impactos derivan de la emisión de compuestos contaminantes, así como el alto consumo de agua, energía y productos químicos, en donde se estimado que se requieren entre 1.5 – 6.9 kg de productos químicos para producir 1 kg de prendas de vestir (Roos, 2016). Similarmente, se estima que para la producción de un par de botas de cuero de origen animal son requeridos 50 m² de suelo y 25.000 litros de agua (García & Prieto, 2019). Por lo tanto, existe una creciente concienciación sobre el impacto ambiental orientado hacia la búsqueda de nuevos materiales sostenibles (Mohamed et al., 2019). En este sentido, los avances de la biotecnología en áreas como el estudio del metabolismo de los microorganismos, sistemas para la expresión heterológica de proteínas y producción de polisacáridos extracelulares han promovido el desarrollo de textiles fabricados a

partir de microorganismos (Mazotto et al., 2021). La biofabricación tiene ventajas sobre otras tecnologías de producción ya que no requieren la extracción de compuestos interferentes tales como lignina, hemicelulosas, ceras y pectinas, utilizando a su vez menor cantidad de productos químicos, agua y energía (Mazotto, et al., 2021).

En las últimas décadas, la empresa Biocouture ha promovido el uso de CB en la manufactura de prendas de vestir y calzados con textura similar al cuero de origen animal mediante la producción artesanal de CB mediante fermentación estática de té de *Kombucha* (Laa-vanya et al., 2021). Similarmente, la empresa ScobyTec desarrolló una alternativa vegana al cuero hecho de BC producido a partir de kombucha, que se utilizó para fabricar varios productos como guantes, zapatos para niños y bolsos de negocios. El material, denominado ScobyTec BNC, posee una alta resistencia mecánica y no es inflamable (Material District, 2022). A nivel nacional, la empresa Simbionet desarrolla nuevos compuestos en base a CB mediante la marca comercial T-Simbionet para la generación de diversos productos biotextiles, packaging y apósitos médicos (Simbionet, 2022). No obstante, la humectabilidad inherente y capacidad de absorción de CB representan la principal brecha para la fabricación de prendas (García & Prieto, 2018). Por lo tanto, existe la necesidad de generar biopelículas de CB hidrofóbicas con el fin de aumentar su aplicación en la generación de prendas de vestir, textiles impermeables resistente a aceites, entre otros (Araujo et al., 2015; Song & Kim, 2019). En este sentido, Fernandes et al., 2019 investigaron la producción de nanocompuestos en base a CB maleable, transpirables e impermeables al agua mediante la impregnación de CB con dos polímeros hidrófobos comerciales utilizados en el acabado textil convencional; polidimetilsiloxano (Persoftal MS) y perfluorocarbono (Baygard EFN). Los autores reportaron un aumento en el ángulo de contacto del agua con la superficie de CB desde $\approx 63.8^\circ$ hasta $\approx 105^\circ$ tras la incorporación de los polímeros, indicando un aumento en la hidrofobicidad del nanocompuesto. Similarmente, Indriyati et al., (2020) investigaron la producción de compuestos de CB incorporados con cera

de abejas con el objetivo de mejorar la hidrofobicidad y la elasticidad. Los autores reportaron una mejora significativa de la hidrofobicidad de CB mediante la medición del ángulo de contacto desde 54° hasta 124° tras la adición de un 40% p/p de cera de abeja. De igual manera, las pruebas de tracción evidenciaron que la elasticidad de las películas aumentó un 38% mientras que la resistencia a la tracción disminuye un 25% aproximadamente.

2.3 Métodos de producción de CB

A pesar del potencial de mercado de la CB, los métodos de producción convencional implican un elevado costo y poseen bajos rendimientos productivos, lo cual limita su uso como alternativa a la celulosa vegetal.

En la industria existen dos métodos de producción de CB; el cultivo estático y agitado, cuya selección tiene una incidencia directa en la estructura macroscópica (figura 5) y en las propiedades del biopolímero (Wang et al., 2019). Al respecto, la CB generada en cultivos estáticos posee un menor grado de polimerización y cristalinidad respecto al cultivo agitado, además de una mayor resistencia a la tracción en comparación con cultivos agitados pero menor retención de agua (Krystynowicz et al., 2002). Los métodos de cultivo, sus ventajas y desventajas se detallan a continuación:

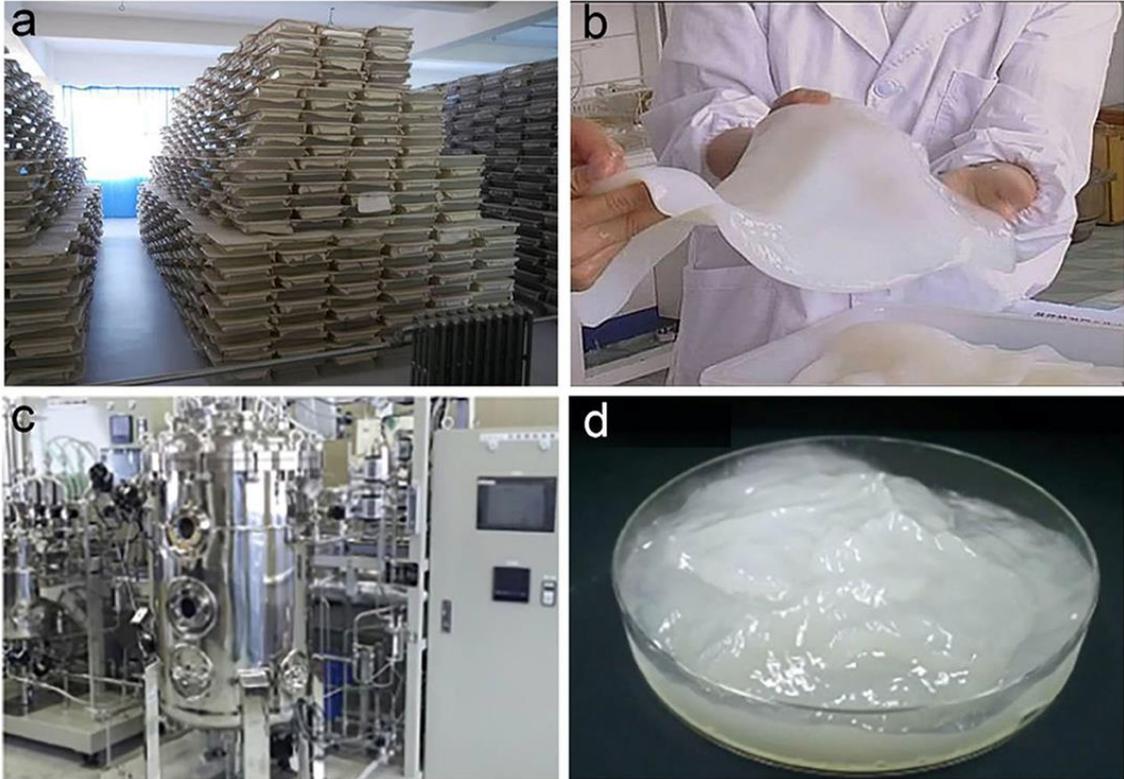


Figura 5. Producción industrial de celulosa bacteriana mediante fermentación estática y agitada. (A): Fermentación estática en bandejas; (B): Biopelícula de celulosa bacteriana purificada (Yeguo Foods Co., Ltda 2022); (C): Fermentación en un biorreactor agitado; (D): Suspensión de celulosa bacteriana recuperada del caldo de cultivo (Kusano Sakko Inc, 2022).

2.3.1 Cultivo estático

Es el principal método de producción utilizado y resulta en la formación de biopelículas lisas y uniformes de celulosa superpuestas en la interfaz aire-líquido del caldo de cultivo (Dobre et al., 2008; Rani & Appaiah, 2011; Islam et al., 2017). El motivo de su uso radica en la compatibilidad de la morfología obtenida como película y en aplicaciones que requieran estructuras fijas, resistencia a la tracción y capacidad de retención de agua, como apósitos para heridas y máscaras faciales (Zhong, 2020). Si bien las cepas cultivadas estáticamente poseen una mayor estabilidad genética para producir celulosa bacteriana, al ser un proceso aeróbico el rendimiento productivo respecto a la densidad celular total presente

es bajo, ya que sólo las células superficiales son aquellas que mayoritariamente producen celulosa bacteriana al estar en contacto directo con el oxígeno (Ul-Islam et al., 2015). Esta característica conduce a que el método sea dependiente de la superficie del recipiente de fermentación sin ser afectado por el volumen y profundidad del medio nutritivo (Hsieh et al., 2016; Zywicka et al., 2015). Lo anterior dificulta el escalamiento y aumenta el costo al requerirse mayor cantidad de bandejas para aumentar la producción (Figura 5A). Por otro lado, la tasa de duplicación descrito es de 8-10 horas y la producción se detiene una vez alcanzado un cierto espesor asociado al consumo de nutrientes en la zona superior y la falta de oxígeno en la zona inferior (Hsieh et al., 2016).

2.3.2 Cultivo agitado

La principal ventaja de este método es la capacidad de producir una mayor concentración celular en el medio de cultivo y en un menor tiempo respecto al método estático ya que el suministro de oxígeno y nutrientes es más eficiente (Zywicka et al., 2015). La CB producida a través de esta modalidad posee una morfología que incluye suspensiones fibrosas, gránulos, esferas o masas irregulares no limitadas a la interfaz aire-liquido (Hsieh et al., 2016; Krystynowicz et al., 2002). Sin embargo, este método usualmente conduce a un aumento de la viscosidad del caldo de cultivo en el tiempo impidiendo la difusión del oxígeno en el medio nutritivo. Asimismo, esto causa la acumulación de subproductos tales como ácido glucónico, ácido acético y ácido láctico que disminuyen el pH del medio por debajo del óptimo para el crecimiento bacteriano y la producción de BC. (Islam et al., 2017).

Por otro lado, en cultivos agitados se ha reportado la aparición y rápida expansión de células mutantes no productoras de BC, disminuyendo gradualmente el rendimiento productivo. Por ejemplo, Sani & Dahman (2009) reportaron la aparición de células mutantes a las 92 horas en cultivos agitados tipo fed-batch. Este fenómeno es un limitante si se considera escalar el proceso y la generación continua de un bioproceso en el tiempo.

2.4 Microbiología de la producción de CB

Las bacterias productoras de CB se encuentran naturalmente en el suelo, donde convierten diversas fuentes de carbohidratos en ácido acético aeróbicamente (Raghavendran et al., 2020). La biosíntesis de CB puede ser dividida en dos etapas principales; i) la polimerización intracelular de las moléculas de glucosa en polímeros de CB y ii) el autoensamblaje de cadenas de polímeros de CB en nanofibras cristalinas (figura 6) (Czaja et al., 2006). Específicamente, la síntesis bioquímica de CB ocurre al interior de la bacteria en donde comúnmente ocurren cuatro reacciones catalizadas por enzimas i) una molécula de glucosa es convertida a glucosa 6-fosfato (Glucosa 6-P) mediante la enzima glucoquinasa; ii) la molécula de glucosa 6-P se isomeriza en glucosa 1-fosfato (glucosa 1-P) mediante la enzima fosfoglucomutasa; iii) la molécula glucosa 1-P reacciona con uridina trifosfato (UTP) para generar glucosa uridina difosfato (UDP-glucosa) catalizado mediante UDP-glucosa pirofosforilasa; iv) la molécula de UDP-glucosa es finalmente polimerizado en cadenas lineales de β -1,4 glucano mediante la enzima celulosa sintasa (figura 6) (Zhong, 2020). Si se utilizan otros tipos de fuentes de carbono para la producción de CB, como los disacáridos, en primer lugar, se hidrolizan en monosacáridos, como la glucosa y la fructosa (Mohammadkazemi et al., 2015) Si es utilizada fructuosa como fuente de carbono, esta es convertida a fructosa 1-fosfato (fructosa 1-P) hasta glucosa 6-P a través de una serie de reacciones químicas descrita en figura 6. Posterior a la polimerización intracelular, las bacterias expulsan las cadenas de polímero de CB fuera de la membrana celular, seguido de un proceso de autoensamblaje impulsado por la fuerza de van der Waals y los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares entre los grupos hidroxilo y los átomos de oxígeno las unidades de anhidroglucosa.

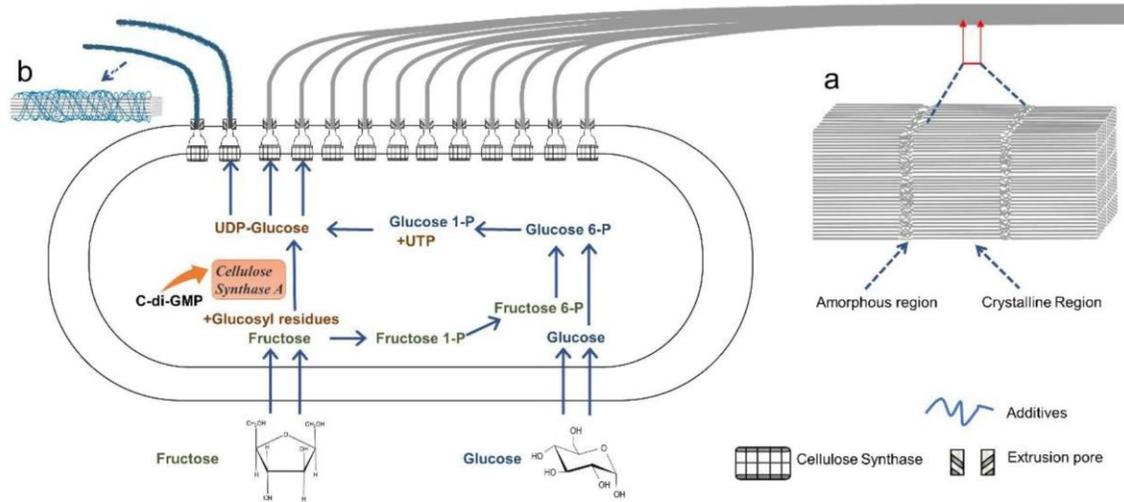


Figura 6. Esquema general de la biosíntesis intracelular de moléculas de CB y autoensamblaje extracelular de cadenas de CB en nanofibras. A. Producción de celulosa tipo I; polímero con forma microfibrilar. B. Producción de celulosa tipo II; polímero amorfo.

Algunas bacterias tales como *Komagataibacter xylinus* contiene entre 50-80 complejos proteicos transmembrana denominados complejos terminales (CT) los cuales se alinean a lo largo del eje longitudinal de la célula bacteriana (Kimura et al., 2001; Krasteva et al., 2017). Desde los CT's, las cadenas de polímero de CB se esparcen y luego se autoensamblan en nanofibras semicristalinas. En detalle, este proceso consta de dos etapas; i) las moléculas de CB extruidas desde el mismo poro de extrusión primero se ensamblan en una única nanofibra elemental de diámetro 1.5 nm; ii) Las nanofibras elementales se ensamblan en una nanofibra en forma de cinta con un grosor entre 3-4 nm y un ancho de 70-80 nm en la sección transversal las cuales se entretajan en una red reticulada tridimensional hasta conformar una biopelícula gelatinosa con hasta un 90% de regiones cristalinas (Portela et al., 2019; Sijabat et al., 2020). Las estructuras cristalinas poseen diferentes poliformismos incluyendo CB tipo I, II, III y IV (O'Sullivan, 1997). Entre estas, la CB tipo I puede ser encontrada principalmente en la naturaleza (Moon et al., 2011). A su vez, CB tipo I posee dos tipos de estructuras cristalinas; triclinica y monoclinica. Está demostrado que triclinica puede convertirse irreversiblemente en monoclinica mediante un tratamiento

térmico en solución alcalina, sugiriendo así que monoclinica posee una termodinámica relativamente inferior (Watanabe et al., 2007; Kose et al., 2011). Además, Además, la unión de hidrógeno en la celulosa triclinica y monoclinica es diferente, lo que debería atribuirse a las diferencias en su estabilidad termodinámica y sus propiedades mecánicas. En la naturaleza, ambos alomorfos coexisten en diferentes proporciones según la especie biológica, predominando triclinica en bacterias por sobre monoclinica (VanderHart and Atalla, 1984; Drahusuk et al., 1997). No obstante, las proporciones de triclinica en bacterias también es dependiente de la especie bacteriana y factores de temperatura, agitación y aditivos en el medio de cultivo (Yamamoto and Horn, 1994; Kose et al., 2011).

2.4.1 *Komagateibacter xylinus*

K. xylinus es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*, con metabolismo aeróbico estricto que realiza fermentación oxidativa a partir de diversos tipos de azúcares, alcoholes y otros sustratos orgánicos. Estas se encuentran en frutas y verduras en proceso de descomposición siendo capaz de sintetizar celulosa como parte de su actividad metabólica normal (Chávez-Pacheco, 2004). Este microorganismo con forma de varilla (figura 7) se caracteriza por su tamaño que varía entre 0.6-0.8 μm de ancho y 1-4 μm de largo (Verschuren, 1999). *K. xylinus* produce celulosa bacteriana en la interfase aire-líquido en cultivos estáticos. Es un microorganismo acidófilo y el pH adecuado para el crecimiento bacteriano óptimo fluctúa entre 5.4-6.3 (Tantratian et al., 2005). Además, es un microorganismo mesófilo con temperatura de crecimiento óptima entre 25-30°C.



Figura 7. *K. xylinus* bajo microscopio electrónico.

Esta bacteria es una de las especies más estudiadas debido a su elevada capacidad para producir CB de alta pureza a partir de una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno en cultivos líquidos (Zhong et al., 2013). Mediante el uso de glucosa marcada radioactivamente, se demostró que *K. xylinus* es capaz de sintetizar CB con hasta un 80% de la glucosa suministrada exógenamente (Hestrin & Schramm, 1954). Por esto, se ha convertido en la cepa más utilizada en aplicaciones de diversas industrias productivas (Shah et al., 2005; Fabra et al., 2016; Czaja et al., 2006; Yin et al., 2014). En la tabla 2 se resumen algunos estudios relevantes en bacterias del género *Komagataibacter* sp. en la producción de celulosa bacteriana para ambas modalidades de cultivo.

Tabla 2. Producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos y agitados en diversas cepas del género *Komagataibacter* spp.

Cepa	Fuente de carbono	Suplemento de nutrientes	Periodo (días)	Productividad (g/L*d)	Método de cultivo	Referencia
<i>G. hanseni</i> i PJK (KCTC 10505 BP)	Desechos cerveceros	-	14	0,61	Estático	Ha et al., 2008

<i>G. hanseni i PJK (KCTC 10505 BP)</i>	Glucosa	Ácido glucurónico	10	0,74	Estático	Ha et al., 2011
<i>G. xylinus Tricoderma Reesei</i>	Glucosa	Lodos de fibra	14	0,44	Estático	Cavka et al., 2013
<i>G. xylinus (IFO 13773)</i>	Melaza de caña de azúcar	-	7	0,83	Estático	Keshk et al., 2011
<i>G. persimmonis (GH-2)</i>	Glucosa	Fructosa, peptona	14	0,36	Estático	Hungund et al., 2013
<i>G. medellensis</i>	Glucosa	-	14	0,32	Estático	Castro et al., 2012
<i>G. xylinus (ATCC 53524)</i>	Sucrosa	-	4	0,95	Estático	Mikkelsen et al., 2009
<i>G. xylinus (K3)</i>	Manitol	Té verde	7	0,47	Estático	Nguyen et al., 2008
<i>G. xylinus (BRP20 01)</i>	Melaza de caña de azúcar	-	3	2,6	Agitado	Bae et al., 2004
<i>G. xylinus</i>	CSL-Fructuosa	Alginato, agar, carboximetilcelulosa	5	1,42	Agitado	Cheng et al., 2006
<i>G. xylinus (RKY5)</i>	Glicerol	-	6	0,93	Agitado	Kim et al., 2006
<i>G. Hanseni i PJK (KCTC 10505 BP)</i>	Glucosa	Etanol	3	0,83	Agitado	Park et al., 2003

2.5 Biorreactor de disco rotatorio como tecnología de producción de celulosa bacteriana

El BDR es un reactor de biopelículas y ha sido utilizado para incrementar el rendimiento productivo de CB (Soleimani et al., 2021). Estos sistemas contemplan una serie de discos planos o corrugados semisumergidos montados horizontalmente en un mismo eje central giratorio conectado a un motor mecánico externo. Durante la rotación continua, las superficies de los discos se alternan entre un periodo de exposición a una fase líquida de nutrientes y a otra fase aérea (Islam et al., 2017). Específicamente, un estudio realizado por Choi & Morgenroth (2003) reportó que el desprendimiento de biopelículas es favorecido cuando los efectos de cizallamiento producto de la operación de reactores a altas velocidades de agitación aumentan gradualmente hasta el punto en donde la fuerza interna de la matriz no permite mantenerse adherida a un sustrato. No obstante, Kim et al., (2007) reportaron la considerable disminución de los efectos de cizallamiento generados en BDR al operar con velocidades significativamente inferiores con respecto a los cultivos agitados. De esta manera, estos sistemas facilitan la adhesión de las bacterias a los discos permitiendo el crecimiento de películas y la obtención nutrientes y oxígeno en forma altamente eficiente (Islam et al., 2017). Lo anterior se evidencia en el estudio realizado por Serafica et al., (2002) quienes reportaron una reducción del tiempo de producción de CB hasta 5 días con respecto a los cultivos estáticos. No obstante, en la actualidad no existen empresas tecnológicas que utilicen esta tecnología para la producción de CB. Por tanto, no existen sistemas experimentales en literatura que permitan el control multivariable y el muestreo en tiempo real para la optimización operacional de estos sistemas que permitan la búsqueda de las condiciones de escalamiento óptimas para viabilizar un negocio (Lin et al., 2014). En la tabla 3 son resumidas las investigaciones realizadas hasta la actualidad.

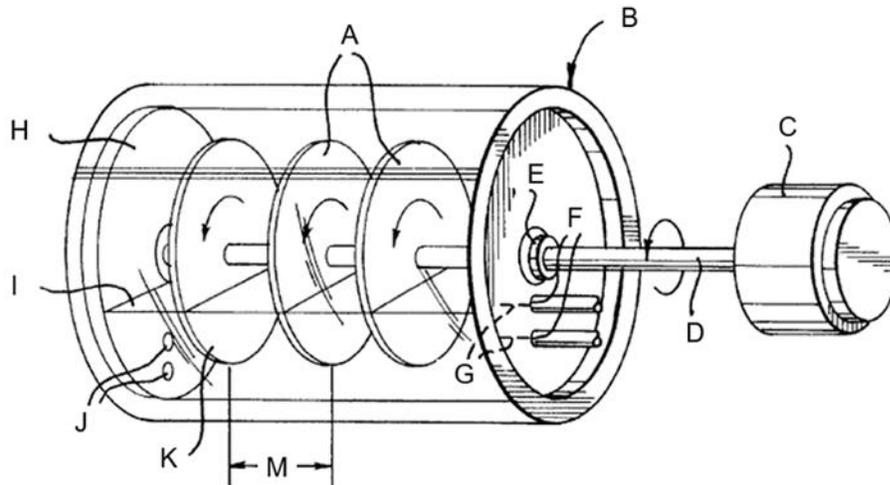


Figura 8. Esquema general de sistemas BDR. (A): Disco, (B): Envase cilíndrico, (C): Motor de rotación, (D): Eje horizontal, (E): Cojinete de cierre hermético, (F): Apertura de fijación, (G): Sensores, (H): Canal del cilindro, (I): Medio de cultivo, (J): Toma de muestra, (K): Velocidad de agitación y (M): Distancia entre discos (Obtenido de Bungay et al., 1999. PA: US595532A) (Obtenido desde Bungay & Serafica, 1999)

Tabla 3. Resumen de estudios previos en BDR.

Autor/Año	Estudio	Resumen
Bungay & Serafica (1999)	Producción de celulosa microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Se informa la patente con el diseño básico y las condiciones de funcionamiento del biorreactor de película de discos giratorios. • Especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta: Estructura cilíndrica para disminuir el medio utilizado en la fermentación. • Discos: 80-90% del tamaño del reactor preferentemente con espacios entre discos lo más pequeño posible maximizando el número de discos. • Condiciones operacionales: <ul style="list-style-type: none"> • Rpm: Según el diámetro de los discos; preferentemente de 1 a 2 veces el diámetro de los discos. • Concentración inicial de carbono: 0.5-100 g/L.

		<ul style="list-style-type: none"> • pH: 3-6. • Temperatura: 25-35°C. • Suministro de oxígeno: 21-100%.
Krystynowicz et al., (2002)	Factores que afectan al rendimiento y propiedades de celulosa microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Se realizan estudios para encontrar las condiciones óptimas de cultivo para la producción efectiva de BC. • Se incluyen estudios del efecto de la velocidad de rotación, superficie, uso del medio y concentración inicial de glucosa. • Resultados: Valores óptimos <ul style="list-style-type: none"> • Rpm: 6 • Medio de cultivo: Shigeru Yamanaka • Número de discos: 24 • Glucosa inicial: 20 g/L. • Sin especificaciones estructurales.
Serafica et al., (2002)	Inclusión de partículas sólidas en celulosa bacteriana	<ul style="list-style-type: none"> • Se realiza estudios sobre la producción de nuevos materiales compuestos a partir de BC mediante la inclusión de partículas sólidas durante la formación. • Partículas añadidas: Aluminio, hierro, gel de sílice, perlas de vidrio. • Resultados: <ul style="list-style-type: none"> • Las perlas de vidrio y el gel de sílice obtuvieron mejor incorporación a BC. • Especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta: Estructura cilíndrica de plástico transparente, D: 15,3 cm. • Discos: Polietileno • Motor: 1-100 rpm • Eje: acero inoxidable • Rpm: 12
Kim et al., (2007)	Celulosa bacteriana producida por <i>Gluconacetobacter</i> sp. RKY5 en BDR	<ul style="list-style-type: none"> • Se realiza estudio para optimizar la producción de BC en un biorreactor tipo BDR. • Se incluyen efectos de la velocidad de rotación, número de discos y tasa de aireación. • Resultados: Valores óptimos <ul style="list-style-type: none"> • Rpm: 15 • Numero de discos: 8 • Tasa de aireación: 1.25 vvm • Especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta: pirex

		<ul style="list-style-type: none"> • Disco: Polipropileno, D: 12 cm, 34% de sumersión, área superficial 226.2 cm², área activa superficial 221.1 cm². • Velocidad de rotación: 15-35 rpm.
Pa'e et al., (2011)	Producción de biopolímeros a partir de <i>Acetobacter xilinum</i> usando diferentes métodos de fermentación.	<ul style="list-style-type: none"> • Se realiza un estudio para comparar la producción de BC mediante el uso de un biorreactor BDR respecto a la fermentación estática convencional. • Resultados: Valores óptimos <ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento: 5.41 g/L (BDR) y 1.04 g/L (estático). • Variación: (+) 80.7% • Rpm: 7 • pH: 5 • Especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta: Estructura cilíndrica de Poli (metil metacrilato) de 2 litros con 1 litro de volumen de trabajo. • Eje: Acero inoxidable • Discos: Acero inoxidable con mallas de 0.3 cm, D:7 cm, espesor: 1 mm, 39% de sumersión, área superficial 77 cm², área activa superficial 71.9 cm², número de discos: 8 • Condiciones operacionales: <ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de rotación: 7-14 rpm • Motor: 18W • Tiempo de fermentación: 5 días. • pH: 4-6 • Temperatura: Ambiente.
Soleimani, et al., 2021	Diseño, construcción y optimización de contactor biológico rotativo flexible a escala de laboratorio para mejorar la producción de celulosa mediante <i>Acetobacter xylinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Se diseña y construye un biorreactor BDR a escala de laboratorio y se evalúa el efecto de la velocidad de rotación, distancia entre discos, materialidad del disco, y aireación externa en la productividad de BC. • Resultados: Valores óptimos <ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento: 6.17 g/L (71% de incremento respecto a fermentación estática). • 1.25 vvm • Material: polietileno • 13 rpm

		<ul style="list-style-type: none"> • Distancia entre discos :1.5 cm • N° de discos: 16 unidades • Especificaciones: <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta: Estructura rectangular de plexiglás con volumen total de 6.75 litros. • Discos: Polietileno, D:13.5 cm, espesor 0.3 cm, área activa superficial 140.5 cm²
--	--	---

Los BDR crean turbulencias que favorecen el mezclamiento y ofrecen una gran superficie para lograr un mayor contacto entre el aire y la biopelícula adherida. Estas ventajas, junto con su bajo consumo de energía, bajo costo de mantenimiento, operación y diseño compacto, hacen del BDR un sistema prometedor y ambientalmente compatible para la producción de CB (Padhi & Gokhale, 2014). En la tabla 4, se resumen algunos ejemplos reportados en literatura.

