PRODUCCIÓN DE BIOMATERIAL ELABORADO CON SCOBY DE KOMBUCHA CASERO

Production of a biomaterial made with homemade Kombucha SCOBY

Ángela Patricia Martínez Arcos

Andrés Felipe Correa Santa

Proyecto de Grado

Asesor, docente

Catalina Giraldo Estrada

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE CIENCIAS APLICADAS E INGENIERÍA

INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2023

Producción de biomaterial elaborado con *SCOBY* de Kombucha casero.

Andrés Felipe Correa Santa[a] , Angela Patricia Martínez Arcos[a]

Catalina Giraldo Estrada[b]

[a] *Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia*
[b] *Profesor, Asesor del Proyecto de Grado, Pregrado de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia*

Resumen

Este proyecto se enfoca en la evaluación y comparación de la producción de un biomaterial a base de un *SCOBY* (Cultivo simbiótico de bacterias y levaduras, por sus siglas en inglés) casero para té de Kombucha, el cual se puso en crecimiento en dos medios de cultivo con dos métodos de inoculación diferentes. Los medios se prepararon, uno a partir de hidrolizado de cáscaras de papa y papaya (RCH) y el otro medio tradicional de Kombucha con sacarosa y té verde (ST); por otro lado, la primera inoculación se realizó únicamente con líquido del preinóculo (células libres) obteniendo los medios RCHL y STL y la segunda con secciones extraídas del *SCOBY (película)* más líquido del preinóculo obteniendo los medios RCHS y STS. Posteriormente, se analizaron las propiedades mecánicas de las películas obtenidas para comparar el biomaterial con cuero animal. Finalmente se obtuvieron pesos secos promedios de 1.9848 g, 1.2866 g, 0.5002 g y 1.4068 g para los medios RCHL, RCHS, STL y STS respectivamente. Para los resultados de las pruebas mecánicas ambos biomateriales se muestran flexibles, se obtuvieron promedios de esfuerzo en MPa de 5,1943, 8,4381, 10,6569 y 10,8183 para los medios RCHL, RCHS, STS y cuero animal, respectivamente. Además, el biomaterial con propiedades más cercanas al cuero fue el del STS. Para complementar la información del estudio, se realiza un análisis del biomaterial según los principios de la química verde, desde el punto de vista de sostenibilidad arrojando que el biomaterial obtenido es una opción más alineada con estos principios en comparación al cuero animal.

Abreviaciones

BK Biomasa de *SCOBY* de Kombucha
RC Residuo de cocina
RCH Residuo de cocina hidrolizado
ST Sacarosa y té verde
SCOBY Cultivo simbiótico de bacterias acéticas y levaduras
RCHL Residuo de cocina hidrolizado con inoculación líquida
STL Sacarosa y té verde con inoculación líquida
RCHS Residuo de cocina hidrolizado con inoculación líquida y sólida
STS Sacarosa y té verde con inoculación líquida y sólida

1. Introducción

Actualmente, el uso de cuero en la industria de la moda y en otros sectores se ha mantenido desde hace mucho tiempo como una opción popular debido a su durabilidad y apariencia estética. Sin embargo, la producción de cuero animal es altamente contaminante y plantea serios problemas éticos; por otro lado, el cuero sintético también presenta impactos ambientales, aunque se haya planteado como alternativa al cuero tradicional. Por esta razón, en los últimos años ha habido un aumento en la investigación y el desarrollo de materiales de origen biomimético, incluyendo biomateriales de hongos, como alternativas sostenibles y éticas al cuero tradicional [1]. Durante el proyecto se analizan propiedades, tales como la resistencia a la tracción, que podrían indicar una posibilidad para reemplazar el cuero animal por biomateriales obtenidos a partir de hongos y bacterias. Otros autores, debido a la pertinencia ambiental de la transición a materiales más 'verdes', exploran la viabilidad y el potencial de estos biomateriales para reemplazar los materiales tradicionales en la industria de

la moda y otros sectores; esto para disminuir el consumo de 100 L de agua por kg de cuero que se produce en las empresas peleteras [2]. Una de las ventajas de estos nuevos biomateriales es que pueden producirse a nivel industrial en 7 días y conservar una cantidad considerable de las propiedades del cuero animal: una resistencia a la tracción <25 Mpa y un rompimiento de tracción del 56% de su máxima resistencia, y para biomateriales obtenidos de biomasa micelial se registran rangos de resistencia de 5.6–12.5 Mpa y de rompimiento entre 16–80%; asimismo, la densidad disminuye de ~570–1170 kg m^{-3} a ~240–800 kg m^{-3} al transcurrir del uso del material animal al micelial [3]. Conviene subrayar que algunos autores reconocen el impacto positivo de estos nuevos materiales textiles en el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) [4], intercediendo directamente en producción y consumo responsables (ODS #12), acción por el clima (ODS #13) e industrial, innovación e infraestructura (ODS #9). Un ejemplo de lo anterior es el análisis comparativo entre el cuero bovino y otras alternativas que se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Ventajas y desventajas cuantitativas y cualitativas de los tres tipos de cueros usados actualmente en la industria. Elaboración propia a partir de [3] y [5].

	Aspectos ambientales	*Cuero bovino*	*Cuero sintético*	*Cuero a base de biomasa**
Impacto ambiental cuantitativo (según el índice de sostenibilidad Higg [5])	Calentamiento global	34,6	7,82	N/A
	Eutrofización	79,6	1,74	N/A
	Escasez de agua	10,1	0,42	N/A
	Agotamiento de recursos/Combustibles fósiles	14	11,5	N/A
	Componentes químicos	40,7	8,61	N/A
	Total	179	30,09	N/A
Impacto ambiental cualitativo	Obtención de materia prima:	Piel animal	Poliuretano/Cloruro de polivinilo	Celulosa/Colágeno/Biomasa fúngica
	Ventajas	Propiedades mecánicas provechosas	Libre de crueldad animal	Libre de crueldad animal
				Renovable
		Renovable	Propiedades similares al cuero	Propiedades similares al cuero
				Menor impacto en generación de GEI
		Biodegradable	Menor impacto por GEI	Amplio aporte a ODS
	Desventajas	Emisiones por la ganadería (GEI)	Basado en hidrocarburos	Puede presentar biodegradabilidad limitada (en materiales compuestos)
		Adversidades por el bienestar animal	No renovable	Propiedades táctiles diferentes al cuero común.
		Tratamiento a base de sales de cromo	No biodegradable	

*Cueros a base de biomasa no necesariamente obtenidas por el método que se utilizado en esta investigación.

