

**EVALUACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO PARA
LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO
*Gluconacetobacter medellinensis***

LINA JANETH ARTEAGA VALENCIA

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA CONVENIO UPB/UCO
MEDELLÍN
2014**

**EVALUACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO PARA
LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO
*Gluconacetobacter medellinensis***

LINA JANETH ARTEAGA VALENCIA

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Biotecnología

Director

**Mabel Milena Torres Taborda, I.Q
Magister en Biotecnología**

Co-director

**Cristina Castro Herazo, I.Q
Doctora en Ingeniería**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA CONVENIO UPB/UCO
MEDELLÍN
2014**

Nota de Aceptación

Firma
Nombre
Jurado

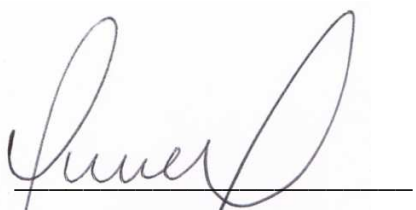
Firma
Nombre
Jurado

Medellín, Septiembre de 2014

Lina Janeth Arteaga Valencia

“Declaro que esta tesis no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Artículo 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lina J. Arteaga Valencia', written over a horizontal line.

Lina J. Arteaga Valencia

CC: 1110461522 de Ibagué

A Dios y la Virgen María, como mis guías, y mis más constantes evaluadores en la lucha por conseguir todos mis sueños.

A mi Pito y mi Mita por su apoyo, esfuerzo, amor incondicional brindado en todos los momentos y sabiduría enseñada para sobrellevar los tropiezos de la vida. A mis hermanos por ser los motivadores constantes y mis ejemplos de vida.

Y a mí por haber superado mis propios miedos.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Debo darle gracias a Dios por la entereza, y la constancia que me regaló para la realización de este proyecto, a mis padres por ser mis motivadores permanentes y por la disciplina y compromiso inculcado, a mis hermanos por siempre estar ahí para mí.

A la Universidad Pontificia Bolivariana como institución, presta siempre a formar personas con calidad académica y humana, al grupo de investigaciones agroindustriales GRAIN, por permitirme desarrollar el proyecto, al Banco Arquideocesano de alimentos por facilitarme la fruta de descarte, a la Magister Mabel Milena Torres por su asesoría, a la Dra. Cristina Castro por su acompañamiento en el proceso, al Magister Hernán Gómez López por su presta disposición y asesoría estadística, al Dr. Robín Zuluaga Gallego por su ejemplo y motivación, a la Dra. Margarita Enid Ramírez por su asesoría metodológica y al Dr. Carlos Ocampo López por su pronta colaboración y receptiva escucha.

A mis compañeros de camino, Jorge Osorio, por su voz de aliento, y a Samuel F. Sierra Ramírez, por su apoyo, ayuda incondicional, cariño infinito, paciencia y enseñanzas dadas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1 MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 CELULOSA.....	3
1.2 Celulosa Bacteriana.....	4
1.2.1 Aplicaciones de la celulosa bacteriana.....	6
1.3 Género <i>Gluconacetobacter</i>	8
1.3.1 Ruta metabólica para la producción de celulosa bacteriana	9
1.4 <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	12
1.5 SUSTRATOS.....	14
1.5.1 Residuos agroindustriales.....	16
1.6 CONDICIONES OPERACIONALES PARA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA.....	21
2 MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 MICROORGANISMO / INÓCULO	23
2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	23
2.3 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO	25
2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA 27	
2.5 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA.....	28
3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
3.1 Caracterización de residuos agroindustriales	29
3.2 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO	37
3.2.1 Ensayo preliminar de producción de CB	37
3.2.2 Establecimiento de condiciones de cultivo	39
3.3 Cinética de crecimiento para <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	58

4	CONCLUSIONES.....	67
5	RECOMENDACIONES	68
	ANEXO A.....	70
6	BIBLIOGRAFÍA	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Productores de celulosa bacteriana y características estructurales del polímero.....	6
Tabla 2. Aplicaciones de la celulosa bacteriana	7
Tabla 3. Características metabólicas de <i>Gluconacetobacter medellinensis</i>	13
Tabla 4. Sustratos empleados para la producción de CB	15
Tabla 5. Origen y porcentaje de residuos en Colombia	18
Tabla 6. Frutas de mayor consumo en Antioquia	19
Tabla 7. Niveles y factores evaluados en el diseño de experimentos factorial	25
Tabla 8. Ensayos para el diseño experimental factorial para cada uno de los residuos seleccionados.....	26
Tabla 9. Niveles y factores evaluados en el diseño de experimentos de superficie de respuesta	27
Tabla 10. Ensayos para el diseño de superficie de respuesta para banano.....	27
Tabla 11 . Cuantificación de azúcares por HPLC	32
Tabla 12 . Contenido de sacarosa, fructosa y glucosa de fruta en buen estado reportado en la literatura.....	32
Tabla 13 . Cuantificación ° Brix en frutas de descarte (naranja, mango, banano, piña y guayaba)	33
Tabla 14 . Índice de madurez Fruta de descarte, expresado en %.....	34
Tabla 15. Resultados del contenido de micronutrientes en jugos obtenidos de fruta de descarte	35
Tabla 16 . Micronutrientes de importancia en el metabolismo celular	36

Tabla 17 . Condiciones del medio de cultivo para ensayo preliminar de producción de CB.....	38
Tabla 18. Resultados diseño de experimentos factorial banano.....	39
Tabla 19 . Tabla ANOVA para el diseño factorial empleando banano como medio de cultivo.....	40
Tabla 20 . Diseño experimental factorial piña	44
Tabla 21. Tabla ANOVA para el diseño factorial empleando piña como medio de cultivo.....	44
Tabla 22. Resultados para la producción de celulosa del diseño de superficie de respuesta para banano	50
Tabla 23. Tabla ANOVA para la producción de celulosa bacteriana evaluada a partir de un diseño de superficie de respuesta	52
Tabla 24 . Modelos GAMLSS ajustados a los datos de producción de CB con jugo de banano como medio de cultivo (μ : media, σ : parámetro de forma, β_i y α_i : coeficientes de ajuste)	54
Tabla 25 . Resultados de ajuste para el modelo 6.....	56
Tabla 26 . Condiciones óptimas seleccionada para cinética.....	58
Tabla 27 . Modelo de Gompertz parametrizado.....	64
Tabla 28. Condición óptima del diseño de superficie de respuesta para la producción de CB en un medio de cultivo con jugo de banano.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura molecular de la celulosa	3
Figura 2 . Celulosa bacteriana micro y macroscópicamente.....	4
Figura 3 . Morfología celulosa bacteriana	6
Figura 4. Características microscópicas (izq.) y macroscópicas (der.) del género <i>Gluconacetobacter</i>	9
Figura 5. Ruta metabólica para la formación de CB	11
Figura 6. Formación de celulosa y excreción al medio de cultivo	12
Figura 7. Características morfológicas de <i>G. medellinensis</i> : microscópicas por tinción de Gram (izq.) y macroscópicas con colonias en medio de cultivo H-S (der.)	13
Figura 8. Principales frutas consumidas en Colombia	17
Figura 9. pH para los jugos de las frutas de descarte evaluadas	30
Figura 10. Contenido de de proteína (%) para las frutas de descarte	31
Figura 11. Producción de celulosa bacteriana en ensayos preliminares para medios de cultivo con mango, banano y piña.	38
Figura 12. Gráfico de Pareto para los resultados del diseño factorial empleando banano como medio de cultivo	41
Figura 13. Efectos principales para los resultados del diseño factorial empleando banano como medio de cultivo	42
Figura 14. Interacciones principales para el medio de cultivo con banano (A: pH, B: Nitrógeno, C: Tiempo)	43
Figura 15. Gráfico de Pareto para los resultados del diseño factorial empleando piña como medio de cultivo.....	45
Figura 16. Efectos principales.....	46

Figura 17. Interacciones principales para el medio de cultivo con piña (A:pH, B: nitrógeno, C: Tiempo)	47
Figura 18. Producción de CB-Evaluación de tiempo 5 días y 10 días	48
Figura 19. Comportamiento de la producción de celulosa bacteriana respecto al pH y el tiempo de cultivo	51
Figura 20 . Diagrama de Cajas y bigotes (Izq.) y Densidad de datos para la producción de celulosa (Der.)	53
Figura 21 . <i>Worm plot</i> para los modelos con mejor ajuste (Menor AIC).....	55
Figura 22 . Comportamiento de la media para la producción de CB (Arriba) y de la desviación estándar (Abajo) respecto al pH y tiempo de cultivo.....	57
Figura 23 . Comportamiento cinético del <i>Gluconacetobacter medellinensis</i> durante 15 días de cultivo.....	59
Figura 24 . Ajuste del Modelo de Gompertz A al crecimiento de <i>G. medellinensis</i>	64

RESUMEN

La celulosa bacteriana es un biopolímero producto del metabolismo expresado como metabolito secundario por el género *Gluconacetobacter* (Skinner & Cannon, 2000). Las propiedades de la membrana de celulosa bacteriana hacen que se le busque en la actualidad usos diferentes que van desde la creación de nuevos materiales hasta aportes en biotecnología biomédica. De allí surge la necesidad de producir celulosa bacteriana y conocer la cinética de producción de la misma.

Se utilizó *Gluconacetobacter medellinensis* como microorganismo productor de celulosa bacteriana. La fermentación se dio a temperatura ambiente y condiciones aerobias.

Se seleccionaron 5 residuos de frutas provenientes del Banco Arquideocesano de alimentos de la ciudad de Medellín: piña, mango, banano, naranja y guayaba, estos residuos tuvieron como característica ser frutas de descarte por su grado de maduración. El trabajo experimental se realizó en 4 fases, la primera fue la caracterización fisicoquímica de los residuos agroindustriales, la segunda el establecimiento de condiciones de fermentación, crecimiento del microorganismo, y purificación de la celulosa bacteriana (tratamiento con KOH al 5%), la tercera, determinación de rendimiento de celulosa bacteriana (CB) y la cuarta, evaluación cinética de condiciones óptimas de cultivo.

Se seleccionaron los residuos con mayor contenido de azúcares (banano, piña y mango) y mayor cantidad de micronutriente que intervienen en funciones metabólicas de la bacteria (banano y piña), a cada uno se le establecieron condiciones de fermentación y se inocularon al 10% (v/v), se les varió el pH, la concentración de fuente de nitrógeno y el tiempo de fermentación en un diseño experimental factorial. Una vez realizados los ensayos, se determinó la elección de la mejor fruta por su producción de celulosa bacteriana y velocidad de producción (análisis a partir del metabolismo) y se efectuó el diseño experimental de superficie para establecer condiciones óptimas de cultivo. Una vez realizado este diseño, arrojó como resultado que probablemente la condición óptima para el

crecimiento del microorganismo y producción de CB es de pH 3.1 y 15 días de fermentación.

Con estas condiciones óptimas arrojadas por el programa StatGraphics centurión XVI se dio paso a la realización de la cinética de crecimiento del microorganismo, obteniendo como producción máxima de CB 0.9135 g/L en 15 de fermentación, estableciendo con esto que el microorganismo asimiló las condiciones dadas para su crecimiento.

PALABRAS CLAVE: celulosa bacteriana, residuos agroindustriales, piña, banano, guayaba, mango, naranja, *Gluconacetobacter medellinensis*

INTRODUCCIÓN

La explotación masiva de los recursos en el siglo pasado, asociado a problemas de contaminación, ha elevado en un número considerable las preocupaciones ambientales; estas razones contribuyen a una transición progresiva hacia la base de una economía de materiales renovables (biomasa).

En virtud de este contexto, los polímeros a partir de recursos renovables, como los polisacáridos, proteínas, lignina, entre otros, están ganando considerable atención (Jaramillo L, Perna M, Benito-Revollo, Arrieta M, & Escamilla M, 2013). La celulosa bacteriana, al igual que otros polisacáridos, proteínas y lignina están siendo objeto de múltiples investigaciones, al ser una fuente única para el desarrollo de nuevos materiales (Giraldo, 2012)

Una manera de disminuir la contaminación ambiental, es el uso de los residuos agroindustriales. Una gran proporción de estos, provienen de la siembra de frutas y hortalizas, como por ejemplo: en Colombia existen 433 especies nativas de frutales comestibles identificadas, que lo hacen el primer país del mundo en biodiversidad de frutas por kilómetro cuadrado (Tafur & Toro, 2007).

Esta riqueza hortifrutícola es aprovechada para la exportación y el consumo interno, por ejemplo, durante el año 2012 sólo en exportaciones se registraron 2.292.387 toneladas de frutas frescas y 3.592 toneladas de hortalizas, mientras que a mayo de 2013 en frutas frescas se exportaron 1.138.121 toneladas y en hortalizas y vegetales frescos 673 toneladas ((ICA), 2013).