Tabla 4. Producción de celulosa bacteriana y características operacionales en sistemas BDR

Productividad (g/L* d)	N° discos	Velocidad de rotación (rpm)	Tiempo de cultivo (d)	Material del disco	Referencia
1,54	8	15	4	Polipropileno	Kim et al., 2007
3,01	16	13	7	Polietileno	Soleimani et al., 2021
0,82	24	4	4	-	Krystynowicz et al., 2002
0,24	3	5	5	Plástico	Lin et al., 2014

Es conocido que el crecimiento de los microorganismos en la operación de BDRs es afectado por diversos parámetros operacionales tales como velocidad de rotación, porcentaje de inmersión del disco, distancia entre los discos, materialidad del disco, pH, temperatura y oxígeno (Najafpour et al., 2006). Así mismo, la alta complejidad del metabolismo bacteriano a menudo implica cinéticas formación de productos no lineales en el tiempo. En consecuencia, la

investigación en bioprocesos puede contribuir a mejorar las herramientas para el control eficiente sobre las numerosas variables internas, entradas y salidas que pueden influir en la calidad y el rendimiento productivo de la CB (Caramihai & Severin, 2013).

2.6 Modelación de la fermentación de *K. xylinus* en BDR

El modelamiento en el campo de los bioprocesos es de gran importancia en el sector bioindustrial ya que facilita la comprensión de procesos complejos donde intervienen múltiples variables de operación. Por lo tanto, el uso de herramientas de modelación permite diseñar bioprocesos de alto rendimiento, optimizar operaciones, aumentar productividades y reducir costos (Velayudhan & Menón, 2007; Ji, 2012; Mandenius & Brundin, 2008).

En el caso de *K. xylinus*, se han publicado diversos estudios que modelan el comportamiento cinético de la bacteria con el objetivo de optimizar la producción de CB. Por ejemplo, Dissanayake & Ismail (2013) reportaron el modelamiento de la producción de CB en fermentaciones tipo batch de *K. xylinus*. En este estudio se asumieron los siguientes supuestos; biopelícula inerte, el microorganismo únicamente consume el oxígeno disuelto, las reacciones metabólicas dependen de un único reactivo limitante, se genera una solución ideal, densidad constante y la producción de celulosa bacteriana se ve alterada ante el aumento de la turbulencia del sistema. El modelo predictivo generado mediante el software *AQUASIM* obtuvo un 97 % de precisión en el rendimiento productivo de celulosa bacteriana respecto a los data experimental obtenida en la investigación. Por su parte, Bagherniya et al., (2021) reportaron el modelamiento de la producción de CB mediante el uso de modelos empíricos basado en ecuaciones cuadráticas polinómicas y la metodología de superficie de respuesta. Estos autores evaluaron experimentalmente el efecto de tres factores con tres niveles diferentes sobre la producción de celulosa bacteriana: agitación (10, 13 y 16 rpm), aireación (0.2, 0.5 y 0.8 vvm) y distancia entre discos (1.5, 2 y 2.5 cm). El modelo predictivo generado mediante el software *Design-Expert 7.0* permitió obtener la

combinación de factores óptima capaz de alcanzar un rendimiento de 11.65 g/L de celulosa bacteriana.

Sin embargo, estos modelos no contemplan los fenómenos específicos que ocurren en la transferencia de oxígeno, siendo este uno de los factores más relevantes a considerar al momento de caracterizar el comportamiento cinético de un bioproceso. En sistemas de tipo BDR, el oxígeno es transferido desde aire a la unidad de tres maneras: (i) absorción de oxígeno en la partícula líquida sobre la superficie de la biopelícula cuando esta se encuentra en la fase aérea, (ii) transferencia directa de oxígeno en la interfase aire-agua y (iii) por absorción directa de oxígeno por los microorganismos durante las exposiciones al aire (Grady, 1982). A raíz de lo anterior, se han desarrollado diferentes modelos matemáticos para la estimación de KLa en reactores BDR. Estos se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Modelos propuestos para la caracterización del coeficiente de transferencia de oxígeno KLa en sistemas BDR.

Nombre	Modelo	Nomenclatura
Kim & Molof, 1982	$KLa = 0.011 \left(\frac{\omega^{1.5} D^{0.5}}{d} \right)^{0.732}$	w= Velocidad de rotación D= Diámetro disco d= Distancia entre discos
Kubsad et al., 2004	$KLa = 0.01315 \left(\frac{1.697An\omega^{1.5}D^{0.5}}{V} \right)^{0.73778}$	A= Área del disco expuesto al aire n= Número de discos w= Velocidad de rotación D= Diámetro del disco V= Volumen de trabajo reactor
Chavan & Mukherji, 2008		D= Diámetro del disco Ad= Área del disco ρ = Densidad del líquido

	$KLa = \left(\frac{D}{Ad^{0.5}}\right)^\psi \left(\frac{\rho Ad \omega}{\mu}\right)^\varepsilon \left(\frac{Ad}{At}\right)^\theta \left(\frac{\delta}{Ad^{0.5}}\right)^\gamma \left(\frac{\mu}{\rho Ad}\right)^\lambda$	w= Velocidad de rotación μ= Viscosidad del líquido At= Área transversal del tanque δ= Espesor de biopelícula V= Volumen de trabajo reactor ψ ε θ λ= Coef. De ajuste
Palma & Verdone, 2009	$KLa = 134.07 \omega^{1.5} C^{0.5} \left(\frac{2.15}{\omega} + 0.006\right)$	w= Velocidad de rotación C= Reducción de la tasa de remoción de carbono en condiciones limitantes (%)

Es posible constatar a partir de la revisión de literatura que no existen modelos cinéticos que integren los fenómenos biológicos y físicos para describir la fermentación de *K. xylinus* y la producción de CB en sistemas BDR. Por este motivo, la investigación realizada apunta a innovar mediante una nueva propuesta tecnológica basada en BDR y una propuesta de simulación para la producción de CB que permita generar las condiciones de estudio necesarias para viabilizar un modelo de negocio basado en la producción y comercialización de CB en los principales sectores productivos identificados como prioritarios.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

El presente capítulo describe las metodologías empleadas en la investigación en el contexto de tres secciones: (i) Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio. (ii) Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica. (iii) Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.

3.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio.

3.1.1 Diseño y construcción del prototipo experimental

El diseño del biorreactor se realizó utilizando el software AutoCAD 360 versión 2022 (figura 8), tomando como base el trabajo publicado por Soleimani et al., (2021). Las especificaciones de diseño están descritas en la sección 5.1 y fueron entregadas a la empresa subcontratista Sermepeval para su construcción. A continuación, se presenta a modo de ejemplo un plano con el diseño conceptual de BDR (figura 9).

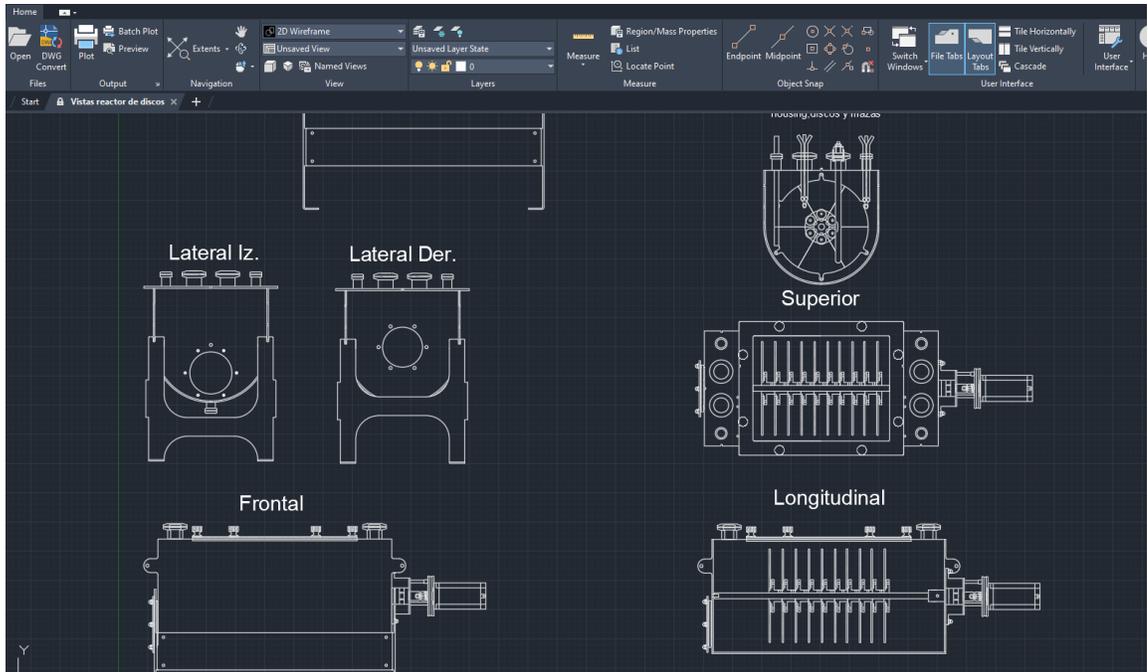


Figura 9. Planilla de diseño del borrador del prototipo del sistema BDR mediante software AutoCAD 360 versión 2022.

El modelo propuesto otorga ventajas operacionales en relación con el sistema publicado originalmente, ya que incorpora nuevas funcionalidades descritas en la tabla 6:

Tabla 6. Ventajas de diseño del modelo BDR propuesto.

Ventaja	Funcionalidad
Versatilidad de componentes	Permite diversificar la disposición y uso de componentes críticos tales como: (i) Ubicación y número de sensores de medición (ii) Número y distancia entre discos en el eje rotatorio (iii) Ubicación de la inyección de aire, buffers y medios de cultivo y (iv) Toma de muestra.
Variabilidad de operar	Permite operar para fermentaciones aeróbicas y anaeróbicas mediante por lotes, fed-batch y continuo.
Facilidad de estudio de parámetros críticos	Permite el estudio simultáneo de diversos parámetros críticos tales como pH, temperatura, velocidad de agitación y tiempo de cultivo. De esta

	manera, se permite simular condiciones para escalar la producción de CB.
Resistencia de material y posibilidad de esterilización	Alta resistencia del material permite esterilizar estructura y componentes mediante el uso de autoclave.

3.1.2 Diseño del proceso de producción de CB en el sistema BDR.

Con el objetivo de generar un proceso productivo de CB mediante el prototipo experimental a escala de laboratorio, se identificaron las etapas principales, procesos fundamentales para la fermentación de microorganismos aeróbicos y equipos requeridos para la operación, monitoreo y logísticas de control. Estas se encuentran descritas en las figuras 17 y 18 de la sección 4.1.2.

3.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.

3.2.1 Definición de una estrategia de vigilancia tecnológica.

Para la correcta y eficiente captura de información, se generó un plan de búsqueda sistemática para la identificación y análisis de información útil en la toma de decisiones mediante el uso de herramientas de vigilancia tecnológica, particularmente del **Observatorio Virtual de Transferencia de Tecnología (OVTT)**, Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) y metabuscadores especializados. De esta manera, se buscó orientar el análisis con foco en la inteligencia competitiva del mercado de CB.

Existe un consenso generalizado sobre las etapas que ha de seguir el proceso de vigilancia e inteligencia tecnológica, denominado ciclo de vigilancia e inteligencia. A continuación, se describen las etapas implementadas en esta investigación de vigilancia tecnológica:

a. Identificación:

Se determinaron las necesidades de información, las tecnologías a vigilar y los Factores Críticos de Vigilancia (FCV) necesarios para diseñar una estrategia

eficaz para cada caso. Estos constituyen técnicas estratégicas para la formulación de prioridades.

- FCV sobre decisiones estratégicas: referidos a cuestiones estratégicas para las organizaciones, sobre todo relativas a la planificación estratégica y su implementación (ej. política de I+D+i, planes de negocio, otros).
- FCV sobre señales tempranas: capaces de identificar potenciales amenazas y oportunidades futuras para la organización (ej. tendencias, nuevas tecnologías, cambios legislativos, nichos de mercado, etc.).
- FCV sobre actores clave: relativos al seguimiento de actores clave en el mercado (ej. competidores, clientes, proveedores, socios, reguladores, tomadores de decisiones públicas, etc.)

b. Búsqueda:

Se definieron los objetivos de la búsqueda de información y se elabora la estrategia para precisar las necesidades, localizar la información y capturarla de una manera organizada. Esto implicó la identificación de palabras claves, validación de expertos, selección de fuentes de información relevantes, formulación de ecuación de búsqueda y elaboración del corpus o registros realizados.

Esta etapa requiere combinar conocimientos en monitorización de información, capacidad de análisis crítico y habilidades técnicas para el manejo eficiente de herramientas informáticas, así como aprender y desarrollar competencias digitales de apoyo para gestionar la infoxicación o sobreinformación que emerge con Internet. Entre los más relevantes se encuentran patentes y resultados de investigación, lo cual fue abarcado en la estrategia de vigilancia del presente estudio.

c. Análisis de información:

Se combinaron criterios de validación de la información, técnicas analíticas de información y herramientas informáticas especializadas que aportaron a seleccionar la información relevante según los objetivos de búsqueda.

d. Valorización de información relevante:

Se analizó la efectividad de la información de valor obtenida para la toma de decisiones y se elaboraron los resultados de la vigilancia tecnológica.

De lo anterior, se diseñó un diagrama de flujo el cual sintetiza las principales etapas de la metodología a seguir para el desarrollo de una correcta vigilancia tecnológica según lo descrito por Observatorio Virtual de Transferencia de Tecnología (Figura 10).

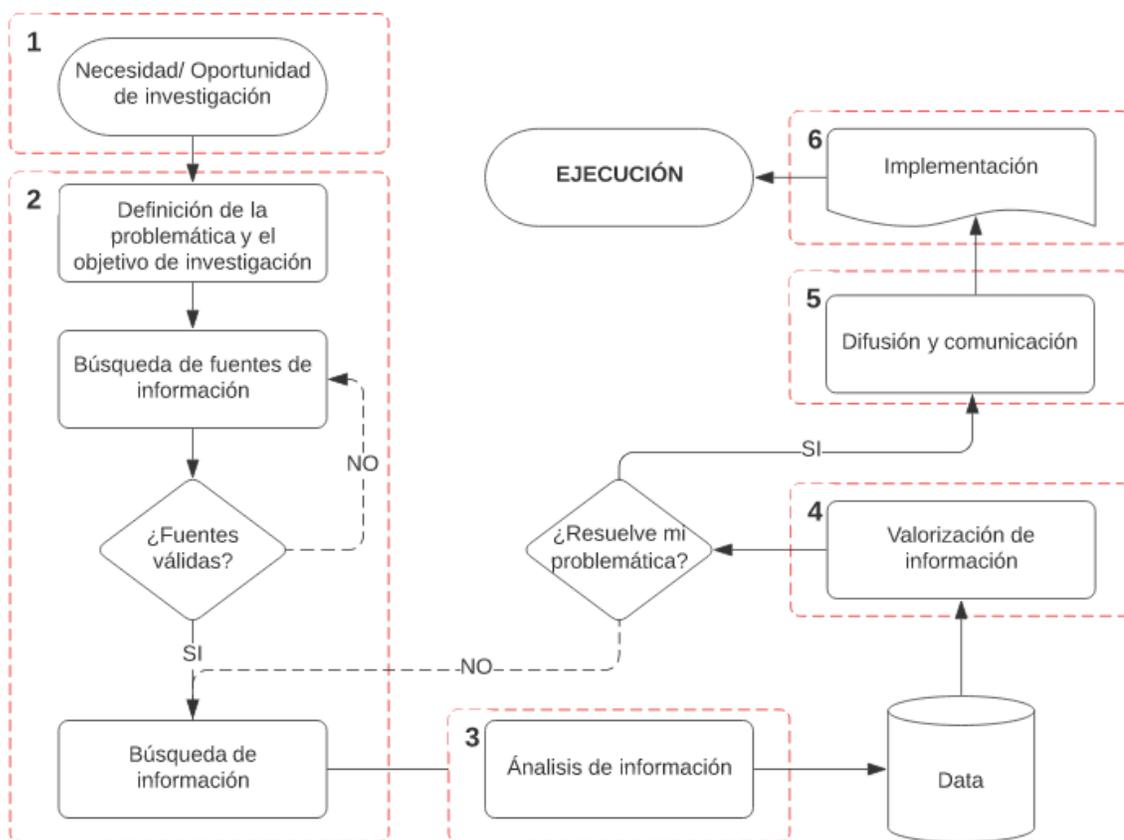


Figura 10. Ciclo de vigilancia tecnológica implementado en el presente estudio.

3.2.2 Estudio de patentes y evaluación del potencial de protección intelectual

La propiedad intelectual e industrial representa un elemento esencial para la inteligencia tecnológica, así como una etapa crucial en la gestión de la transferencia de tecnología e innovación y, cada vez más, su registro posibilita la creación de empresas de base tecnológica (OVTT, 2022).

En este sentido, para el estudio del contexto internacional respecto a los métodos de producción y productos en base a CB, se realizó un análisis de patentes y análisis pseudo estadísticos según el método propuesto en la “Guía práctica de búsqueda sobre el estado de la técnica de invenciones - 2021” obtenida desde la Oficina de Propiedad Intelectual de la Universidad Francisco de Paula Santander.

Para analizar el enfoque biotecnológico asociado a los métodos de producción y productos de CB a nivel internacional, se realizaron numerosas iteraciones de la información disponible en las bases de datos de la “Organización Mundial de la Propiedad Intelectual” y “Oficina de Patentes Europea” para la definición de las ecuaciones de búsqueda óptimas que se ajusten a las palabras claves, activos intangibles definidos y el objetivo del estudio.

3.2.3 Análisis estratégico

Se utilizaron el método de PESTEL (análisis Políticos, Económicos, Sociales, Tecnológicos, Ecológicos y Legales) y análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) con la finalidad de determinar las oportunidades, amenazas y el contexto donde se insertará el desarrollo de un potencial bionegocio en base a la producción de CB considerando el marco regulatorio, factores sociales y el contexto económico y tecnológico actual de la celulosa bacteriana como producto final.

3.2.4 Modelo de negocio

La propuesta del modelo de negocios se realizó través del método CANVAS con base a los antecedentes obtenidos a partir del análisis estratégico y estudio de patentes, permitiendo diseñar una propuesta de valor para la producción de CB mediante el prototipo propuesto en la presente investigación.

3.3 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.

3.3.1 Materiales y equipamiento.

Los estudios preliminares de producción de CB a nivel de matraces se realizaron con las cepas *Komagataeibacter oboediens* y una cepa no identificada productora de CB y aislada de vinagre (cepa del vinagre) facilitada por la Dra. Dariela Núñez de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. A partir de estos estudios, se seleccionó la cepa productora de CB más eficiente para su posterior inoculación y modelación en el biorreactor tipo BDR. Por otro lado, los materiales de laboratorio, equipamiento, reactivos y software son mencionados en la tabla 7.

Tabla 7. Material de laboratorio, equipos, reactivos y software utilizados en la investigación.

Material de laboratorio	Equipos	Reactivos	Software
<ul style="list-style-type: none"> •Micropipetas (200µL, 20µL, 2µL) • Tubos falcon (15 mL y 50 ML) •Vasos precipitados (1000 mL) •Probetas •Pipetas •Propipetas •Matraz volumétrico 1000 mL •Frascos Schott 1000 mL 	<ul style="list-style-type: none"> •Cámara de flujo laminar (ESCO, Laminar Flow Cabinet) •Autoclave (Quimis, Q-190-26) •Balanza analítica (SHIMADZU, AUX 120) •pH-metro (HANNAH Instruments, pH 211) •Agitador magnético (Magnetic Stirrer 	<ul style="list-style-type: none"> •D-glucosa •Peptona •Extracto de levadura •Na₂HPO₄ •Ácido Cítrico •Agar •d-H₂O •NaOH •Celulasa de <i>Aspergillus Niger</i> C1184 (Sigma-Aldrich) •Ácido acético •H₂SO₄ •Residuos agroindustriales 	<ul style="list-style-type: none"> •Microsoft [®] Word 2010 •Microsoft [®] Excel 2010 •Mendeley [®] •GraphPad Prism 8.0 •AQUASIM [®]

<ul style="list-style-type: none"> •Placas Petri •Gradillas •Matraz Erlenmeyer •Tubos eppendorf •Embudos de vidrio •Gotero •Espátula de laboratorio •Piseta •Jeringa •Otros 	<ul style="list-style-type: none"> with Hot Plate, Glassco) •Microondas (LG Electronics, MH-3046SP) •Estufa de secado (Quimis) •Incubadora de cultivo (Memmert ICO50) •Refrigerador (Electrolux, ERDG195YSKW) •Centrífuga (HERMLE 7400K) •Microcentrífuga (Hettich, mikro 200r) •Shaker orbital (Barnstead Max Qmini 4000) •Vortex shaker (Benchmark Benchmixer) •Espectrofotómetro (Perkin Elmer, analyst 200) •Biorreactor de tanque agitado y accesorios de medición (Eppendorf New Brunswick) •Biorreactor BDR •Motor de rotación externo (Splendid BRS-120) 		
---	---	--	--

3.3.2 Propagación de *K. xylinus* y cepa del vinagre

K. xylinus y la cepa del vinagre previamente almacenadas en criotubos con una solución de glicerol al 20% y almacenada a -80°C fue inoculada en placas de Petri con medio Hestrin-Schramm (HS) sólido compuesto por 2.0 % de fuente de carbono (Glucosa), 0.5 % peptona, 0.5 % extracto de levadura y 0.27%

Na₂HPO₄, 0.15% ácido cítrico y 1.8 % de agar (Costa et al., 2017). Los componentes del medio Hestrin-Schramm se resumen en la tabla 8:

Tabla 8: Composición y cantidad de componentes del medio HS.

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	20
Peptona	5
Extracto de levadura	5
Fosfato de disodio	2,7
Ácido cítrico	1,5
Agar*	18

Para la preparación de 1 L de medio y posterior plaqueo, se procedió de la siguiente manera:

- Se adicionaron 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 2.7 g de fosfato de disodio, 1.5 g ácido cítrico y 18 g de agar. Luego se aforó a 950 mL de agua destilada en un matraz de aforo de 1 L. Se mezcló y traspasó a un frasco tipo schott de 1 L. Se ajustó el pH a 5 usando NaOH 1.0 M y se esterilizó con calor húmedo durante 15 minutos a 121°C a 1 atm.
- Para la glucosa, se adicionaron 20 g en 50 mL de agua destilada y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Luego, se utilizó filtros de membrana de 0.22 µm para la eliminación de sólidos suspendidos en la solución de glucosa en condiciones estériles. Posteriormente, se adicionó esta solución a la solución de nutrientes descrita anteriormente y fueron traspasados a placas Petri asépticamente para la posterior solidificación del medio HS, sellado y almacenamiento.

Para la propagación en medio sólido, se procedió de la siguiente manera:

- Se tomó una muestra de la cepa bacteriana desde el criotubo utilizando una aza curva estéril al interior de una cámara de flujo. Luego se plaqueó

en placas Petri con medio HS sólido previamente preparadas. Finalmente, el cultivo fue incubado a 28°C por 48 h.

Para generar el inóculo para las fermentaciones, se procedió de la siguiente manera:

- Se utilizó medio Hestrin-Schramm pH 5 preparado según lo descrito en el punto anterior. Luego, se preparó un cultivo líquido desde una colonia tomada a partir de una placa de cultivo con 10 mL de medio Hestrin-Schramm sólido y se incubó a 28°C y 100 rpm durante 3 días. Posteriormente, la solución resultante fue utilizada como inóculo.
- Las fermentaciones posteriores se realizaron en matraces de 50 mL agregando en cada uno 9 mL de medio de cultivo Hestrin-Schramm. Las fermentaciones fueron inoculadas con 1 mL de suspensión celular previamente preparadas y se agitaron 100 rpm durante 2, 4, 6 y 8 días a 28°C. Al término del cultivo, la solución fue centrifugada a 5000 rpm, siendo el pellet y el sobrenadante almacenados para su posterior análisis.

3.3.3 Cuantificación de la biomasa

La suspensión celular se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 25 mL de agua destilada y se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Este proceso es repetido 3 veces. Luego, se agregaron 8.86 mL de buffer citrato 1 M y 135 µl de celulasa. Se dejó incubar a 100 rpm durante 1 hora a 50°C. La suspensión fue centrifugada y lavada según lo descrito anteriormente. El pellet resultante se dejó secar a 80°C durante 3 días. La biomasa producida se calculó en base al peso seco según la siguiente ecuación:

Ecuación 1:

$$Biomasa (X) = \frac{(N1 + N2 + N3)}{3} (g)$$

Todos los experimentos se desarrollaron por triplicado (N1, N2 y N3) y los valores fueron expresados como la media aritmética con su respectiva desviación estándar.

Los resultados fueron comparados mediante análisis estadístico t de Student desapareado empleando el programa GraphPad Prism® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

3.3.4 Cuantificación del consumo de glucosa

Se tomó 1 mL de la suspensión celular y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El pellet fue descartado y el sobrenadante fue diluido en agua destilada (1:10). La cuantificación de azúcar consumida en la fermentación será realizada mediante el método de determinación de azúcares reductores totales descrito por Gil et al., (2006). Este método analítico permite calcular la concentración de azúcares reductores en distintos materiales. El procedimiento se basa en una reacción redox que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en las muestras, pudiendo cuantificarse mediante espectrofotometría (Figura 11).

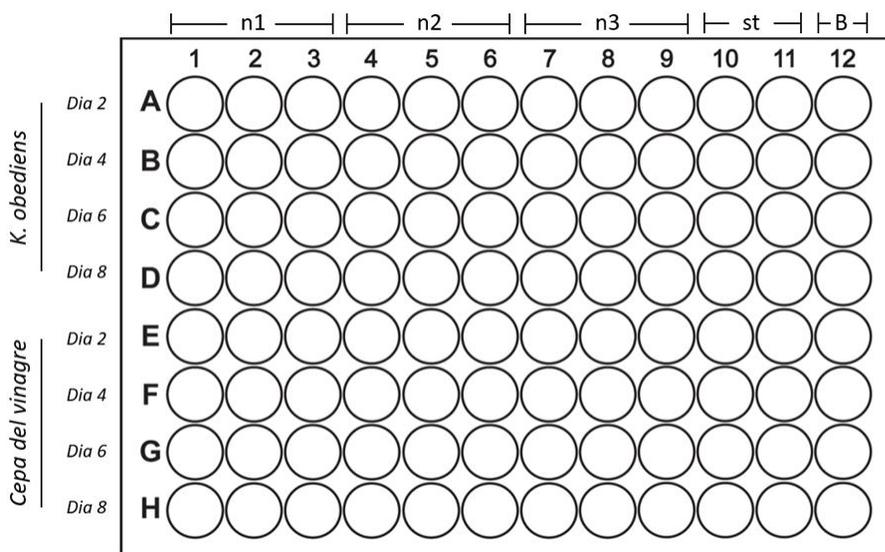


Figura 11: Ensayo de cuantificación del consumo de glucosa en cultivos de *K. xylinus* y cepa del vinagre en microplacas y mediante espectrofotometría a 540 nm.