Con relación a lo anterior, se han evaluado los agentes que permiten y optimizan el crecimiento del *SCOBY* y la producción de celulosa bacteriana para un desarrollo ideal de las características del biomaterial (conservando similitudes con las propiedades mencionadas en el párrafo anterior), tales como microorganismos involucrados, oxigenación durante las diferentes etapas de crecimiento y tratamientos para refuerzo de propiedades y protección biológica del biomaterial [6]. Con relación a los microorganismos estudiados para producción de celulosa bacteriana se encuentran *Achromobacter, Agrobacterium, Komagataeibacter, Gluconacetobacter, Rhizobium, Sarcina* y *Pseudomonas* [7]; mientras, del ecosistema que compone el *SCOBY*, se tienen registros de levaduras del género *Brettanomyces* y de bacterias del género *Komagataeibacter*, principalmente [8]. Las levaduras anteriormente mencionadas descomponen la sacarosa en glucosa y fructosa mediante la enzima invertasa, mientras liberan etanol debido a su fermentación; paralelamente, se forma la biopelícula en la superficie del líquido, especialmente a partir de las bacterias acéticas del género mencionado; estos microorganismos se distribuyen bajo una naturaleza sésil o planctónica alrededor del medio y el consorcio [9]. Asimismo, la celulosa bacteriana se considera un polisacárido extracelular producido por estos microorganismos, de donde se extrae el biomaterial con propiedades mecánicas resistentes que, incluso, superan la celulosa obtenida de las plantas [10], reafirmando la hipótesis de que se podría sustituir el cuero animal [11].

Por otro lado, en cuanto a la producción de celulosa bacteriana con *SCOBY* de Kombucha, se ha encontrado que un medio con 1% de té negro, 6% de glucosa y pH 6 a 30˚C con una duración de cultivo de 10 días puede obtenerse un máximo de 18.68 g/L de celulosa bacteriana [6]. En el presente estudio se utiliza un medio tradicional para té de Kombucha [12] y un medio de un hidrolizado de cáscara de papa y papaya; se escoge la papaya por su alto contenido proteico de 2,23 ± 0,19 % [13], además de su contenido de nutrientes como 68,26 ± 1,12 g de carbohidratos cada 100 g de cáscara y 3,64 ± 0.10 g de lípidos cada 100 g de cáscara [14]. Adicionalmente, se escoge la papa por su contenido de 72,53 ± 0.08 g de carbohidratos, 11.17 ± 0.03 g de proteína, 2.09 ± 0.01 g de grasas, valores calculados por cada 100 g de cáscaras en peso seco y vitaminas del complejo B [15]. Otros estudios, que analizan medios a partir de residuos hidrolizados, tales como carne, arroz y vegetales variados, establecen que el rendimiento de producción de celulosa bacteriana cae a medida que el medio se diluye, por ejemplo, para una dilución 1:1 de un medio RCH estudiado, el rendimiento llega a caer un 46,24%, por el contrario de la tasa de degradación de azúcar que aumenta un 12,85% [16]. Al mismo tiempo, puede analizarse la actividad microbiana del complejo, como para el caso del crecimiento del biomaterial de celulosa bacteriana que, analizando desde un peso seco, se podría decir que alcanza un aumento significativo entre los días 3 y 5, transcurriendo de 1,71 ± 0,4 mg a 11,8 ± 5,4 mg [9].

Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso evaluar un biomaterial elaborado a partir de biomasa obtenida de un *SCOBY* de uso casero para Kombucha en dos medios de cultivo, estos medios consistieron de un método tradicional ST y otro medio creado con un hidrolizado de cáscaras de papa y papaya (RCH); además de estudiar dos tipos de inóculo para cada medio según lo que se conoce sobre bacterias sésiles y planctónicas.

2. Materiales y métodos

- Preparación preinóculo *SCOBY* de Kombucha casero.

Se preparó un medio con 5 g de té verde natural de Viella S.A. en 500 mL de agua desionizada, esta mezcla se hirvió durante 20 min en agitación a 400 rpm. [12]. Seguidamente, se filtró el té y se agregaron 50 g de sacarosa al líquido, agitando durante 5 min a 200 rpm para homogenizar. El medio se agregó a un Beaker de 800 mL cubierto por 10 capas de gasa, este se esterilizó en la autoclave (C.I Dental X Ray®) para finalmente inocular el *SCOBY* de Kombucha, extraído de un cultivo de *SCOBYs* para la elaboración de té de Kombucha casero, y dejar en fermentación estática a una temperatura de 30˚C durante 4 días.

- Preparación del medio de cultivo a partir de un hidrolizado enzimático de residuos de cocina para fermentación con *SCOBY* de Kombucha casero.

Se recogieron 330 g de cáscaras de papa y 330 g de cáscara de papaya, como sustrato para el medio de cultivo RC [13, 14, 15];. Estos residuos orgánicos se mezclaron con agua en una proporción de peso y volumen 1:1 y se dejaron en remojo durante 5 min a temperatura de ebullición. A continuación, el RC se filtró y se trituró en una máquina de picar (Handy Chopper, Black & Decker™) hasta dejar una consistencia lodosa. Esta suspensión RC se hidrolizó a 46˚C, durante 60 min., con agua desionizada en una proporción sólido-líquido de 1:1 (p/v) y con 4,41 g de Pancreatina de Merck S.A. de actividad amilasa de 7500 FIP-U [16]. Posteriormente, se filtró, el líquido recuperado se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min (Hettich® ROTINA 420 R), y el sobrenadante fue recuperado y empleado como el medio RCH.

- Preparación del medio de cultivo de té y sacarosa para fermentación con *SCOBY* de Kombucha casero.

Se preparó un medio con 8,64 g de té verde natural de Viella S.A. en 1200 mL de agua desionizada, esta mezcla se hirvió durante 20 min en agitación a 400 rpm. [12]. Seguidamente, se filtraron las hojas de té y se agregaron 120 g de sacarosa al líquido, agitando durante 5 min a 200 rpm para homogenizar. Finalmente, el líquido resultante fue el medio ST, el cual fue diluido adicionando agua destilada con base en el contenido de azúcares del medio RCH, con el fin de iniciar los cultivos celulares con similar concentración de fuente de carbono ©.

- Cuantificación de proteínas y carbohidratos de los medios de cultivo.

Para cuantificar algunos nutrientes de los medios de cultivo se eligen 2 pruebas analíticas: determinación de proteínas, con el método de Lowry modificado, empleando BSA (albúmina suero bovino) como estándar para la curva de calibración [17], y determinación de sacarosa por el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico) con hidrólisis previa con solución de HCl al 10% y un stock de sacarosa de 30 g/L para la curva de calibración [18], con el fin de tener contenidos proteicos y de carbohidratos similares para ambos medios (el contenido de carbohidratos se determinó en g de sacarosa Eq.).