Adicionalmente, es conocido que los alimentos se desperdician a lo largo de la cadena de suministro, desde la producción agrícola inicial hasta el consumo final en el hogar. En los países de ingresos altos y medianos, los alimentos se malgastan en gran medida, lo que significa que se tiran, incluso si todavía son adecuados para el consumo humano; no obstante, estos también se pierden al principio de la cadena. En los países de ingresos bajos, se pierden principalmente durante las primeras etapas y etapas intermedias de la cadena y se desperdician muchos menos en el consumo. La pérdida per capita de alimentos en América Latina esta entre los 200 y 230 kg/año, mientras que en Europa y América del norte la pérdida está entre 280 y 300 kg/año. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2012)

Los residuos sólidos de Colombia están constituidos en más del 50% por residuos orgánicos. Los mencionados pueden generar beneficios económicos y medioambientales con la obtención de tecnología adecuada para la transformación de los mismos (Ros, y otros, 2012).

Se ha encontrado que a partir de los residuos agroindustriales y su debida transformación, se pueden obtener productos de valor, como la celulosa bacteriana (CB).

La CB ha sido preferida por su pureza, su grado de polimerización y su índice de cristalinidad, además, sus propiedades fisicoquímicas como la capacidad de absorber agua, porosidad, intercambio gaseoso y biocompatibilidad la hacen un material de alta aplicabilidad (Giraldo, 2012). Sin embargo, su uso a nivel industrial es limitado debido a su alto costo de producción cuando se usan medios sintéticos. (Carreira, y otros, 2011).

En fermentaciones microbianas, es sabido que el medio de fermentación puede representar el 30% del costo total del proceso (Rivas, Moldes, Dominguez, & Parajo, 2004). Tradicionalmente, la celulosa bacteriana se produce a partir de medios de cultivo costosos, que contienen como fuente de carbono glucosa y otras fuentes de nutrientes resultando en elevados costos de producción, lo que limita la utilización de este material. Por tanto, el empleo de fuentes de carbono económicas y micronutrientes es una estrategia interesante para superar esta limitación, aumentando la competitividad de este material (Hungund, y otros, 2013).

De allí que se busquen formas de obtención de celulosa bacteriana analizando el efecto en la producción de la misma con diferentes parámetros de operación, siendo primordial la búsqueda de la mejor fuente de carbono a partir de residuos agroindustriales.

En este proyecto se realizó la evaluación de diferentes tipos de residuos agroindustriales colombianos, que pueden emplearse como fuentes de carbono para la producción de celulosa bacteriana a partir de *Gluconacetobacter medellinensis*

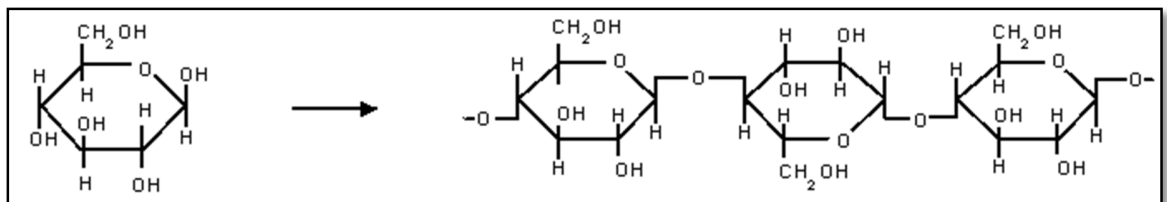
1 MARCO TEÓRICO

1.1 CELULOSA

La celulosa es el biopolímero más abundante en la corteza terrestre (Chandra & Rustgi, 1998). Se estima que en la naturaleza se produce entre 10^{10} y 10^{11} toneladas de celulosa por año (Hong D. , 1994) Es el mayor constituyente de los órganos fotosintéticos en las plantas, donde desempeña una función estructural al conferirle resistencia a la pared celular, también está presente en algunas bacterias, hongos, algas e incluso en animales (O'Sullivan, 1997).

Como se observa en la Figura 1, la estructura de la celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucosa a través de enlaces β -1,4-glucosídico, se describe entonces como un polímero de cadena lineal de glucanos con estructura uniforme, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ y peso molecular variable, (Wolfe, 1996).

Figura 1. Estructura molecular de la celulosa



A la izquierda, β -glucosa; a la derecha, varias β -glucosa unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos. Fuente: (Chavez-Pacheco, Martinez. Y, Contreras. Z, & Escamilla. M, 2004)

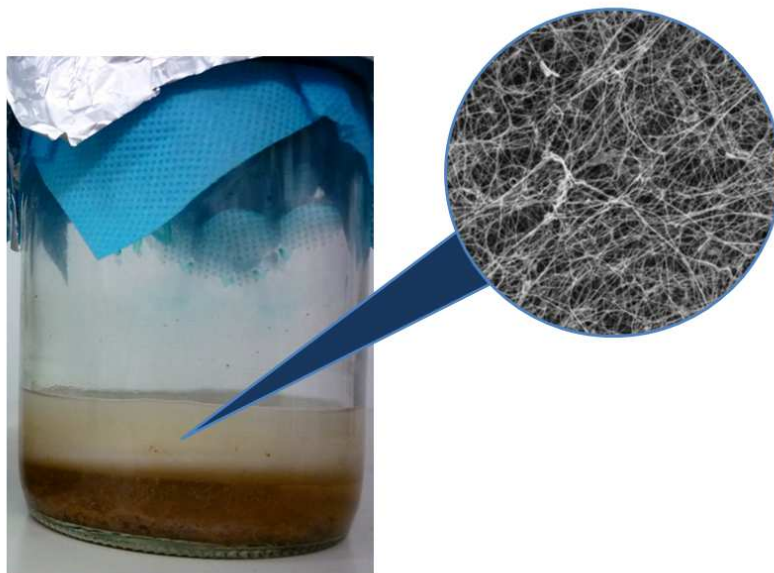
Tiene una estructura fibrosa, en la que se establecen múltiples enlaces de hidrógeno intra- e inter- moleculares entre los grupos hidroxilo, los cuales son responsables de su morfología, rigidez, orientación, resistencia, reactividad e insolubilidad en agua (Hans & Rasmuson, 1995) (Gardner & Blackwell, 1974).

1.2 CELULOSA BACTERIANA

Desde el punto de vista metabólico, la celulosa bacteriana es un metabolito secundario, sintetizado para cumplir una función protectora, mientras que la celulosa vegetal tiene una función principalmente estructural (Skinner & Cannon, 2000).

En las bacterias, la celulosa se excreta extracelularmente en forma de cintas de tamaño nanométrico, las cuales constituyen la membrana que se observa macroscópicamente en la interfase aire líquido del medio de cultivo estático (Setywati, Chien, & Lee, 2009), como se observa en la Figura 2.

Figura 2. Celulosa bacteriana micro y macroscópicamente



Fuente: Castro Herazo, C. I. (Abril de 2012).

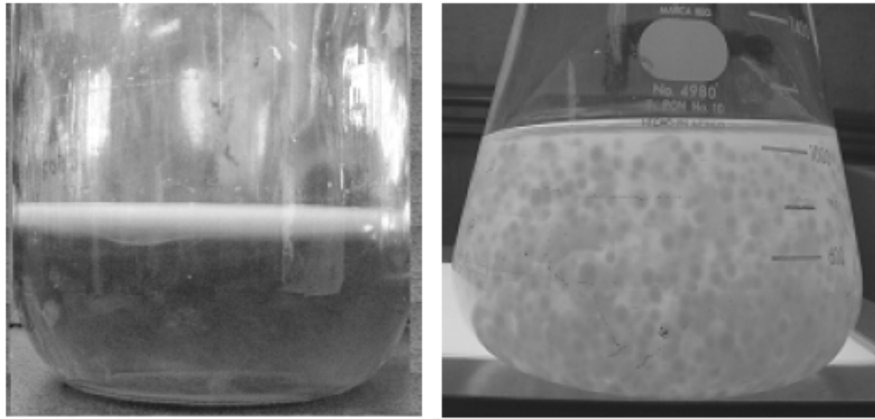
Según (Setywati, Chien, & Lee, 2009), la película protege las células del efecto de la luz ultravioleta, de la deshidratación del medio de cultivo y las mantiene en un ambiente aerobio al acercarlas a la superficie aire-líquido. Adicionalmente, los investigadores comprobaron que la remoción de la película de la celulosa, trae como consecuencia la drástica disminución de su viabilidad hasta tan sólo un 3%.

Dentro de los géneros de microorganismos productores de celulosa bacteriana (CB) se encuentran: *Acetobacter sp*, *Rhizobium sp*, *Agrobacterium sp*, y *Sarcina sp* (Dudman, 1959); los productores más eficientes son bacterias Gram negativas, ácido-acéticas del género *Acetobacter* reclasificadas como *Gluconacetobacter* (Yamada, Hoshino, & Ishikawa, 1997). Este género puede ser encontrado en la superficie de plantas o frutas, constituye la microbiota secundaria del material vegetal en descomposición y desarrolla la acidificación de zumos de frutas y bebidas alcohólicas.

La composición química de la CB es idéntica a la celulosa vegetal, pero a diferencia de esta es químicamente pura debido a que no está asociada a la hemicelulosa y la lignina las cuales son difíciles de remover (Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska, 2005). Otras características importantes son su alto grado de cristalinidad, alta resistencia mecánica, durabilidad, alta capacidad para absorber agua y poseen una alta área superficial. (Chavez-Pacheco, Martinez. Y, Contreras. Z, & Escamilla. M, 2004). Otra característica importante es que la CB es no tóxica, no alergénica, biocompatible y biodegradable (Duvay, Saxena, Singh, Ramana, & Chauchan, 2002).

A nivel microscópico, la morfología de la celulosa bacteriana puede variar dependiendo del tipo de microorganismo, como se observa en la Tabla 1. Macroscópicamente, la morfología de la CB depende de las condiciones de cultivo, en condiciones estáticas la bacteria acumula capas de celulosa que forman la película en la superficie del medio de cultivo, en cultivos agitados la producción de CB es irregular, y con apariencia de *pellets* ver la Figura 3 (Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska, 2005).

Figura 3 . Morfología celulosa bacteriana



Fuente: (Chávez-Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004)

Tabla 1. Productores de celulosa bacteriana y características estructurales del polímero

GÉNERO	ESTRUCTURA DE LA CELULOSA
<i>Gluconacetobacter</i>	Película compuesta de cintas
<i>Achromobacter</i>	Cintas
<i>Aerobacter</i>	Cintas
<i>Agrobacterium</i>	Cintas cortas
<i>Alcaligenes</i>	Cintas
<i>Pseudomonas</i>	No hay distinción de Cintas
<i>Rhizobium</i>	Cintas cortas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No está bien definido

Fuente: (Bielecki, Krystynowicz, Turkiewicz, & Kalinowska, 2005) *Biopolymers online*

1.2.1 Aplicaciones de la celulosa bacteriana

Las propiedades específicas de la celulosa bacteriana la hacen interesante para diferentes aplicaciones como las presentadas en la Tabla 2

Tabla 2. Aplicaciones de la celulosa bacteriana

Área	Aplicación	Referencia
Cosmética	Estabilizador de emulsiones (componente de las uñas artificiales)	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Industria textil	Textiles artificiales: materiales de alta absorción	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Deporte y turismo	Ropa deportiva, tiendas de campaña, material de camping	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Minería y refinería	Esponjas para la recuperación de petróleo derramado, material de absorción de toxinas	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Tratamiento de residuos	Reciclado de aceites y minerales	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Tratamiento de aguas	Purificación de aguas residuales urbanas, ultrafiltración de aguas	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Radiodifusión	Diafragmas sensibles para micrófonos y auriculares estéreo	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Forestal	Sustituto artificial de la madera, madera contrachapada de múltiples capas	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Industria del papel	Papeles especiales, documentos de recuperación, pañales, servilletas, billetes de banco	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Industria mecánica	Partes de carros, piezas de aviones, sellado de grietas	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Producción de alimentos	Inhibición de enzimas, ingrediente de alimentos ricos en fibra dietaria, emulsificante, aditivo de bajo contenido calórico, estabilizante, modificador de textura clarificadores de jugos	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008) (Krystynowicz & Bielecki, 2000)

Medicina	Piel artificial temporal para el tratamiento de quemaduras y úlceras, componente de implantes dentales, aplicaciones clínicas como en la creación de órganos, vasos sanguíneos y pabellón auricular	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008) (Phan, 2010) (Nimeskerm, y otros, 2013).
Laboratorio	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía	(Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)
Nuevas aplicaciones	Plásticos biodegradables, plantillas de pantallas de LCD, material para prueba de balas, refuerzo de materiales	(Martins, 2009) (Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008)

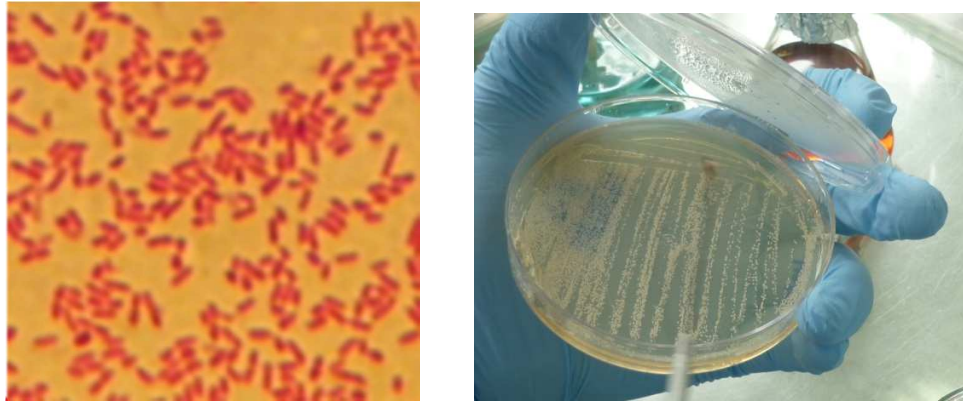
Fuente: Modificado de (Pecoraro, Manzani, Messaddeq, & Ribeiro, 2008).