3.3.5 Purificación y cuantificación de celulosa bacteriana

La suspensión celular se centrifugó a 5000 rpm durante 25 minutos. El sobrenadante fue descartado, mientras que el pellet se resuspendió en 25 mL de agua destilada y se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repitió 3 veces, seguido de la adición de agregó 50 mL de NaOH 0.1 M y se incubó a 80°C durante 3 horas estáticamente. Luego, se centrifugó y lavó según lo descrito anteriormente. El pellet resultante se dejó secar a 80°C durante 3 días estáticamente. La cantidad de CB se calculó en base al peso seco y por triplicado (M1, M2 y M3) según la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

$$\text{Celulosa bacteriana (P)} = \frac{(M1 + M2 + M3)}{3} (g)$$

Los resultados fueron comparados mediante análisis estadístico t de Student desapareado empleando el programa GraphPad Prism® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.)

3.3.6 Determinación de rendimientos productivos

El coeficiente de rendimiento de producto (CB) en función del sustrato ($Y_{P/S}$) se determinó mediante la relación de peso entre la celulosa bacteriana seca producida y la fuente de carbono consumida durante el periodo de fermentación. El cálculo se realizó utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 3:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

Donde ΔP es la cantidad de celulosa formada y ΔS el sustrato utilizado para la síntesis, en gramos.

El coeficiente de rendimiento de producto (CB) en función de la biomasa ($Y_{P/X}$) se determinó mediante la relación de peso entre la celulosa bacteriana seca

producida y la biomasa producida durante el periodo de fermentación. El cálculo se realiza utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 4:

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta X}$$

Donde ΔP es la cantidad de celulosa formada y ΔX la biomasa producida, en gramos.

El coeficiente de rendimiento celular en función del sustrato ($Y_{x/s}$) se determinó mediante la relación de peso entre la biomasa producida y el sustrato consumido durante el tiempo de fermentación. El cálculo se realiza utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 5:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

Donde ΔX es la cantidad de biomasa producida y ΔS el sustrato consumido, en gramos.

La productividad volumétrica Q , corresponde a la masa de producto obtenido dividido por el tiempo y el volumen de la fermentación. El cálculo se realiza utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación 6:

$$Q = \frac{MP \text{ (mg)}}{T \text{ (d)} * V \text{ (L)}}$$

Donde MP es la masa de producto (mg), T es el tiempo de cultivo (d^{-1}) y V es el volumen de la fermentación (L^{-1}).

3.3.7 Simulación matemática del bioproceso de producción de CB

Se realizó una simulación de la cinética de producción de CB en función de ecuaciones descritas en literatura, considerando la agitación como variable crítica de operación en un biorreactor de disco rotatorio. En particular, se utilizó como

base el estudio reportado por Dissanayake & Ismail (2013), considerando las condiciones experimentales, parámetros de diseño del BDR y valores de rendimientos obtenidos en la etapa experimental en matraces para la simulación matemática de la producción de CB en función de las velocidades de rotación de estudio 8, 11, 13 y 15 rpm en un periodo de 13 días.

A continuación, se detallan los supuestos de la simulación realizada por estos autores y que también son aplicables al análisis realizado en esta tesis:

- El sustrato de biopelícula es inerte.
- La bacteria sólo consume OD como fuente de oxígeno.
- Para un microorganismo dado, la tasa de reacciones metabólicas depende de un reactivo limitante.
- Los fenómenos biológicos ocurridos en la fase líquida no son considerados en la modelación.
- La solución del reactor es homogénea y BDR opera por lotes.
- La densidad del sistema es constante.
- El crecimiento bacteriano es disminuido ante turbulencias del flujo.
- No es considerado el decaimiento de la biomasa.

La velocidad específica de crecimiento se determinó mediante el uso de la ecuación de Monod (Takamatsu et al., 1981) la cual describe la relación entre la velocidad específica y el sustrato limitante.

Ecuación 7:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_s + S}$$

Donde μ_{max} es la tasa específica de crecimiento máximo (h^{-1}), S es la concentración de sustrato limitante ($g L^{-1}$) y K_s es la constante de saturación a la cual $\mu = \mu_{max}$ ($g h^{-1}$).

Luego de la determinación de μ , se calculó la tasa de generación de la biomasa en función de la velocidad de rotación mediante el uso de la ecuación de Monod (Takamatsu et al., 1981).

Ecuación 8:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y X es la concentración de biomasa (g/L).

Por otro lado, la producción de CB es afectada por la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo. En consecuencia, se consideró una constante que considere la variación de OD en el sistema en función de la velocidad de rotación.

Ecuación 9:

$$K_{DO} \propto \omega$$

Donde K_{DO} es el flujo de oxígeno disuelto y ω es la velocidad de rotación de los discos (rpm^{-1}).

A bajas velocidades de rotación, las corrientes de flujo en el medio de cultivo se localizarían en la región laminar. Sin embargo, el aumento de la velocidad de rotación genera turbulencias que evitan la formación de biopelículas adheridas a los discos a pesar de suministrar un exceso de OD (Dissanayake & Ismail, 2013). Por lo tanto, la agitación corresponde a un parámetro operacional que altera los regímenes de flujo y tiene una relación directa en la producción de CB en los sistemas BDR. Por ende, la función K_{DO} para el medio de cultivo puede escribirse matemáticamente como una ecuación cuadrática de la siguiente manera:

Ecuación 10:

$$K_{DO} = -a\omega^2 + b\omega$$

y

Ecuación 11:

$$K_{DO} = K_{DO,\omega} + K_{DO,static}$$

En donde se asume que, a bajas velocidades de rotación,

Ecuación 12:

$$K_{DO,\omega} = 0$$

Entonces,

Ecuación 13:

$$K_{DO} = K_{DO,static} = C$$

Donde a y b son coeficientes que describen la contribución de otros factores tales como las características del disco y del recipiente en el sistema. Además, el parámetro C puede ser obtenido experimentalmente.

Por otro lado, el consumo de sustrato se calculó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 14:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{xs}}$$

Finalmente, y tras la determinación de los parámetros μ , dX/dt e $Y_{p/s}$, la producción de CB se calculó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 15:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dX}{dt} \frac{K_b K_{DO} \rho}{Y_{ps}}$$

Donde K_b es una constante de proporcionalidad ($\text{mm}^{-4} \text{g}^{-2}$) y ρ es la densidad de la celulosa bacteriana (g L^{-1}). A partir de los datos simulados, se estimó la producción de CB seca considerando el contenido de humedad presente en la CB húmeda obtenida mediante la fermentación de *K. xylinus* en un BDR por Soleimani et al (2021) el cual corresponde a 93,65%. De esta manera, se calculó

una productividad volumétrica simulada de CB mediante la utilización de un sistema BDR.

CAPITULO 4 RESULTADOS

4.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio.

4.1.1 Diseño BDR.

Estructuralmente, el biorreactor se encuentra compuesto por un recipiente semicilíndrico de acero inoxidable de dimensiones $L= 500$ mm, $A= 240$ mm y $A_n= 241$ mm montado sobre un soporte de dimensiones $L= 500$ mm, $A= 180$ mm, $A_n= 246$ mm y $L_{pie}= 50$ mm. (Figura 12). Adicionalmente, se incorporaron dos mirillas laterales redondas de $D= 45$ mm para la visualización de la zona líquida de la fermentación (Figura 13). Estas conformaciones permiten obtener un sistema con volumen total de 11,3 litros.

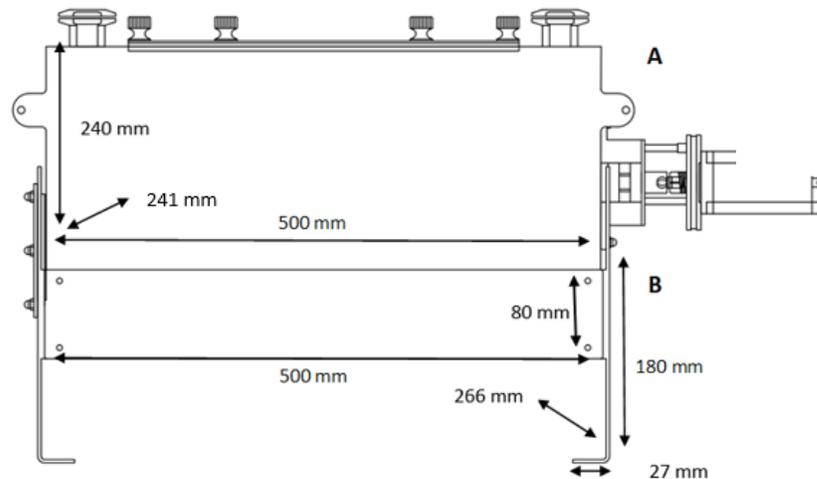


Figura 12. Vista frontal del BDR. A: Estanque de acero inoxidable, B: Soporte de acero inoxidable.

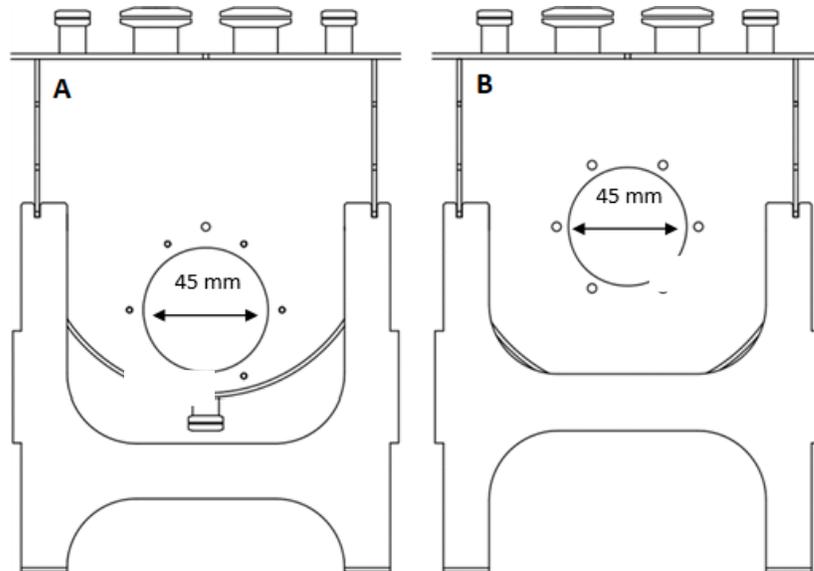


Figura 13. Vista lateral del BDR. A: Mirilla lateral izquierda, B: Mirilla lateral derecha.

En la parte superior, se incorporaron 3 puertos con rosca universal adaptados para insertar sensores de pH, oxígeno disuelto y temperatura en diferentes ubicaciones del estanque (Figura 14). Además, cuenta con 5 puertos específicos para la inoculación de aire, soluciones buffer, medio de cultivo, inoculación de suspensión bacteriana y toma de muestra líquida (Figura 15).

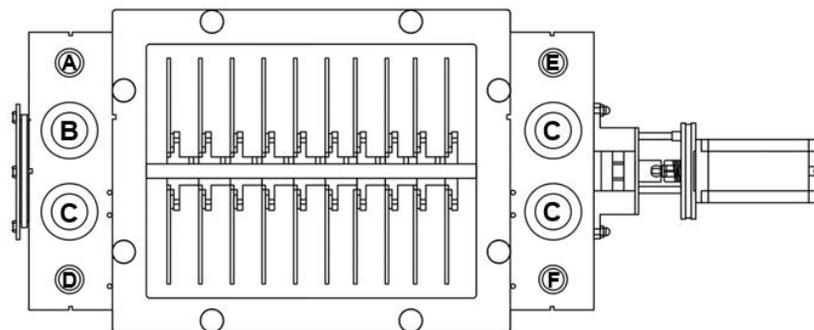


Figura 14. Vista superior del BDR y localización de componentes de medición e inoculación. A: Inoculación de aire, B: Inoculador de soluciones buffer, C: Sensor de pH, OD o temperatura, D: Inoculador de medio de cultivo, E: Inoculador de suspensión bacteriana y F: Toma de muestra líquida.

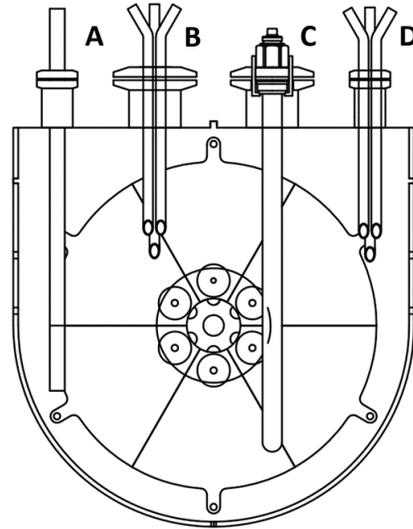


Figura 15: Vista interna lateral izquierda del BDR y detalle de puertos móviles para sensores y específicos de inoculación. A: Inoculador de aire, B; Inoculador de soluciones buffer, C: Sensor de pH, OD o temperatura y D: Inoculador de medio de cultivo.

Internamente, el sistema cuenta con 10 discos móviles de acero inoxidable montados verticalmente en un eje horizontal giratorio de acero inoxidable de $L= 458$ mm y $D= 13$ mm conectado a un motor eléctrico externo de $L= 110$ mm. Estos se componen por 6 segmentos imantados unidos con dimensiones de $D= 168$ mm y $E= 3$ mm sostenidos mediante masas de rotación magnéticas móviles de acero inoxidable con dimensiones de $D= 57$ mm y $A_n= 22$ mm (Figura 16). Estas medidas fueron seleccionadas para optimizar el área superficial efectiva de cada disco equivalente a 221.6 cm². Considerando ambas caras y número de discos totales, el área superficial total del sistema equivale a 4432 cm².

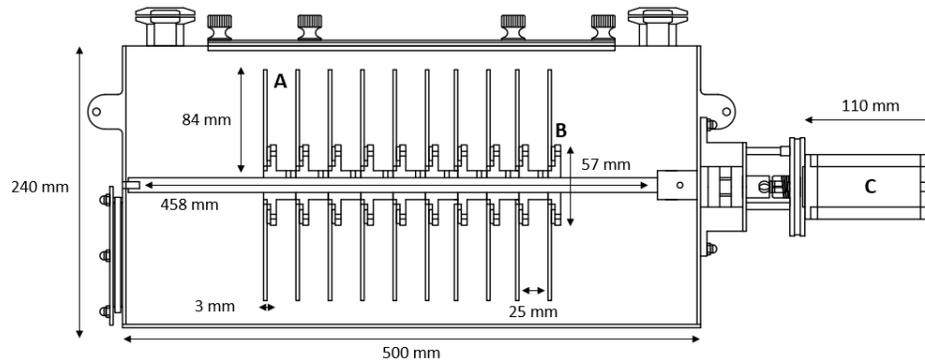


Figura 16: Vista longitudinal del BDR. A: 10 discos montados en el eje horizontal, B: Motor eléctrico externo.

Se contempló una inmersión del 43,5% del área superficial efectiva en el medio de cultivo, considerando como criterio los resultados reportados por Soleimani et al., (2021). Al respecto, los sistemas BDR exponen a los discos a la zona aeróbica y al medio nutritivo de forma alterna (Seráfica et al., 2007). Según lo reportado por Bungay et al., (1999), la exposición aérea por parte de los discos por debajo del 50% puede aumentar la tasa de crecimiento bacteriano y prevenir daños en el eje horizontal.

4.1.2 Diagrama de flujo para las etapas productivas *upstream* y *downstream*

Las figuras 17 y 18 esquematizan la propuesta de proceso para la producción continua de CB en el sistema BDR a escala de laboratorio, junto con los sistemas de control y accesorios. El detalle de cada etapa y descripción de equipos se detallan en la tabla 9.

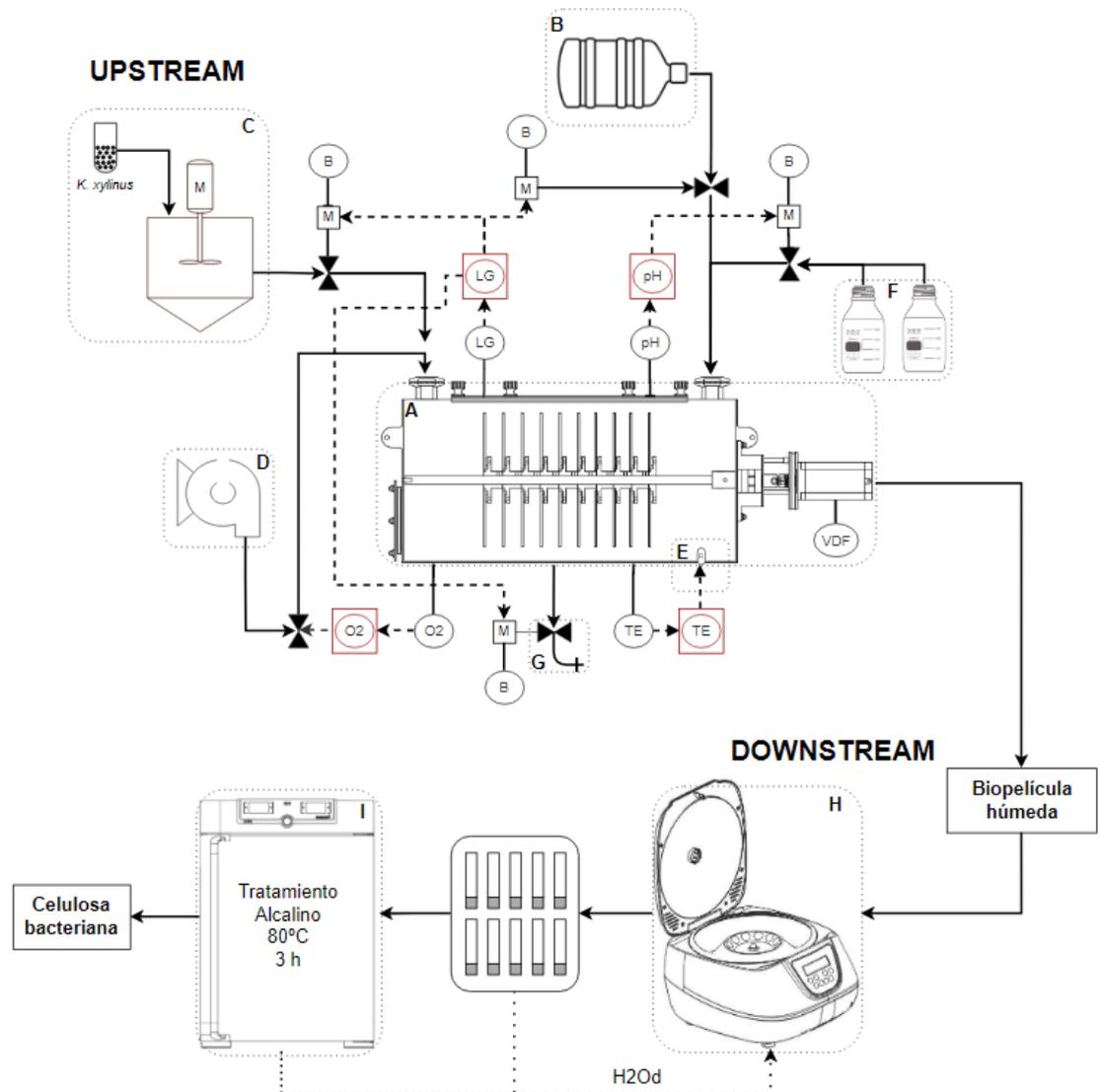


Figura 17. Diagrama de proceso de producción de celulosa bacteriana mediante un sistema BDR, destacando las etapas *upstream* y *downstream*. A: BDR, B: Contenedor de medios de cultivo, C: Reactor de tanque agitado, D: Soplador de aire, E: Resistencia eléctrica, F: Contenedores de soluciones buffer, G: Válvula electromecánica de despiche, H: Centrífuga, I: Estufa de cultivo.

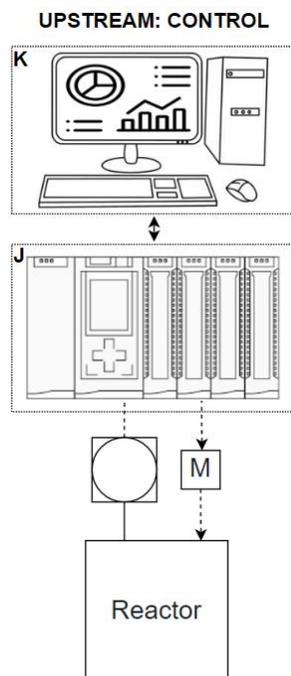
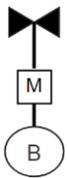
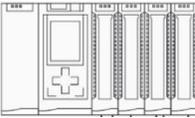
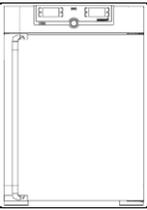


Figura 18. Diagrama de lógica de control de proceso de producción de celulosa bacteriana mediante un sistema PLC. J: PLC, K: Display.

Tabla 9: Descripción de equipos y procesos involucrados en etapas upstream y downstream.

Etapa		Esquema	Equipo	Proceso
Upstream	A		BDR	Fermentación de <i>K. xylinus</i> para la producción de biopelículas de CB.
Upstream	B		Contenedor de medio de cultivo	Inoculación de medio de nutrientes al sistema BDR.
Upstream	C		Inóculo inicial en tubo Falcon	Inóculo de <i>K. xylinus</i> .
Upstream	C		Biorreactor de tanque agitado	Fermentación primaria de <i>K. xylinus</i> para la inoculación en el sistema BDR.

Upstream	D		Bomba de aire	Dosificación de aire.
Upstream	E		Resistencia eléctrica	Transferencia de calor al sistema BDR.
Upstream	F		Contenedor de buffers	Dosificación de buffers para la regulación de pH.
Upstream	G		válvula electro mecánica de despacho	Eliminación de medio de cultivo.
Upstream	-		Sensor de nivel	Monitoreo del nivel de medio de cultivo.
Upstream	-		Sensor de OD	Monitoreo del OD en el medio de cultivo.
Upstream	-		Sensor de pH	Monitoreo del pH en el medio de cultivo.
Upstream	-		Sensor de temperatura	Monitoreo de la temperatura en el medio de cultivo.
Upstream	-		Motor de bombeo conectado a válvulas electro mecánicas	Apertura, cierre y bombeo de líneas en rango de valores programados.
Upstream	-		Logística de control de nivel	Automatización de la respuesta ante variaciones en los niveles del medio de cultivo en un rango predefinido.

Upstream	-		Logística de control de OD	Automatización de la respuesta ante variaciones de OD del medio de cultivo en un rango predefinido.
Upstream	-		Logística de control de pH	Automatización de la respuesta ante variaciones de pH del medio de cultivo en un rango predefinido.
Upstream	-		Logística de control de temperatura	Automatización de la respuesta ante variaciones de temperatura del medio de cultivo en un rango predefinido.
Upstream	J		PLC	Controlador de la automatización del proceso.
Upstream	K		Display	Visualización del comportamiento de variables operacionales
Downstream	H		Centrífuga	Lavado biomasa y separación de sobrenadante.
Downstream	I		Estufa de cultivo	Tratamiento alcalino para la purificación de CB
Global	-		-	Flujo de procesos
Global	-		-	Flujo de señalizaciones

4.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.

4.2.1 Estudio de patentes y tendencias productivas actuales

En la figura 19 se esquematizan las múltiples secciones presentes en la clasificación internacional de la WIPO y sus ciclos de refinamiento para definir las ecuaciones de búsqueda óptimas tomando como criterio las palabras claves “*bacterial cellulose*” (ISO/TS 20477:2017E). Se consideró un nivel de significancia mínimo para iteraciones superiores a 10 y un aporte de patentes igual o mayor al 5% del total de patentes. Los niveles jerárquicos de la WIPO están detallados en Anexo 1.

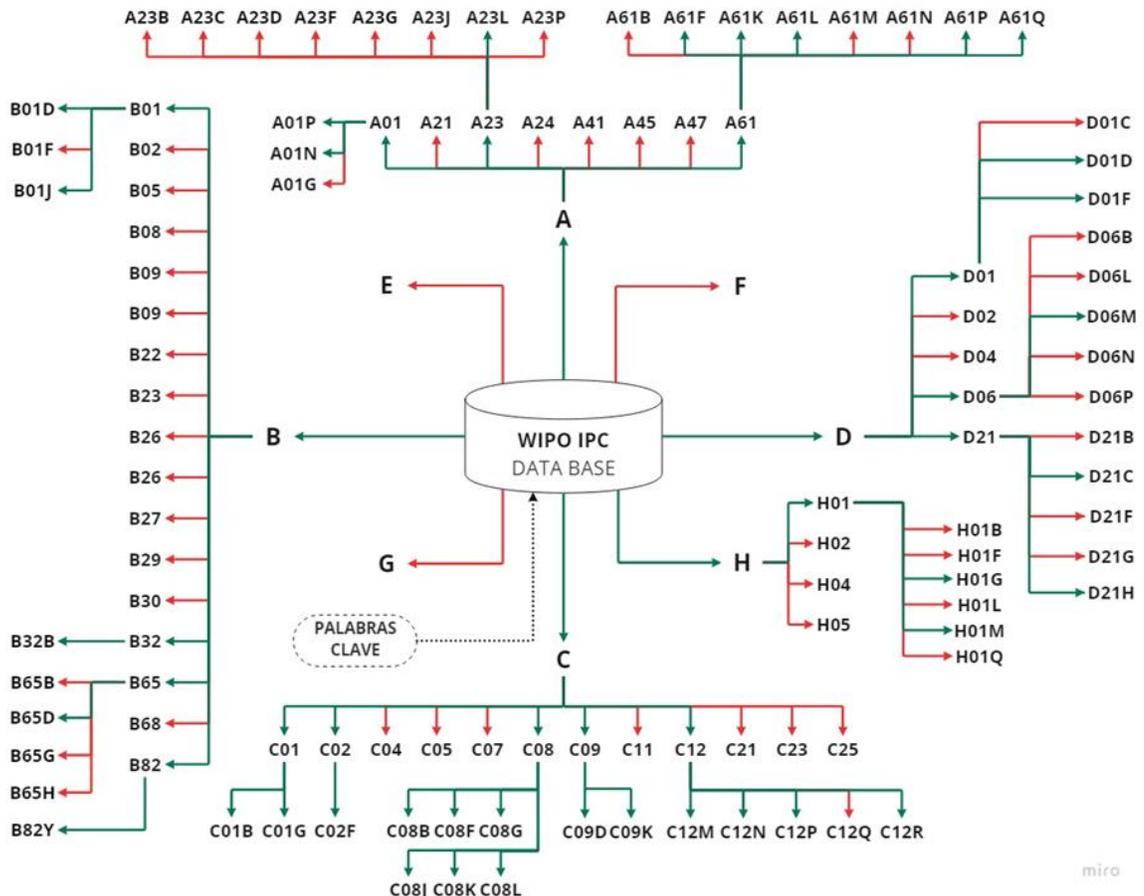


Figura 19. Refinamiento de ecuaciones de búsqueda jerarquizadas por clasificación tipo CIP. Las flechas verdes indican refinamientos significativos y las flechas rojas indican aquellos refinamientos insignificantes.

La figura 20 sugiere un alto interés internacional enfocado en el uso de CB en las secciones C, A, B, D y H con valores de 56%, 20%, 9%, 9% y 5% respectivamente con respecto al total de patentes publicadas hasta el 01 de octubre de 2022. Específicamente, se evidencia que las patentes de celulosa bacteriana se encuentran prioritariamente enfocadas en “Química; Metalurgia”, “Necesidades humanas”, “Técnicas industriales diversas; transportes”, “Textiles; papel” y “Electricidad”. El detalle de las iteraciones de búsqueda realizadas y la asignación de la relevancia es descrito en la tabla 10.