- Inoculación de los medios de cultivo.

Para el montaje se utilizaron Beakers de 600 mL, los cuales se prepararon agregando 180 mL de cada medio (RCH y ST). Cada recipiente se cubrió con 10 capas de gasa y se esterilizó en la autoclave (C.I Dental X Ray®). Posteriormente, se procedió a inocular en la cámara de flujo laminar empleando dos métodos: 1) Agregar 20 mL del preinóculo (células libres) a cada uno de los medios RCHL y STL y 2) Agregar 20 mL del preinóculo y 13,09 cm^2 de *SCOBY* inicial (el área añadida corresponde a la división del *SCOBY* inicial en 6 partes iguales), a cada uno de los medios RCHS y STS. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

- Producción de la biomasa.

Los cultivos se desarrollaron de forma estática a una temperatura de 30°C durante 15 días. Cumplido este periodo, se extrajo la biomasa que creció en forma de película en cada medio, se lavó con agua desionizada y se llevó a secado a 28°C hasta peso constante [16]. Posteriormente, se pesó en balanza analítica para estimar peso seco.

- Tratamiento de la biomasa obtenida.

Con la biomasa en forma de película seca, se aplicó un tratamiento para inhibir la actividad de microrganismos aun presentes en el material. Para esto, se calentó una solución de NaOH 0,3 M a 90˚C [16] y se adicionaron las muestras circulares por 1 h. Se lavaron nuevamente las muestras con agua desionizada para neutralizar el pH y se secaron a 30˚C hasta tener un peso constante. Finalmente, se llevaron las muestras secas a una máquina de corte láser (Kentron®), cortando 3 probetas del biomaterial obtenido en cada ensayo según diseño realizado bajo la norma ASTM D638 (archivo .DXF) [19], el diseño se observa en la Figura 1.

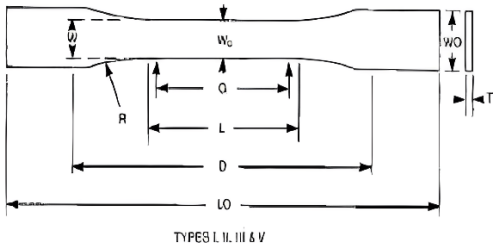


Figura 1. Probeta Tipo V de la norma ASTM D638.

- Medición de propiedades mecánicas del biomaterial.

Las probetas cortadas de cada biomaterial obtenido fueron procesadas en la Máquina Universal de ensayos (INSTRON® 6800 series) de la Universidad EAFIT, donde se midieron propiedades mecánicas de tracción, para obtener el esfuerzo soportado por cada probeta; cada ensayo se realizó 3 veces para el biomaterial producido en cada medio de cultivo y con los diferentes métodos de inoculación.

- Diseño de experimentos y análisis estadístico

Se hizo un diseño de experimentos 2^2 en el que se evaluaron 2 factores cada uno con 2 niveles. El primero corresponde al tipo de medio de cultivo (RCH y ST) y el segundo al método de inoculación (líquido y líquido + sólido, representados así: RCHL, RCHS, STL y STS,). Por otro lado, las variables de respuesta evaluadas fueron esfuerzo y peso seco producido en los diferentes tratamientos. El tratamiento estadístico de datos se realizó con un análisis de varianza y un análisis de media en el software Statgraphics19® con un nivel de confianza del 95%. En la tabla 2 se muestra el diseño seleccionado.

Tabla 2. Diseño de experimentos.

Tipo de medio	*Método de inoculación*	*Tratamiento*
RCH	RCHL	1
RCH	RCHS	2
ST	STL	3
ST	STS	4

- Microscopía electrónica de barrido SEM

Para conocer las características superficiales y la composición química del biomaterial se realizó una microscopía electrónica de barrido para una réplica de cada tipo de biopelícula RCHL, RCHS, STS correspondiente a la que presentó mayor esfuerzo mecánico. Primero, se tomaron fotos tomando como base de medición 10 µm y se observaron diferentes relieves para cada medio. Posteriormente se analizó la composición química de las muestras en el mismo equipo, para evaluar concentraciones de diferentes elementos presentes en el material.

- Análisis de sostenibilidad:

Para complementar el estudio del biomaterial obtenido se hace un análisis de sostenibilidad según los 12 principios de la química verde. Este análisis es comparativo; se hace una revisión de sostenibilidad del material de este estudio junto con el cuero animal. Se escogieron principios de química verde con diferencias entre estos materiales; el criterio para definir estos principios fue una búsqueda de fuentes bibliográficas donde se reportan impactos detallados del biomaterial de Kombucha y el cuero animal. Los datos fueron recopilados de diferentes autores que reportaron impactos cuantitativos o cualitativos, por ejemplo, en el área ambiental, social o laboral.

3. Resultados y análisis

- Composición de los medios de cultivo

El contenido inicial de azúcares y proteínas de los medios se muestran en la tabla 3. En la cuantificación de azúcares se encontró que el medio ST contenía 106,41g/L y el medio RCH 50.99g/L, por lo que se hizo una dilución a la mitad del medio ST y así tener la misma concentración inicial de eq de sacarosa en ambos medios [6].

Tabla 3. Características iniciales de los medios de cultivo

Parámetro	*Medio RCH*	*Medio ST*
Azúcares (g/L)	50,9973	51
pH	6-7	7-8

Es importante resaltar que el medio ST contenía únicamente té verde y sacarosa, mientras el medio RCH aportaba otros nutrientes que no fueron cuantificados, pero se han reportado por otros autores en estudios de caracterización [13, 14, 15]. La papa aporta vitaminas B1, B2 y B6, potasio, fósforo y magnesio, todos esenciales en el crecimiento celular [15]. En complemento de esto, se observó un crecimiento más rápido de la biomasa del medio RCH, hecho que se evidenciará con los pesos secos reportados en la tabla 4.

- Tratamiento de BK

Para el tratamiento de la BK durante el estudio preliminar, se realizaron pruebas con recubrimiento de cera de carnauba teniendo en cuenta sus propiedades de reducción de la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno. [20]. Sin embargo, se obtuvieron pérdidas en las propiedades mecánicas porque el recubrimiento era frágil, como se muestra en la figura 2; y en el proceso de corte de las probetas era tedioso y contaminante porque se generaba un humo negro con olor fuerte.

Figura 2. Tratamiento con cera de carnauba.

Por lo anterior, se eligió el tratamiento con la solución de NaOH 0,3 M [16] que se emplea usualmente para el tratamiento de biomateriales por su contribución significativa a la mejora de las propiedades mecánicas de las películas, aumentando su resistencia a la tracción y la elasticidad, y la actividad antibacteriana [21]. Finalizado el tratamiento se observó que las películas perdieron el color aportado por los medios, dejando en la solución una tonalidad amarilla.