Como se expone anteriormente, son muchas las aplicaciones industriales en las que las CB pueden ser utilizadas, sin embargo debido a su baja producción no es posible su explotación a escala industrial. En este sentido se vienen desarrollando investigaciones encaminadas a aumentar su producción ya sea por la modificación o mutación del microorganismo, el uso de materias primas baratas para el medio de cultivo y el diseño de nuevos tipos de reactores para su fermentación. (Castro Herazo, 2012)

1.3 GÉNERO *Gluconacetobacter*

Las cepas de *Gluconacetobacter* son aerobias obligadas, Gram negativas, cuando envejecen los cultivos son Gram variables; tienen forma bacilar, son catalasa positiva, oxidasa negativa, no licuan la gelatina, forman indol o H₂S y tienen motilidad negativa. Se observan en la Figura 4 características microscópicas y macroscópicas de *Gluconacetobacter* sp cultivado en agar H-S.

Figura 4. Características microscópicas (izq.) y macroscópicas (der.) del género *Gluconacetobacter*



Fuente: Lina J. Arteaga Valencia

Es importante tener en cuenta dentro del metabolismo del *Gluconacetobacter* que éste oxida el etanol a ácido acético, el acetato y el lactato los oxida a CO₂ y H₂O, y puede formar ácidos a partir de n-propanol, n-butanol y D-glucosa. No hidrolizan lactosa ni el almidón (Parant Rodewald, 2005), reducen nitratos a nitritos y son acidófilas tolerantes, capaces de crecer en pH menores de 5 (Chávez-, Martínez, Contreras, & Escamilla, 2004)

1.3.1 Ruta metabólica para la producción de celulosa bacteriana

La síntesis de la celulosa, consta de dos etapas, en la primera ocurre la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa, el cual es utilizado como sustrato, y en la segunda se da la formación de la celulosa y su secreción al medio (Prashant R, Ishwar B, A, & Survase and Rekha S, 2009).

A su vez, la síntesis de la CB ocurre en dos etapas, en la primera se polimeriza la glucosa entre la membrana celular y el citoplasma y en segunda el polímero es extruido al medio de cultivo.

Para la biosíntesis de CB existen dos vías anfibólicas importantes que han sido estudiadas ampliamente en *G. xylinum*: el ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs (Ross & Mayer, 1991). Carreño (2011) establece que el microorganismo cataboliza diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerol, fructosa, manitol o arabitol. Y puede catabolizar la sacarosa mediante una hidrólisis en el periplasma a glucosa y fructosa (Velasco Bedrán, 2007)

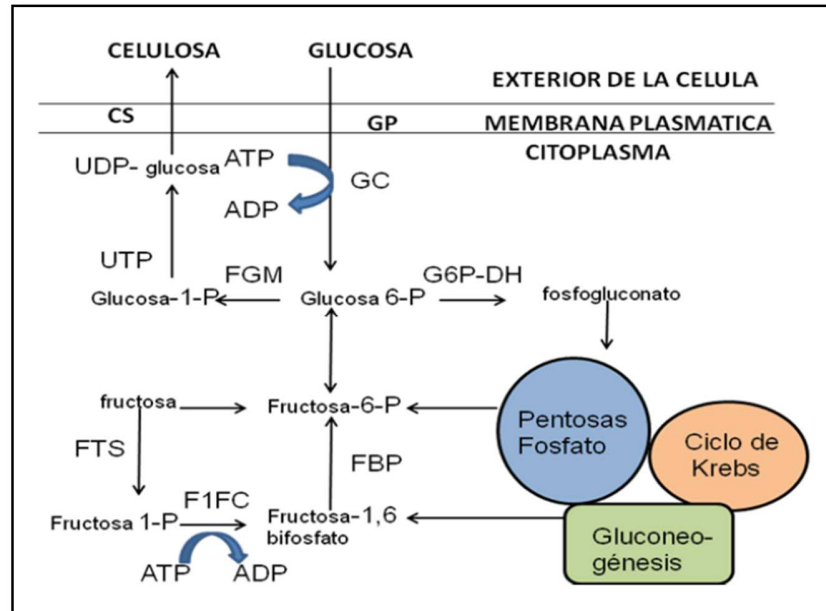
Pueden definirse cuatro pasos principales que expresan completamente la conversión de glucosa en celulosa bacteriana, (Ross & Mayer, 1991) que involucran varias enzimas y un operón llamado bcs (por sus siglas en inglés síntesis de celulosa bacteriana) (Chávez-Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004).

Este operón codifica proteínas y enzimas que hacen una asociación para la polimerización de la glucosa y la formación de celulosa, siendo este operón conservado entre varias especies de bacterias Gram negativas (Moretti Vieira, 2013). Por otro lado, las enzimas que intervienen en el mecanismo son: la glucoquinasa, que es la enzima responsable de la fosforilación de carbono 6 de la glucosa, la fosfoglucomatasa que cataliza la reacción de isomerización de la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato y el UDPG-pirofosforilasa (glucosa-1-fosfato uridiltransferasa) que sintetiza UDP-glucosa y la celulosa sintasa (CS) que produce la celulosa a partir de UDP-glucosa (Donini, y otros, 2010).

La reacción de síntesis de celulosa bacteriana es un proceso costoso para la célula, este consume aproximadamente el 10% del ATP generado en el metabolismo bacteriano. Por lo tanto, la energía utilizada para la síntesis de CB proviene de su metabolismo aerobio (Chávez-Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004).

En la Figura 5 se muestra un resumen de las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de celulosa bacteriana

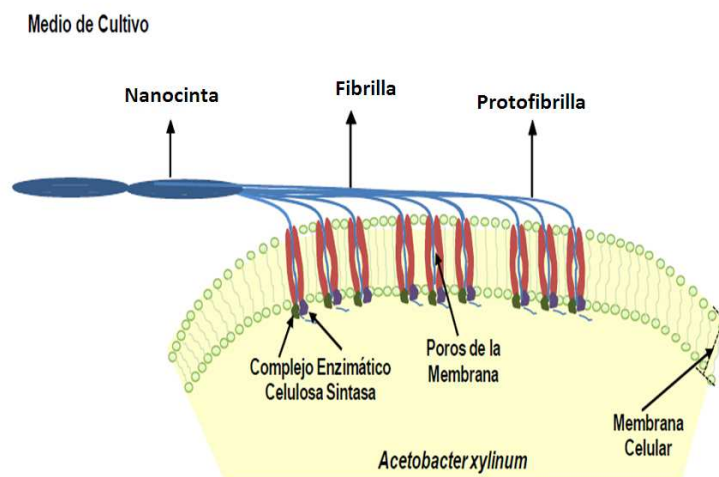
Figura 5. Ruta metabólica para la formación de CB



Fuente: (Chávez-Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004)

En la segunda etapa de biosíntesis ocurre la liberación de la celulosa del interior de la célula. Las cadenas de glucosa polimerizadas son ensambladas por medio de puentes de hidrógeno formando una protofibrilla, que a su vez se une a otras para formar nanofibrillas que se ensamblan en nanocintas en planos paralelos que constituyen la película observada en la superficie de los medios de cultivo (Jonas & Farah, Production and application of microbial cellulose, 1998), como se observa en la Figura 6.

Figura 6. Formación de celulosa y excreción al medio de cultivo

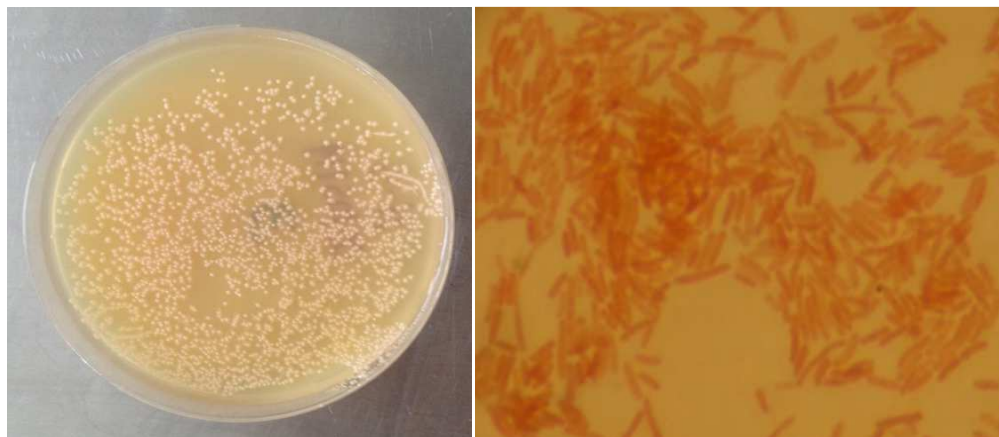


Fuente: Modificado de (Carreño Pineda, 2011).

1.4 *Gluconacetobacter medellinensis*

El *Gluconacetobacter medellinensis* tiene similares características fisicoquímicas y microbiológicas que el *Gluconacetobacter xilynun*, tal como lo establece (Castro Herazo, 2012). Las células son bacilos Gram-negativos, con aproximadamente 3,1 μm de largo y 0,6 a 0,7 μm de ancho, se presentan de forma individual, en parejas o en cadenas, son oxidasa negativos y catalasa positivos. En el medio de cultivo, las colonias son de color beige, redondas, ásperas y opacas, como se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Características morfológicas de *G. medellinensis*: microscópicas por tinción de Gram (der.) y macroscópicas con colonias en medio de cultivo H-S (izq.)



Fuente: Lina J. Arteaga Valencia

Oxidán el etanol a ácido acético, y D-glucosa a ácido 2- y 5- ceto-D-gluconico. Las células utilizan para su metabolismo D-fructosa, maltosa, sacarosa, sorbitol, D-manitol, D-gluconato, y débilmente D-ribosa y D-xilosa y no se observaron células en 30% de D-glucosa. La celulosa se produce a partir de D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, etanol, maltosa, sorbitol, D-manitol, galactosa y celobiosa. Todas las características se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características metabólicas de *Gluconacetobacter medellinensis*

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Producción de ceto-D-gluconato de D-glucosa	
2-ceto-D-gluconato	Positivo
5-ceto-D-gluconato	Positivo
Crecimiento en 3% de etanol en presencia de ácido acético a:	
0%:	Positivo
4%:	Negativo
6%:	Negativo
8%:	Negativo

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Crecimiento en fuentes de carbono:	
Etanol:	Positivo
D-Fructosa:	Positivo
Maltosa:	Positivo
D-Ribosa:	Débil
D-Xilosa:	Débil
Sacarosa:	Positivo
Sorbitol:	Positivo
D-Manitol:	Positivo
D- Gluconato:	Positivo
Crecimiento en presencia del 30% D-Glucosa :	Negativo
Producción de Celulosa:	Positivo

Fuente: (Castro Herazo, 2012).