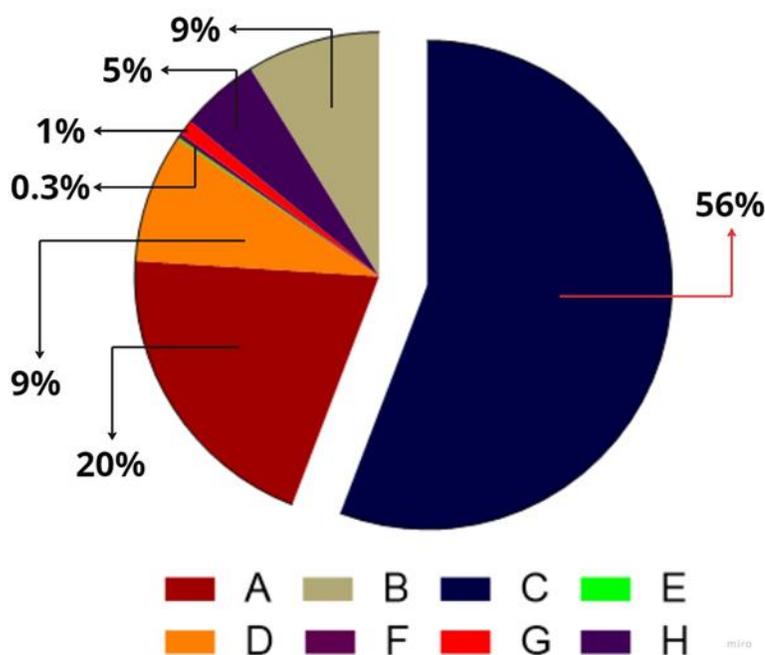


Figura 20. Clasificación IPC y su aporte de patentes asociadas a métodos y productos en base a CB (Generado a partir de base de datos WIPO, 2022). A: Necesidades Humanas, B: Técnicas industriales diversas; transportes, C: Química, metalúrgica, D: Textiles; papel, E: Construcciones fijas, F: Mecánica; iluminación; calefacción; armas; voladura, G: Física y H: Electricidad.

Tabla 10. Número de iteraciones realizadas, patentes publicadas según el tipo de sección CIP y categorización de relevancia para el estudio entre 1987 y 2022.

A: Necesidades Humanas, B: Técnicas industriales diversas; transportes, C: Química, metalúrgica, D: Textiles; papel, E: Construcciones fijas, F: Mecánica; iluminación; calefacción; armas; voladura, G: Física y H: Electricidad.

AÑO	A	B	C	D	E	F	G	H	Acumulad o
1987	1	0	0	1	0	0	0	1	3
1988	0	1	1	2	0	0	1	1	9
1989	0	1	1	2	0	0	0	0	13
1990	1	1	2	2	0	0	0	0	19
1991	0	0	0	3	0	0	0	0	22
1993	1	0	1	2	0	0	0	0	26
1994	0	1	2	0	0	0	0	0	29
1995	0	0	2	3	0	0	0	0	34
1996	1	0	0	1	0	0	0	1	37
1997	1	1	2	1	0	0	0	0	42
1998	2	0	1	4	0	0	0	0	49
1999	2	1	2	1	0	0	0	0	55
2000	1	0	1	2	0	0	0	0	59
2002	2	0	2	0	0	0	0	0	63
2003	1	0	1	0	0	0	0	0	65
2005	2	0	1	1	0	0	0	0	69
2006	1	1	1	2	0	0	0	0	74
2007	2	0	3	0	0	0	0	0	79
2008	1	0	5	0	0	0	0	1	86
2009	2	1	6	3	0	0	1	1	100
2010	9	1	4	3	0	0	0	0	117
2011	12	7	10	3	0	0	0	2	151
2012	9	4	20	1	0	0	0	5	190
2013	35	7	44	22	0	0	0	0	298
2014	23	11	65	11	0	0	1	1	410
2015	18	8	77	4	0	0	0	5	522
2016	23	3	93	8	0	0	2	8	659
2017	31	19	90	13	1	2	3	18	836
2018	26	14	104	9	0	0	3	6	998
2019	36	14	97	5	0	0	1	13	1164
2020	29	16	91	9	0	1	1	11	1322
2021	37	22	109	11	0	1	1	9	1512
2022	19	9	67	9	1	1	2	2	1622
N.º patentes	328	143	905	138	2	5	16	85	1622
Aporte (%)	20%	9%	56%	9%	0%	0%	1%	5%	100%

N.º iteraciones	28	26	29	19	1	1	1	11	116
Relevante	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si	-

Paralelamente, la figura 21 evidencia la evolución anual del número de patentes referentes a bioproductos y tecnologías de producción asociadas a BC entre 1987 y 2022. Se evidencia un crecimiento exponencial en el número de publicaciones a partir de 2014 con un valor de 200 publicaciones extras anuales por año aproximadamente.

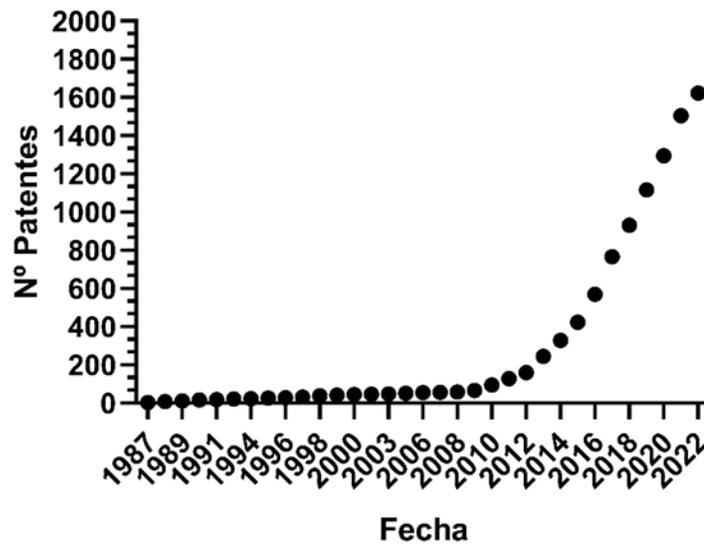


Figura 21: Evolución del número de patentes asociadas a CB en el periodo comprendido entre los años 1987 y 2022.

La figura 22 muestra que este crecimiento se encuentra principalmente enfocado en la sección C; Química, metalúrgica.

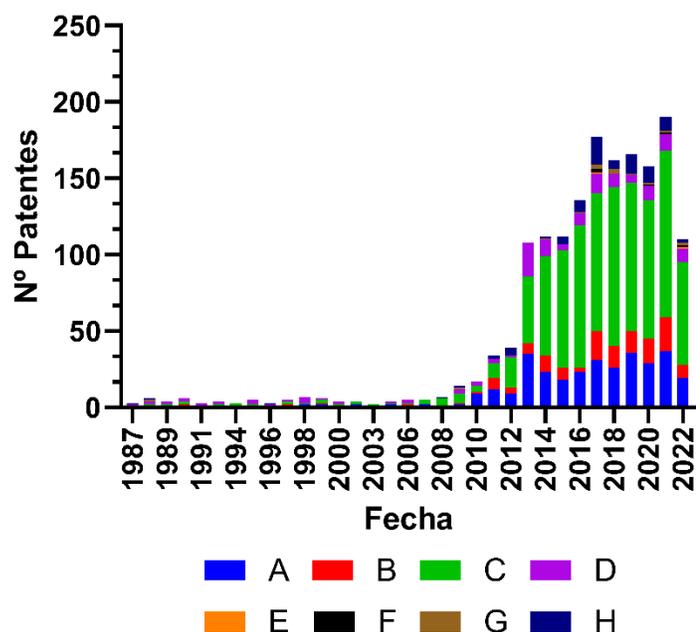


Figura 21: Distribución del número y tipo de patentes asociadas a CB entre 1987 y 2022 según tipo de clasificación CIP. A: Necesidades Humanas (azul) , B: Técnicas industriales diversas; transportes (rojo), C: Química, metalúrgica (verde), D: Textiles; papel (morado), E: Construcciones fijas (naranja), F: Mecánica; iluminación; calefacción; armas; voladura (negro), G: Física (café) y H: Electricidad (azul marino).

En la tabla 11 se especifica el nivel de significancia considerando la subdivisión en la sección de la clasificación internacional previamente mencionadas. En particular, los resultados del refinamiento consideraron al menos 40 patentes para la asignación de la significancia con respecto al total de patentes. Se evidencia una tendencia productiva en las ciencias médicas, alimentos, métodos de producción, fibras y materiales compuestos.

Tabla 11: Tendencia productiva realizadas a partir de la clasificación por clase y categorización de relevancia.

Sección	Clase	N.º de patentes	Descripción	Relevancia
A	A01	19	Agricultura; silvicultura; la cría de animales; caza; captura; pescar	No relevante
	A21	3	Horneando; equipos para hacer o procesar masa; masa para hornear	No relevante
	A23	50	Alimentos o productos alimenticios; su tratamiento , no cubierto por otras clases	Relevante
	A24	5	Tabaco; cigarros; cigarrillos; dispositivos simulados para fumar; requisitos de fumadores	No relevante
	A41	2	Prendas de vestir	No relevante
	A45	10	Artículos de mano o de viaje	No relevante
	A47	6	Muebles; artículos o electrodomésticos; molinos de café; molinos de especias; aspiradores en general	No relevante
	A61	233	Ciencias médicas o veterinarias; higiene	Relevante
B	B01	65	Procesos físicos o químicos o aparatos en general	Relevante
	B02	4	Trituración, pulverización o desintegración; tratamiento preparatorio del grano para la molienda	No relevante
	B05	1	Rociado o atomizado en general; aplicación de líquidos u otros materiales fluidos sobre superficies, en general	No relevante
	B08	3	Limpieza	No relevante
	B09	1	Eliminación de residuos sólidos; recuperación de suelos contaminados	No relevante
	B22	1	Fundición; metalurgia de polvos	No relevante
	B23	1	Herramientas de máquina; metalización no prevista en otro lugar	No relevante
	B26	4	Herramientas de corte manuales; corte; cortando	No relevante

	B27	6	Trabajo o conservación de la madera o materiales similares ; maquinas clavadoras o grapadoras en general	No relevante
	B29	5	Trabajo de plásticos ; trabajo de sustancias en estado plástico en general	No relevante
	B30	5	Prensas	No relevante
	B32	19	Productos en capas	No relevante
	B65	5	Transporte; embalaje; almacenamiento; manipulación de material delgado o filamentario	No relevante
	B68	2	Talabartería; tapicería	No relevante
	B82	21	Nanotecnología	No relevante
C	C01	38	Química inorgánica	No relevante
	C02	67	Tratamiento de aguas, aguas residuales, aguas residuales o lodos	Relevante
	C04	4	Cementos; concreto; piedra artificial; cerámica; refractarios	No relevante
	C05	5	Fertilizantes; fabricación de los mismos	No relevante
	C07	10	Química orgánica	No relevante
	C08	339	Compuestos orgánicos macromoleculares; su preparación o elaboración química ; composiciones a base de él	Relevante
	C09	25	Tintes; pinturas; pulido; resinas naturales; adhesivos; composiciones no previstas en otro lugar; aplicaciones de materiales no previstos de otro modo	No relevante No relevante
	C11	6	Aceites, grasas, sustancias grasas o ceras, animales o vegetales; ácidos grasos procedentes; detergentes; velas	No relevante
	C12	402	Bioquímica; cerveza; espíritu; vino; vinagre; microbiología;	Relevante

			enzimología; mutación o ingeniería genética	
	C21	3	Metalurgia del hierro	No relevante
	C23	1	Revestimiento material metálico ; material de recubrimiento con material metálico ; tratamiento químico de superficies ; tratamiento por difusión de materiales metálicos ; recubrimientos por evaporación al vacío, por sputter, por implantación de iones o por depósito de vapor químico, en general; inhibir la corrosión de materiales metálicos o incrustaciones en general	No relevante
	C25	5	Procesos electrolíticos o electroforéticos; aparato para ello	No relevante
D	D01	44	Hilos o fibras naturales o artificiales; hilado	Relevante
	D02	6	Hilos; acabado mecánico de hilos o cuerdas; deformación o rayos	No relevante
	D04	2	Trenza; fabricación de encajes; tejido de punto; recortes; telas no tejidas	No relevante
	D06	41	Tratamiento de textiles o similares; lavado; materiales flexibles no previstos en otro modo	Relevante
	D21	45	Fabricación de papel; producción de celulosa	Relevante
H	H01	70	Elementos eléctricos básicos	Relevante
	H02	4	Generación, conversión o distribución de energía eléctrica	No relevante
	H04	3	Técnica de comunicación eléctrica	No relevante
	H05	8	Técnicas eléctricas no previstas en otro modo	No relevante

El detalle de los principales enfoques productivos clasificados como relevantes son resumidos en la tabla 12

Tabla 12. Principales enfoques productivos asociados a bioproductos en base a CB y tecnologías productivas.

Enfoque productivo	Nº de patentes	Detalle
Alimentos	443	Alimentos o productos alimenticios, su tratamiento, no cubierto por otras clases (A23); Bioquímica, cerveza, vino, vinagre, microbiología, enzimología, mutación o ingeniería genética (C12).
Ciencias médicas	361	Ciencias médicas o veterinarias, higiene (A61).
Materiales compuestos	339	Compuestos orgánicos macromoleculares, su preparación o elaboración química, composiciones a base de él (C08).
Textiles y fibras	221	Hilos o fibras naturales o artificiales; hilado (D01); Tratamiento de textiles o similares, lavado, materiales flexibles no previstos en otro modo (D06); Fabricación de papel; producción de celulosa (D21).
Métodos productivos	130	Procesos físicos o químicos o aparatos en general (B01).
Electricidad	105	Elementos eléctricos básicos (H01).
Sanitario	67	Tratamiento de aguas, aguas residuales, aguas residuales o lodos (C02).
Nanotecnología	42	Nanotecnología (B68)

Por otro lado, en la figura 22 se evidencia una predominancia de China y Estados Unidos como los países con mayor generación de patentes relacionadas a la producción y uso de CB con un total de 1304 y 117 respectivamente. Lo anterior equivale al 80.4% y 7.2% del total de patentes disponibles en la WIPO hasta el 01 de octubre de 2022 respectivamente.

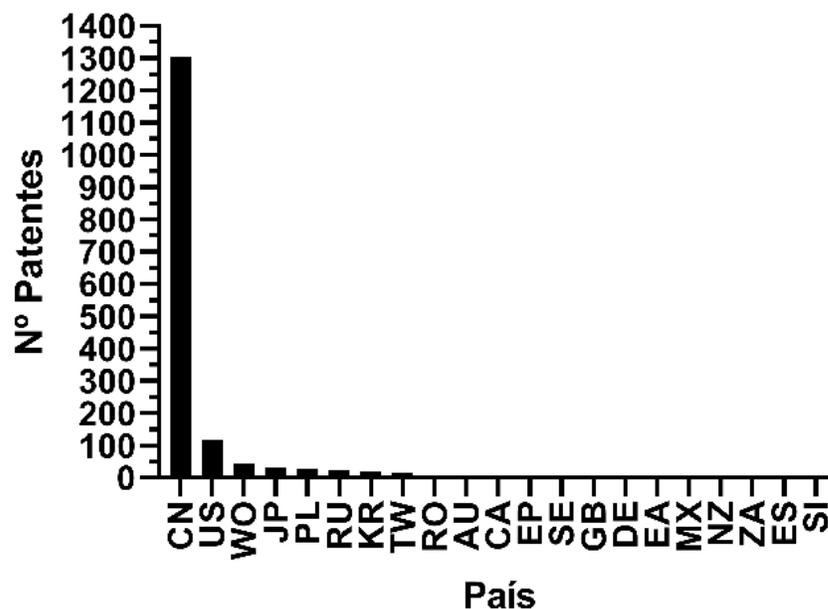


Figura 22. Número de patentes relacionadas a la producción y uso de CB publicadas por país. CN: China; US: Estados Unidos; WO: WIPO; JP: Japón; PL: Polonia; RU: Rusia; KR: República de Corea; TW: Taiwán; RO: Rumania; AU: Australia; CA: Canadá; EP: Oficina Europea de Patentes; SE: Suecia; GB: Reino Unido; DE: Alemania; EA: Organización Asiática de Patentes; MX: México; NZ: Nueva Zelanda; ZA: Sudáfrica; ES: España y SI: Eslovenia.

Se realizó una búsqueda específica en métodos tecnológicos basado en biorreactores de discos rotatorios para su uso en la producción de celulosa bacteriana. La búsqueda determinó el hallazgo de una única patente registrada el 21 de septiembre de 1999 (US5955326) denominada “*Production of microbial cellulose using rotating disk film biorreactor*” presentada por Bungay et al., 1999 (Figura 23). La Ley de Patentes de EE. UU., 35 USC informa que “los plazos de protección patentada sobre una tecnología son de 20 años a partir de la fecha de presentación de la primera solicitud estadounidense o internacional”. Por ende, no existen conflictos de interés con los autores de la publicación. Sumado a lo anterior, se considera el criterio de nivel inventivo impuesto por la Ley 19.039 chilena artículo 35 que menciona: “una invención tiene nivel inventivo, si para una persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente, ella no

resulta obvia ni se habría derivado de manera evidente del estado de la técnica”. En este estudio, el diseño operacional del biorreactor de disco rotatorio contempla múltiples aspectos operacionales y medidas de control optimizadas descritas en 3.1.1 con respecto a lo publicado por Bungay et al., 1999. Por ende, posee un nivel inventivo con elevado potencial de patentabilidad.

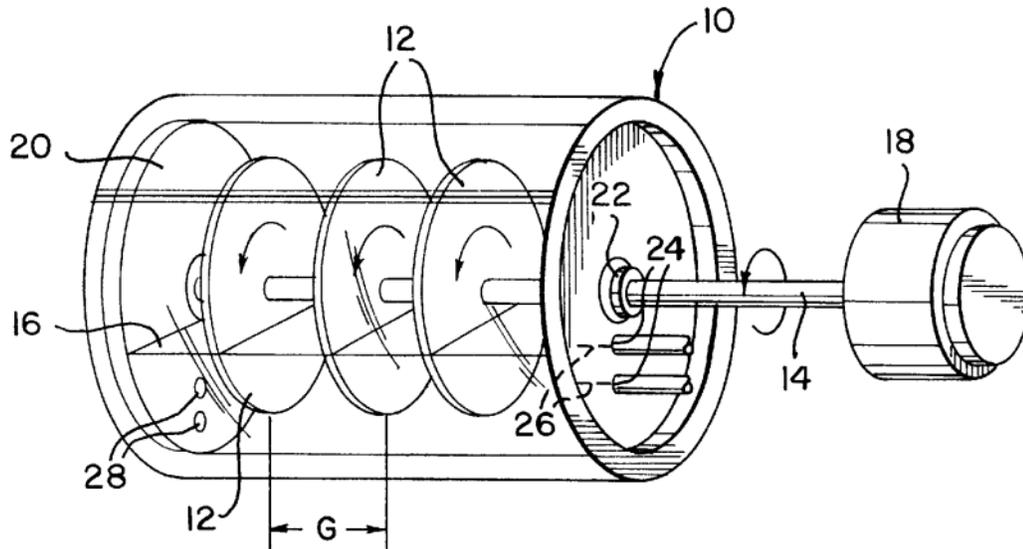


Figura 23. Diseño de biorreactor de disco rotatorio patentado por Bungay et al. 1999 (patente US5955326).

4.3 Análisis del Entorno Interno y Externo

4.3.1 Análisis PESTEL del uso de celulosa bacteriana

A continuación, se describen los resultados del análisis PESTEL que fue realizado en los principales sectores productivos obtenidos en el punto anterior.

4.3.1.1 Marco regulatorio

Los productos comerciales elaborados a partir de organismos biológicos existentes en el mercado son sumamente variados, y sus precios están fuertemente influidos por el nivel de sofisticación tecnológica, aplicación, aprobaciones y reclamaciones regulatorias. A continuación, se presenta las principales regulaciones, instituciones y consideraciones que podrían estar

relacionadas al uso de celulosa bacteriana en aplicaciones alimenticias, cosméticas y médicas en Chile.

- **Alimentos:**

En Chile, el Ministerio de Salud dispone el decreto supremo 977/96 (actualizado el 05.07.2022) que dicta el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y *“establece las condiciones sanitarias a que deberá ceñirse la producción, importación, elaboración, envase, almacenamiento, distribución y venta de alimentos de uso humano, con el objetivo de proteger la salud y nutrición de la población y garantizar el suministro de productos sanos e inocuos”*. Específicamente, el artículo nº2 define alimento como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas al consumo humano, incluyendo bebidas y todos los ingredientes y aditivos de dichas sustancia”*. Lo anterior es aplicable igualmente a todas las personas, naturales o jurídicas, que se relacionen o intervengan en los procesos aludidos anteriormente, así como a los establecimientos, medios de transporte y distribución destinados a dichos fines. Por tanto, la producción y uso de celulosa bacteriana como aditivo de alimentos debe cumplir la normativa vigente. Por otra parte, se presentan regulaciones e instituciones internacionales que implican a Chile y pueden estar relacionadas para comercializar celulosa bacteriana con estos fines en el mercado exterior. A continuación, se ejemplifican los más relevantes.

En primer lugar, la FDA (Food and Drug Administration) es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos. La comercialización de alimentos se encuentra normada por la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFCA) y la Ley sobre Etiquetado y Embalaje (PFLA). Segundo, el Parlamento Europeo establece el Reglamento General de Ley Alimentaria que aplica a la Unión Europea y garantiza la salud de los consumidores, circulación de alimentos y facilitar el comercio mundial. Además, el Parlamento Europeo dispone de la Ley 2015/2283

y que regula la comercialización de nuevos alimentos en la Unión Europea. Finalmente, la principal normativa que rige la calidad e integridad de los alimentos en Japón es la Ley de Sanidad Alimentaria (FSA) dictada por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW). Si bien este país asiático no posee leyes específicas con respecto al uso de aditivos a los alimentos, es el MHLW quien posterior a la evaluación y resolución del Consejo de Saneamiento de Alimentos y Asuntos Farmacéuticos, autoriza la venta, producción, importación, procesamiento, uso, almacenamiento y exhibición con fines comerciales.

- **Cosméticos:**

En Chile, el Ministerio de Salud dispone el decreto supremo 2390/02 que aprueba el Reglamento del Sistema Nacional de Control de Cosméticos y establece los lineamientos de la autorización sanitaria para la comercialización de cosméticos en Chile. Específicamente, el artículo n°44 establece que *“todos los ingredientes cosméticos del presente reglamento deben cumplir las especificaciones de calidad e inocuidad definidos”*. Por tanto, el uso de celulosa bacteriana como componente de productos cosméticos debe cumplir la normativa vigente. De igual manera, se presentan regulaciones e instituciones internacionales que implican a Chile y pueden estar relacionadas para comercializar celulosa bacteriana con estos fines en el mercado exterior. A continuación, se ejemplifican los más relevantes.

En el caso de Estados Unidos, la FDA es la encargada de normar la comercialización de cosméticos mediante la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFCA) y la Ley sobre Etiquetado y Embalaje (PFLA). En el caso de la Unión Europea, el Parlamento Europeo establece la Ley N°1223/2009 y establece “el marco regulador de la fabricación y comercialización de los productos cosméticos con fin de garantizar que estos no sean perjudiciales si se utilizan de forma normal o previsible”. En Japón, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW) y la Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos (PMDA) establece los requisitos del cumplimiento

normativos normando la seguridad y eficacia de productos cosméticos disponibles en el mercado japonés.

- **Medicina**

En Chile, el Ministerio de Salud dispone el decreto supremo 825/98 que dicta el Reglamento de Control de Productos y Elementos de Uso Médico y establece *“Los instrumentos, aparatos, dispositivos y otros artículos o elementos destinados al diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades de seres humanos o al reemplazo o modificación de sus anatomías y que no corresponden a los productos farmacéuticos, alimentos de uso médico y preparados cosméticos a que se refieren los artículos 97, 98 y 99 del Código Sanitario, sólo podrán ser fabricados, importados, comercializados o distribuidos en el país si poseen la certificación respectiva por cumplir con las normas y exigencias de calidad que les sean aplicables según su naturaleza, de acuerdo con el artículo 101 de ese Código y el presente reglamento”*. Por tanto, el uso de celulosa bacteriana como apósitos médicos debe cumplir la normativa vigente. De igual manera, se presentan regulaciones e instituciones internacionales que implican a Chile y pueden estar relacionadas para comercializar celulosa bacteriana con estos fines en el mercado exterior. A continuación, se ejemplifican los más relevantes.

En el caso de Estados Unidos, la FDA es la encargada de normar la comercialización de cosméticos mediante la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFCA) y la Ley sobre Etiquetado y Embalaje (PFLA). En la Unión Europea, todo producto con fines médicos se encuentra regulado por la legislación farmacéutica mediante la Ley 2001/83 la cual establece los requisitos del cumplimiento normativo para la autorización de su comercialización. En Japón, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW) y la Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos (PMDA) establece los requisitos del cumplimiento normativos normando la seguridad y eficacia de productos médicos disponibles en el mercado japonés.

- **Textil**

En Chile, el Ministerio de Economía, Fomento y Turismo promulgó la Ley 397 que crea la Superintendencia de la Industria Textil responsable del “regularizar las actividades de la Industria Textil de manera que se garantice la función social que debe satisfacer en un plano de libertad, pero resguardando, al mismo tiempo, los derechos de los consumidores y de los trabajadores”. Esto implica a su vez la vigía de condiciones de las materias primas, insumos y contar con una capacidad productiva capaz de satisfacer la demanda. Sin embargo, la normativa no hace mención respecto a la responsabilidad legal respecto al impacto medioambiental de la industria textil en territorio nacional.

Sin embargo, la reciente incorporación de la industria textil dentro del marco regulatorio de la reciente Ley de Responsabilidad Extendida del Productor (REP) y con entrada en vigor a partir de septiembre de 2023 viene a cubrir dicho vacío legal en respuesta al impacto ambiental generado por el desperdicio de textiles en el ecosistema. La Ley REP establece que “Los productores e importadores deberán organizar y financiar la recolección y valorización de residuos introducidos al mercado cumplimiento las metas establecidas por el Ministerio del Medio Ambiente”.

Por tanto, el uso de celulosa bacteriana como biotextiles debe cumplir la normativa vigente. De igual manera, se presentan regulaciones e instituciones internacionales que implican a Chile y pueden estar relacionadas para comercializar celulosa bacteriana con estos fines en el mercado exterior. A continuación, se ejemplifican los más relevantes.

En el caso de Estados Unidos, la FDA es la encargada de normar el uso, fabricación y comercialización de textiles mediante el “Código de Regulaciones Federales – artículo 177; Textiles y fibras”. En la Unión Europea, se presenta el “Reglamento textil nº1007/2011” sobre los nombres de las fibras, etiquetado y marcados relacionados con la composición de la fibra de los productos textiles

con fin de salvaguardar los intereses de los consumidores y eliminar posibles obstáculos del mercado interior. En Japón, los productos textiles están regulados por la " Ley sobre el control de productos domésticos que contienen sustancias nocivas, Ley No. 112 de 1973 " dictada por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar. Esta Ley tiene por objeto prevenir los riesgos para la salud resultantes de las sustancias químicas nocivas contenidas en los productos domésticos. La Ley prevé la designación de sustancias nocivas y establece los criterios necesarios para sus niveles de contenido permisibles.

4.3.1.2 Factores Económicos y Tecnológicos con foco en I+D

En la actualidad existe un alto grado de incertidumbre en la evolución de las perspectivas económicas mundiales dado principalmente por la persistencia del conflicto internacional entre Ucrania y Rusia, en conjunto con políticas macroeconómicas contractivas de las principales economías, el impacto generado por la pandemia COVID-19 y la desaceleración de la actividad económica de China (SUBREI, 2022). A pesar de mantener las estimaciones de crecimiento del PIB mundial en 3.2% para el 2022, el Fondo Monetario Internacional (FMI) disminuyó sus proyecciones de crecimiento a un 2.7% para 2023, mientras la OCDE lo sitúa en 3.0% para el año en curso y también rebajó sus proyecciones a un 2.2% en 2023. Para la región que implica a Chile, la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), proyectó un crecimiento de 3.2% en 2022 y un fuerte descenso a 1.4% para 2023. A continuación, se resumen las variaciones anuales del PIB a nivel internacional.

Tabla 13. Variación anual del PIB para el periodo entre 2019 y 2023 a nivel global, países desarrollados y países en vías de desarrollo (Obtenido desde SUBREI, 2022).