Figura 3. Tratamiento con NaOH 0,3 M.

- Producción de BK

En la producción de BK se obtuvieron variaciones de crecimiento según los tipos de medios y los métodos de inoculación, los cuales se observan en la tabla 4. La mayor producción de BK se obtuvo en el medio RCHL con promedio de 1,9848 g de peso seco, mientras que la menor producción fue en el medio STL con 0,5002 g de peso seco. De manera general los mejores resultados de crecimiento de BK se obtuvieron en el medio RCH pues en ambos tipos de inoculación los pesos secos promedios fueron altos debido a que este aportaba, a través de la papa y la papaya, otros nutrientes adicionales como minerales y vitaminas B, tales como la riboflavina o la niacina, que son esenciales para la síntesis de proteínas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos esenciales

(alrededor de 429–666 mg/100 g peso seco de minerales y vitaminas del complejo B son la cantidad ideal para la síntesis mencionada) [15].

Tabla 4. Pesos secos de la biomasa obtenida de los medios de cultivo

Medio de cultivo	*Peso seco Promedio(g)*
RCHL	1.9848 ± 0.2902
RCHS	1.2866 ± 0.0354
STL	0.5002 ± 0.0956
STS	1.4068 ± 0.6470

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) se ajustó un modelo estadístico lineal general que relaciona peso seco con 2 factores predictivos. Dado a que se obtuvo que el valor-P para el factor tipo de medio fue de 0,00114 (<0,05) este tiene un efecto estadísticamente significativo, sin embargo el factor tipo de inoculación presentó un valor-P de 0,06191 (>0,05) por lo tanto este factor no tiene efecto significativo sobre la variable de respuesta peso seco con un nivel de confianza del 95,0%.Adicionalmente se analizó la combinación de tipo de medio y tipo de inoculación, obteniendo un vapor-P de 0,0014, el cual indica que también hay diferencia significativa.

Adicionalmente, se realizó una comparación de medias (figura 4), en la que se muestra el peso seco como variable de respuesta para el tipo de medio, que es el factor que presenta diferencias significativas. Los intervalos desplegados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En este caso como los intervalos no se traslapan verticalmente corresponden a pares de medias que tienen una diferencia estadísticamente significativa.

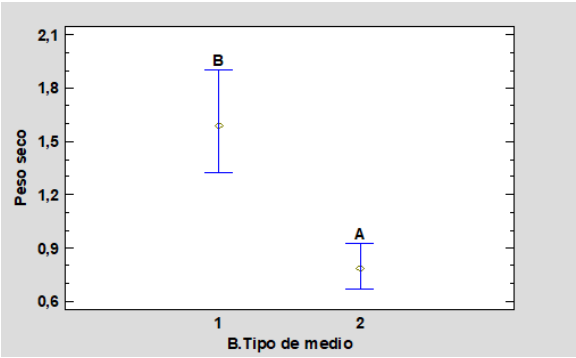


Figura 4. Análisis de medias de peso seco para el factor de tipo de medio. 1 y 2 corresponden a RCH y ST, respectivamente.

Otro factor importante en el crecimiento de BK fue la dilución realizada al medio ST, el crecimiento posiblemente se redujo por no tener la concentración de nutrientes necesarios en el mismo, de acuerdo con lo reportado en la literatura la concentración de sacarosa usualmente empleada es 100 g/L y de té verde es 7,2 g/L [12]; pero ambas se modificaron disminuyendo a la mitad para aproximarlas a las del medio RCH.

- Análisis de propiedades

Para el esfuerzo soportado por el biomaterial, se realizó una modificación en el análisis, empleando un diseño 3^1 donde los factores fueron 3 tipos de medios (RCHL, RCHS Y STS), lo anterior se estableció porque con el biomaterial producido en el medio STL no fue posible elaborar probetas, debido a que a las condiciones de este

cultivo se recupera una BK con características que no permiten obtener probetas bajo la norma ASTM trabajada y, a su vez, la alta fragilidad del biomaterial favorecía la ruptura del mismo, impidiendo su cuantificación.

Es importante mencionar que el esfuerzo soportado por cada probeta hace referencia al cálculo del cociente entre el máximo de la fuerza aplicada y el área transversal de la menor sección de las probetas. Para asegurar la consistencia y reproducibilidad del ensayo de tracción, de cada medio se cortaron 3 probetas (réplicas). Los resultados del esfuerzo se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Promedios de los esfuerzos soportados por las probetas del biomaterial obtenido y el cuero animal en el ensayo de tracción.

Medio de cultivo	*Esfuerzo (MPa)*
RCHL	5.1943 ± 0.5507
RCHS	8.4381 ± 3.2858
STS	10.6569 ± 2.8429
Cuero animal	10.8183 ± 2.4633

A partir del análisis de varianza (ANOVA) se ajustó un modelo estadístico lineal general que relaciona a esfuerzo con tipo de medio. Dado que se obtuvo que el valor-P fue 0,0430 (<0.05), hay un efecto estadísticamente significativo del tipo de medio sobre el esfuerzo, con un nivel de confianza del 95,0%. Con el análisis de comparación de medias (figura 5), se muestra el esfuerzo promedio para cada nivel de tipo de medio y también se muestran intervalos alrededor de cada media, los cuales indican que entre el medio 1 y 2 (RCHL y RCHS) y entre el 2 y 3 (RCHS y STS) no hay diferencias estadísticamente significativas para esta variable de salida. Sin embargo, entre el medio 1 y 3 (RCHL y STS) si las hay. Pese a que la producción de BK promedio fue mayor y más rápida, según el seguimiento día a día que se hizo a los cultivos, no se obtuvieron los mayores resultados en esfuerzo respecto al medio STS. El hecho de una producción rápida y mayor de BK pudo ser contraproducente en cuanto a obtención de celulosa bacteriana, pues al tener una película gruesa en la superficie del medio se afectaba la completa oxigenación de los microorganismos planctónicos y las colonias sésiles de la cara inferior del biofilm [9, 22]; es decir, mientras la BK de los medios RCH alcanzaban un mayor tamaño gracias a los nutrientes, la BK del medio STS tenía un crecimiento lento pero posiblemente una producción mayor de biocelulosa gracias a la oxigenación que permitía su delgada película.