1.5 SUSTRATOS

La producción de celulosa bacteriana tradicionalmente se ha realizado utilizando medios de cultivo definidos tales como el desarrollado por Hestrin y Schramm (Medio H-S), compuesto por glucosa, peptona, extracto de levadura, fosfato disódico, ácido cítrico y pH de 6 (Hestrin & Schramm, 1954); a partir de este medio de cultivo se han desarrollado investigaciones realizando modificaciones en la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y pH (Carreño, Caicedo, & Martínez, 2012)

Generalmente, las fuentes de carbono como el manitol, glicerol, glucosa, entre otros, tienen altos costos en el mercado lo que puede limitar la producción de celulosa bacteriana a escala industrial y por consiguiente su aplicabilidad comercial. Estos costos de producción de la celulosa bacteriana se pueden reducir drásticamente por el uso de medios de cultivo no definidos o complejos en los que se incorporan residuos agroindustriales o de alimentos (Kurosomi, Sasaki, Yamashita, & Nakanura, 2009).

Estos medios han sido utilizados con éxito para el cultivo selectivo de las bacterias productoras de ácido acético, ya que están especialmente adaptadas a ambientes

que contienen elevadas concentraciones de alcohol y son además menos sensibles que otras bacterias a la inhibición por el ácido acético que ellas mismas producen (Stanier, Ingrahan, Wheelis, & Painter, 1992).

Dentro de los componentes utilizados en los medios no definidos se encuentran, la melaza de remolacha, la melaza de caña, jarabe de dátiles, jarabe de arce, agua de coco maduro, jugo de piña, harina de Konjack, cascarilla de arroz, cáscara y jugo de piña, cáscara de melón, jugo de arándano, glicerol, manitol y glucosa, residuos de la molienda de oliva, aguas residuales, vino de arroz, residuales de biorrefinerías de lignocelulosa, fructosa, entre otros tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Sustratos empleados para la producción de CB

SUSTRATO	CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
Melaza de remolacha	NA	(Keshk, Razek, & Sameshima, 2006)
Melaza de caña	Los diferentes componentes de la melaza fueron combinados con el medio H-S	(Premjet, Premjet, & Ohtani, 2007)
Jarabe de dátiles	Se comparó con una solución de sacarosa a 10 °Brix	(Moosavi-Nasab & Yousefi, 2011)
Jarabe de arce	Se comparó con fructosa	(Zenga, Darcy, & Wan, 2011)
Agua de coco maduro	Con agitación y adición de sales	(Almeida, Wosiacki, Junior, Madalozzo, & Zanlorenzi, 2008)
Harina de konjack	La harina se hidrolizó con hidróxido de calcio	(Hong & Qiu, 2008)
Cascarilla de arroz	Se trató enzimáticamente y enriqueció con glucosa	(Goelzera, Faria-Tischer, Victorino, Sierakowski, & C.A.Tisher, 2008)
Cáscara y jugo de	Se realizó cultivo bajo	(Castro, y otros, 2012)

SUSTRATO	CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
piña	condiciones de pH bajo	
Cáscara de melón	Se varió el pH y temperatura	(Mohamed, 2010)
Molienda de oliva	Se realizó hidrólisis Mejorado con fuente de nitrógeno y fósforo	(Gomes, y otros, 2013)
Aguas residuales destilería de vino de arroz	Rica en ácidos orgánicos y aminoácidos	(Wu & Liu, 2013)
Aguas residuales biorrefinería lignocelulosa	Hidrolizadas previamente	(Cavka, y otros, 2013)
Glicerol, manitol y glucosa	NA	(Vasconcellos Antônio, y otros, 2012)
Fructosa	pH constante a 5.6 diferentes concentraciones de fructosa	(Jaramillo, y otros, 2013)

1.5.1 Residuos agroindustriales

La celulosa bacteriana se produce económicamente utilizando subproductos industriales, residuos ricos en nutrientes como carbono (glucosa, sacarosa y fructuosa), sales y vitaminas para la producción de nuevos materiales (Almeida Gomes, 2011).

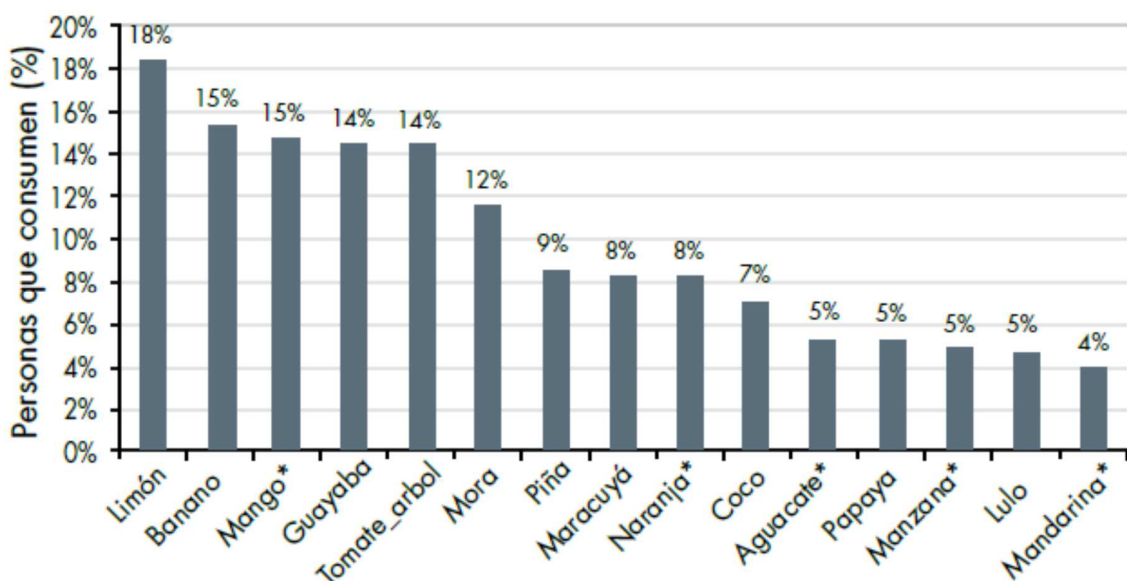
El incremento mundial en el consumo de frutas, verduras, hortalizas, semillas tubérculos, generan abundantes residuos que permiten su optimización a través de la agroindustria (Saval, 2012).

La agroindustria en Colombia tiene una fuente inagotable de residuos agroindustriales, al tener identificadas 433 especies nativas diversas, lo que nos hace ser el primer país del mundo en esta rica biodiversidad por kilómetro cuadrado (Tafur & Toro, 2007).

El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en Colombia reportó el cultivo de 41 especies de frutales perennes mayores, transitorias y perennes menores, de las cuales 20 son frutales introducidos, que no son nativos de Colombia que abarcaron el 50% del área nacional (94.639 hectáreas) según datos registrados en el año 2007 (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), 2008). El mayor número de hectáreas sembradas, en su orden son: banano, mango, naranja, patilla, maracuyá, limón, mandarina, melón, vid, ciruela, fresa, caducifolios, feijoa, macadamia, brevo, mangostino, tamarindo, toronja, lima y dátil. Los diez cultivos de mayor impacto socio económico por su área sembrada son: banano, aguacate, mango, naranja, guayaba, piña, mora, chontaduro, patilla y tomate de árbol (Asohfrucol; MAVDT; Corpoica; Ideam, 2009).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN) realizada en 2006, las frutas de mayor consumo son: limón, banano, mango, guayaba, tomate de árbol, mora y piña como se muestra en la Figura 8 (ICBF, Profamilia, INS, Universidad de Antioquia, Organización Panamericana de la Salud, 2006)

Figura 8. Principales frutas consumidas en Colombia



(*) frutas pertenecientes al grupo de las 10 frutas consumidas en mayor cantidad en gramos diarios. Fuente: (ICBF, Profamilia, INS, Universidad de Antioquia, Organización Panamericana de la Salud, 2006).

Adicionalmente, los residuos sólidos de Colombia son en un 50% de naturaleza orgánica. En la Tabla 5 se presenta una clasificación de residuos de acuerdo al sector del que provienen y el porcentaje de producción. Como es observado, el sector agrario genera el 11%, lo que representaría beneficios económicos y medioambientales si se utiliza tecnología adecuada para su transformación en productos de valor agregado (Ros, y otros, 2012)

Tabla 5. Origen y porcentaje de residuos en Colombia

ORIGEN	PORCENTAJE (%)
Doméstico	37.8
Industrial	16.6
Construcción y demolición	14.0
Agrario	11.0
Servicios municipales	9.5
Zonas de plantas de tratamiento	6.0
Comercial	5.0
Institucional	0.1
Total	100.0

Fuente: (Mejía Mesa & Gómez López, 2000).

Antioquia es un amplio productor de residuos (Inter Aseo S.A., E.S.P), en el sur del valle de Aburrá se generan 27 toneladas día y en Medellín 136 ton/ día (Cardona, 2002).

A nivel del departamento de Antioquia, se produce principalmente naranja, tomate de árbol y banano, y las de mayor consumo son banano, mango; tomate de árbol, limón y guayaba (Ministerio de salud y protección social- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO, 2013).

En la Tabla 6 se describe, nombre común, científico y porcentajes de consumo de frutas en Antioquia. Debido a que estas son las de mayor consumo y por tanto las que generan mayor cantidad de residuos, fueron las utilizadas en esta investigación.

Tabla 6. Frutas de mayor consumo en Antioquia

FRUTA	NOMBRE CIENTÍFICO	% DE CONSUMO EN ANTIOQUIA
Banano	<i>Musa paradisiaca</i>	17%
Mango	<i>Mangifera indica</i>	16%
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>	13%
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	8%
Piña	<i>Ananas comosus</i>	8%

Fuente: (ICBF, Profamilia, INS, Universidad de Antioquia, Organización Panamericana de la Salud, 2006) (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); Programa de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (PRONATTA), 2002)

1.5.1.1 Banano

De acuerdo con la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations , 2014), la producción de banano corresponde aproximadamente al 12% del total de frutas en el mundo. Para el 2003, la superficie cultivada de banano en el mundo era de alrededor de 4.494.686 hectáreas. El banano es rico en glúcidos, en 100 g 12.2g son azúcares totales repartidos en sacarosa 2.39 g, glucosa 4.9 g, fructosa 4.8 g, además, aporta potasio, magnesio y vitamina B9 (ácido fólico). Dentro de las fibras se destaca especialmente un tipo llamado fructo-oligosacáridos, que al fermentar produce ciertas sustancias (ácido butírico y propiónico) que tienen un efecto protector al cáncer de colon, regulando el tránsito intestinal e inhibiendo el crecimiento de células tumorales. El banano también estimula la formación de endorfinas (estimulantes del buen humor) (Expofrut Argentina, 2013)

1.5.1.2 Mango

El cultivo de mango en Colombia se encuentra a lo largo de 16 departamentos, siendo el Tolima uno de los principales productores, llegando a representar en el 2012 el 18% del área sembrada a nivel nacional con 4.007 ha, y el 27.1% de la producción con 56.193 toneladas. (Asociación Hortifrutícola de Colombia. ASOHOFRUCOL, 2013). El mango tiene un alto contenido de agua y aporta gran cantidad de glúcidos (alrededor del 15%) por lo que su valor calórico es elevado. Es rico en potasio, betacarotenos, vitamina C y fibras (Expofrut Argentina, 2013)

1.5.1.3 Guayaba

Es originaria de las zonas tropicales y subtropicales. En Colombia se encuentra en todo el territorio nacional y se producen más de 300.000 ton/año, principalmente en los departamentos de Santander, Boyacá, Atlántico, Antioquia, Valle, Cundinamarca, Caldas, Huila y Magdalena (en Santander se concentra el 38% de la producción nacional) (Nivia, Castro, Parada, Rodriguez, & Patricia, 2007). (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2006) es una de las frutas con mayor contenido vitamínico (16 vitaminas diferentes). Contiene minerales como el calcio, fósforo, hierro; sustancias albuminoides, ácido tánico, vitamina A, B1, B2, B3 y C, en una porción de 100 g tiene 11.88 g de carbohidratos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2006).

1.5.1.4 Naranja

Las naranjas dulces es el grupo cítrico más cultivado en el mundo (Leon M, Arango W, & Orduz R, 2009). La naranja es una fruta de escaso valor calórico (en 100 g tiene 8.6 g de carbohidratos) y bajo contenido de grasa por su alto contenido de agua. En su composición también cabe destacar la elevada cantidad de ácido ascórbico o vitamina C que contiene (una naranja de tamaño medio aporta 82 mg de vitamina C, siendo 60 mg la ingesta recomendada al día para este nutriente), esta vitamina favorece la absorción intestinal del hierro. También contiene cantidades apreciables de ácido fólico, y en menor cantidad, provitamina A, (Fundación Española de la Nutrición (FEN), 2010).