	2019	2020	2021	2022	2023
Mundo	2.9	-3.1	6.0	3.2	2.7
Países desarrollados	1.7	-4.5	5.2	2.4	1.1

Países en vías de desarrollo	3.7	-2.0	6.6	3.7	3.7
------------------------------	-----	------	-----	-----	-----

En la economía chilena, el menor ritmo de expansión de la actividad económica ha quedado de manifiesto según el Índice Mensual de Actividad Económica (IMACEC), que en agosto de 2022 experimentó un nulo crecimiento, frente a igual mes del año anterior. Según el Informe de Política Monetaria (IPOM) de septiembre de 2022, el Banco Central de Chile proyectó un crecimiento real entre 1.75% y 2.25% en 2022 en dirección hacia un rango contractivo que osciló entre -1.5% y 0.5%. El FMI lo situó en 2.0% para el año 2022 con una contracción de 0.9% para 2023. En consecuencia, Chile es uno de los países con menor crecimiento económico proyectado para el 2023 en Latinoamérica y demás países de la OCDE. (figura 24).

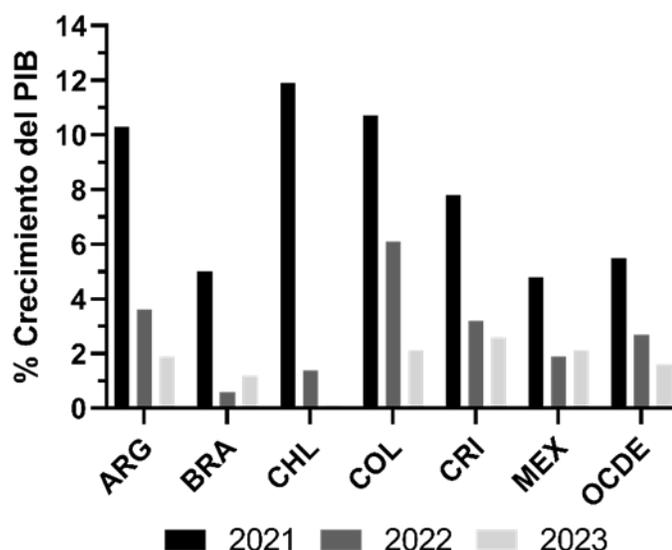


Figura 24. Comparación del comportamiento del Producto Interno Bruto (PIB) latinoamericano y países OCDE entre 2021 - 2023 (Obtenido desde OCDE, 2022).

Si bien se observaba un crecimiento sostenido del PIB nacional en entre el año 1999 y 2021, alcanzando un valor máximo de 267.869 millones de euros a finales de 2021 con un aumento en un 11.7% con respecto al año anterior. No obstante,

en el año 2022, se observa una significativa disminución del crecimiento del PIB con respecto al 2021 alcanzando un aumento de 2% (Figura 25) (OCDE. 2022).

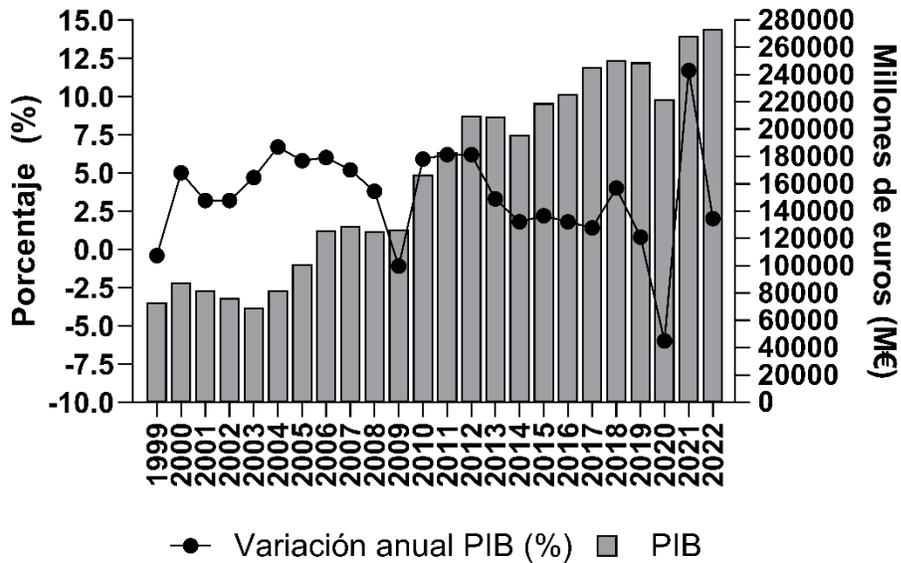


Figura 25. Comportamiento del PIB nacional y variación anual para el periodo entre 1999 y 2022 (Obtenido desde OCDE, 2022).

Específicamente, el escenario inflacionario actual representa una condición compleja y desafiante para las economías globales en donde la economía chilena continúa su proceso de ajuste tras los importantes desequilibrios acumulados durante 2021. Según el Informe de Política Monetaria del Banco Central, esta dinámica de inflación subyacente principalmente provocada por la pandemia COVID-19 se puede dividir en tres etapas; i) El primero, partir de marzo de 2020 se contempla el impacto inicial del cierre de la economía producto del COVID-19, lo que generó un impacto en la oferta y una presión sobre el precio al alza. Al mismo tiempo, las restricciones de movilidad y el ahorro precautorio implicaron una caída en la demanda y presiones en direcciones opuestas, en donde ambos efectos tendieron a cancelarse y resultaron en la escasa variación de los niveles de precios; ii) El segundo periodo abarca la totalidad de 2021 en donde la oferta se fue normalizando en la medida que las empresas se fueron adaptando a las nuevas condiciones y las cadenas de suministro se fueron restableciendo. Paralelamente, el relajamiento de las medidas de confinamiento e inyecciones de

liquidez a los hogares generaron un fuerte aumento de la demanda por bienes, reflejado en un impacto en la demanda que fue incrementándose durante ese año. De esta manera, se impulsó una importante aceleración de la inflación y iii) Finalmente, durante 2022, y en un contexto de alta demanda, la invasión rusa a Ucrania y la política de cero Covid-19 en China provocó un aumento significativo en los precios de los *commodities* y una interrupción de las cadenas de suministro a nivel mundial, gatillando un impacto en la oferta sumado a niveles previos de inflación elevados.

En la actualidad, existe una excesiva volatilidad inflacionaria la que puede mantenerse durante los próximos meses (Banco Central, 2023). Este aumento alcanzó un valor máximo de 14,1% en agosto de 2022 a partir del cual se ha ido reduciendo paulatinamente, de manera que el Banco Central ha previsto una disminución durante 2023 hasta alcanzar la meta de 3% en 2024. No obstante, existen diversos riesgos para recuperación de la economía nacional asociados al dinamismo económico internacional tales la posibilidad de entrada a un proceso de recesión de las economías de Estados Unidos y Europa, el bajo crecimiento económico del mercado chino y la persistencia del conflicto bélico entre Ucrania y Rusia. Debido a lo anterior, el Proyecto de Ley de Presupuestos Para el Sector Público 2023 considera la reactivación de la economía a través de la inversión pública de \$70.8 billones, gasto total de inversión que representa un 5.5% superior con respecto a la Ley de Presupuesto 2022 y que tendrá énfasis en la diversificación productiva con foco en sostenibilidad ambiental. En este punto en particular, la Ley de Presupuesto 2023 busca fortalecer el desarrollo productivo y enfrentar la crisis climática mediante el programa “Desarrollo Productivo Sostenible” liderado por el Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, que articula recursos hacia los Ministerios de Energía, Medio Ambiente y Ciencia, Tecnología e Innovación. En este contexto, el presupuesto del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo alcanzando \$155.280 millones, lo que implica un 15.2% de aumento con respecto al presupuesto anterior. Estos recursos permitirán el financiamiento de nuevas coberturas a programas de innovación,

difusión y transferencia tecnológica, formación de capital humano y emprendimiento. Además, este programa considera \$61.249 millones en créditos, destinados, entre otros, a proyectos de hidrógeno verde y pilotos de la Banca del Desarrollo.

4.3.1.3 Factores Sociales con foco en el medio ambiente

Según la encuesta nacional del medio ambiente realizada por el Ministerio del Medio Ambiente durante 2019, se informó que la protección y recuperación de los ecosistemas representa una preocupación relevante para el segmento encuestado compuesto por hombres y mujeres mayores de 18 años, habitantes de viviendas particulares ocupadas y pertenecientes a diferentes niveles socioeconómicos. Predominantemente, la población posee una visión negativa de la situación ambiental donde el 64% opinó que el avance en materia de protección del ambiente se encuentra estancada, 23.5% opinó que la situación ambiental empeoró y sólo un 12.5 % opinó que mejoró. Por otro lado, se informó que los principales problemas identificados por la población implican la contaminación del aire y el exceso de basura con un 32.8% y un 29.7 % respectivamente (ENA, 2019). Así mismo, dentro de las medidas efectivas para abordar estos problemas se encuentran la inversión en I+D para la búsqueda de soluciones tecnológicas y el incentivo económico a empresas que tomen medidas para la protección del medio ambiente.

4.3.2 Análisis FODA

Tabla 14. Identificación de las características internas de la propuesta de bionegocios.

Fortalezas	<ul style="list-style-type: none"> • Método productivo de alta eficiencia (Padhi & Gokhale, 2014). • Generación de biopelículas de celulosa bacteriana con propiedades mecánicas superiores a la celulosa vegetal (Wang et al., 2019). • Requiere una baja área de operación (Mohamed et al., 2022). • Menor costo de operación respecto a sistemas de producción convencionales a escala de laboratorio (Padhi & Gokhale, 2014). • Permite el uso de fuentes de carbono de bajo costo (Azeredo et al., 2019).
------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicación en diversas industrias productivas (Jagannath et al., 2010)
Debilidades	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de modelación cinética en sistemas BDR (Mohamed et al., 2022). • Dificultad de escalamiento (Mohamed et al., 2022). • Alta frecuencia de mantenimiento en componentes de accionamiento mecánico (Mohamed et al., 2022).
Oportunidades	<ul style="list-style-type: none"> • Connotación ambiental positiva por reciclaje de residuos agroindustriales (del Río et al., 2021). • Aumento en las tendencias de uso de biomateriales (Singh et al., 2019). • No presencia de empresas productoras de celulosa bacteriana a gran escala en Chile.
Amenazas	<ul style="list-style-type: none"> • Existe competencia incipiente en producción comercial de celulosa bacteriana. • Empresas productoras de celulosa vegetal que compiten por el mismo segmento del mercado. • Falta de interés por industrias alimenticias, cosméticas y biomédicas nacionales. • Importaciones de celulosa bacteriana extranjera. • Falta de personal capacitado. • Falta de financiamiento .

4.3.3 Modelo de negocios

Tabla 15. Modelo de negocios para la comercialización del sistema experimental BDR.

Socios Claves	Actividades claves	Propuesta de valor	Relación clientes	Clientes
<ul style="list-style-type: none"> Investigadores de la Universidad San Sebastián Empresas de servicios que diseñen y adapten soluciones biológicas. OTL de la Universidad San Sebastián Fabricantes a gran escala Clientes que otorguen datos de retroalimentación 	<ul style="list-style-type: none"> I+D Marketing enfocado a B2B Escalamiento Eliminación de riesgos Validación técnica y comercial Conformación de empresa Protección intelectual Estrategia de transferencia <p style="text-align: center;">Recursos Claves</p> <ul style="list-style-type: none"> Patente de invención. Instalación de producción e investigación. Equipamientos y procedimiento estándar 	<ul style="list-style-type: none"> Tecnología de producción innovadora y eficiente para la producción sustentable de celulosa bacteriana. Aumentar la producción de celulosa bacteriana, reducción de costos OPEX/CAPEX Servicios de atención al cliente 	<ul style="list-style-type: none"> Servicio al cliente Capacitaciones Mantenimiento Asesorías <p style="text-align: center;">Canales</p> <ul style="list-style-type: none"> Página Web. Redes Universidad San Sebastián. Acercamiento directo Conferencias y eventos de start-up 	<p>B2B:</p> <ul style="list-style-type: none"> Compañías que requieran celulosa bacteriana como materia prima para complementar su portafolio de productos en las siguientes áreas productivas: <ol style="list-style-type: none"> Fabricantes de alimentos. Fabricantes de insumos médicos. Fabricante de insumos cosméticos. Fabricantes de textiles.
Estructura de costes				Estructura de ingresos
<ul style="list-style-type: none"> I+D Infraestructura de producción y distribución. Marketing. Protección Intelectual. Consideraciones legales. Sueldos. Capacitaciones. Impuestos. 				<ul style="list-style-type: none"> Licenciamiento / Venta de tecnología. Venta directa de celulosa bacteriana a fabricantes. Servicio de asesorías, puesta en marcha y acompañamiento tecnológico. Inversionistas.

4.4 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.

Se caracterizó experimentalmente una cepa productora de celulosa bacteriana como base para inocular el sistema experimental BDR para determinar parámetros cinéticos aplicables en un análisis matemático para simular la cinética del bioproceso. A continuación, se describe el estudio experimental en matraces para determinar parámetros productivos a escala de laboratorio.

4.4.1 Determinación de biomasa

La figura 26 presenta una cinética de crecimiento microbioano realizada mediante cultivo en matraces agitados, los cuales fueron inoculados con las cepas *K. oboediens* y *cepa del vinagre* a 28°C en medio de cultivo HS (descrito en tabla 8).

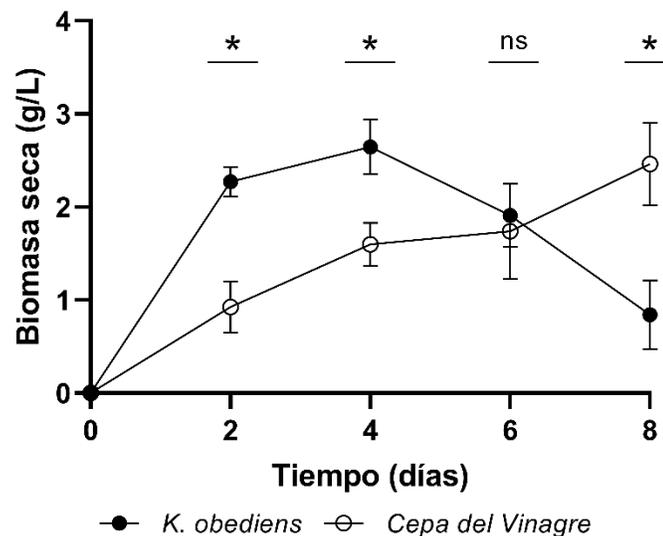


Figura 26. Comparación de las cinéticas de crecimiento *K. oboediens* y *cepa del vinagre* en un periodo de cultivo de 8 días (ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ y **** = $p < 0,0001$).

En el caso de *K. oboediens*, se evidencia un mayor crecimiento de la biomasa en los primeros 4 días de fermentación con respecto a la cepa del vinagre alcanzando un valor máximo de $2,644 \pm 0,294$ g/L y $1,600 \pm 0,231$ g/L

respectivamente. No obstante, y a diferencia de *K. oboediens*, se evidencia un crecimiento sostenido de la biomasa producida por la *cepa del vinagre* durante la totalidad del periodo de estudio alcanzando un valor máximo de $2,462 \pm 0,443$ g/L en el día 8.

4.4.2 Determinación del consumo de glucosa

Las figuras 27 y 28 representan las cinéticas de crecimiento y de consumo de glucosa mediante el cultivo matraces de las cepas *K. oboediens* y *cepa del vinagre* a 28°C en medio de cultivo HS respectivamente (descrito en tabla 8).

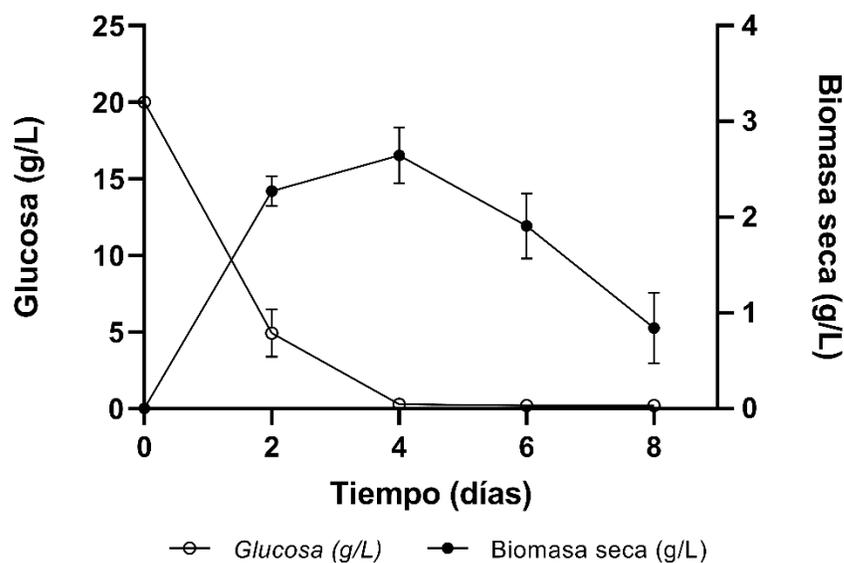


Figura 27. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del cultivo de *K. oboediens* en matraces en un periodo de 8 días.

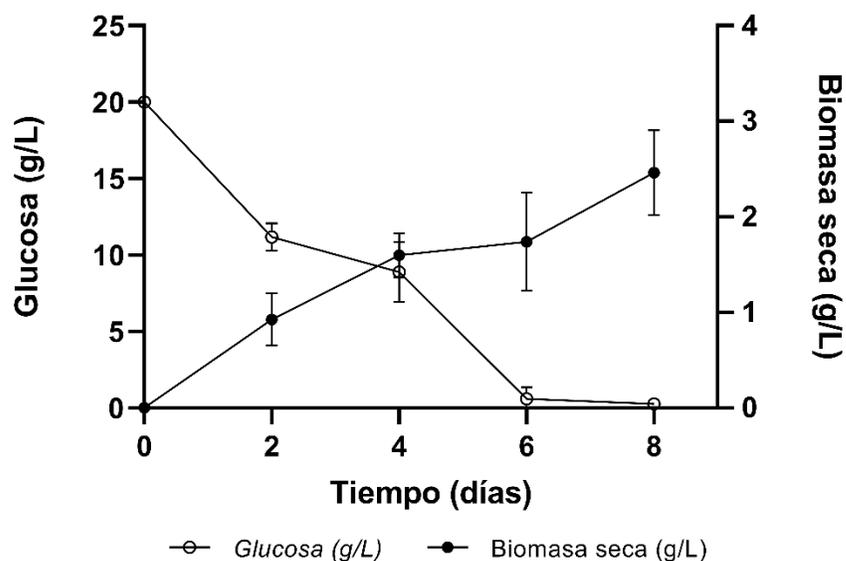


Figura 28. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del cultivo de cepa del vinagre en matraces en un periodo de 8 días.

En el caso de *K. oboediens*, en el día 4 se evidencia un consumo de un 99% de la glucosa presente en el medio HS, que corresponde a $0,273 \pm 0,050$ g/L de la fuente de carbono. A su vez, la totalidad del consumo de glucosa se produjo durante el último periodo de crecimiento de biomasa observado entre el día 2 y día 4. En el caso de la cepa del vinagre, el 99% de la glucosa consumida se observó al día 6 ($0,479 \pm 0,539$ g/L). Sin embargo, se observa un crecimiento de biomasa sin presencia de glucosa en el medio de cultivo entre el día 6 y 8. En la figura 29 se presenta en detalle el consumo de la glucosa por parte de ambas cepas y se constata que *K. oboediens* consume más tempranamente la fuente de carbono (al día 4) con respecto a la cepa del vinagre (al día 6).

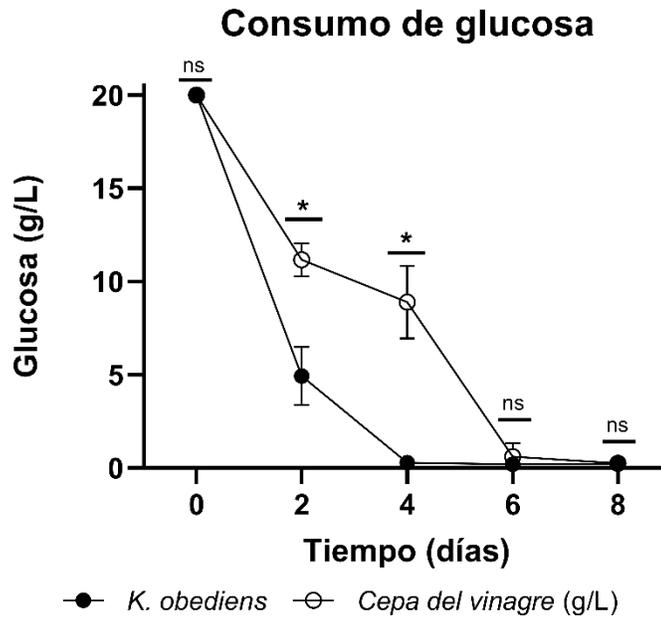


Figura 29. Comparación del consumo de glucosa entre *K. oboediens* y *cepa del vinagre* (ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ y **** = $p < 0,0001$).

4.4.3 Cuantificación de la celulosa bacteriana

La figura 30 fue construida a partir de los datos de celulosa producida en matraces con las cepas *K. oboediens* y *cepa del vinagre* a 28°C en medio de cultivo HS (descrito en punto tabla 8).

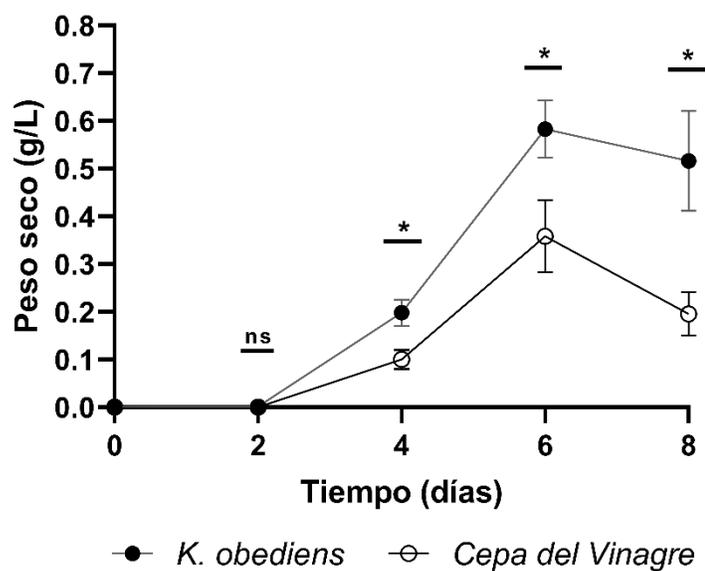


Figura 30. Cinética de producción de CB entre *K. oboediens* y *cepa del vinagre* en un periodo de cultivo de 8 días (ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ y **** = $p < 0,0001$).

En ambos casos, *K. oboediens* y *cepa del vinagre* evidencian una fase exponencial de producción de CB entre el día 2 y el día 6, alcanzando respectivamente $0,583 \pm 0,0603$ g/L y $0,358 \pm 0,0751$ g/L. De lo anterior, existe una diferencia estadísticamente significativa, siendo *K. oboediens* predominante en un 39% con respecto a la *cepa del vinagre*. Posteriormente, se evidencia una disminución de la producción de CB en el día 8 en *K. oboediens* y *cepa del vinagre* alcanzando $0,516 \pm 0,1045$ g/L y $0,1960 \pm 0,0459$ g/L respectivamente.

4.4.4 Rendimiento productivo y selección de cepa

Utilizando los datos obtenidos a partir del cultivo en matraces, se determinaron los parámetros de rendimiento de la producción de celulosa bacteriana en función de la biomasa y la glucosa consumida según los indicadores señalados en la tabla 16.

Tabla 16. Parámetros de rendimiento determinados en base a datos cinéticos obtenidos experimentalmente.

Indicador	<i>K. oboediens</i>	<i>Cepa del vinagre</i>	Unidad
Y x/s	13,3	8,8	%
Y p/s	2,9	1,8	%
Y p/x	25,7	14,9	%
Q	1,29	0,89	g/L*d

Se concluye que *K. oboediens* posee una mayor eficiencia en la conversión de glucosa en celulosa bacteriana respecto a la cepa aislada desde el vinagre con un 2,9% y 1,8% respectivamente. De igual manera, se observa que *K. oboediens* destina un mayor porcentaje de la fuente de carbono para la generación de biomasa respecto a la *cepa del vinagre* con un 13,3% y 8,8% respectivamente. Finalmente, se constata una mayor productividad volumétrica de *K. oboediens* con respecto a la cepa del vinagre con valores de 1,29 g/L*d y 0,89 g/L*d respectivamente.

4.4.5 Simulación de la producción de CB

La figura 31 representa los datos simulados para la producción de CB por parte de *K. oboediens* mediante BDR considerando los valores de rendimientos descritos en tabla 14 y el modelo matemático descrito en la ecuación 15.

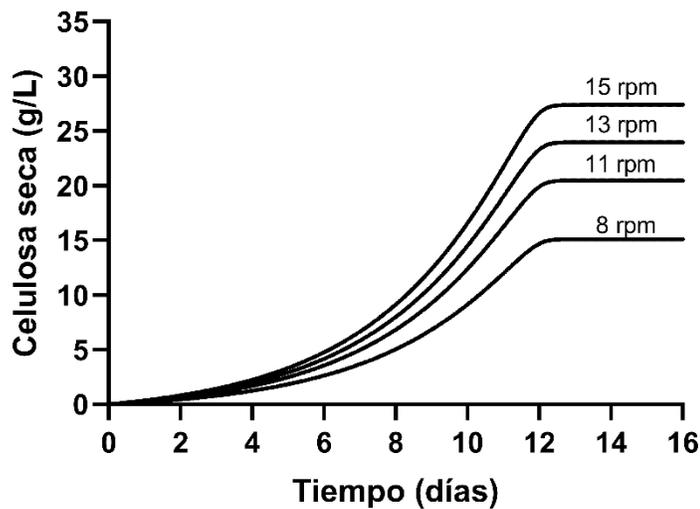


Figura 31. Simulación de la producción de CB en función para 4 valores de rotación (rpm) en la fermentación de *K. oboediens* en un sistema BDR durante un periodo de cultivo de 16 días.

A partir de estos resultados, es posible establecer que la producción de CB incrementa al aumentar la velocidad de rotación de los discos en un periodo de fermentación de 16 días. Específicamente, se evaluaron las velocidades de rotación 8, 11, 13 y 15 rpm, obteniendo valores de CB seca equivalente a 15,1 g/L, 20,5 g/L, 24 g/L y 27,4 g/L respectivamente. Los valores de productividad volumétrica para esta simulación se detallan en tabla 17.

Tabla 17. Productividades volumétricas simuladas para la producción de CB seca en velocidades crecientes de rotación para sistemas BDR.

Velocidad de rotación (rpm)	Q simulado (g/L*d)
8	3,3
11	4,5
13	5,3
15	6,0

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Diseñar y construir un sistema experimental en base a un biorreactor de disco rotatorio

Los BDR ofrecen ventajas competitivas en términos de producción de biopelículas de celulosa y biomasa bacteriana al generar una elevada superficie de contacto que favorece la adhesión de las bacterias a un sustrato y permite suministrar nutrientes y oxígeno de forma eficiente. Además, es considerado un método con bajos requerimientos de espacio, facilidad de operación, control y monitoreo (Cortez et al., 2008).

Hasta el momento, existen pocos estudios publicados que reporten el uso de BDR para la producción de celulosa bacteriana, no obstante, los trabajos reportados han demostrado capacidad para generar altas productividades respecto a métodos de producción convencionales. En este sentido, Soleimani et al., (2021) compararon la producción de CB en la fermentación de *K. xylinus* en un sistema BDR aireado y no aireado con respecto a la fermentación convencional estática para un volumen de 3 L de cultivo durante un periodo de 7 días. Este estudio reportó rendimientos de 21,12 g/L, 14,37 g/L y 12,35 g/L respectivamente, es decir, aumentaron la producción hasta aproximadamente el doble con respecto a la producción convencional. Según los autores, estos resultados derivan del hecho de que el área de interfase aire/líquido del reactor BDR es considerablemente más alta que la interfase del cultivo estático, favoreciendo así una mayor transferencia de oxígeno a *K. xylinus* durante la fermentación.