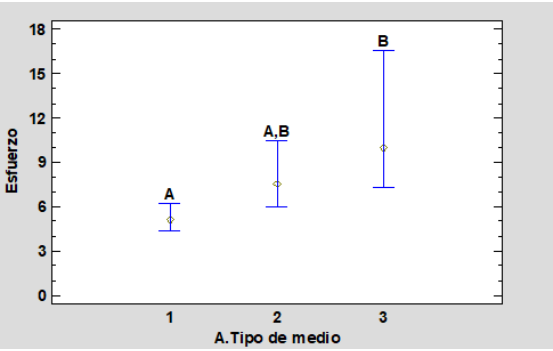


Figura 5. Análisis de media de esfuerzo soportado, donde los factores son tipo de medio, donde 1, 2 y 3 corresponden a RCHL, RCHS y STS, respectivamente.

En adición a los análisis anteriores, para comparar el biomaterial producido con el cuero animal, se cortaron probetas del cuero, obtenido de residuos industriales, bajo la misma norma empleada y se sometieron al ensayo de tracción. Debido a que las probetas de cuero tenían un mayor espesor que las del biomaterial, los resultados de los ensayos de tensión máxima eran considerablemente mayores en el cuero, por lo que fue necesario calcular el área transversal de ambos materiales para poder considerar esta condición y que sean comparables los resultados del esfuerzo soportado. El área para las probetas de los medios ST y RCH fue de 0,636 mm^2 y 1,27 mm^2 y para las de cuero fue 5,088 mm^2. Los resultados del esfuerzo promedio soportado para las probetas de cuero se muestran en la tabla 5.

Con los cálculos realizados, se obtuvieron resultados satisfactorios del biomaterial para el esfuerzo, porque para algunas réplicas de los medios fue incluso mayor que el del cuero animal que fue de 10,818 MPa. De manera general el esfuerzo más bajo fue para el medio RCHL con un promedio de 5,1943 MPa y el mayor fue para el medio STS con un promedio de 10.6569 MPa. Adicional al análisis a partir de estos valores promedio, se resalta que se presentaron réplicas de BK con algunos valores incluso más cercanos y otros superiores al cuero animal, como el valor de RCHS (réplica 3) con 11.9680 MPa, y el valor de STS (réplica 2) con 12.56 MPa respectivamente; mostrando el alto potencial que puede tener este biomaterial para el futuro desarrollo de productos biobasados. Finalmente, el biomaterial de los medios con mayor resultado se puede comparar con algunos HDPE, que tienen esfuerzos cercanos a 12 MPa en sus condiciones más rígidas [23].

Para comparar la densidad del biomaterial obtenido con el cuero animal se realizaron mediciones de dimensiones para calcular el volumen y se pesaron las muestras. Los resultados obtenidos para esta propiedad son menores en todos los medios de cultivo en relación con la densidad del cuero animal. Se puede afirmar que esto es satisfactorio porque se presentan resultados altos de esfuerzo aun teniendo menor cantidad de masa en el mismo volumen, como se observa en la tabla 6.

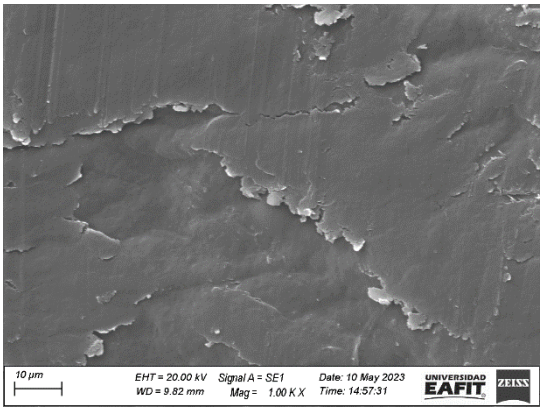
Tabla 6. Promedios de la densidad obtenidos para el biomaterial y el cuero animal.

Medio de cultivo	*Densidad promedio (g/cm^3)*
RCHL	0,2975 ± 0,0415
RCHS	0,4205 ± 0,0782
STS	0,4771 ± 0,1075
Cuero	1,0515

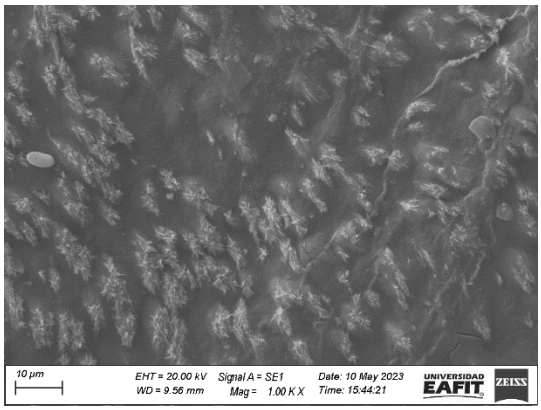
- Análisis con Microscopía Electrónica de Barrido - SEM

Con los resultados obtenidos con la microscopía electrónica de barrido se obtuvo que el medio RCHL presentó características más lisas que los otros 2, y el medio RCHS presentó más irregularidades como se observa en la figura 6. En la figura 6B se observa una formación de cristales, posiblemente ocasionada por la rápida evaporación de líquido durante la fase de secado y la presencia de azúcares en la superficie de la muestra; esto también puede observarse a menor escala en la figura 6C para el medio STS. Lo anterior puede indicar una alta cantidad de azúcares disueltos en el inóculo que, por diferencias de concentración, empezaron a pasarse al líquido contenido dentro de la biomasa en crecimiento. Sin embargo, la superficie del biomaterial de este proyecto tiene apariencia distinta a la encontrada por un biomaterial producido con inoculación similar, pero con un recubrimiento de emulsión polimérica de polimetil metacrilato, en este último se veían nano fibrillas (o hebras) a lo largo de la superficie [24] a diferencia del material liso que se observa en la figura 6. Por el contrario, lo hallado en este análisis con SEM corrobora que, entre biomateriales de Kombucha, o al menos entre aquellos cuya producción tiene variación entre componentes del inóculo entre té verde, té negro, yerbabuena, lavanda,

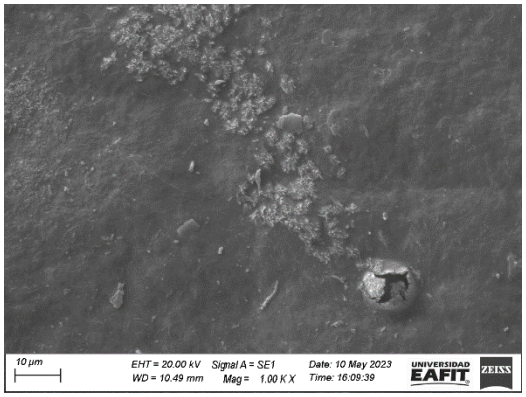
orégano e hinojo, el obtenido de la fermentación a base de té verde es el que menos fibrillas presenta en su superficie, indicando que es común que la superficie presente poca densidad de fibrillas, como en la figura 6C [25]. No se han encontrado reportes de producción de biomaterial en medios similares al RCH utilizado; de las figuras 6A y 6B se puede concluir que, para el medio RCH, el método de inoculación repercute considerablemente en la organización molecular del biomaterial, formando cristales o capas en la superficie.