1.5.1.5 Piña

Los principales países productores de piña son: Brasil, Costa Rica, Filipinas, China e Indonesia. Colombia ocupa el puesto 10 en la producción mundial con 512.496 toneladas y se produce en mayor cantidad la variedad Perolera. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Fondo para el financiamiento del sector agropecuario, 2013). La piña posee el 90% de agua, en 100 g aporta 9.3 g de glúcidos totales repartidos en sacarosa 5.5 g glucosa 1.7 g, fructosa 2.1 g, y contiene también una enzima llamada bromelina, potasio, yodo, vitamina C y fibra (Expofrut Argentina, 2013)

1.6 CONDICIONES OPERACIONALES PARA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

La biotecnología permite la bio-conversión de residuos agroindustriales en productos de interés comercial mediante procesos de extracción directos o de transformación química o microbiológica (Moldes, Cruz, Dominguez, & Parajó, 2002). Uno de los usos que se le ha dado a los residuos agroindustriales ha sido su aprovechamiento como sustrato y fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana (Lestari, Elfrida, Suryani, & Suryadi, 2014). En estos se ha estudiado su producción a diferentes condiciones de operación, como el pH, la temperatura, los días de fermentación, tipo de cultivo, estático o agitado, importantes para una mayor producción.

Con miras de aumentar la producción se han propuesto cultivos con métodos de agitación lo cual ha resultado exitosos debido a que la interface aire líquido es más amplia, lo que ha indicado que el efecto área/volumen también debe ser tenido en cuenta. Como ya fue expuesto anteriormente, la producción de celulosa bacteriana está controlada por la transferencia de oxígeno, lo cual se facilita aumentando el área superficial del fermentador (Caicedo, Franca, & López, 2001).

Las condiciones de temperatura inciden en la producción de celulosa bacteriana, el microorganismo no es termo tolerante, por ende solo crece a temperaturas entre 28-32 °C (Junaidi & Muhammadazlan, 2012).

El pH es una condición operacional muy importante, incluso por el metabolismo del microorganismo. Se ha evaluado pH entre 2 y 8.5 mostrando que es un microorganismo ácido tolerante, pero su mayor producción está dada entre 5 -5.5 para el *G. xylinus* (Poyrazoglu Coban & Halil, 2011). Para otras especies como el *G. medellinensis* se ha demostrado mayores producciones en pH de 3-3.5 (Castro, y otros, 2012).

El nitrógeno es el principal componente de las proteínas necesarias en el metabolismo de la célula. Comprende entre el 8-14% de la masa seca de la bacteria, su efecto en la producción de celulosa bacteriana también ha sido reportado, concluyendo que la adición de una fuente de nitrógeno favorece la producción de biomasa pero disminuye la producción de la celulosa (Ragunathan, 2013)

La condición operacional tal vez más influyente para la producción del microorganismo es la fuente de carbono, porque está relacionada directamente con el metabolismo. El microorganismo asimila todos los azúcares, pero cuando glucosa y fructosa son utilizados, estos entran directamente al metabolismo, mientras que los otros tardan más pues necesitan ser interconvertidos (Velasco Bedrán, 2007).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de la CB a partir de *Gluconacetobacter medellinensis* se realizó en las instalaciones del laboratorio del Grupo de Investigaciones Agroindustriales de la Universidad Pontificia Bolivariana con la donación de fruta de descarte del Banco Arquidiocesano de Alimentos.

2.1 MICROORGANISMO / INÓCULO

Se empleó la cepa *Gluconacetobacter medellinensis* identificada como ID13488 = LMG 1693. Esta cepa fue aislada en investigaciones previas, a partir de vinagre casero adquirido en la Central Minorista de la ciudad de Medellín (Colombia) (Castro Herazo, 2012).

El establecimiento del inóculo para los ensayos de fermentación se realizó a partir de un cultivo en medio sólido Hestrim-Schramm (H-S) compuesto por 2% (p/v) de glucosa, 0,5% (p/v) de peptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 0,27% (p/v) Na_2HPO_4 y 1,15% (p/v) de ácido cítrico (Ishihara, Matsunage, Hayashi, & Tisler, 2002). El microorganismo fue recolectado y suspendido en 10 mL de agua estéril, posteriormente fue centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos para eliminar restos del medio de cultivo. Las células centrifugadas fueron llevadas a una concentración de 12×10^8 bacterias/mL utilizando el tubo 4 de la escala patrón de Macfarland, correspondiente a una absorbancia de 0.532 a 420 nm en un espectrofotómetro (PRO-LAB DIAGNOSTIC, 2012). La solución de células fue distribuida en viales y se criopreservó con glicerol en una proporción 3:1 (glicerol:solución) (Arcos, Ossa, & Díaz, 2004), a -80°C condiciones del laboratorio del grupo de investigaciones agroindustriales.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Se realizó la caracterización de frutas de descarte las cuales fueron piña, mango, banano, naranja y guayaba donadas por el Banco Arquidiocesano de Alimentos ubicado en la ciudad de Medellín-Colombia.

Se realizó una toma de muestra de 100 g de cada uno de los residuos, se cortaron en pedazos más pequeños, se homogenizaron con 400 mL de agua utilizando una

licuadora Siemens LTDA referencia LAR-04MB y esta mezcla se filtró utilizando membranas de tela. El zumo obtenido de cada residuo se analizó para determinar el pH, la acidez titulable, los grados Brix, el contenido de azúcares, micronutrientes y proteína, de acuerdo con las siguientes técnicas:

pH: Norma técnica colombiana (NTC 1990/ AOAC 981.12). Se realizó la medición con pHmetro Schott Instruments lab 850.

Acidez titulable: Expresada como % del ácido predominante en cada fruta (ácido acético anhidro, ácido cítrico anhidro, ácido tartárico anhidro, ácido málico anhidro, ácido oxálico anhidro, ácido láctico anhidro) de acuerdo con la Norma AOAC, Método oficial 942.15. Acidez (Titulable) en productos con frutas. (A.O.A.C., 2005)

° **Brix:** El valor de °Brix corresponde a la tasa de sólidos en suspensión presentes en un zumo o pulpa se determinó utilizando un refractómetro ABBE digital siguiendo la NTC 5208.

Azúcares: Los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa fueron determinados por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) a partir del Método IFU No 71 (1998).

Proteína: La determinación de proteína se realizó utilizando el método Oficial de Kjeldahl designado por la Norma AOAC 2001.11 (Persson, 2000).

Nitrógeno: se determinó por el método Oficial de Kjeldahl designado por la Norma AOAC 2001.11 (Persson, 2000).

Micronutrientes: Se determinó el contenido de cloruros, fósforo total, fósforo reactivo, fósforo orgánico, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal, sulfatos, sulfuros, aluminio, bario, calcio, cobre, cromo total, hierro, magnesio, potasio, sodio, zinc. Según técnicas analíticas del Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios ambientales (IDEAM)

Todos los análisis se realizaron con cinco réplicas para cada muestra.

2.3 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Las frutas caracterizadas con mayor cantidad de azúcares se utilizaron para evaluar su potencial de producción de CB mediante un ensayo preliminar. Se prepararon tres medios de cultivo, uno para cada fruta seleccionada (mango, piña y banano), homogenizando 250 g de fruta en 1000 mL de agua. Se utilizó un recipiente cilíndrico con un área transversal de 46.95 cm² con un volumen de fermentación de 200 mL para cada uno de los medios de cultivo y un 10% de inóculo. La fermentación fue estática y se realizó con los residuos procesados con agua sin ajustar pH, ni °Brix. Este medio se esterilizó a una temperatura entre 123 °C-127 °C y presiones entre 17-20 psi por 20 min (Rios Osorio A. D., 2012). Se tomaron las membranas de CB y se purificaron con KOH al 5%, luego se determinó la producción, por peso seco, después de 10 días de fermentación a 28 °C.

A partir de esta primera evaluación se estableció un diseño de experimentos factorial 2³ para los dos residuos con la mayor producción de CB, para evaluar el efecto del pH, adición de sulfato de amonio y tiempo de fermentación teniendo como variable de respuesta la producción de CB (peso seco), los °Brix fueron ajustados para todos los ensayos en 3. En la Tabla 7 se muestran los niveles y factores evaluados, todos los ensayos se realizaron con cinco réplicas en recipientes de un área transversal de 46.95 cm² con 200 mL de medio de cultivo y 10% de inóculo. Los ensayos realizados se describen en la Tabla 8.

Tabla 7. Niveles y factores evaluados en el diseño de experimentos factorial

pH	SULFATO DE AMONIO (g)	TIEMPO DE FERMENTACIÓN (días)
3-7	0.5-1.5	5-10

Tabla 8. Ensayos para el diseño experimental factorial para cada uno de los residuos seleccionados

PIÑA			
ENSAYOS	pH	SULFATO DE AMONIO (g)	TIEMPO (días)
1	3	1.0	10
2	3	0.5	10
3	7	1.0	10
4	7	0.5	10
5	7	0.5	5
6	3	0.5	5
7	7	0.5	5
8	3	1.0	5
BANANO			
1	3	1.0	5
2	7	0.5	5
3	7	1.0	5
4	3	0.5	10
5	7	0.5	10
6	3	0.5	5
7	7	1.0	10
8	3	1.0	10

Una vez realizado el diseño de experimentos factorial, se desarrolló un diseño de optimización por superficie de respuesta estrella, rotatable y ortogonal, para establecer así valores de los factores que optimizan la producción de CB. Los niveles que se utilizaron para evaluar el diseño de superficie en banano se muestran en la Tabla 9, teniendo como variable de respuesta la producción de celulosa bacteriana por peso seco y manteniendo fija la concentración de sulfato de amonio y °Brix. Los recipientes para el ensayo y la cantidad de inóculo fueron los mismos utilizados en los ensayos previos. Los ensayos realizados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 9. Niveles y factores evaluados en el diseño de experimentos de superficie de respuesta

pH	TIEMPO DE FERMENTACIÓN (DÍAS)
3.5 - 5.5	8-13

Tabla 10. Ensayos para el diseño de superficie de respuesta para banano

ENSAYOS	pH	TIEMPO (días)
1	4.5	10.5
2	3.1	10.5
3	4.5	10.5
4	3.5	13
5	6	10.5
6	4.5	7
7	4.5	10.5
8	4.5	10.5
9	4.5	10.5
10	4.5	14
11	5.5	13
12	3.5	8
13	4.5	10.5
14	5.5	8
15	4.5	10.5
16	4.5	10.5

2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

En todos los ensayos de producción de CB, una vez cumplido el tiempo de fermentación, la membrana de celulosa bacteriana producida fue retirada y puesta en una solución de KOH al 5% (p/p) durante 14 horas a temperatura ambiente entre 28-30°C para eliminar la biomasa y azúcares presentes en la membrana. Posteriormente, las membranas de celulosa se lavaron con agua de forma sucesiva hasta que su pH fue neutro (entre 8 y 10 días).

Posteriormente, el secado de las membranas lavadas se realizó en un horno de convección natural Binder de 23 L a 60°C por 24 horas y luego 105°C por 2 horas o hasta que se alcanzó peso constante. La producción se determinó como el peso en gramos de las membranas de celulosa secas por mL de medio fermentado.

2.5 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA

Para el proceso de evaluación de cinética del *Gluconacetobacter medellinensis* se calculó la producción celular, consumo de sustrato y producción de CB. Para cada ensayo se realizó una fermentación por duplicado, con las condiciones establecidas por el diseño de experimentos de superficie de respuesta, el cual estableció un pH de 3.1 y un tiempo de fermentación de 15 días.

El seguimiento de la fermentación se realizó a partir de las siguientes metodologías: para la cuantificación de azúcares reductores se empleó un método colorimétrico utilizando el ácido dinitrosalicílico (DNS), las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu) a 540 nm (Segal Kischinevzky & Rodarte Murguía, 2011)

La producción de celulosa bacteriana se cuantificó mediante el método de gravimetría tal como se mencionó en el numeral 2.4.

El crecimiento celular se cuantificó teniendo en cuenta la biomasa suspendida en el medio de cultivo y la presente en las membranas de celulosa, para esto las muestras fueron homogenizadas empleando un procesador marca Oster Minipimer 250W 2609 Stick Mixer previamente desinfectado y se realizó una digestión de la celulosa de acuerdo al método de Chao y colaboradores, quienes indican que a 1 mL de muestra homogenizada se adicione 8 mL de buffer acetato de sodio 100mM de pH 5 y 1 mL de celulasa (Celluclast 1,5L, Novozymes) al 20% y se deje a 30° C por una hora para hidrolizar completamente la celulosa (Chao, Ishida, Sugano, & Shoda, 2000). A partir de la solución obtenida se prepararon diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} (para realización de conteo en placa), las cuales fueron sembradas por duplicado, en agar H-S e incubadas a 28 °C por 5 días para realizar el conteo de UFC, tiempo en el que se observa crecimiento del microorganismo.