En este sentido, Krystynowicz et al., 2002 compararon la producción de CB mediante la fermentación estática y la fermentación en BDR aireado de *K. xylinus* E_{25} en función de la relación superficie/volumen ($S/V \text{ cm}^{-1}$) para un periodo de

cultivo de 7 días. Este estudio reportó que el cultivo estático cuenta con un S/V de $0,71 \text{ cm}^{-1}$ y un rendimiento 1.8 g/L . Por otro lado, el cultivo en BDR reportó un S/V de $1,03 \text{ cm}^{-1}$ alcanzando un rendimiento de $3,3 \text{ g/L}$ con la utilización de 24 discos. Similarmente, Pa'e et al., 2011 compararon la producción de CB mediante la fermentación estática y la fermentación en BDR por lotes de *K. xylinus* durante un periodo de cultivo de 5 días. En particular, los autores describieron un S/V de $0,2 \text{ cm}^{-1}$ y 0.6 cm^{-1} respectivamente, siendo el área superficial de BDR 3 veces superior con respecto al contenedor de la fermentación estática. Los autores reportaron un rendimiento de CB equivalente a $1,04 \text{ g/L}$ generado estáticamente y 5.41 g/L en BDR, siendo este último 5.2 veces superior con la utilización de 8 discos. Esto es concordante con lo descrito por Joris et al., 1990 indicando que una mayor superficie de contacto proporcionada por un sistema productivo tiene incidencia en la producción de CB. Inclusive, Serafica (1997) describió que los sistemas de discos rotatorios pueden incrementar el área superficial hasta en un orden de magnitud con respecto a los cultivos estáticos. En este sentido, el S/V calculado para el prototipo experimental con un volumen de trabajo efectivo de 4,5 litros y la utilización de 10 discos corresponde a 0.98 cm^{-1} . Lo anterior implica un 5% de diferencia con respecto a lo reportado por Krystynowicz et al., 2002 y un 63% superior con respecto a Pa'e et al., (2011). Utilizando estos valores como referencia, la producción esperada del prototipo experimental equivale a un rango entre $3,1 \text{ g/L}$ y $8,8 \text{ g/L}$.

Los sistemas BDR reportados en la actualidad han sido confeccionados de tal manera que no permiten versatilidad para estudiar el comportamiento de las diversas variables operacionales durante la fermentación de manera simultánea y que son fundamentales estudiar su comportamiento y optimizar los rendimientos productivos. Un ejemplo de lo anterior es el sistema BDR reportado por Soleimani et al., (2021), quienes investigaron la producción de CB mediante una modalidad de cultivo por lotes con capacidad limitada para evaluar parámetros operacionales. Además, el sistema tampoco contó con monitoreo continuo para el análisis de las variaciones del medio de cultivo tales como pH,

temperatura, OD, entre otros. Esto impide la oportuna toma de acciones correctivas ante condiciones desfavorables en la producción de CB. De igual manera, Lin et al., (2014) reportaron el uso de un sistema BDR para evaluar la producción de CB de manera semi-continua en función del tipo de material que componen los discos los cuales se encontraban semi sumergidos en el medio de cultivo. Sin embargo, los autores señalan una dificultad operacional producto de la necesidad del sistema de detenerse para inocular con medio de cultivo o suspensión bacteriana durante la fermentación, afectando así la productividad de CB.

En esta investigación, se diseñó un prototipo experimental BDR a escala de laboratorio, cuyo diseño permite el estudio de múltiples variables simultáneamente para monitorear y controlar la fermentación de bacterias productoras de CB. Este sistema ofrece la posibilidad de establecer condiciones óptimas para aumentar la eficiencia de los métodos actuales (figura 11, 12, 13, 14 y 15). Asimismo, la propuesta de diseño contempló un diagrama de operación y una lógica de control para su operación, permitiendo así el monitoreo continuo y simulación de condiciones de escalamiento (Figura 16 y 17).

5.2 Desarrollar un modelo de negocio para producir celulosa bacteriana a través de una empresa biotecnológica.

El modelo de negocios se basó en la utilización del prototipo experimental BDR para la producción eficiente de CB que permita viabilizar un negocio enfocado en la comercialización de CB como materia prima para su uso en los principales sectores productivos. La definición del contexto productivo en base al análisis de patentes, y que, a pesar de que no todas entregan como resultado una comercialización activa, el crecimiento, evolución y acumulación en categorías específicas otorgan directrices concretas para inferir tendencias del mercado, inversiones e innovaciones de productos y procesos relacionados (Kalpana et al., 2015; Schmoch, 2007).

A partir de un total de 116 ciclos de búsqueda realizadas sobre 1622 patentes existentes en la actualidad, se observó que los bioproductos basado en CB reportan un crecimiento acumulado exponencial en las últimas décadas (Figura 20). Al respecto, patentes clasificadas como “Química; Metalúrgica (C), Necesidades humanas (A), Técnicas industriales diversas (B); transportes, Textiles; papel (D) y electricidad (H)” fueron las más relevantes con un aporte del 56%, 20%, 9%, 9% y 5% al total de patentes presentes en las bases de datos internacionales en la actualidad (Figura 19 y figura 21). Específicamente, el modelo de negocios propuesto contempló como enfoque comercial a la industria de alimentos (A23 y C32), las ciencias médicas (A61), materiales compuestos (C08) y textiles (D01, D06 y D21) ya que en su conjunto representan el 80% del mercado de CB y pueden otorgar mayores beneficios económicos. Lo anterior es concordante con lo descrito por diversas investigaciones que señalan que las principales aplicaciones de CB se enfocan en alimentos, biomedicina, textiles, productos cosméticos y materiales compuestos (Bhat et al., 2018; Blanco et al., 2018; Charreau et al., 2013; Chauve & Bras, 2014; Halib & Ahmad, 2018; Tayeb & Tayeb, 2019; Tayeb et al., 2018; Wang et al., 2019). Además, los grandes tamaños de mercados de los enfoques comerciales seleccionados reafirman su selección ya que en su conjunto pueden sobrepasar los \$1.000 millones de dólares sólo en Estados Unidos (Donskova et al., 2018; Bianchet et al., 2020; da Silva et al., 2021)

Por otro lado, la estrategia de vigilancia tecnológica utilizada permitió la profundización e identificación de los mercados internacionales relevantes de celulosa bacteriana validando el interés productivo mediante el número de publicaciones de patentes obtenidas en las bases de datos. En este contexto, de las 1622 patentes de estudio son cesionarios un total de 433 entidades diferentes. Entre ellos, un 68,3% de los documentos pertenecen a instituciones académicas e investigación, un 28,4% a empresas y 3,3% a personas naturales (figura 32). Según el estudio realizado por Charreau et al., (2020), cerca de un 50% de las patentes corresponden al sector académico, 40% al sector empresarial y 10 %

repartidos entre personas naturales y colaboraciones industria-empresas para un periodo de estudio entre 1987 y 2022. Sin embargo, el estudio realizado contempla el análisis de las bases de datos internacionales entre el año 2010 y 2017. Por tanto, se infiere que más de la mitad de las invenciones aún no son transferidos a la industria.

En referencia a aquellos cesionarios que poseen el mayor número de patentes, las universidades de China representan una entidad predominante en el aporte de patentes relacionadas con CB. Específicamente, estas corresponden a la Universidad de Ciencia y Tecnología de Tianjin, Universidad Tecnológica del Sur de China, Universidad de Ciencia y Tecnología de Nanjing, Universidad Nacional Dong Hwa y Universidad de Donghua con 43, 43, 41, 34 y 28 patentes respectivamente. En términos de empresas, Hainan Yeguo Foods Co., Ltd. (China), Weyerhaeuser (USA) y Shandong Tiansheng Biotechnology Co., Ltd. (China) son predominan con 44, 11, y 9 respectivamente.

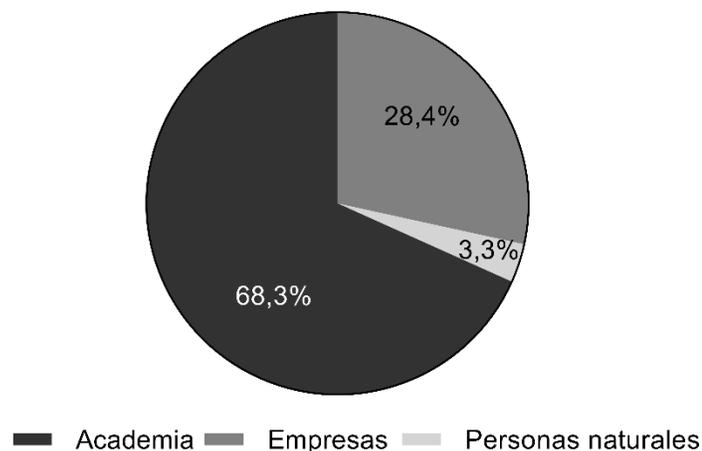


Figura 32. Aporte de patentes según tipo de cesionario con respecto al total de patentes de estudio.

El mayor contribuyente de patentes se concentra en China con un 80,4% del total de publicaciones internacionales (figura 22). Específicamente, las barreras políticas públicas, legales, sistema financiero, cultura, lenguaje, distancia geográfica, entre otros son considerados los factores más relevantes para la

toma de decisión en la entrada a un nuevo mercado. En particular, existen múltiples barreras de entradas a empresas que desean exportar a mercados asiáticos que dificultan la generación de negocios. Entre las principales se encuentran el acceso a un potencial de mercado sin explotar, gran variedad de datos geográficos superpuestos que requieren un enfoque personalizado, diferencias culturales, aceptación de las restricciones de precios predefinidos y el elevado costo para plantear una cadena de suministro en el país (Mesquita, 2016). En este sentido, la selección de China como potencial mercado de comercio de un potencial bionegocio no resulta favorable para la licitación de la tecnología BDR debido a la alta tasa de ocupación del nicho económico cubierto y las barreras de entrada señaladas (Hope & Lau, 2004). No obstante, los demás mercados señalados en la figura 22 si representan un potencial nicho económico de interés para la presente investigación destacando la ausencia de Chile, lo cual implica una ventaja para la generación de una patente de invención con un elevado índice de novedad.

Si bien existe una patente basada en un biorreactor de disco rotatorio disponible en las bases de datos WIPO, esta fue registrada el 21 de septiembre de 1999 (US5955326). De lo anterior, Ley de Patentes de EE. UU., 35 USC informa que “los plazos de protección patentada sobre una tecnología son de 20 años a partir de la fecha de presentación de la primera solicitud estadounidense o internacional”. El estudio no reveló una revalidación de la patente por parte de los autores, por ende, no existen potenciales conflictos de interés con los autores de la publicación si se busca el licenciamiento del prototipo experimental BDR en la actualidad.

La materialización del modelo de negocio bajo el contexto nacional está sujeto a diversos factores normativos, políticos, económicos y sociales que deben ser considerados. En este sentido, los resultados del análisis PESTEL señalan un panorama nacional que presenta marcos regulatorios que norman la producción, comercialización y distribución de CB como producto en el sector alimenticio y

médico. Además, las recientes encuestas señalan una connotación positiva en la población nacional hacia productos que generen un impacto ambiental positivo, por lo cual se presume una potencial facilidad para la inserción de CB en los mercados al contemplar la sustentabilidad en la propuesta de valor del modelo de negocios. No obstante, el contexto económico nacional actual se encuentra altamente afectado debido a diversos factores externos e internos generados en los últimos 3 años lo que representa un alto grado de incertidumbre y disminución del interés de inversionistas por modelos de negocios que contengan altos niveles de riesgo. Por lo tanto, es fundamental plasmar el modelo de negocios con una tecnología que permita asegurar un requerimiento productivo mínimo señalado por Donini et al., (2020) con un enfoque sostenible, en el marco de un enfoque de proyectos sostenibles para la subvención de proyectos de emprendimiento de base científico-tecnológico contemplado en el Plan de Presupuesto 2023.

5.3 Simular la producción de celulosa bacteriana utilizando un modelo matemático desarrollado para biorreactores de disco rotatorio.

La elección de un microorganismo capaz de sintetizar CB es un factor relevante para métodos productivos eficientes ya que existe una variedad de cepas taxonómicamente relacionadas con los géneros *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* y *Salmonella* las cuales son capaces producir este biopolímero (Torres et al., 2019).

En particular, *K. oboediens* fue seleccionada para la inoculación del sistema experimental BDR al ofrecer una mayor productividad volumétrica de CB con respecto a la cepa del vinagre (1,29 g/L*d y 0,89 g/L*d respectivamente). Esto es equivalente a un 31% superior de *K. oboediens* con respecto a la cepa del vinagre. Lo anterior es concordante con lo reportado por Li et al., (2022) en donde reportan productividades de CB entre 0,53 g/L*d y 2,33 g/L*d en diferentes cepas pertenecientes al género *Gluconacetobacter sp* fermentadas en diversas fuentes de carbono. Inclusive, Bae et al., (2003) reportó una productividad de 4,70 g/L*d

en el cultivo agitado de la cepa *A. xylinum BPR2001*. En este sentido, Islam et al., (2017) señalaron que el género *Komagataeibacter sp.* representa a las bacterias del ácido acético más eficientes para la producción de CB. Además, su elevada productividad en comparación con otras cepas productoras de CB le confiere la capacidad de ser utilizada con fines comerciales (Lin et al., 2013). Cabe destacar que las diferencias de productividades presentes en las diversas cepas son dependientes de los nutrientes del medio de cultivo, uso de aditivos y las condiciones operacionales de la fermentación (Campano et al., 2016). Por tanto, la selección de la cepa debe ser complementada mediante estrategias productivas como el uso de sistemas de producción más eficientes tales como los sistemas BDR.

La simulación para la producción de CB mediante el prototipo experimental BDR entregó una solución numérica señalada en ecuación 14, la cual evidenció un incremento de la producción de CB en función del aumento de la velocidad de agitación. La selección de la velocidad rotación de los discos es un desafío en el diseño del reactor BDR para una alta producción de celulosa bacteriana. En este contexto, Bungay et al., (1999) señalan que la velocidad de rotación a seleccionar puede corresponder al aumento de hasta cinco veces el radio del disco. Por otro lado, Soleimani et al., (2021) recomiendan utilizar hasta dos veces el radio del disco. Utilizando el lineamiento anterior, fueron seleccionados los valores de agitación de 8, 11, 13 y 15 rpm para la modelación de la producción de CB obteniéndose productividades volumétricas de 3,3 g/L*d, 4,5 g/L*d, 5,3 g/L*d y 6,0 g/L*d respectivamente. Esto es concordante por lo descrito por Soleimani et al., (2021) los cuales reportan valores de 3,8 g/L*d, 4,3 g/L*d, 6,0 g/L*d, y 4,3 g/L*d para las mismas velocidades de estudio respectivamente. Si bien existen una elevada correlación de las productividades entre 8 rpm y 13 rpm, los autores reportan una reducción de la producción de CB en valores por sobre 15 rpm. Similarmente, Kim et al., (2007) describieron la producción de CB por parte de *Gluconacetobacter sp. RKY5* en un BDR para rango de velocidades de agitación entre 15 rpm y 35 rpm reportando una mayor producción a la menor velocidad de rotación de estudio.

Si bien lo anterior evidencia concordancia con los datos simulados respecto a lo disponible en literatura, en el rango 8 y 15 rpm, el modelo propuesto no contempla el efecto de la velocidad de rotación en un rango superior al de estudio respecto a la productividad de CB debido a la falta de datos experimentales que permitan evaluar el efecto de cizallamiento sobre el comportamiento de las variables operacionales y su efecto sobre la totalidad de los fenómenos biológicos que pueden afectar la producción de CB. Según Bungay et al., (1999), elevadas velocidades de rotación en sistemas BDR generan desprendimiento de las células bacterianas adheridas al disco como consecuencia de la generación de efectos de cizallamiento en el medio de cultivo, disminuyendo el rendimiento de CB. Esto es concordante con lo descrito por Krystynowicz et al., 2002 quienes reportaron la obtención mayores rendimientos productivos a menores velocidades de rotación y la generación de efectos de desprendimiento a altas velocidades de rotación con consecuencias negativas en el rendimiento de CB. Por otro lado, Mayer & Benziman (1991) reportaron la aparición espontánea de mutantes celulares no productoras de CB ante incrementos de agitación, lo cual genera una disminución de la productividad de CB. Ryngajłło et al., (2020) señalaron que el aumento en la agitación genera el aumento del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, promoviendo así la degradación de la glucosa en ácido glucónico en lugar de CB. Por lo tanto, es fundamental contar con datos experimentales que permitan dilucidar estas incógnitas. No obstante, la presente simulación permite otorgar un escenario preliminar capaz de predecir productividades a bajas velocidades de rotación de modo de optimizar la producción de CB en el prototipo BDR. Este análisis contribuye en la búsqueda de alcanzar la producción mínima descrita por Donini et al., (2010) para viabilizar su uso en un potencial negocio para el área de alimentos, materiales compuestos, biomedicina y textiles.

CAPITULO 6

CONCLUSIÓN

Se diseñó un prototipo experimental BDR que mejora las limitaciones operaciones de los modelos BDR actuales. Este análisis tiene el potencial de contribuir a aumentar la productividad de CB, ya que mejora las capacidades de monitoreo de múltiples variables y facilita la investigación de variables críticas de fermentación tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto, velocidad de rotación, distancia entre discos, modalidad de operación, entre otros. Por lo tanto, el prototipo experimental posee variables de diseño que permiten establecer condiciones de cultivo y producción óptimas, que junto con un análisis cuantitativo del bioproceso a través de herramientas de simulación que permite proyectar las condiciones de escalamiento para alcanzar condiciones de producción de CB compatibles con los requerimientos de mercado.

Los principales mercados que sustentan la estrategia de negocio fueron establecidos para el sector alimenticio (A23 y C12), biomédico (A61), cosmético (A61), materiales compuestos (C08) y textil (D01, D06 y D21) que en su conjunto comprenden el 84% equivalente a 1364 patentes respecto al total de patentes de estudio. Además, estas se encuentran predominantemente en China, siendo el sector académico el cesionario predominante en un 40% por sobre el sector empresarial. Por tanto, el 16% restante se distribuyen en los demás países. Por ende, y a diferencia del mercado asiático, existe un mercado favorable en occidente debido a una baja tasa de ocupación del nicho económico para la comercialización de BC. Particularmente, en Chile no figuran patentes de invención relacionadas a métodos productivos en base a BDR para producción de CB, por tanto, existe la oportunidad de patentar el sistema propuesto con un elevado índice de novedad. No obstante, el escenario económico actual representa la principal barrera para la implementación del modelo de negocio.

Fue posible la simulación de la producción de CB en un BDR utilizando ecuaciones descritas en literatura y datos cinéticos determinados experimentalmente en la cepa *K. oboedien*, cuyos resultados son concordantes con productividades previamente reportadas en este tipo de sistemas a bajas velocidades de rotación. Si bien la modelación del bioproceso fue exitosa, el modelo no contempla ecuaciones que consideren aspectos potencialmente inhibitorios de la producción de CB, tales como una excesiva velocidad de rotación, variaciones del pH, temperatura, distancia entre discos, entre otros.

Por lo tanto, el presente estudio entrega luces de la posibilidad de optimizar los rendimientos productivos y viabilizar su producción a nivel comercial mediante un bioproceso basado en tecnología de BDR. Así mismo, los análisis de mercado y de propiedad intelectual realizados confirman que esta tecnología tiene el potencial de sustentar un bionegocio en base a la producción y comercialización de CB en diferentes mercados nacionales e internacionales.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

A Abol-Fotouh, D., Hassan, M. A., Shokry, H., Roig, A., Azab, M. S., & Kashyout, A. E. H. B. (2020). Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60315-9>

Aburto, F., Cartes, E., Mardones, O., & Rubilar, R. (2021). Hillslope soil erosion and mobility in pine plantations and native deciduous forest in the coastal range of south-Central Chile. *Land Degradation and Development*, 32(1), 453–466. <https://doi.org/10.1002/ldr.3700>

Aguilar, L.F. (2010). Governance and Evaluation: a potentially fruitful relationship. *Revista Gestión y Análisis de Políticas Públicas*, 4: 23-51.

Akil, H. M., Omar, M. F., Mazuki, A. A. M., Safiee, S., Ishak, Z. A. M., & Abu Bakar, A. (2011). Kenaf fiber reinforced composites: A review. *Materials and Design*, 32(8–9), 4107–4121. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2011.04.008>

Alavi, M. & Nokhodchi, A. (2019). An overview on antimicrobial and wound healing properties of ZnO nanobiofilms, hydrogels, and bionanocomposites based on cellulose, chitosan, and alginate polymers. *Carbohydr Polym.*, 227: 115349. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115349

Atalla, R. & Vanderhart, D. (1984). Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. *Science*, 223 (4633): 283-285. DOI: 10.1126/science.223.4633.283.

Augimeri, R. V., Varley, A. J., & Strap, J. L. (2015). Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: Lessons learned from diverse biofilm producing Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>

Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(February). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>

Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B.R., Risberg, B. & Gatenholm, P. (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9): 2141-2149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.026>

Bae, S. & Shoda, M. (2004). Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. *Biotechnology Progress*, 20(5): 1366-1371. <https://doi.org/10.1021/bp0498490>.

Bagherniya, M., Babaeipour, V. & Soleimani, A. (2021). Optimization of Bacterial Nano-Cellulose Production in Bench-Scale Rotating Biological Contact Bioreactor by Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 40(2):407-416. 10.30492/IJCCE.2020.38040

Barrera Pedraza, D. (2018). Celulosa chilena: Avances y perspectivas de su comercio exterior: enero de 2018. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 3–12. www.odepa.gob.cl

Basta, A. H., & El-Saied, H. (2009). Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 2098–2107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04467.x>

Behera, S. & Ray, C (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol*, 86: 656-669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>

Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). Marine anthropogenic litter. *Marine Anthropogenic Litter*, 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>

Betlej, I., Krajewski, K. J., Boruszewski, P., & Zakaria, S. (2021). Bacterial cellulose-properties and its potential application. *Sains Malaysiana*, 50(2), 493–505. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5002-20>

Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C. C., Verma, V., Wang, H. T., Ismadji, S., & Cheng, K. C. (2020). Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 397–414. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>

Bogdanović, E., Lazić, V., Vodnik, V., Budimir, M., Marković, Z. & Dimitrijević, S. (2014). Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters*, 128(1): 75-78. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.106>.

Brigham, C. (2017). Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. In *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3>

BROWN, A. J. (1886). Brown on acetic ferment. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49(432), 432–439.

Buruaga-Ramiro, C., Valenzuela, S., Valls, C. & Roncero, M.B. (2020). Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper. *Cellulose* 27(6) 3412-3426. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03025-9>

Çakar, F., Özer, I., Aytakin, A. Ö., & Şahin, F. (2014). Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.103>

Caramihai, M. & Severin, I. (2013). Bioprocess modeling and control. *Biomass Now: Sustainable Growth and Use* (Matovic, DB, ed.), InTech, Rijeka.

Carranza, J. (2016) *Etología Adaptativa: el comportamiento como producto de la selección natural*. UCO Press y Publ. Universidad de Extremadura. 704 pp.

Castro, C., Cleenwerck, I., Trcek, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., Aguirre, R., Putaux, J-L. & Gañán, P. (2012). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose- and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63(3):1119-1125. DOI: 10.1099/ijs.0.043414-0.

Cavalcanti, A.B., Suzumura, E.A., Laranjeira, L.N., Paisani, D.M., Damiani, L.P., Guimarães, H.P., Romano, E.R., Regenga, M., Taniguchi, L.N.T., Teixeira, C., 2, Pinheiro de Oliveira, R., Ribeiro, F., Diaz-Quijano, F.A., Soares de Alencar-Filho, M., Silva-Maia, I., Bernardete-Caser, E., de Oliveira, W., Carvalho-Borges, M., de Aquino-Martins, P., Matsui, M., Ospina-Tascón, G.A., Giancursi, T.S., Giraldo-Ramirez, N.D., Regina-Rios, S., Pasquotto de Lima, M.G., Hasan, M.G., Szczeklik, M., Rios, F., Britto-Passos, M., Berwanger, O. Ribeiro de Carvalho, C.R. (2017). Effect of Lung Recruitment and Titrated Positive End-Expiratory

Pressure (PEEP) vs Low PEEP on Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 318(14):1335-1345.

Cavka, A., Guo, X., Tang, S-J. & Winestrand, S. (2013). Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1):25. DOI:10.1186/1754-6834-6-25.

Chantereau, G., Sharma, M., Abednejad, A., Vilela, C., Costa, E. M., Veiga, M., Antunes, F., Pintado, M. M., Sèbe, G., Coma, V., Freire, M. G., Freire, C. S. R., & Silvestre, A. J. D. (2020). Bacterial nanocellulose membranes loaded with vitamin B-based ionic liquids for dermal care applications. *Journal of Molecular Liquids*, 302, 112547. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112547>

Chavan, A. & Mukherji, S. Dimensional analysis for modeling oxygen transfer in rotating biological contactor. *Bioresource Technology*, 99(1): 3721-8. DOI: 10.1016/J.Biortech.2007.07.021.

Chávez-Pacheco, J.L., Martínez-Yee, S., Contreras-Zentella, M. & Escamilla-Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1):18-25.

Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.

Chen, L., Hong, F., Yang, X. xia, & Han, S. fen. (2013). Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresource Technology*, 135, 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029>

Chen, P., Cho, S. Y., & Jin, H. J. (2010). Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromolecular Research*, 18(4), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s13233-010-0404-5>

Chiaoprakobkij, N., Seetabhawang, S., Sanchavanakit, N. & Phisalaphong, M. (2019). Fabrication and Characterization of Novel Bacterial Cellulose/Alginate/Gelatin Biocomposite Film. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 30(11):1-20. DOI:10.1080/09205063.2019.1613292.

Choi, Y.C. & Morgenroth, E. (2003). Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci Technol.* 2003;47(5):69-76.

Cielecka, I., Szustak, M., Kalinowska, H. & Gendaszewska-Darmach, E. (2019). Glycerol-plasticized bacterial nanocellulose-based composites with enhanced flexibility and liquid sorption capacity. *Cellulose* 26(2): 5409-5426. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02501-1>

Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>

Cui, Z., Li, P.P. & Zhang, D. (2012). Survival and performance of two cellulose-degrading microbial systems inoculated into wheat straw-amended soil. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(1): 126-132. <https://doi.org/10.4014/jmb.1102.02021>.

Cuypers, D., Geerken, T., Gorissen, L., Lust, A., Peters, G., Karstensen, J., Sylvia Prieler, Fisher, G., Hizsnyik, E., & Velthuisen, H. Van. (2013). The impact of EU consumption on deforestation: Comprehensive analysis of the impact of EU consumption on deforestation. In Technical Report - 063 - European Commission (Issue June). <https://doi.org/10.2779/822269>

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>

Czaja, W., Romanovicz, D., & Brown, R. malcolm. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 11(3/4), 403–411. <https://doi.org/10.1023/b:cell.0000046412.11983.61>

de Amorim, J. D. P., de Souza, K. C., Duarte, C. R., da Silva Duarte, I., de Assis Sales Ribeiro, F., Silva, G. S., de Farias, P. M. A., Stingl, A., Costa, A. F. S., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics

and engineering. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 851–869. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>

De Mattos, I.B., Nischwitz, S.P., Tuca, A.-C., Groeber-Becker, F., Funk, M., Birngruber, T., Mautner, S.I., Kamolz L.-P. & Holzer, J.C.J. (2020). Delivery of antiseptic solutions by a bacterial cellulose wound dressing: Uptake, release and antibacterial efficacy of octenidine and povidone-iodine. *Burns*, 46:918–927.