A) Superficie medio RCHL (réplica 1)



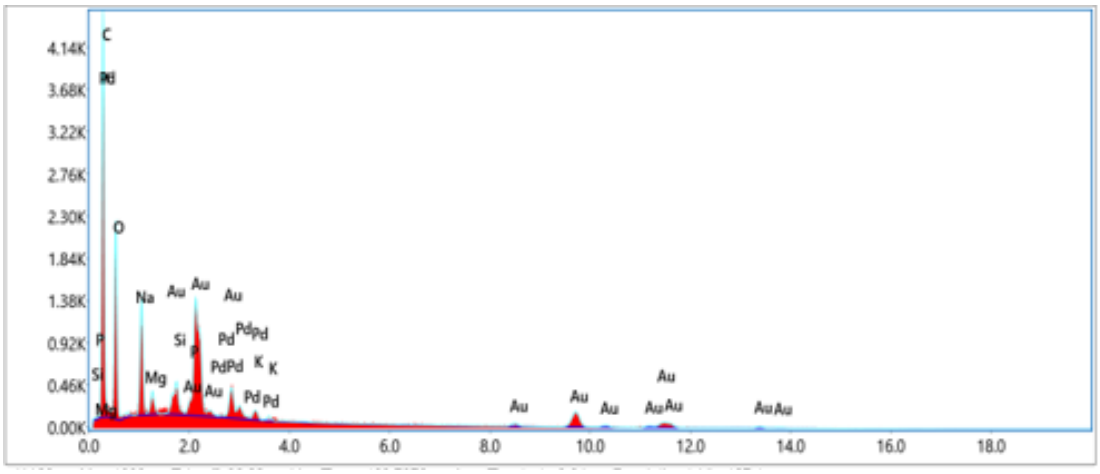
B) Superficie medio RCHS (réplica 3)



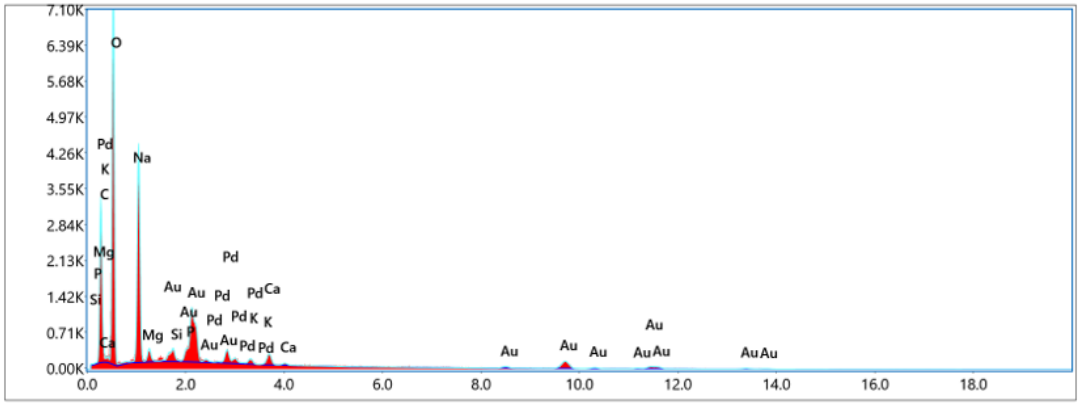
C) Superficie medio STS (réplica 2)

Figura 6. Comparación de superficies entre las muestras A) RCHL, B) RCHS y C) STS.

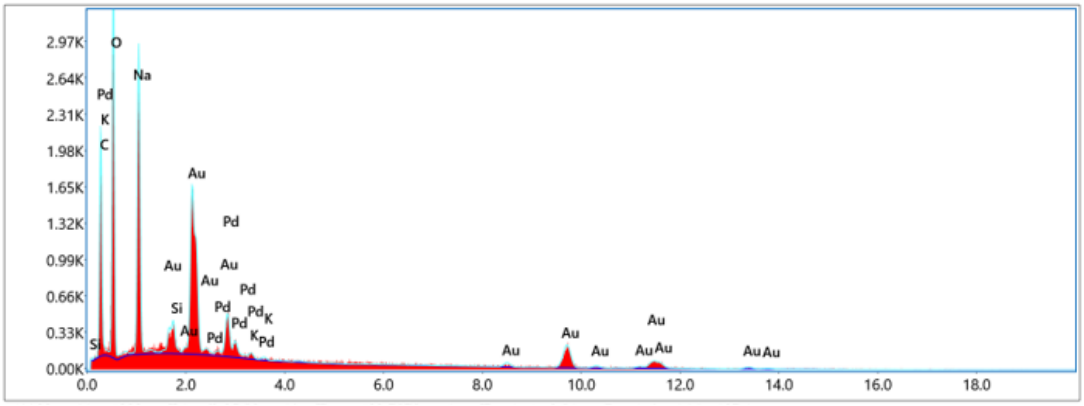
Los resultados de análisis de composición química de las muestras en el mismo equipo se muestran en las gráficas de composición de la figura 7, aparecen picos de oro (Au) y paladio (Pd), que se deben omitir en el análisis al ser parte del recubrimiento que se les hace a las muestras previo a la medición, para poder observar con claridad las composiciones química y superficial. De los picos más altos se encuentran el oxígeno (O) y el carbono (C), datos que tienen sentido al ser un material de tejidos orgánicos a partir de levaduras y bacterias; por otro lado, los picos de sodio (Na) pueden deberse al pretratamiento con NaOH realizado, indicando una adsorción de esta solución básica por parte del biomaterial, hecho que también pudo influir en la adquisición de rigidez por parte del material, según lo que se observó y sintió posterior a retirar el biomaterial de la solución, junto con la ausencia de este elemento en otros reportes [24, 26]. En consecuencia, el efecto del tratamiento conNaOH podría ser modificado por el de cera de carnauba u otro tratamiento en la capa superficial, para evitar la penetración de compuestos que pueden ser no deseados, o que afecten ciertas propiedades del biomaterial.



A) Composición medio RCHL (réplica 1)



B) Composición medio RCHS (réplica 3)



C) Composición medio STS (réplica 2)

Figura 7. Comparación de composición química entre las muestras RCHL (replica 1) vs. RCHS (réplica 3) vs. STS (réplica 2).