3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se evaluaron cinco residuos agroindustriales como fuentes de carbono, correspondientes a fruta de descarte por su alto grado de maduración, para la producción de celulosa bacteriana a partir de *Gluconacetobacter medellensis*. Posteriormente, se estableció el potencial de éstos para la producción de celulosa bacteriana mediante una caracterización fisicoquímica y ensayos preliminares de producción. A partir de los residuos seleccionados se evaluó el efecto de condiciones de fermentación tales como pH, tiempo de cultivo y adición de sulfato de amonio y finalmente los resultados obtenidos se emplearon para establecer la cinética de crecimiento del microorganismo. Los resultados se presentan a continuación.

3.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Los sustratos utilizados para el crecimiento de *Gluconacetobacter medellinensis* fueron residuos agroindustriales frutales que se cosechan todo el año en Colombia, además de estar entre las frutas de mayor consumo en el país según (ICBF, Profamilia, INS, Universidad de Antioquia, Organización Panamericana de la Salud, 2006), lo que permitió la adquisición del residuo.

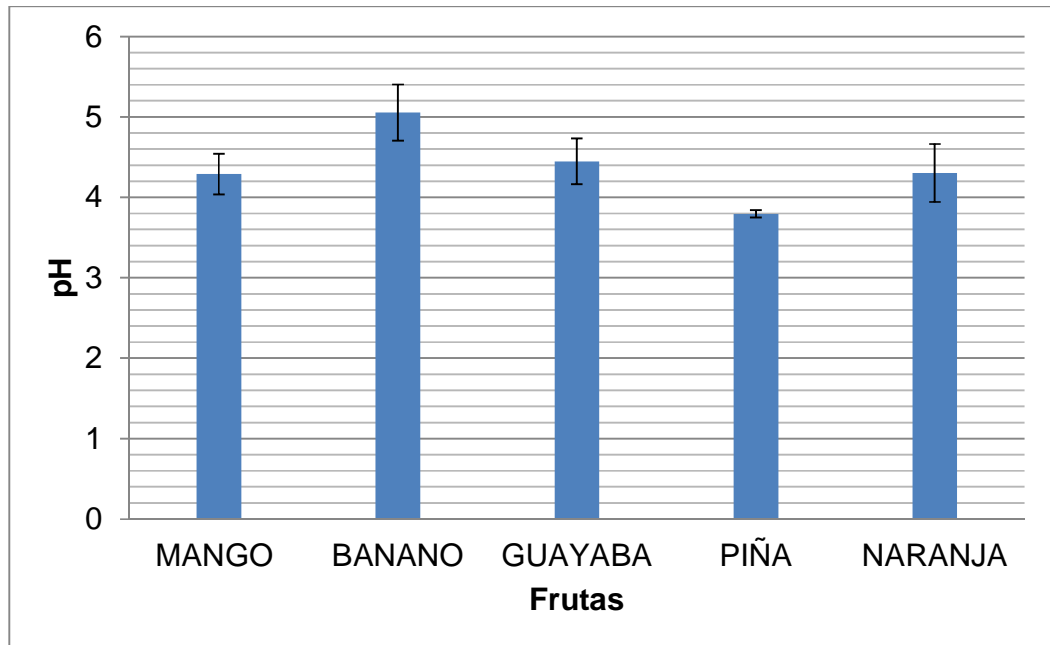
Estos fueron: mango, banano, guayaba, piña y naranja; se prepararon jugos a partir de estas frutas de descarte (250 g de fruta/1000 mL de agua) y se les determinó el pH, contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), °Brix, nitrógeno y micronutrientes (cloruros, fósforo, nitratos, nitritos, sulfatos, sulfuros, aluminio, bario, calcio, cobre, cromo, hierro, magnesio, potasio, sodio, zinc).

Esta caracterización se realizó para conocer el residuo e identificar las características que permitan el crecimiento del microorganismo *Gluconacetobacter medellinensis* en dichas frutas de descarte.

Se inició la caracterización de los residuos con la evaluación del pH, puesto que la literatura explica que es una condición operacional para el crecimiento del *Gluconacetobacter* (Lin, kuo, Lin, Chen, & Sung, 2010)

El valor de pH encontrado para cada uno de los desechos homogenizados se presenta en la Figura 9.

Figura 9. pH para los jugos de las frutas de descarte evaluadas



Los resultados muestran que las frutas evaluadas tienen un rango de pH entre 3.5 y 5.0, siendo la piña la de menor pH con un promedio de 3.795 ± 0.045 y el banano que presenta el mayor valor con un promedio de 5.055 ± 0.349

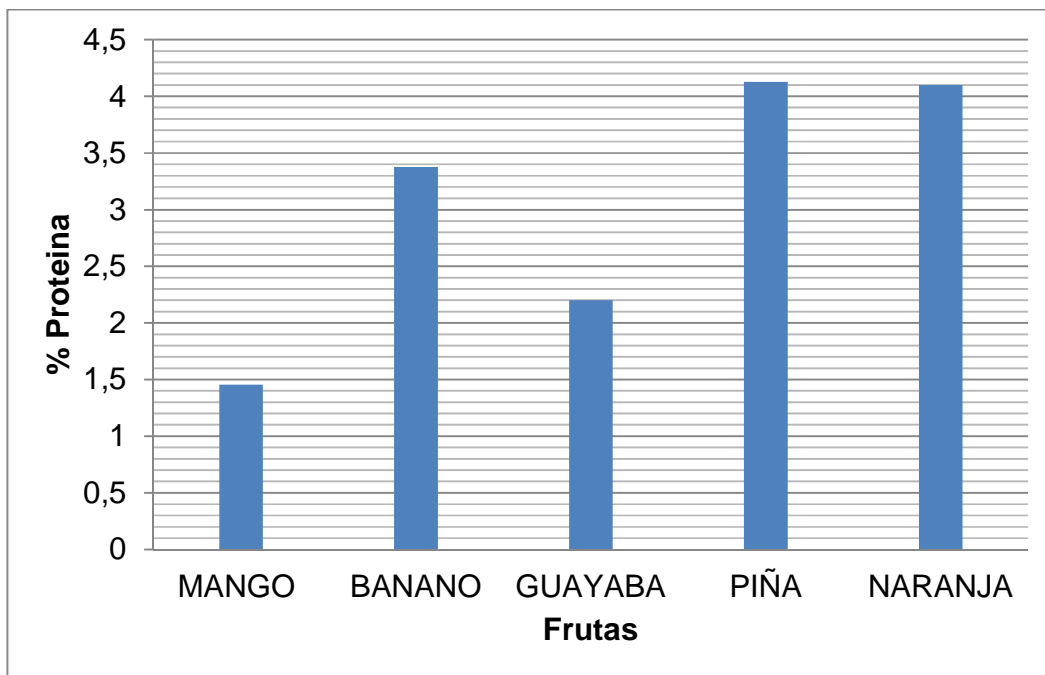
La literatura reporta rangos de pH para pulpa de frutas en buen estado, para el mango entre 3.9-4.2, guayaba 3.8-5.0, piña entre 3.6-3.8, naranja 3.0-8.4, banano entre 5.0-7.8 (Fast Fruit , 2012) (Alvarado, 2000) y (Millán Cardona & Ciro Velásquez, 2010).

Estos resultados muestran que la fruta analizada y los valores de referencia teóricos son similares, puesto que se muestran en medio de los rangos expresados o en el límite superior como es el caso del mango y la piña.

Adicionalmente, los valores hallados de pH se encuentran dentro del rango reportado para el crecimiento del género *Gluconacetobacter* y la producción de celulosa bacteriana (pH de 3-5.5), favoreciendo la utilización de estos residuos como sustrato en la producción de CB (Di Zakaria & Nazeri, 2012) (Castro, y otros, 2012).

Para el contenido de proteína, expresado en porcentaje (%), se determinó que la naranja y la piña presentan 4.1 y 4.13%, respectivamente, mientras que el mango mostró el menor porcentaje de proteína con 1.45%, ver Figura 10.

Figura 10. Contenido de de proteína (%) para las frutas de descarte



De acuerdo con (Sinha, Sidho, Barta, Wu, & Cano, 2012) el contenido de proteína en frutas generalmente está alrededor del 1% del peso fresco de las mismas, tal como en el mango (0.6%), banano (1.2%), guayaba (1.1%), piña (1.2%) y naranja (1%).

En esta investigación se encontró un contenido de proteína mayor que lo reportado en la fuente anterior, para todas las frutas, lo que está relacionado con el grado de maduración de las mismas, confirmando lo establecido por Wills y colaboradores que reporta que la proteína se incrementa durante la maduración debido a la síntesis de enzimas que intervienen en las reacciones durante este proceso (Wills, Lee, McGlasson, & Graham, 1984).

A partir de la cuantificación de azúcares por HPLC, se observó que las frutas de descarte con mayor concentración de azúcares fueron: mango, banano y piña, mientras que las de menor concentración de azúcares fueron naranja, y guayaba,

todo expresado en mg de azúcar/g de fruta, los valores se presentan en la Tabla 11

Tabla 11 . Cuantificación de azúcares por HPLC

FRUTA	SACAROSA (mg/g de fruta)	GLUCOSA (mg/g de fruta)	FRUCTOSA (mg/g de fruta)
Naranja	2.516	2.888	3.439
Mango	10.525	15.105	47.340
Banano	4.904	44.221	45.534
Guayaba	1.514	0.991	5.593
Piña	34.102	11.831	18.418

En la literatura pueden encontrarse caracterizaciones para el contenido de azúcares de fruta en buen estado, algunas de estas son presentadas en la Tabla 12, todo expresado en mg de azúcar/g de fruta.

Tabla 12 . Contenido de sacarosa, fructosa y glucosa de fruta en buen estado reportado en la literatura

FRUTA	SACAROSA (mg azúcar/g fruta)	GLUCOSA (mg azúcar/g fruta)	FRUCTOSA (mg azúcar/g fruta)	REFERENCIA
Naranja	37.151	14.533	15.399	(Benvenuti & Burgess, 2012)
Mango	82.000	6.000	38.000	(Sinha, Sidho, Barta, Wu, & Cano, 2012)
Banano	23.900	49.000	48.000	(Expofrut Argentina, 2013)
Guayaba	12.000	35.000	10.600	(Medina B & Pagano, 2003)
Piña	45.100	26.000	25.900	(Gallego Úbeda, 2012)

Como se observa, las frutas en buen estado presentan un contenido de azúcares mayor que las que fueron utilizadas en esta investigación.

El proceso de maduración es la primera fase de la última etapa en el desarrollo de los frutos, conocido como senescencia, durante esta etapa ocurren una serie de modificaciones irreversibles que tienen como efecto hacer más apetitoso al fruto y como última etapa, conduce a la muerte celular e inacceptabilidad sensorial del mismo (Nieto, 2000), por ende los resultados no tienen el comportamiento normal de la maduración, si no el de muerte celular.

Lo que muestra coherencia con Ansejo y colaboradores quienes afirman que en los procesos de respiración celular durante la etapa de muerte celular de las frutas, la piruvato descarboxilasa provoca el aumento del CO₂ liberado en el consumo de azúcares, disminuyendo por tanto la cantidad de azúcares en el fruto (Ansejo Vera, Morales de los Rios, Sainz Urruela, & Tapia Hernandez, 2000). Además de los daños extrínsecos como lo es la contaminación por microorganismos patógenos para la fruta, donde se encuentra con mayor frecuencia las bacterias y los hongos que también utilizan el azúcar de las frutas como fuente de carbono. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2004)

El contenido de azúcares totales se cuantificó empleando °Brix, estos dan cuenta del contenido de sólidos solubles totales suspendidos en una solución; esto incluye, para el caso de las frutas, no solo la concentración de azúcar si no de ácidos, vitaminas, aminoácidos y algunas pectinas (Dadzie & Orchard, 1997). En la Tabla 13 se reporta la cuantificación de los °Brix en la fruta de descarte, esto se establece con base al peso de la fruta empleada en la preparación de los jugos.

Tabla 13 . Cuantificación ° Brix en frutas de descarte (naranja, mango, banano, piña y guayaba)

FRUTA	°BRIX
Naranja	13.2 ±1.0.
Mango	15 ± 2.75
Banano	18 ± 2.4
Guayaba	7.5 ±1.05
Piña	14.7 ± 0.55

Esta cuantificación expone que la fruta con mayor °Brix fue el banano con 18 ± 2.4 y la de menor fue la guayaba con 7.5 ± 1.05 .