Dissanayake, D.M.S.C. & Ismael, F.M. (2013). Mathematical Modeling Of Bacterial Cellulose Production By *Acetobacter Xylinum* Using Rotating Biological Fermentor. 27th Conference on Modelling and Simulation. DOI:10.7148/2013-0459

Dobre, T., Stoica, A., Parvulescu, O. C., Stroescu, M., & Iavorschi, G. (2008). Factors influence on bacterial cellulose growth in static reactors. *Revista de Chimie*, 59(5), 591–594. <https://doi.org/10.37358/rc.08.5.1835>

Doerr, S. H., Shakesby, R. A., Blake, W. H., Chafer, C. J., Humphreys, G. S., & Wallbrink, P. J. (2006). Effects of differing wildfire severities on soil wettability and implications for hydrological response. *Journal of Hydrology*, 319(1–4), 295–311. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2005.06.038>

Donini, Í. A. N., De Salvi, D. T. B., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Ecletica Quimica*, 35(4), 165–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>

Dourado, F., Fontão, A., Leal, M., Cristina Rodrigues, A. y Gama, M. (2016a). “Capítulo 12: Modelado de procesos y evaluación tecnoeconómica de un proceso de fermentación de nanocelulosa bacteriana industrial”, en *Nanocelulosa bacteriana: de la biotecnología a la bioeconomía*, eds

Draushuk, A. T., Choy, C. O., Kumar, S., McReynolds, J. H., and Olson, J. R. (1997). Modulation of cytochrome P450 by 5,5'-bis-trifluoromethyl-2,2'-dichlorobiphenyl, a unique environmental contaminant. *Toxicology* 120(1): 197–205. doi: 10.1016/s0300-483x(97)00056-5.

Drozd, R., Szymańska, M., Rakoczy, R., Junka, A., Szymczyk, P., & Fijałkowski, K. (2019). Functionalized Magnetic Bacterial Cellulose Beads as Carrier for

Lecitase® Ultra Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 176–193. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2816-1>

Drzyzga, O., & Prieto, A. (2019). Plastic waste management, a matter for the 'community.' *Microbial Biotechnology*, 12(1), 66–68. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13328>

El-Saied, H., Basta, A. H., & Gobran, R. H. (2004). Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (Bacterial cellulose and its application). *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 43(3), 797–820. <https://doi.org/10.1081/PPT-120038065>

Fabra, M.J., López-Rubio, A., Ambrosio, J. & Lagaron, J.M. (2016). Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. *Food Hydrocolloids*, 61:261-268. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.025>.

Feng, X., Ullah, N., Wang, X., Sun, X., Li, C., Bai, Y., Chen, L. & Li, Z. Characterization of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917. *J Food Sci*, 80 (10): E2217-27. DOI: 10.1111/1750-3841.13010

Fernandes, M., Gama, F.M., Dourado, F.O.Q. & Souto, A.P. (2019). Development of novel bacterial cellulose composites for the textile and shoe industry. *Microbial Biotechnology* 12(3):1-12. doi:10.1111/1751-7915.13387.

Fontana, J. D., Koop, H. S., Tiboni, M., Grzybowski, A., Pereira, A., Kruger, C. D., da Silva, M. G. R., & Wielewski, L. P. (2017). New Insights on Bacterial Cellulose. In *Food Biosynthesis* (Issue June 2019). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811372-1.00007-5>

Foresti, M. L., Vázquez, A., & Boury, B. (2017). Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 157, 447–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.008>

Fürsatz, M., Skog, M., Sivilér, P., Palm, E., Aronsson, E., Skallberg, A., Greczynski, G., Khalaf, H., Bengtsson, R. & Aili, D. (2018). Functionalization of

bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L-Lysine. *Biomedical Materials*, 13 (2): 25014.

Galperin, M. Y., & Institutet, K. (2016). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, 23(9), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>. Bacterial

García, C. & Prieto, M.A. (2018). Bacterial cellulose as a potential bioleather substitute for the footwear industry. *Microbial Biotechnology*, 12(4):582-585. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13306>.

Ghazimoradi, S., James, A. A Scale-up Design Procedure for Rotating Biological Contactors. *International Journal of Engineering*, 16 (2): 133-146.

Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5593>

Gomide, J.L., Colodette, J.L., Oliveira, R.C. & Silva, C.M. Technological characterization of the new generation of Eucalyptus clones in Brazil for Kraft pulp production. *Revista Árvore*, 29 (1) 129-137.

Grady, C.P.L. Jr. (1982) Modelling of biological fixed films—A state of the art review. In: Wu YC, Smith ED, Miller RD, Patken (eds) *Proceedings of the 1st international conference on fixed-film biological processes*, April 20–23. University of Pittsburgh, Ohio, USA, pp 344–403.

Granger, C., Leger, A., Barey, P., Langendorff, V., and Cansell, M. (2005). Influence of formulation on the structural networks in ice cream. *Int. Dairy J.* 15, 255–262. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.07.009

Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings- entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2013–2025. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265>

Grimson, M. J., Haigler, C. H., & Blanton, R. L. (1996). Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during

culmination in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science*, 109(13), 3079–3087.

Groot, J., Bing, X., Bos-Brouwers, H., & Bloemhof-Ruwaard, J. (2014). A comprehensive waste collection cost model applied to post-consumer plastic packaging waste. *Resources, Conservation and Recycling*, 85(2014), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.10.019>

Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803–807. <https://doi.org/10.1126/science.297.5582.803>

Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>

Guasch-Ferré, M., Babio, N., Martínez-González, M.A., Corella, D., Ros, E., Martín-Peláez, S., Estruch, R., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Santos-Lozano, J.M., Serra-Majem, L., Bulló, M., Toledo, E., Barragán, R., Fitó, M., Gea, A. & Salas-Salvadó, J. (2015). *Am J Clin Nutr.*, 102(6): 1563-1573.

Guo, Y., Zhang, X., Hao, W., Xie, Y., Chen, L., Li, Z., et al. (2018). Nano-bacterial cellulose/soy protein isolate complex gel as fat substitutes in ice cream model. *Carbohydr. Polym.* 198, 620–630. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.078

Gupta A., Briffa S.M., Swingler S., Gibson H., Kannappan V., Adamus G., Kowalczyk M., Martin C., Radecka I. (2020). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin-Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications. *Biomacromolecules*. 21:1802–1811. doi: 10.1021/acs.biomac.9b01724.

Ha, J. H., Shah, N., Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2011). Bacterial cellulose production from a single sugar α -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. *Process Biochemistry*, 46(9), 1717–1723. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.024>

Ha, J., Khan, I S., Lee, S.Y., Park, J., Khan, T. & Park, J.K. (2008). Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25:812-815.

Ha, J., Shah, N., Ul-Islam, M., Khan, T. & Park, J.K. (2011). Bacterial cellulose production from a single sugar α -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. *Process Biochemistry*, 46(9):1717-1723. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.024>.

Hainan Yeguo Foods Co Ltd (2020). Available online at: <http://www.yeguo.com> (accessed July 10, 2022).

Han, y., Li, c., Cai, Q., Bao, X., Tang, T., Ao, H., Liu, J., Jin, M., Zhou, Y., Wan, Y. & Liu, Z. (2020). Studies on bacterial cellulose/poly(vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma. *Biomed Mater*, 15(3): 035022. DOI 10.1088/1748-605X/ab56ca.

Heinze, T. (2015). Cellulose: Structure and properties. *Advances in Polymer Science*, 271, 1–52. https://doi.org/10.1007/12_2015_319

Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., & Duflos, G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 182, 781–793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.096>

Hestrin, S. & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J.*, 58(2):345-352. doi: 10.1042/bj0580345.

Hinterstoisser, B., & Salmén, L. (2000). Application of dynamic 2D FTIR to cellulose. *Vibrational Spectroscopy*, 22(1–2), 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(99\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(99)00063-6)

Holtzapple, M. T. (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 998–1007. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X001851%0Ahttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X001851>

Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A. M., & Schmauder, H. P. (2006). Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: Evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537–545. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620162>

- Hsieh, J. T., Wang, M. J., Lai, J. T., & Liu, H. S. (2016). A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 63, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.020>
- Huber, A., Iroumé, A., Mohr, C., & Frêne, C. (2010). Efecto de plantaciones de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus* sobre el recurso agua en la Cordillera de la Costa de la región del Biobío, Chile. *Bosque*, 31(3), 219–230. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002010000300006>
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V. & Gupta, S.G. (2013). Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources. *J Microb Biochem Technol*, 5(2):31-33. DOI:10.4172/1948-5948.1000095.
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T. & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. *Cellulose*, 26, 2895-2911.
- Ibrahim, S., Riahi, O., Said, S. M., Sabri, M. F. M., & Rozali, S. (2019). Biopolymers From Crop Plants. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.11573-5>
- Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., & Ashfaq, H. (2016). Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. *Advances in Enzyme Research*, 04(02), 44–55. <https://doi.org/10.4236/aer.2016.42005>
- Indriyati, Frecilla, N., Nuryadin, B.W., Irmawate, Y. & Srikandace, Y. (2020). Enhanced Hydrophobicity and Elasticity of Bacterial Cellulose Films by Addition of Beeswax. *Macromolecular Symposia*, 391(1):1900174. <https://doi.org/10.1002/masy.201900174>.
- INSTITUTO FORESTAL. (2020). Anuario Forestal 2020. <https://wef.infor.cl/publicaciones/anuario/2020/Anuario2020.pdf>
- Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 102, 1166–1173.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110>

Jagannath, A., Raju, P. S., & Bawa, A. S. (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 43(8), 1197–1203. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.009>

Janpetch, N. & Saito, N. (2016). Fabrication of Bacterial Cellulose-ZnO Composite via Solution Plasma Process for Antibacterial Applications. *Carbohydrate Polymers* 148(1): 335-344.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.066>

Ji, X., Xu, Y., Zhang, C., Chen, N. & Lu, X. (2012). A new locus affects cell motility, cellulose binding, and degradation by *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(1): 161-170. DOI: 10.1007/s00253-012-4051-y

Jozala, A. F., de Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa-Jr, A., Grotto, D., Gerenutti, M., & Chaud, M. V. (2016). Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2063–2072. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>

Jozala, A. F., Pértile, R. A. N., dos Santos, C. A., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Seckler, M. M., Gama, F. M., & Pessoa, A. (2015). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1181–1190. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>

Kaewnopparat, S., Sansernluk, K., & Faroongsarng, D. (2008). Behavior of freezable bound water in the bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum*: An approach using thermoporosimetry. *AAPS PharmSciTech*, 9(2), 701–707. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9104-2>

Keshk, S. M. (2014). Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000150>

- Keshk, S.M.A.S., Rzek, T.A.A.M.A. & Sameshima, K. (2011). Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses. *African journal of biotechnology* 5(17):1519-1523.
- Khalid, A., Khan, R., Khan, T. & Ul-Islam, M. (2017). Bacterial Cellulose-Zinc Oxide Nanocomposites as a Novel Dressing System for Burn Wounds. *Carbohydrate Polymers* 164 (1): 214-221. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.061.
- Khattak, W. A., Khan, T., Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., Wahid, F., & Park, J. K. (2015). Production, characterization and biological features of bacterial cellulose from scum obtained during preparation of sugarcane jaggery (gur). *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8343–8349. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1936-7>
- Kim, B.J. & Molof, A. (1982). The Scale-Up and Limitation of Physical Oxygen Transfer in Rotating Biological Contractors. *Water Science and Technology*, 14(1): 569-579.
- Kim, Y.-J., Kim, J.-N., Wee, Y.-J., Park, D.-H., & Ryu, H.-W. (2007). Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 in a Rotary Biofilm Contactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(4), 529–537. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-181-3_44
- Kimura, S., Ohshima, C., Hirose, E., Nishikawa, J., & Itoh, T. (2001). Cellulose in the house of the appendicularian *Oikopleura rufescens*. *Protoplasma*, 216(1–2), 71–74. <https://doi.org/10.1007/BF02680133>
- Klemm, D., Heublein, B. & Fink, Hans-Peter. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie*, 44 (22): 2258-3393.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)

Ko, H., Zhai, L., Park, J.H., Lee, J.Y., Kim, D. & Kim, J. (2018). Poly(vinyl alcohol)–lignin blended resin for cellulose-based composites. *Applied Polymer Science*, 135(34). DOI:10.1002/app.46655.

Kose, R., Kasai, W. & Kondo, T. (2011). Switching Surface Properties of Substrates by Coating with a Cellulose Nanofiber Having a High Adsorbability. *FIBER* 67(7):163-167. DOI:10.2115/fiber.67.163.

Krasteva, P.V., Bernal-Bayard, J., Travier, L., Martin, F.A., Kaminski, P-A., Karimova, G., Fronzes, R. & Ghigo, J-M. (2017). Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nat Commun*, 8(1):2065.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçalves-Miśkiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189–195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>

Kubsad, V., Chaudhari, S. & Gupta, S. (2004). Model for oxygen transfer in rotating biological contactor. *Water research*, 30(20): 4297-4304. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.016>.

Kumar, V., Sharma, D. K., Bansal, V., Mehta, D., Sangwan, R. S., & Yadav, S. K. (2019). Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium. *Bioresource Technology*, 275(October 2018), 430–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.042>

Kurosumi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakamura, Y. (2009). Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 333–335. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.009>

Kusano Sakko Inc (2020). Disponible en línea en: <https://www.kusanosk.co.jp/lab/2016> (consultado el 20 de agosto de 2020).

Laavanya, D., Shirkole, S. & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295(1):126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>.

Lakshmi, D. S., Trivedi, N., & Reddy, C. R. K. (2017). Synthesis and characterization of seaweed cellulose derived carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 157(November), 1604–1610. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.042>

Lamb, J. B., Willis, B. L., Fiorenza, E. A., Couch, C. S., Howard, R., Rader, D. N., True, J. D., Kelly, L. A., Ahmad, A., Jompa, J., & Harvell, C. D. (2018). Plastic waste associated with disease on coral reefs. *Science*, 359(6374), 460–462. <https://doi.org/10.1126/science.aar3320>

Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of Urinary Bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 300(11), 1303–1310. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>

Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., and Bras, J. (2012). “Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review,”

Lazarini, S.C., Aquino, R., Amaral, A.C. & Corbi, F.C.A. (2016). Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose* 23(1):737-748. DOI:10.1007/s10570-015-0843-4

Le Ouay, B. & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nanotoday*, 10(3): 339-354. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>

Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 10–32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>

Leitao, A.F., Faria, M.A., Faustino, A. & Moreira, R. (2015). A Novel Small-Caliber Bacterial Cellulose Vascular Prosthesis: Production, Characterization, and Preliminary In Vivo Testing. *Macromolecular Bioscience*, 16(1): 139-150. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500251>.

- Li, Y., Xie, D., Xiao, J., Wu, W., Zhang, L., Xiao, H. & Chen, J. (2020). Dual responsive copolymers-grafted microfibrillated cellulose composites for removing lead ions from aqueous solution. *Journal of Cleaner Production.*, 258: 120867. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120867>.
- Lima, H. L. S., Nascimento, E. S., Andrade, F. K., Brígida, A. I. S., Borges, M. F., Cassales, A. R., Muniz, C. R., Souza Filho, M. D. S. M., Morais, J. P. S., & Rosa, M. D. F. (2017). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice - An agroindustry waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(3), 671–680. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150514>
- Lin, K.W. & Lin, H.W. Quality characteristics of Chinese-style meatball containing bacterial cellulose (nata) *J. Food Sci.* 2004;69:SNQ107–SNQ111. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13378.x
- Lin, S. P., Hsieh, S. C., Chen, K. I., Demirci, A., & Cheng, K. C. (2014). Semi-continuous bacterial cellulose production in a rotating disk bioreactor and its materials properties analysis. *Cellulose*, 21(1), 835–844. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0136-8>
- Liu, C. L. C., Kuchma, O., & Krutovsky, K. V. (2018). Mixed-species versus monocultures in plantation forestry: Development, benefits, ecosystem services and perspectives for the future. *Global Ecology and Conservation*, 15(August), e00419. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2018.e00419>
- Liu, W., Du, H., Zhang, M., Liu, K., Liu, H., Xie, H., Zhang, X., & Si, C. (2020). Bacterial Cellulose-Based Composite Scaffolds for Biomedical Applications: A Review. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(20), 7536–7562. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00125>
- Lopes, T. D., Riegel-Vidotti, I. C., Grein, A., Tischer, C. A., & Faria-Tischer, P. C. de S. (2014). Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.047>

Luo, J., Davijani, A., Clive Liu, H. & Chang, H. (2017). Influence of high loading of cellulose nanocrystals in polyacrylonitrile composite films. *Cellulose* 24(4): 1745-1758. DOI:10.1007/s10570-017-1219-8.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. & Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66 (3): 506-77. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.

M. Gama, F. Dourado y S. Bielecki (Amsterdam: Elsevier), 199–214. doi: 10.1016/C2013-0-16061-8

M. Iguchi;, S. Yamanaka;, & A. Budhiono; (2000). Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270.

Mammadova, A., Masiero, M., & Pettenella, D. (2020). Embedded deforestation: The Case study of the Brazilian-Italian bovine leather trade. *Forests*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/F11040472>

Mandenius, C-F. & Brundin, A. (2008). Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*. 24(6): 1191-1203. <https://doi.org/10.1002/btpr.67>

Mandour, Y.M.H., Shendy, M.F., Badie, S., Elrefai, A., Mohammed, S. & Menem, M.O.A. (2019). Use of bacterial cellulose in closure of nasal septal perforation. *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2019 Jul;5(4):830-835. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/issn.2454-5929.ijohns20192701>.

Manfredi Vale, Marta Pantalone, Morena Bragagnolo. Collaborative Perspective in Bio-Economy Development: A Mixed Method Approach. 18th Working Conference on Virtual Enterprises (PROVE), Sep 2017, Vicenza, Italy. pp.553-563, [ff10.1007/978-3-319-65151-4_49ff](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65151-4_49ff). [ffhal-01674905f](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65151-4_49ff)

Marcos-García, M., Menéndez, E., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2016). Obtaining bacterial cellulose as alternative to plant cellulose. *New Biotechnology*, 33(3), 413. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.10.075>

Mazotto, A.M., Silva, J., Almeida de Brito, L.A., Rocha, N.U. & Souza-Soares, A. (2021). How can microbiology help to improve sustainability in the fashion industry?. *Environmental Technology & Innovation*, 23:101760. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101760>.

Menoj, M.K. & Velayudhan, A. (2008). Modeling of Purification Operations in Biotechnology: Enabling Process Development, Optimization, and Scale-Up. *Biotechnology Progress*, 23(1): 68-73. <https://doi.org/10.1021/bp060378m>.

Mikkelsen, D., Flanagan, B.M., Dykes, G.A. & Gidley, M. (2009). Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2):576-83. DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x.

Mohamed, F., Jamil, M. & Zain, F.M. (2019). Sustainable Material: Challenges and Prospect. *Journal of Advanced Research in Materials Science* 57(1): 7-18.

Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, 117, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>

Mohite, B.V. & Patil, S.V. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnol Appl Biochem*, 61(2): 101-110. DOI: 10.1002/bab.1148

Monika, O., Peresin, M.S., Johansson, L.S. & Tammelin, T. (2013). Clean and reactive nanostructured cellulose surface. *Cellulose*, 20, 983-990. DOI:10.1007/s10570-013-9920-8.

Moniri, M., Boroumandmoghaddam, A. & Azizi, S. (2018). In vitro molecular study of wound healing using biosynthesized bacteria nanocellulose/silver nanocomposite assisted by bioinformatics databases. *International Journal of Nanomedicine*, 13(1): 5097-5112. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164573>.

Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J. & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev*, 40(7): 3941-3994. DOI:10.1039/c0cs00108b.

Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1119–1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300033>

Mwanza, B. G., & Mbohwa, C. (2017). Major Obstacles to Sustainability in the Plastic Industry. *Procedia Manufacturing*, 8(March 2017), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.02.021>

Najafpour GD, Zinatizadeh AAL, Lee LK (2006) Performance of a three-stage aerobic BDR reactor in food canning wastewater treatment. *Biochem Eng J* 30(3):297–302

Najafpour, G. D., Zinatizadeh, A. A. L., & Lee, L. K. (2006). Performance of a three-stage aerobic BDR reactor in food canning wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 30(3), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.013>

Nakashima, K., Yamada, L., Satou, Y., Azuma, J. I., & Satoh, N. (2004). The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Development Genes and Evolution*, 214(2), 81–88. <https://doi.org/10.1007/s00427-003-0379-8>

Nguyen, V.T., Flanagan, B.M., Gidley, M. & Dykes, G.A. (2008). Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* Strain from Kombucha. *Current Microbiology* 57(5):449-53. DOI:10.1007/s00284-008-9228-3.

Nisar, T., Wang, Z.-C., Alim, A., Iqbal, M., Yang, X., Sun, L., et al. (2019). Citrus pectin films enriched with thinned young apple polyphenols for potential use as bio-based active packaging. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 695–705. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1640798>.

Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., & Langan, P. (2003). Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), 14300–14306. <https://doi.org/10.1021/ja037055w>

O’Sullivan, A.C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(1): 173-207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>.

Ochaikul, D., Chotirittikrai, K., Chantra, J. & Wutigornsombatkul, S. (2006). Studies on fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 WITH BACTERIAL CELLULOSE FROM *Acetobacter xylinum* TISTR 967. (2006). *KMITL Sci. Tech. J.* 6, 13–17.

- Okiyama, A., Motoki, M., and Yamanaka, S. (1993). Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food Hydrocoll.* 6, 503–511. doi: 10.1016/S0268-005X(09)80074-X
- Olatunji, O. (2015). Natural polymers: Industry techniques and applications. *Natural Polymers: Industry Techniques and Applications*, 1–370. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1>
- Pa'e, N. (2009). Rotary disc reactor for enhanced production of microbial cellulose. Master Degree Thesis
- Pacheco, G., Nogueira, C. R., Meneguim, A. B., Trovatti, E., Silva, M. C. C., Machado, R. T. A., Ribeiro, S. J. L., da Silva Filho, E. C., & da S. Barud, H. (2017). Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. *Industrial Crops and Products*, 107(May), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.026>
- Padhi, S. K., & Gokhale, S. (2014). Biological oxidation of gaseous VOCs - Rotating biological contactor a promising and eco-friendly technique. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(4), 2085–2102. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.09.005>
- Pal, S., Shrivastava, J.P. & Mukhopadhyay, S.K. (2017). Effects of biocides and metals on antibiotic resistance: a genomic and metagenomic perspective. PhD thesis. University of Gothenburg. ISBN 978-91-629-0047-2.
- Palma, L.D. & Verdone, N. (2009). The effect of disk rotational speed on oxygen transfer in rotating biological contactors. *Bioresour Technol*, 100(3):1467-1470. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.058.
- Park, J. K., Jung, J. Y., & Khan, T. (2009). Bacterial cellulose. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, 34(6), 724–739. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.724>
- Park, J.K., Jung, J.Y. & Park, Y.H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnol Lett*, 25(24): 2055-2090. DOI: 10.1023/b:bile.0000007065.63682.18.
- Paximada, P., Koutinas, A.A., Scholten, E. & Mandala, I.G. (2015). Effect of bacterial cellulose addition on physical properties of WPI emulsions. Comparison

with common thickeners. *Food Hydrocolloids*, 54(1): 245-254. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.10.014.

Payn, T., Carnus, J. M., Freer-Smith, P., Kimberley, M., Kollert, W., Liu, S., Orazio, C., Rodriguez, L., Silva, L. N., & Wingfield, M. J. (2015). Changes in planted forests and future global implications. *Forest Ecology and Management*, 352, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.021>

Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277–1286. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y>

Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., Martin, A. A., da Silva, R., & de Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>

Pogorelova, N., Rogachev, E., Digel, I., Chernigova, S., and Nardin, D. (2020). Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties. *Materials* 13:2849. doi: 10.3390/ma13122849

Portela, R., Leal, C.R., Almeida, P.L. & Sobral, R.G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4): 586-610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>.

Raghavendran, V., Asare, E. & Roy, I. (2020). Chapter Three - Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. *Advances in Microbial Physiology*, 77, 89-138. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.07.002>

Raghavendran, V., Asare, E., & Roy, I. (2020). Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.07.002>

Ragunathan, D. (2013). Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash waters. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 275–290. <https://doi.org/2004R0726-v.7> of 05.06.2013

Rahman, S. S. A., Vaishnavi, T., Vidyasri, G. S., Sathya, K., Priyanka, P., Venkatachalam, P., & Karuppiah, S. (2021). Production of bacterial cellulose

using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82596-4>

Rani, M. U., & Appaiah, A. (2011). Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Annals of Microbiology*, 61(4), 781–787. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0196-7>

Rebelo, A., Liu, C., Schafer, K-H. & Saumer, M. (2019). Poly(4-vinylaniline)/Polyaniline Bilayer-Functionalized Bacterial Cellulose for Flexible Electrochemical Biosensors. *Langmuir* 35(32): 10354-10366. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01425>

Revin, V., Liyaskina, E., Nazarkina, M., Bogatyreva, A., & Shchankin, M. (2018). Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012>

Reza, M. & Cuenca, M. (2019). The multi-stage vertical bioreactor in water engineering. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98 (1), 172-185. DOI:10.1002/cjce.23621

Rios, R. V., Garzón, R., Lannes, S. C. S., and Rosell, C. M. (2018). Use of succinyl chitosan as fat replacer on cake formulations. *LWT* 96, 2660–2265. doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.041

Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F. C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*, 5(September). <https://doi.org/10.1038/srep14340>

Rodríguez, A.G., dos Santos, M. & Echeñique, O. (2019). Hacia una bioeconomía sostenible en América Latina y el Caribe: elementos para una visión regional, *Recursos Naturales y Desarrollo CEPAL*, 60 pp.

Rodriguez, M. T. (2017). Production of Bacterial Nanocellulose by Fermentation Process. *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona*, Bachelor's Thesis, January.

Rojewska, A., Boczkaja, K., Karewicz, A. & Wolski, K. (2017). Modified bionanocellulose for bioactive wound-healing dressing. *European Polymer Journal*, 96(1):200-209. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.010>

Roman, M., Haring, A.P. & Bertucio, T.J. (2019). The growing merits and dwindling limitations of bacterial cellulose-based tissue engineering scaffolds. *Curr Opin Chem Eng*, 24:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.03.006>

Roman, M., Haring, A.P. & Bertucio, T.J. (2019). The growing merits and dwindling limitations of bacterial cellulose-based tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 24: 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.03.006>.

RömLing, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, 23(9), 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>

Salas, C., Donoso, P. J., Vargas, R., Arriagada, C. A., Pedraza, R., & Soto, D. P. (2016). The forest sector in chile: An overview and current challenges. *Journal of Forestry*, 114(5), 562–571. <https://doi.org/10.5849/jof.14-062>

Sani, A. & Dahman, Y. (2009). Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2): 151-164. <https://doi.org/10.1002/jctb.2300>.

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

Shah, M.P., Reddy, G.V., Bonarjee, R., Babu, P.R. & Kothahi, I.L. (2005). Microbial degradation of Banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001) and *Aspergillus* spp. MPS-002), *Process Biochemistry*, 40(1), 445-451.

Shao, W., Wang, S., Wu, J. & Min, H. (2016). Synthesis and Antimicrobial Activity of Copper nanoparticles Loaded Regenerated Bacterial Cellulose Membranes. *RSC Advances* 6(70): 65879-65884. <https://doi.org/10.1039/C6RA07984A>.

Sheu, F., Wang, C.L. & Shyu, Y.T. (2000). Fermentation of *Monascus purpureus* on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus-nata* Complex. *J. Food Sci.*, 65 (2): 342-345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16004.x>

Shezad, O., Khan, S., Khan, T., and Park, J.K. (2010). Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. *Carbohydrate Polymers* 82 (1): 173–180.

Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>

Shrivastava, A. (2018). Introduction to Plastics Engineering. Introduction to Plastics Engineering, 1–16. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-39500-7.00001-0>

Siddhanta, A. K., Chhatbar, M. U., Mehta, G. K., Sanandiyaa, N. D., Kumar, S., Oza, M. D., Prasad, K., & Meena, R. (2011). The cellulose contents of Indian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 919–923. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9599-2>

Sijabat, E.K., Nuruddin, A., Aditiawate, P. & Purwasasmita, B.S. (2020). Optimization on the synthesis of bacterial nano cellulose (BNC) from banana peel waste for water filter membrane applications. *Materials Research Express*, 7(5): 055010. DOI 10.1088/2053-1591/ab8df7.

Sokolnicki, A. M., Fisher, R. J., Harrah, T. P., & Kaplan, D. L. (2006). Permeability of bacterial cellulose membranes. *Journal of Membrane Science*, 272(1–2), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.06.065>

Soleimani, A., Hamedi, S., Babaeipour, V. & Rouhu, M. (2021). Design, construction and optimization a flexible bench-scale rotating biological contactor (RBC) for enhanced production of bacterial cellulose by *Acetobacter Xylinium*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 44(6):1071-1080. DOI: 10.1007/s00449-021-02510-0.