- Análisis de sostenibilidad

Se realizó un análisis comparativo entre el biomaterial obtenido y el cuero bovino desde los 12 principios de la química verde [27], estableciendo así un análisis cualitativo desde los conceptos de la sostenibilidad en el diseño de productos debido a que no es posible desarrollar un análisis de ciclo de vida (ACV) porque los datos sobre la producción del biomaterial de Kombucha a escala industrial son escasos, y habría que hacer diversas suposiciones aún imprecisas, tales como equipos de producción, balances de masa a escala industrial, entre otros. De los 12 principios que abarca la química verde, se seleccionaron algunos de ellos donde hay una diferencia considerable entre el impacto de estos materiales. El criterio para escoger estos principios fue que presentaran diferencia entre ambos materiales y que estuvieran reportadas cuantitativa o cualitativamente por otros autores, apuntando a áreas ambientales, sociales o de seguridad.

Inicialmente, teniendo en cuenta que el ganado produce alrededor del 14% de los gases de efecto invernadero, aproximadamente 7,1 millones de toneladas equivalentes de CO_2 al año [28], y sus residuos se componen principalmente de excrementos, orina, residuos de piensos y agua de lavado, que contribuyen al 30% de las emisiones de nitrógeno y fósforo a medios acuíferos de Estados Unidos [29] se corrobora el impacto ambiental de la deficiente gestión de residuos de la industria ganadera; mientras el biomaterial de Kombucha para el método de RCH emplea residuos orgánicos de cocina (convirtiendo los residuos en materia prima) y para el método ST tiene como único residuo el líquido donde se hace la inoculación, que es considerado como un subproducto al ser el té fermentando de Kombucha altamente consumido en Asia y ganando mercado en otras regiones. En relación con lo anterior, la transición de un material a otro está relacionada con el estamento 1: prevención de residuos en lugar de gestión de los mismos. Segundo, respecto a economía de átomos, la obtención de azúcares del medio que es uno de los procesos que permite el crecimiento de la biomasa estudiada, no es eficiente en esta fermentación debido al bajo consumo de estos azúcares respecto a la cantidad total de carbohidratos disponibles en el medio [16]; pero sus residuos o subproductos, al no ser sintéticos, impactan menos a nivel ambiental si se extraen del proceso (subproductos tales como el té fermentado de Kombucha, si se considera el biomaterial como el producto principal). La fase posterior al curtido del cuero bovino se realiza en un medio acuoso y consiste en procesos químicos que requieren químicos como desacidulantes, engrasantes sintéticos, tensioactivos, colorantes y auxiliares químicos y ácidos [30] que ni son reaprovechados ni están cerca de ser absorbidos en su totalidad por el producto [31]; por ello, la elevada concentración de contaminantes y la baja biodegradabilidad de las aguas residuales post-curtido [32] constituyen una importante fuente de preocupación medioambiental, una representación de la baja economía de átomos de este proceso y una escasez de innovación en el diseño de productos químicos seguros y del uso de disolventes y auxiliares más seguros (estos últimos siendo el 4to y el 5to estamento de la química verde).

Al mismo tiempo, el problema de la cantidad de químicos empleados durante el proceso productivo del cuero bovino, pues la volatilidad de los polvos orgánicos del cuero, las curtientes vegetales y los polvos minerales de las sustancias causan irritación en los tractos respiratorios de quienes trabajan bajo ambientes de exposición constante a estos componentes [33] impactando negativamente en el 4to estamento de la química verde; por otro lado, el biomaterial de BK no requiere elementos especiales de protección al menos en escala de laboratorio, al trabajar mayormente con azúcares, agua y otros componentes no perjudiciales. Para concluir y reforzar esta sección del análisis, se puede remitir a la Tabla 1, donde se observan impactos ambientales según el índice Higgs [5] de índole cualitativa, pues corrobora que cueros a base de biomasa tienden a presentar menor impacto que el cuero animal; además, este tipo de estudios pueden fundamentar futuros cálculos para índices cuantitativos relacionados con este tipo de materiales aún en desarrollo.

4. Conclusiones

En relación con la evaluación de los medios de cultivo es importante tener en cuenta el tipo y la concentración de los nutrientes en los medios, el medio RCHL favoreció la mayor producción BK, pero el mayor esfuerzo soportado lo tuvieron las probetas del medio STS. Por lo que el tipo de medio de cultivo y los métodos de inoculación presentaron efecto estadísticamente significativo sobre el peso seco de la BK y el esfuerzo soportado. Además, los resultados de esfuerzo en comparación con el cuero animal demuestran que el

biomaterial producido puede ser una alternativa viable y con propiedades mecánicas (esfuerzo) similares a las del cuero.

Entre los medios estudiados, el RCH obtuvo mayores pesos secos promedio para el biomaterial producido del *SCOBY*, siendo el RCHL el de mayor producción general. Estos resultados se deben probablemente a la riqueza de otros nutrientes que se encontró reportada por otros autores para medios residuales similares; esto refuerza la idea que la biomasa residual es un buen reemplazo para abonos y una importante fuente energética. Por otro lado, el medio con un esfuerzo mayor en la prueba de tracción fue el STS, posiblemente por una mayor producción de biocelulosa debido a una mayor oxigenación durante su tiempo de inoculación e indicando una probable relación entre esta producción y el esfuerzo del material.

La elección del proceso de tratamiento es fundamental para las propiedades obtenidas del biomaterial, cuando se realizó el recubrimiento con cera de carnauba se dificultó el corte de las probetas, se generó un humo, y se observó afectación en la elasticidad; por otro lado, con el tratamiento de NaOH se solucionaron estos problemas pero se hallaron trazas de Na en la composición del biomaterial según el análisis obtenido del SEM; por ello, se propone la posibilidad que el tratamiento con NaOH sea cambiado por otro para evitar la presencia de Na en el biomaterial, se podría analizar una disolución en alcohol de alguna cera para crear un barniz, se sugiere ahondar más en futuros estudios. En cuanto a las imágenes de análisis de superficie, se obtuvieron películas con pocas fibrillas en la superficie, siendo el medio RCHL el que presentó características más lisas, mientras el medio RCHS presentó más irregularidades

Finalmente, el biomaterial de Kombucha muestra un potencial significativo para alinearse con los principios de la Química Verde en comparación con el cuero bovino. Este potencial se refleja en su capacidad para reducir residuos al utilizar menos recursos en su producción, la posibilidad de minimizar el uso de productos químicos peligrosos en el proceso de fabricación, y la perspectiva de un menor consumo de energía. Además, el biomaterial de Kombucha aprovecha materias primas renovables o convertir residuos de otras áreas en materias primas, puede ser más seguro tanto para los trabajadores como para el medio ambiente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la producción de biomaterial de Kombucha todavía está en desarrollo y requiere investigaciones adicionales para perfeccionar completamente su sostenibilidad, viabilidad y efectividad.