Para fruta en buen estado, los contenidos de azúcares totales están alrededor de: mango: 10-14, banano: 12-14 guayaba: 8.0-15 piña: 10-14 naranja: 10 -12(Flavor alchemy , 2010) (Ikegwu & Ekwu, 2009) . Mostrando que la fruta utilizada para esta investigación tiene una cantidad de °Brix más alta, esto debido a que los sólidos solubles totales (SST) en las frutas aumentan a medida que éstas maduran. El contenido de sólidos solubles en la fruta puede representar un índice o estado de madurez útil, este indicador debe asegurar la calidad mínima aceptable para el consumo y una vida de almacenamiento larga (Dadzie & Orchard, 1997) y esta característica es la relación que existe entre los °Brix o sólidos solubles totales y el % de acidez (Villalba, Yepes, & Arrázola, 2006), con esto a saber, se determinó el índice de madurez a las frutas donadas a cada uno de los lotes, el promedio de este índice se muestra en la Tabla 14 expresado en porcentaje.

Tabla 14 . Índice de madurez Fruta de descarte, expresado en %

ÍNDICE DE MADUREZ				
MANGO (%)	BANANO (%)	GUAYABA (%)	PIÑA (%)	NARANJA (%)
423.3137	680.1740	308.7281	181.3406	219.5722

Se observa que los % de índice de madurez que mostraron las frutas fueron altos, lo que expresa que la fruta no era apta para el consumo humano. En las regiones tropicales la acidez de la fruta por lo general es menor, por ende una relación de 10 en índice de madurez, es aceptable. Cuando la relación entre los grados Brix y la acidez es superior a 16, se considera que la fruta está sobremadura y que su sabor no es agradable y por lo tanto no es apropiada para la comercialización (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2000).

Uno de los aspectos más importantes para la elección del residuo para el crecimiento del microorganismo *Gluconacetobacter medellinensis* fue la cantidad de azúcares. En estudios realizados por otros investigadores, se muestra que la producción de celulosa bacteriana está influenciada por las diferentes fuentes de carbono, siendo la glucosa y la fructosa los azúcares con mayor porcentaje de transformación por la bacteria, esto debido a que dichos azúcares son transportados directamente a través de la membrana celular y se incorporan en la

vía de biosíntesis de la celulosa (ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs) (Mikkelsen, Flanagan, Dykes, & Gidley, 2009). Es por esto, que se seleccionaron las frutas como las de mayor potencial como lo fueron banano, piña y mango, a estos se les realizó una caracterización de micronutrientes. Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del contenido de micronutrientes en jugos obtenidos de fruta de descarte

MICRONUTRIENTES (mg/L)	MANGO	PIÑA	BANANO
Cloruros	3	4274.58	193.98
Fósforo total	22.05	28.32	67.09
Fósforo reactivo	19.17	25.06	42.05
Fósforo orgánico	2.88	3.26	25.04
Nitratos	35.3	7.1	24.7
Nitritos	0.002	0.002	0.002
Nitrógeno amoniacal	3	3	12.14
Nitrógeno orgánico	142.13	172.54	405.42
Nitrógeno total	143.69	172.65	417.56
Sulfatos	5.4	11.57	41.35
Sulfuros	1	1	1
Aluminio	0.055	0.055	0.055
Bario	0.031	0.043	0.191
Calcio	16.146	17.408	17.065
Cobre	0.085	0.086	0.101
Cromo total	0.088	0.088	0.088
Hierro	0.214	0.318	0.622
Magnesio	12.883	13.993	27.854
Potasio	190.426	376.592	582.951
Sodio	1.499	3.776	3.379
Zinc	0.448	0.493	0.695

Estos micronutrientes se cuantificaron con el fin de establecer cuáles estaban presentes y así mismo saber si el medio de cultivo a diseñar necesitaría de suplementación o no.

Los resultados arrojaron que la fruta de descarte contenía concentraciones de, fósforo total, calcio, cobre, hierro, magnesio y zinc, además llamó la atención por su cantidad en las tres frutas, el potasio y el nitrógeno total mientras que solo para banano y piña gran cantidad de cloruro. La importancia de estos en el metabolismo celular de presentan en la Tabla 16.

Este contenido los hace potenciales en el desarrollo de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos, ya que estos micronutrientes intervienen en las funciones metabólicas de las células. En este caso microorganismos quimiorganótrofos heterótrofos, como el *G. medellinensis*, son capaces de utilizar materia orgánica (para esta investigación la fruta de descarte) como fuente de nutrientes y energía, obteniendo de estos los micronutrientes que intervendrán en el metabolismo microbiano (Adams & Moss, 1997).

Prashant y colaboradores establecen que el diseño óptimo del medio de cultivo es muy importante para el crecimiento del microorganismo (*Gluconacetobacter xylinum*) estimulando así la formación de productos, los micronutrientes requeridos en el crecimiento del mismo, además de su fuente de carbono, son nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio (Prashant R, Ishwar B, A, & Survase and Rekha S, 2009)

Tabla 16 . Micronutrientes de importancia en el metabolismo celular

MICRONUTRIENTE	FUNCIÓN
Fósforo total	Es utilizado principalmente a nivel celular para la síntesis de ácidos nucleicos
Calcio	Permite estabilizar la pared celular bacteriana
Cobre	Implicado en la respiración como citocromo oxidasa (proteína trasmembrana)
Hierro	Participa en procesos de respiración celular
Magnesio	Estabiliza ribosomas, membranas y ácidos nucleicos y se presenta como cofactor en reacciones que requieren ATP

MICRONUTRIENTE	FUNCIÓN
Zinc	Interviene en la estabilización de complejos enzimáticos como la ADN y ARN-polimerasas
Potasio	Interviene en la activación de enzimas y participa en la síntesis de proteínas
Nitrógeno total	Componente mayoritario de las proteínas y ácidos nucleicos, una bacteria típicamente contiene el 12% de Nitrógeno en peso seco
Cloruro	Interviene en procesos metabólicos para la regulación osmótica

Fuente: (Brock, Madigan, & Martinko, 2004).

En ese sentido, se puede concluir que las frutas con mayor cantidad de micronutrientes son banano y piña, haciendo de estas posibles medios de cultivo para el *Gluconacetobacter medellinensis*.

3.2 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

3.2.1 Ensayo preliminar de producción de CB

Los resultados de la caracterización mostraron que de los residuos analizados la piña, el mango y el banano son las frutas con mayor cantidad de azúcares y micronutrientes que intervienen en el metabolismo celular, debido a esto fueron seleccionados como los residuos con mayor potencial para la producción de CB, para verificarlo se realizó un ensayo preliminar de fermentación para cada residuo; se utilizaron medios de cultivo preparados a partir de la homogenización de 250 g de fruta con 1000 mL de agua (las tres frutas en sus condiciones originales, es decir, sin ajustar pH, ° Brix, y sin fuente de nitrógeno adicional). Para cada medio se reportó al inicio de la fermentación, °Brix y pH. Los datos se presentan en la Tabla 17.

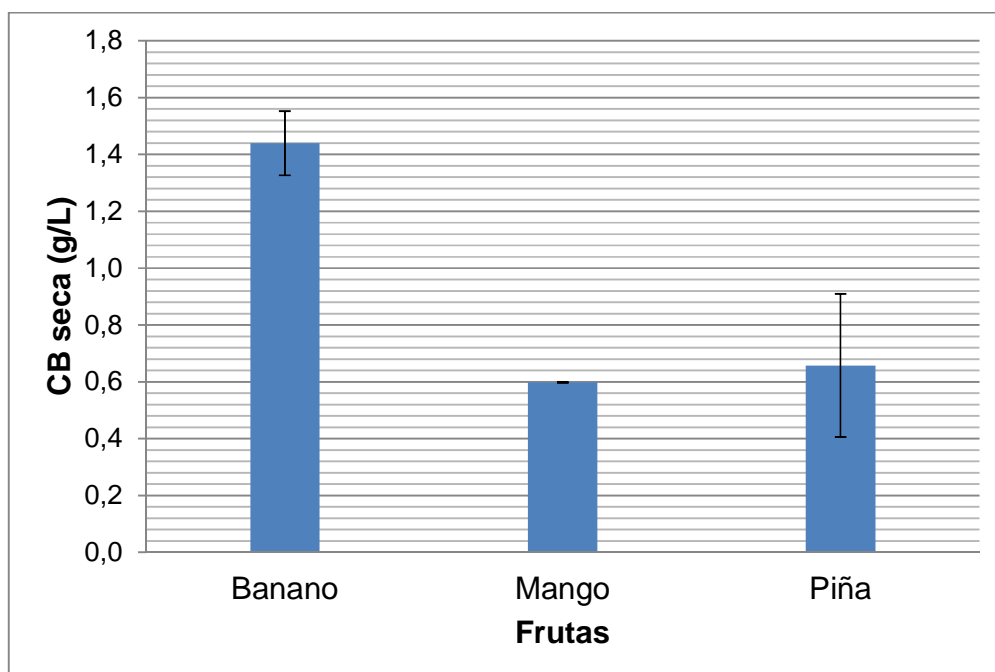
Tabla 17 . Condiciones del medio de cultivo para ensayo preliminar de producción de CB

FRUTA	°BRIX	pH
Mango	2.933 ± 0.115	4.109± 0.006
Banano	3.467 ± 0.153	4.476 ± 0.004
Piña	2.700 ± 0.265	4.271± 0.010

Las frutas presentaron características diferentes, la de menor concentración de sólidos solubles totales fue piña, y el de mayor banano, en el pH se muestra que el mango tiene el menor y el banano el mayor.

Se encontró que en promedio, para una fermentación durante 8 días a temperatura de 28 °C, el mango tuvo una producción en peso seco de CB de 0.5983 ± 0.0018 g/L, piña 0.6571 ± 0.2513 g/L y banano 1.4395 ± 0.1131 g/L como se muestra en la Figura 11.

Figura 11. Producción de celulosa bacteriana en ensayos preliminares para medios de cultivo con mango, banano y piña.



Con los resultados obtenidos, se estableció que las frutas de descarte con una mayor producción de CB fueron piña y banano, los cuales son los residuos con mayor contenido de fructosa y glucosa que son los azúcares mejor asimilados por el género *Gluconacetobacter* (Chávez-Pacheco, Martínez Yee, Contreras Zentella, & Escamilla Marván, 2004) además de ser los de mayor contenido de micronutrientes que contribuirán en mejores condiciones para el medio de cultivo.

3.2.2 Establecimiento de condiciones de cultivo

Se realizó un experimento bajo diseño completamente al azar con 3 repeticiones en arreglo factorial 2^3 utilizado para evaluar el efecto de 3 factores, el pH, concentración de sulfato de amonio y tiempo de fermentación sobre la producción de celulosa bacteriana, a partir de las frutas de descarte banano y piña. Los resultados fueron analizados utilizando el software StatGraphics Centurión XVI.

3.2.2.1 Diseño de experimentos factorial con jugo de banano de descarte como medio de cultivo

En la Tabla 18 se muestra el diseño de experimentos empleando jugo de banano como medio de cultivo, con respecto a la variable de respuesta (CB producida) en peso seco.

Tabla 18. Resultados diseño de experimentos factorial banano

ENSAYOS	pH	SULFATO DE AMONIO (g)	TIEMPO (días)	CELULOSA BACTERIANA (g)
1	3	1	5	0.0015
2	7	0.5	5	0.0371
3	7	1	5	0.0412
4	3	0.5	10	0.2627
5	7	0.5	10	0.0510
6	3	0.5	5	0.0104
7	7	1	10	0.1236
8	3	1	10	0.2436

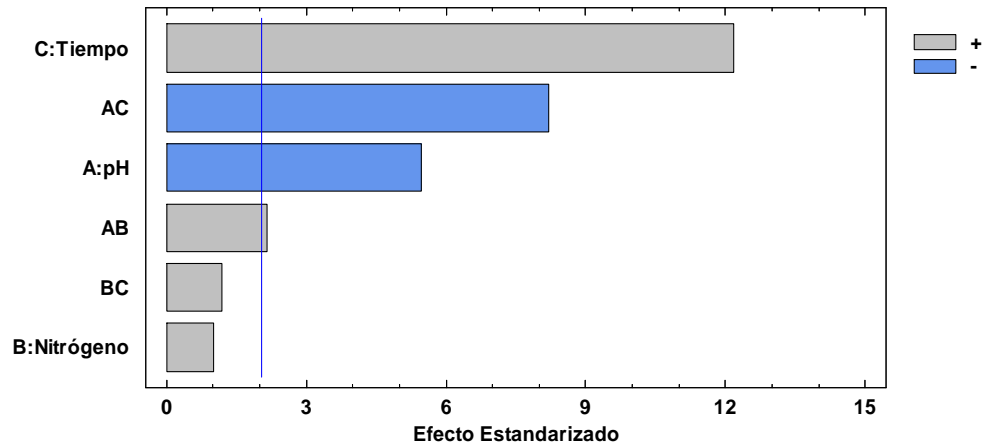
A partir de estos datos, se realizó el análisis para la varianza representado por la ANOVA en la Tabla 19.