Song, J.E., Silva, C., Cavaco-Paulo, A.M. & Kim, H.R. (2019). Functionalization of Bacterial Cellulose Nonwoven by Poly(fluorophenol) to Improve Its Hydrophobicity and Durability. *Front Bioeng Biotechnol.* 7:332. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00332.

Swan, S. H. (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental Research*, 108(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.08.007>

Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., Kruse, R. L., Calafat, A. M., Mao, C. S., Redmon, J. B., Tennant, C. L., Sullivan, S., Teague, J. L., Drobni, E. Z., Carter, B. S., Kelly, D., Simmons, T. M., Wang, C., Lumbreras, L., Villanueva, S., Diaz-Romero, M., ... Maifeld, M. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(8), 1056–1061. <https://doi.org/10.1289/ehp.8100>

Swazey, J. M. (2014). Surfactant Thickened Systems Comprising Microfibrous Cellulose and Methods of Making Same. U.S. Patent No 8,772,359 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Swazey, J., Morrison, N., Yang, Z. F., Compton, J., and Nolan, T. (2013). Microfibrous Cellulose Composition Comprising Fermentation Media and Surfactant. U.S. Patent No 10,292,927 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Swazey, J.M. & Madison, N. (2010). Methods of Improve the Compatibility and Efficiency of Powdered Versions of Microfibrous Cellulose. U.S. Patent No 2011/0,059,883 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Swingler S, Gupta A, Gibson H, Kowalczyk M, Heaselgrave W, Radecka I. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. *Polymers*. 2021; 13(3):412. <https://doi.org/10.3390/polym13030412>

Tahara, N., Tabuchi, M., Watanabe, K., Yano, H., Morinaga, Y. & Yoshinaga, F. (1997). Degree of Polymerization of Cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 Decreased by Cellulase Produced by the Strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (11); 1862-1865. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1862>

Tang, W., Jia, S., Jia, Y., & Yang, H. (2010). The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0151-y>

- Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W. & Bhattarakosol, P. (2005). Effect of Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter* sp. *J. Sci. Res. Chula. Univ.*, 30(2).
- Thompson, A., Davis, J. D., & Oliphant, A. J. (2016). Surface runoff and soil erosion under eucalyptus and oak canopy. *Earth Surface Processes and Landforms*, 41(8), 1018–1026. <https://doi.org/10.1002/esp.3881>
- Torgbo, S. & Sukyai, P. (2019). Fabrication of microporous bacterial cellulose embedded with magnetite and hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Mater. Chem. Phys.* 237:121868. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.121868>.
- Torres, D., K. & Zuluaga M., T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Colombia.
- Torres, F., Commeaux, S., & Troncoso, O. (2012). Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(4), 864–878. <https://doi.org/10.3390/jfb3040864>
- Ul-Islam, M., Khan, S., Khattak, W. A., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2015). Synthesis, chemistry, and medical application of bacterial cellulose nanocomposites. In *Advanced Structured Materials* (Vol. 74, Issue January 2017). https://doi.org/10.1007/978-81-322-2473-0_13
- Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>
- Ul-Islam, M., Ullah, M.W., Khan, S. & Park, J.L. (2020). Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37, 925-937.
- Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., & Yang, G. (2019). Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose. In *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials* (Issue March). <https://doi.org/10.1002/9783527807437.ch4>

- Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Khan, S., Kim, Y., & Park, J. K. (2016). Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydrate Polymers*, 136, 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.010>
- Valero-Valdivieso, M. F., Ortigón, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: Avances y perspectivas. *DYNA (Colombia)*, 80(181), 171–180.
- Velásquez-Riaño, M., & Bojacá, V. (2017). Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates. *Cellulose*, 24(7), 2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>
- Vermeulen, S. J., Campbell, B. M., & Ingram, J. S. I. (2012). Climate change and food systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 37, 195–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-020411-130608>
- Verschuren, P., Cardona, T., Nout, M., De Gooijer, K. & Van Den Heuvel J. Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. *J Biosci Bioeng* 2000; 89(5):414-419. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89089-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89089-1)
- Villarrubia-Gómez, P., Cornell, S. E., & Fabres, J. (2018). Marine plastic pollution as a planetary boundary threat – The drifting piece in the sustainability puzzle. *Marine Policy*, 96(November), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.11.035>
- Vismara, E., Bernardi, A. & Bongio, C. (2019). Bacterial Nanocellulose and Its Surface Modification by Glycidyl Methacrylate and Ethylene Glycol Dimethacrylate. Incorporation of Vancomycin and Ciprofloxacin. *Nanomaterials* 9(12):1668. DOI:10.3390/nano9121668
- Volova, T. G. , Shumilova, A. A. , Shidlovskiy, I. P. , Nikolaeva, E. D. , Sukovatiy, A. G. , Vasiliev, A. D. , and Shishatskaya, E. I. (2018) Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics. *Polym Test* 65: 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.10.023>
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review.

Carbohydrate Polymers, 219(February), 63–76.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>

Watanabe, A., Morita, S., and Ozaki, Y. (2007). Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I α studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I β . *Biomacromolecules* 8(1): 2969–2975. doi: 10.1021/bm700678u

Welch, K., Cai, Y., & Strømme, M. (2012). A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(2), 418–431. <https://doi.org/10.3390/jfb3020418>

Wu, J. M., & Liu, R. H. (2012). Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylicus*. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.003>

Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>

Yamamoto, H., and Horn, F. (1994). In situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I α and I β as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS)¹³C NMR spectroscopy. *Cellulose* 1, 57–66. doi: 10.1007/BF0081879.

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y., & Uryu, M. (1989). The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 24: 3141–3145.

Yin, N., Santos, T.M.A., Auer, G.K., Crooks, J.A., Oliver, P.M. & Weibel, D.B. (2014). Bacterial cellulose as a substrate for microbial cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 80(6): 1926-1932. DOI: 10.1128/AEM.03452-13.

Yu, X., & Atalla, R. H. (1996). Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(2), 145–146. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)01109-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)01109-9)

- Yuan, H., Chen, L., Hong, F. F., and Zhu, M. (2018). Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization. *Carbohydr. Polym.* 196, 457–464. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.055
- Zhang, L., Zheng, S., Hu, Z., fon, L., Wang, Y., & Zhang, X. (n.d.). applied sciences Preparation of Polyvinyl Alcohol / Bacterial-Cellulose- Coated Biochar – Nanosilver Antibacterial Composite Membranes.
- Zheng, L., Li, S., Luo, J., & Wang, X. (2020). Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.593768>
- Zhong C. Y. (2008). Bacterial cellulose gel face mask, CN Patent, 200610075040.8.
- Zhong, C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>
- Zhong, C., Zhang, G-C., Liu, M., Zheng, X-T., Han, P-P., Jia, S-R. (2013). Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(14): 6189-6199. DOI: 10.1007/s00253-013-4908-8.
- Zou, X., Zhang, S., Chen, L., Hu, J., & Hong, F. F. (2020). Determination of live and dead *Komagataeibacter xylinus* cells and first attempt at precise control of inoculation in nanocellulose production. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 458–469. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13494>
- Zywicka, A., Peitler, D., Rakoczy, R., Konopacki, M., Kordas, M., & Fijałkowski, K. (2015). The effect of different agitation modes on bacterial cellulose synthesis by *Gluconacetobacter xylinus* strains. *Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica*, 14(1).
- Żywicka, A., Wenelska, K., Junka, A., Czajkowska, J., & Fijałkowski, K. (2019). An efficient method of *Yarrowia lipolytica* immobilization using oil- and emulsion-modified bacterial cellulose carriers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 41, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.06.002>

Zywicka, Anna, Peitler, D., Rakoczy, R., Konopacki, M., Kordas, M., & Fijałkowski, K. (2015). The Effect of Different Agitation Modes on Bacterial Cellulose Synthesis. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 14(1), 137–150.

CAPITULO 8

ANEXOS

8.1 ANEXO 1

8.1.1 Niveles Jerárquicos de codificación de patentes CIP 2022

- Sección: Está compuesto por un símbolo de sección identificado por una letra mayúscula entre A-H, y un título de sección el cual indica de manera general el contenido. Este conjunto de conocimientos es el primer nivel jerárquico de la CIP y está dividido en las siguientes 8 secciones:
 - A: Necesidades corrientes de la vida
 - B: Técnicas industriales diversas; transportes
 - C: Química, metalúrgica
 - D: Textiles; papel
 - E: Construcciones fijas
 - F: Mecánica; iluminación; calefacción; armamento; voladura
 - G: Física
 - H: Electricidad
- Clase: Son las divisiones de las secciones. Es el segundo nivel jerárquico de la CIP. Se compone de:
 - Símbolo de clase representado por una letra seguida de un número de 2 dígitos. Ejemplo: A61.
 - Título de la clase indica el contenido de la clase. Ejemplo: A61: Ciencias Médicas o Veterinarias; Higiene.
- Subclase: Son las subdivisiones de las clases y es el tercer nivel jerárquico de la CIP. Se compone de:
 - Es el símbolo de clase seguido de una letra mayúscula. Ejemplo: A61F.
 - Título de la Subclase: indica el contenido de la subclase. Ejemplo: A61F: Filtro implantables en los vasos sanguíneos; Prótesis;

Dispositivos que mantienen la luz o que evitan el colapso de estructuras tubulares, p. ej. Stents ; Dispositivos de ortopedia, cura o para la contracepción; Fomentación; tratamiento o protección de ojos y oídos; vendajes, apósitos o compresas absorbentes; botiquines de primeros auxilios.

- Grupo: Son las subdivisiones de una subclase que se puede ubicar en un grupo principal, y es el cuarto nivel jerárquico de la CIP. o en un subgrupo que son los niveles inferiores dependientes de un grupo principal de la clasificación. Se compone de:
 - Símbolo del grupo: Es el símbolo de la subclase seguido de dos números separados por una barra diagonal (/). Ejemplo: A61F2/.
 - Símbolo del grupo principal: Es el símbolo de la subclase seguido de un número de uno a tres dígitos, de la barra diagonal (/) y del número 00. Ejemplo: A61F2/00: Filtros implantables en los vasos sanguíneos; Prótesis, es decir, elementos de sustitución o de reemplazo para partes del cuerpo; Dispositivos para unirlos al cuerpo; Dispositivos para proporcionar permeabilidad o para evitar que colapsen las estructuras tubulares del cuerpo, p. ej. Stents.
 - Símbolo del subgrupo: Son las subdivisiones de los grupos principales. El símbolo del subgrupo está compuesto por el símbolo de la subclase seguido del número (de uno a tres dígitos) de su grupo principal, de la barra diagonal (/) y de un número de al menos dos dígitos distintos de 00. Ejemplo: A61F2/66.
 - Título del subgrupo: Define con precisión, dentro del ámbito cubierto por su grupo principal, una materia considerada de utilidad para la búsqueda relativa. Ejemplo: A61F2/66 Pasteles; Articulaciones del tobillo.

Véase la Clasificación Internacional de Patentes en:
<https://ipcpub.wipo.int/?notion=scheme&version=20210101&symbol=none&>

menulang=en&lang=en&viewmode=f&fipcpc=no&showdeleted=yes&indexes=no&headings=yes¬es=yes&direction=o2n&initial=A&cwid=none&tree=no&searchmode=smart (WIPO, 2022).

8.2 ANEXO 2

Tabla 18. Nomenclatura universal de países WIPO.

Código	País
CN	China
US	Estados Unidos
WO	Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO)
JP	Japón
PL	Polonia
RU	Rusia
KR	República de Corea
TW	Taiwán
RO	Rumania
AU	Australia
CA	Canadá
EP	Oficina Europea de Patentes
SE	Suecia
GB	Reino Unido
DE	Alemania
EA	Organización Asiática de Patentes
MX	México
NZ	Nueva Zelanda
ZA	Sudáfrica
ES	España
SI	Eslovenia

8.3 ANEXO 3:

8.3.1 Cuantificación de la biomasa seca

8.3.1.1 Normalidad: Método de Shapiro-Wilks

- **Hipótesis:**

H0: $X_i \approx N$ (Los datos se ajustan a una distribución normal): SW calculado > SW teórico y p-valor > 0,05.

Ha: $X_i \neq N$ (Los datos no se ajustan a una distribución normal): SW calculado < SW teórico y p-valor < 0,05.

• *K. xylinus*

N° días	Xi (menor a mayor)	$(Xi-\bar{X})^2$	Coefficiente de SW	Xi INV (mayor a menor)	Abs (Xi-Xi INV)
0	2,500333333	0,904527804	0,6646	0	2,500333333
2	2,496	0,896304004	0,2413	0,841666667	1,654333333
4	1,908333333	0,128928871	0	1,908333333	0
6	0,841666667	0,50069776		2,496	
8	0	2,400227204		2,500333333	

Promedio Xi	Suma $(Xi-\bar{X})^2$	Suma (Coef. SW*Abs(Xi-Xi INV))	Indicador de SW calculado	Indicador de SW teórico	p-valor
1,549266667	4,830685644	2,060912167	0,879245571	0,762	0.95 - 0.98

Conclusión: Debido a que SW calculado > SW teórico y p-valor > 0.05, se acepta la hipótesis nula y los datos se ajustan a una distribución normal.

- Cepa del vinagre

N° días	Xi (menor a mayor)	$(Xi-\bar{X})^2$	Coefficiente de SW	Xi INV (mayor a menor)	Abs (Xi-Xi INV)
0	2,462333333	1,248284804	0,6646	0	2,500333333
2	1,737666667	0,15413476	0,2413	0,841666667	1,654333333
4	1,600333333	0,065161071	0	1,908333333	0
6	0,925	0,176456004		2,496	
8	0	1,809204338		2,500333333	

Promedio Xi	Suma $(Xi-\bar{X})^2$	Suma (Coef. SW*Abs(Xi-Xi INV))	Indicador de SW calculado	Indicador de SW teórico	p-valor
1,549266667	4,830685644	2,060912167	0,879245571	0,762	0,95 – 0,98

Conclusión: Debido a que SW calculado > SW teórico y p-valor > 0.05, se acepta la hipótesis nula y los datos se ajustan a una distribución normal.

Tabla 19. p-valores de Shapiro-Wilks.

Coeficientes a_{in} para el contraste de Shapiro-Wilks

n	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2		0.7071										
3		0.7071	0.0000									
4		0.6872	0.1677									
5		0.6646	0.2413	0.0000								
6		0.6431	0.2806	0.0875								
7		0.6233	0.3031	0.1401	0.0000							
8		0.6052	0.3164	0.1743	0.0561							
9		0.5888	0.3244	0.1976	0.0947	0.0000						
10		0.5739	0.3291	0.2141	0.1224	0.0399						
11		0.5601	0.3315	0.2260	0.1429	0.0695	0.0000					
12		0.5475	0.3325	0.2347	0.1586	0.0922	0.0303					
13		0.5359	0.3325	0.2412	0.1707	0.1099	0.0539	0.0000				
14		0.5251	0.3318	0.2495	0.1802	0.1240	0.0727	0.0240				
15		0.5150	0.3306	0.2495	0.1878	0.1353	0.0880	0.0433	0.0000			
16		0.5056	0.3290	0.2521	0.1988	0.1447	0.1005	0.0593	0.0196			
17		0.4968	0.3273	0.2540	0.1988	0.1524	0.1109	0.0725	0.0359	0.0000		
18		0.4886	0.3253	0.2553	0.2027	0.1587	0.1197	0.0837	0.0496	0.0163		
19		0.4808	0.3232	0.2561	0.2059	0.1641	0.1271	0.0932	0.0612	0.0303	0.0000	
20		0.4734	0.3211	0.2565	0.2085	0.1686	0.1334	0.1013	0.0711	0.0422	0.0140	
21		0.4643	0.3185	0.2578	0.2119	0.1736	0.1339	0.1092	0.0804	0.0530	0.0263	0.0000
22		0.4590	0.3156	0.2571	0.2131	0.1764	0.1443	0.1150	0.0878	0.0618	0.0368	0.0122
23		0.4542	0.3126	0.2563	0.2139	0.1787	0.1480	0.1201	0.0941	0.0696	0.0459	0.0228
24		0.4493	0.3098	0.2554	0.2145	0.1807	0.1512	0.1245	0.0997	0.0764	0.0539	0.0321
25		0.4450	0.3069	0.2543	0.2148	0.1822	0.1539	0.1283	0.1046	0.0823	0.0610	0.0403
26		0.4407	0.3043	0.2533	0.2151	0.1836	0.1563	0.1316	0.1089	0.0876	0.0672	0.0476
27		0.4366	0.3018	0.2522	0.2152	0.1848	0.1584	0.1346	0.1128	0.0923	0.0728	0.0540
28		0.4328	0.2992	0.2510	0.2151	0.1857	0.1601	0.1372	0.1162	0.0965	0.0778	0.0598
29		0.4291	0.2968	0.2499	0.2150	0.1864	0.1616	0.1395	0.1192	0.1002	0.0822	0.0650
30		0.4254	0.2944	0.2487	0.2148	0.1870	0.1630	0.1415	0.1219	0.1036	0.0862	0.0697
31		0.4220	0.2921	0.2475	0.2145	0.1874	0.1641	0.1433	0.1243	0.1066	0.0899	0.0739
32		0.4188	0.2898	0.2463	0.2141	0.1878	0.1651	0.1449	0.1265	0.1093	0.0931	0.0777
33		0.4156	0.2876	0.2451	0.2137	0.1880	0.1660	0.1463	0.1284	0.1118	0.0961	0.0812
34		0.4127	0.2854	0.2439	0.2132	0.1882	0.1667	0.1475	0.1301	0.1140	0.0988	0.0844
35		0.4096	0.2834	0.2427	0.2127	0.1883	0.1673	0.1487	0.1317	0.1160	0.1013	0.0873
36		0.4068	0.2813	0.2415	0.2121	0.1883	0.1678	0.1496	0.1331	0.1179	0.1036	0.0900
37		0.4040	0.2794	0.2403	0.2116	0.1883	0.1683	0.1505	0.1344	0.1196	0.1056	0.0924
38		0.4015	0.2774	0.2391	0.2110	0.1881	0.1686	0.1513	0.1356	0.1211	0.1075	0.0947
39		0.3989	0.2755	0.2380	0.2104	0.1880	0.1689	0.1520	0.1366	0.1225	0.1092	0.0967
40		0.3964	0.2737	0.2368	0.2098	0.1878	0.1691	0.1526	0.1376	0.1237	0.1108	0.0986
41		0.3940	0.2719	0.2357	0.2091	0.1876	0.1693	0.1531	0.1384	0.1249	0.1123	0.1004
42		0.3917	0.2701	0.2345	0.2085	0.1874	0.1694	0.1535	0.1392	0.1259	0.1136	0.1020
43		0.3894	0.2684	0.2334	0.2078	0.1871	0.1695	0.1539	0.1398	0.1269	0.1149	0.1035
44		0.3872	0.2667	0.2323	0.2072	0.1868	0.1695	0.1542	0.1405	0.1278	0.1160	0.1049
45		0.3850	0.2651	0.2313	0.2065	0.1865	0.1695	0.1545	0.1410	0.1286	0.1170	0.1062
46		0.3830	0.2635	0.2302	0.2058	0.1862	0.1695	0.1548	0.1415	0.1293	0.1180	0.1073
47		0.3808	0.2620	0.2291	0.2052	0.1859	0.1695	0.1550	0.1420	0.1300	0.1189	0.1085
48		0.3789	0.2604	0.2281	0.2045	0.1855	0.1693	0.1551	0.1423	0.1306	0.1197	0.1095
49		0.3770	0.2589	0.2271	0.2038	0.1851	0.1692	0.1553	0.1427	0.1312	0.1205	0.1105
50		0.3751	0.2574	0.2260	0.2032	0.1847	0.1691	0.1554	0.1430	0.1317	0.1212	0.1113

$n \setminus P$	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	0.9	0.95	0.98	0.99
3	0.753	0.756	0.767	0.789	0.959	0.998	0.999	1.000	1.000
4	0.687	0.707	0.748	0.792	0.935	0.987	0.992	0.996	0.997
5	0.686	0.715	0.762	0.806	0.927	0.979	0.986	0.991	0.993
6	0.713	0.743	0.788	0.826	0.927	0.974	0.981	0.986	0.989
7	0.730	0.760	0.803	0.838	0.928	0.972	0.979	0.985	0.988
8	0.749	0.778	0.818	0.851	0.932	0.972	0.978	0.984	0.987
9	0.764	0.791	0.829	0.859	0.935	0.972	0.978	0.984	0.986
10	0.781	0.806	0.842	0.869	0.938	0.972	0.978	0.983	0.986
11	0.792	0.817	0.850	0.876	0.940	0.973	0.979	0.984	0.986
12	0.805	0.828	0.859	0.883	0.943	0.973	0.979	0.984	0.986
13	0.814	0.837	0.866	0.889	0.945	0.974	0.979	0.984	0.986
14	0.825	0.846	0.874	0.895	0.947	0.975	0.980	0.984	0.986
15	0.835	0.855	0.881	0.901	0.950	0.975	0.980	0.984	0.987
16	0.844	0.863	0.887	0.906	0.952	0.976	0.981	0.985	0.987
17	0.851	0.869	0.892	0.910	0.954	0.977	0.981	0.985	0.987
18	0.858	0.874	0.897	0.914	0.956	0.978	0.982	0.986	0.988
19	0.863	0.879	0.901	0.917	0.957	0.978	0.982	0.986	0.988
20	0.868	0.884	0.905	0.920	0.959	0.979	0.983	0.986	0.988
21	0.873	0.888	0.908	0.923	0.960	0.980	0.983	0.987	0.989
22	0.878	0.892	0.911	0.926	0.961	0.980	0.984	0.987	0.989
23	0.881	0.895	0.914	0.928	0.962	0.981	0.984	0.987	0.989
24	0.884	0.898	0.916	0.930	0.963	0.981	0.984	0.987	0.989
25	0.888	0.901	0.918	0.931	0.964	0.981	0.985	0.988	0.989
26	0.891	0.904	0.920	0.933	0.965	0.982	0.985	0.988	0.989
27	0.894	0.906	0.923	0.935	0.965	0.982	0.985	0.988	0.990
28	0.896	0.908	0.924	0.936	0.966	0.982	0.985	0.988	0.990
29	0.898	0.910	0.926	0.937	0.966	0.982	0.985	0.988	0.990
30	0.900	0.912	0.927	0.939	0.967	0.983	0.985	0.988	0.990
31	0.902	0.914	0.929	0.940	0.967	0.983	0.986	0.988	0.990
32	0.904	0.915	0.930	0.941	0.968	0.983	0.986	0.988	0.990
33	0.906	0.917	0.931	0.942	0.968	0.983	0.986	0.989	0.990
34	0.908	0.919	0.933	0.943	0.969	0.983	0.986	0.989	0.990
35	0.910	0.920	0.934	0.944	0.969	0.984	0.986	0.989	0.990
36	0.912	0.922	0.935	0.945	0.970	0.984	0.986	0.989	0.990
37	0.914	0.924	0.936	0.946	0.970	0.984	0.987	0.989	0.990
38	0.916	0.925	0.938	0.947	0.971	0.984	0.987	0.989	0.990
39	0.917	0.927	0.939	0.948	0.971	0.984	0.987	0.989	0.991
40	0.919	0.928	0.940	0.949	0.972	0.985	0.987	0.989	0.991
41	0.920	0.929	0.941	0.950	0.972	0.985	0.987	0.989	0.991
42	0.922	0.930	0.942	0.951	0.972	0.985	0.987	0.989	0.991
43	0.923	0.932	0.943	0.951	0.973	0.985	0.987	0.990	0.991
44	0.924	0.933	0.944	0.952	0.973	0.985	0.987	0.990	0.991
45	0.926	0.934	0.945	0.953	0.973	0.985	0.988	0.990	0.991
46	0.927	0.935	0.945	0.953	0.974	0.985	0.988	0.990	0.991
47	0.928	0.936	0.946	0.954	0.974	0.985	0.988	0.990	0.991
48	0.929	0.937	0.947	0.954	0.974	0.985	0.988	0.990	0.991
49	0.929	0.939	0.947	0.955	0.974	0.985	0.988	0.990	0.991
50	0.930	0.938	0.947	0.955	0.974	0.985	0.988	0.990	0.991

8.3.1.2 Homogeneidad: Método de Davene

H0: varianza *K. xylinus* = varianza Cepa Vinagre (p-valor > 0,05)

Ha: varianza *K. xylinus* ≠ varianza Cepa Vinagre (p-valor < 0,05)

Xi <i>K. xylinus</i>	Xi Cepa Vinagre	\bar{X} <i>K. xylinus</i>	\bar{X} Cepa Vinagre	(Xi-\bar{X}) <i>K. xylinus</i>	(Xi-\bar{X}) Cepa Vinagre
0	0	1,549266667	1,345066667	1,549266667	1,345066667
2,500333333	0,925	1,549266667	1,345066667	0,951066667	0,420066667
2,496	1,600333333	1,549266667	1,345066667	0,946733333	0,255266667
1,908333333	1,737666667	1,549266667	1,345066667	0,359066667	0,3926
0,841666667	2,462333333	1,549266667	1,345066667	0,7076	1,117266667

• ANOVA

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Xi-X <i>K. xylinus</i>	5	4,513733333	0,902746667	0,188981981
Xi-X Cepa Vinagre	5	3,530266667	0,706053333	0,240171108
ANÁLISIS DE VARIANZA				

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,096720668	1	0,096720668	0,450751357	0,520889086	5,317655072
Dentro de los grupos	1,716612354	8	0,214576544			
Total	1,813333022	9				

Conclusión: Debido a que $p\text{-valor} > 0,05$, se acepta la hipótesis nula y las varianzas son homogéneas.

8.3.1.3 Independencia de los datos

Los datos son independientes entre sí ya que cada observación fue tomada de manera independiente en periodos diferentes sin afectación una por sobre la otra.

Las data utilizada corresponde al promedio de muestreos aleatorios generados durante los periodos de estudio.

Conclusión: Ante el cumplimiento de los tres supuestos estadísticos, se seleccionó el uso de T-test como método estadístico inferencial adecuado en el análisis de la certeza de las hipótesis.

8.4 Anexo 4.

8.4.1 Curva de calibración de glucosa método DNS

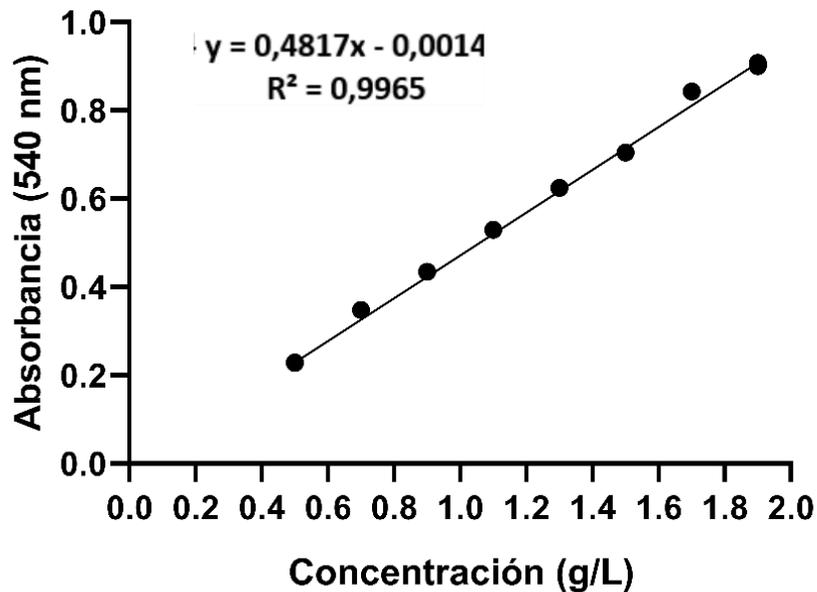


Figura 33: Curva de calibración de glucosa para el cálculo de la concentración de glucosa mediante el método DNS.