Referencias

[1] Q. Zhang, et. al, “Biomimetic Materials: A Promising Approach for the Development of Next-Generation Materials”, Advanced Materials, vol. 32, 2021.

[2] A. P. Provin, A. L. Vieira, A. R. de Aguiar & N. Köhler, "Textile industry and environment: can the use of bacterial cellulose in the manufacture of biotextiles contribute to the sector?”, Clean Techn Environ Policy, vol. 23, pp. 2813-2825, 2021.

[3] M. Jones, A. Gandia, S. John & A. Bismarck, “Leather-like material biofabrication using fungi”, Nat Sustain, vol. 4, pp. 9–16, 2021.

[4] A. P. Provin, A. R. de Aguiar, I. C. Aguiar & A. L. Vieira, “Circular economy for fashion industry: Use of waste from the food industry for the production of biotextiles”, Technological Forecasting & Social Change, vol. 169, pp. 6-10, 2021.

[5] Higg. [2022, oct 14]. The Higg Materials Sustainability Index: Leather [Online]. Recuperado de: https://bit.ly/3AAm4IP

[6] N. H. Avcioglu, M. Birben & I. S. Bilkay, “Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium”, Process Biochemistry, vol. 108, pp. 60-68, 2021.

[7] H.T Nguyen, N. Saha, F. A. Ngwabebhoh, O. Zandraa, T. Saha, & P. Saha, “Kombucha-derived bacterial cellulose from diverse wastes: a prudent leather alternative. Cellulose”, vol. 28, p.p. 9335-9353, 2021.

[8] K. Harrison & C. Curtin, “Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America”, Microorganisms, Journal of Food Protection, vol. 80, pp. 902-908, 2021.

[9] T. Tran, et. al., “Oxygen management during kombucha production: Roles of the matrix, microbial activity, and process parameters”, Food Microbiology, vol. 105, 2022.

[10] Z. Hussain, W. Sajjad, T. Khan, F. Wahid, “Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review”, Cellulose, vol. 26, pp. 2895-2911, 2019

[11] A. P. Provin, et. al., “Use of bacterial cellulose in the textile industry and the wettability challenge—a review”, Cellulose, vol. 28, pp. 8255-8274, 2021.

[12] A. Artica, “K-BIOTEX MATERIAL BIOTEXTIL DE CELULOSA BACTERIANA GESTADO EN KOMBUCHA”, Tesis de pregrado, Construcción y Tecnología Arquitectónica, UPM, Madrid, ES, 2019.

[13] M. L. Vargas, H. Figueroa, J. A. Tamayo,V. M. Toledo & V. M. Moo, “Aprovechamiento de cáscaras de frutas: análisis nutricional y compuestos bioactivos”, CIENCIA ergo-sum, vol. 26, n. 2, p. 6, 2019.

[14] J. Silva, et. al., “Effect of drying on nutritional composition, antioxidant capacity and bioactive compounds of fruits co-products”, Food Science and Technology, vol. 40, n. 4, pp. 810-816, 2020.

[15] S. L. Sampaio, et. al., “Potato peels as sources of functional compounds for the food industry: A review”, Trends in Food Science & Technology, vol. 103, pp. 118-129, 2020.

[16] Q. Weihua, R. Hong & W. Qianhui, “Production of bacterial cellulose from enzymatic hydrolysate of kitchen waste by fermentation with kombucha”, Biomass Conv. Bioref., vol. 1, pp. 1-5, 2022.

[17] G. L. Peterson, “A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable”. Anal. Biochem., vol. 83, n. 2, pp. 346-356, 1977.

[18] G. L. Miller, “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, Anal. Chem., vol. 31, n. 3, pp. 426-428, 1959.

[19] ASTM D638-14, "Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.

[20] M. Konop et. al. "Wax Coating on Kombucha SCOBY Biomaterial for Improved Barrier Properties and Mechanical Stability," Polymers, vol. 13, no. 4, pp. 1-6 2021.

[21] A. El-Shafei, “Effect of NaOH Treatment on the Physicochemical and Biological Properties of Bacterial Cellulose-Hyaluronic Acid Composite Films”, Materials, p. 5, 2019.

[22] J. Nazar, “Biofilms bacterianos”, Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello, vol. 67, pp. 61-72, 2007.

[23] MatWeb. [2023, jun 7]. Overview of materials for High Density Polyethylene (HDPE), Extruded [online]. Recuperado de: https://bit.ly/3RAIrrD

[24] H. Oliver-Ortega, S. Geng, F. X. Espinach, K. Oksman & F. Vilaseca, “Bacterial Cellulose Network from Kombucha Fermentation Impregnated with Emulsion-Polymerized Poly(methyl methacrylate) to Form Nanocomposite”, Polymers, vol. 13, p. 664, 2021.

[25] Y. A. Ramírez, M. V. Di Monte, M. A. Peltzer & A. G. Salvay, “Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions”, Food Chemistry, vol. 372, 2022.

[26] A. Candra, et. al, “Eco-benign synthesis of nano-gold chitosan-bacterial cellulose in spent ground coffee kombucha consortium: Characterization, microbiome community, and biological performance”, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 253, pp. 6-8, 2023.

[27] P. Anastas & J. Warner, “GREEN CHEMISTRY: THEORY AND PRACTICE”, Oxford University Press, Nueva York, p. 30, 2000.

[28] K. Sakadevan & M. L. Nguyen, “Livestock Production and Its Impact on Nutrient Pollution and Greenhouse Gas Emissions”, Advances in Agronomy, pp. 147–184, 2017.

[29]WRI (World Resource Institute), “Eutrophication: Sources and Drivers of Nutrient Pollution”, World Resource Institute, Washington, Estados Unidos, pp. 8, 2009.

[30] Hansen, É., Monteiro de Aquim, P., Hansen, A.W., Cardoso, J.K., Ziulkoski, A.L., Gutterres, M., “Impact of post-tanning chemicals on the pollution load of tannery wastewater”, J. Environ. Manag., Vol. 269, 2020.

[31] Hansen, É., Monteiro de Aquim, P., Gutterres, M., “Current technologies for post-tanning wastewater treatment: a review”, J. Environ. Manag., vol. 294, 2021.

[32] Hansen, É., de Aquim, P.M., Gutterres, M., “Environmental assessment of water, chemicals and effluents in leather post-tanning process: a review”. Environ. Impact Assess, Rev. 89, 2021.

[33] M. Henández, “Riesgos laborales en el procesamiento del cuero”, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México, 2000.