Tabla 19 . Tabla ANOVA para el diseño factorial empleando banano como medio de cultivo

Efectos	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio del error	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.0439901	1	0.0439901	29.88	0.0000
B:Nitrógeno	0.00148474	1	0.00148474	1.01	0.3226
C:Tiempo	0.218109	1	0.218109	148.14	0.0000
AB	0.00683561	1	0.00683561	4.64	0.0386
AC	0.0990324	1	0.0990324	67.26	0.0000
BC	0.00212431	1	0.00212431	1.44	0.2382
Total error	0.0485875	33	0.00147235		
Total (corr.)	0.420163	39			
R-cuadrado = 88.44%					
R-cuadrado (ajustado G.L..) = 86.33%					
Error estándar = 0.0383712					

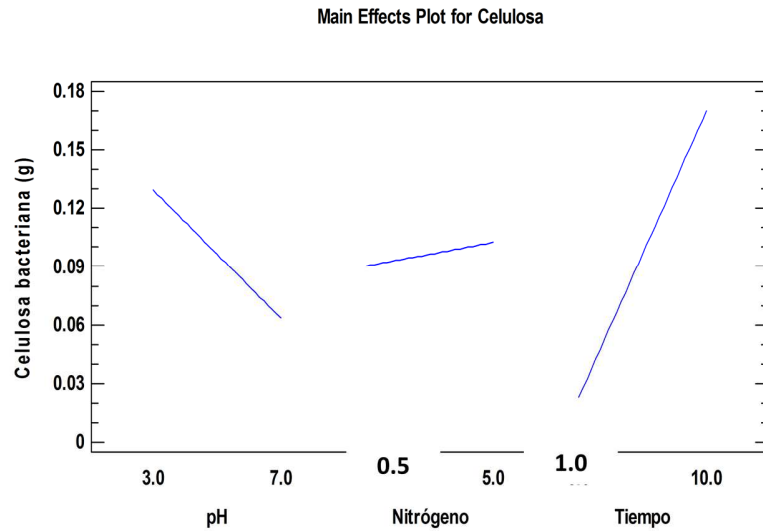
Como se puede observar en la Tabla 19, el pH, el tiempo y las interacciones entre pH-nitrógeno y pH-tiempo presentan efectos significativos para la producción de celulosa bacteriana, evidenciados por los valores P inferiores a 0.05 (datos en rojo), lo que indica que son significativamente diferentes a cero en un nivel de confianza del 95%. El R-cuadrado muestra que el modelo explica el 88.44% de la variabilidad en la producción de la celulosa y el R-cuadrado ajustado (que permite comparar modelos con diferente número de variables independientes) con un valor de 86.33%, muestra que los factores estudiados explican en un porcentaje alto la variabilidad de la respuesta. El error estándar para el experimento fue de 0.0383 lo que señala que el tratamiento de la muestra fue el adecuado. Los 4 efectos significativos se pueden apreciar mejor en el gráfico de Pareto (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de Pareto para los resultados del diseño factorial empleando banano como medio de cultivo



Este gráfico de Pareto se utiliza para resumir la importancia relativa de los diferentes efectos, ordenando de mayor a menor su magnitud. Los efectos que superan el límite de significancia (línea azul), se consideran significativos ya sea de forma positiva o negativa. En este caso el tiempo y la interacción tiempo-nitrógeno tienen un efecto positivo, es decir, que al pasar del nivel inferior al nivel superior del factor se obtiene un incremento en la producción de CB; mientras que el pH y la interacción pH-tiempo tienen un efecto negativo, es decir, que al pasar del nivel inferior al nivel superior del factor se obtiene una disminución en la producción de CB. Los efectos principales para cada uno de los factores se presentan en la Figura 13.

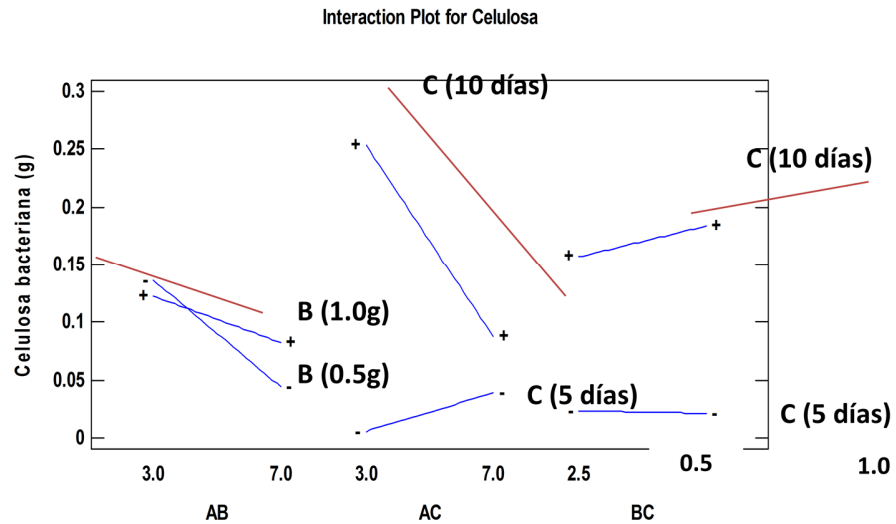
Figura 13. Efectos principales para los resultados del diseño factorial empleando banano como medio de cultivo



En esta gráfica se muestra que el pH es significativamente negativo lo que indica que a medida que aumenta de 3 a 7 se disminuye la producción de celulosa bacteriana en 0.038 gramos, el tiempo en cambio tuvo un efecto positivo sobre la respuesta aumentándola en 0.070 gramos cuando se pasa de cinco días a diez, mientras que el nitrógeno no muestra efecto significativo con respecto a la producción de CB en ninguna de las concentraciones utilizadas.

Además de los efectos simples es importante resaltar las interacciones entre los diferentes factores como se muestra en la Figura 14, donde se muestra que el efecto de un factor depende de lo que ocurre con el otro, mostrando así, que las interacciones más importantes son las de AB (pH-fuente de nitrógeno) y AC (pH-tiempo).

Figura 14. Interacciones principales para el medio de cultivo con banano (A: pH, B: Nitrógeno, C: Tiempo)



En la interacción AB el efecto del nitrógeno a pH bajo, es negativo, al disminuir la producción de celulosa bacteriana cuando pasa del nivel inferior al superior; en cambio el efecto del nitrógeno a pH alto es positivo, incrementando la producción de celulosa bacteriana al suplementar el medio con 1 g de sulfato de amonio; lo anterior demuestra, una interacción entre estos dos factores.

En la interacción AC el efecto del tiempo en pH bajo es positivo, al igual que el efecto del tiempo en pH alto, aunque para este último caso ocasiona un menor aumento en la producción de CB.

La interacción BC no presenta diferencia significativa en la producción de celulosa bacteriana para los valores evaluados, es decir que el nitrógeno no afectó la producción de CB en ninguno de los tiempos examinados.

3.2.2.2 Diseño de experimentos factorial con jugo de piña de descarte como medio de cultivo

En la Tabla 20 se muestran los resultados de dichos factores en la piña con respecto a la variable de respuesta (CB producida) en peso seco

Tabla 20 . Diseño experimental factorial piña

ENSAYOS	pH	SULFATO DE AMONIO (g)	TIEMPO (días)	CELULOSA BACTERIANA (g)
1	3	1	10	0.22106
2	3	0.5	10	0.26546
3	7	1	10	0.06596
4	7	0.5	10	0.0764
5	7	1	5	0.0074
6	3	0.5	5	0.0019
7	7	0.5	5	0.0087
8	3	1	5	0.0013

A partir de estos datos, se realizó el análisis para la varianza representado por la ANOVA en la Tabla 21.

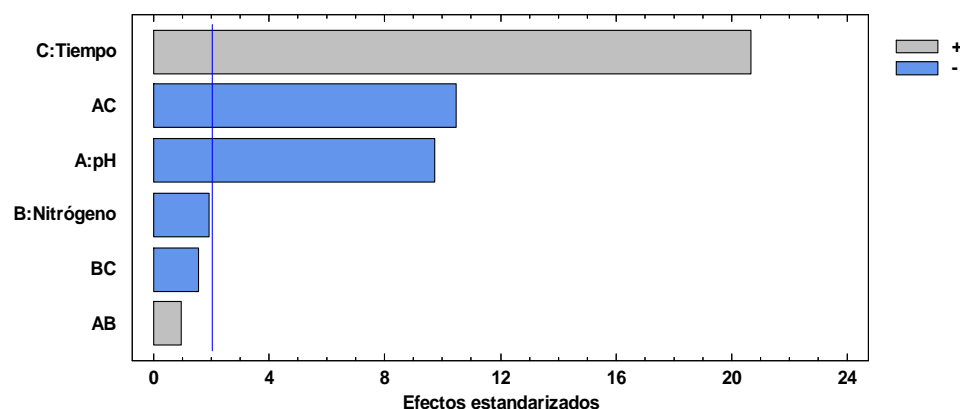
Tabla 21. Tabla ANOVA para el diseño factorial empleando piña como medio de cultivo

Efectos	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio del error	F-Ratio	P-Valor
A: pH	0.0686164	1	0.0686164	94.28	0.0000
B:Nitrógeno	0.00270039	1	0.00270039	3.71	0.0627
C:Tiempo	0.31059	1	0.31059	426.76	0.0000
AB	0.000694722	1	0.000694722	0.95	0.3357
AC	0.0796467	1	0.0796467	109.44	0.0000
BC	0.00174636	1	0.00174636	2.40	0.1309
Total error	0.0240169	33	0.000727786		

Efectos	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio del error	F-Ratio	P-Valor
Total (corr.)	0.409042	39			
R-cuadrado = 94.12%					
R-cuadrado (ajustado G.L)= 93.06%					
Error estándar. = 0.0269775					

En los resultados se encontró que existen 3 efectos significativos el pH, el tiempo y la interacción pH-tiempo para la producción de celulosa bacteriana, evidenciados por los valores P inferiores a 0.05 (datos en rojo), lo que indica que son significativamente diferentes a cero en un nivel de confianza del 95%. El R-cuadrado indica que el modelo explica 94.12% de la variabilidad en la producción de la celulosa y el R-cuadrado ajustado (es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes) es de 93.06%, lo que muestra la sobresaliente relación que hay entre los factores utilizados. El error estándar muestra la desviación estándar que es de 0.0269. Los 4 efectos significativos se pueden apreciar mejor en el gráfico de Pareto (Figura 15).

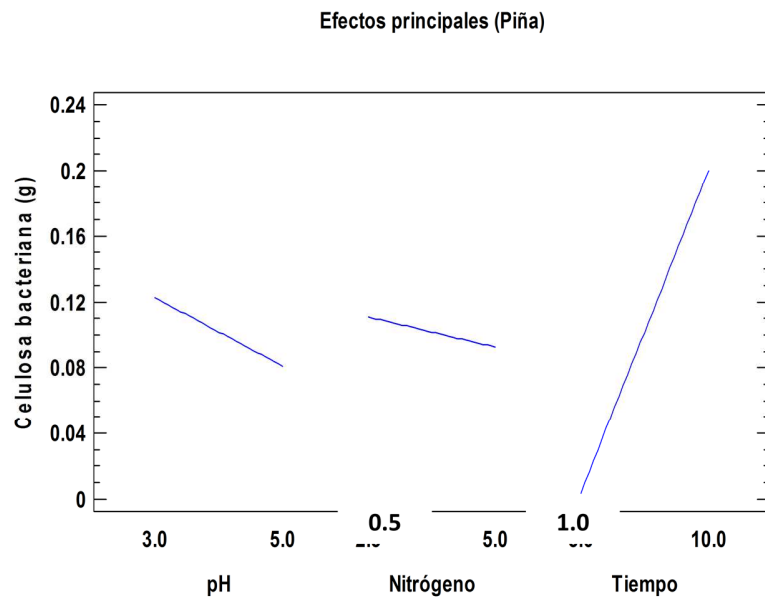
Figura 15. Gráfico de Pareto para los resultados del diseño factorial empleando piña como medio de cultivo



En esta gráfica se observa que los efectos que superan el límite de significancia (línea azul) se consideran significativos ya sea de forma positiva o negativa,

mostrando en este caso, que el pH y la interacción pH-tiempo tienen un efecto negativo, mientras que el tiempo tiene un efecto positivo. Los efectos principales para cada uno de los factores se presentan en la Figura 16.

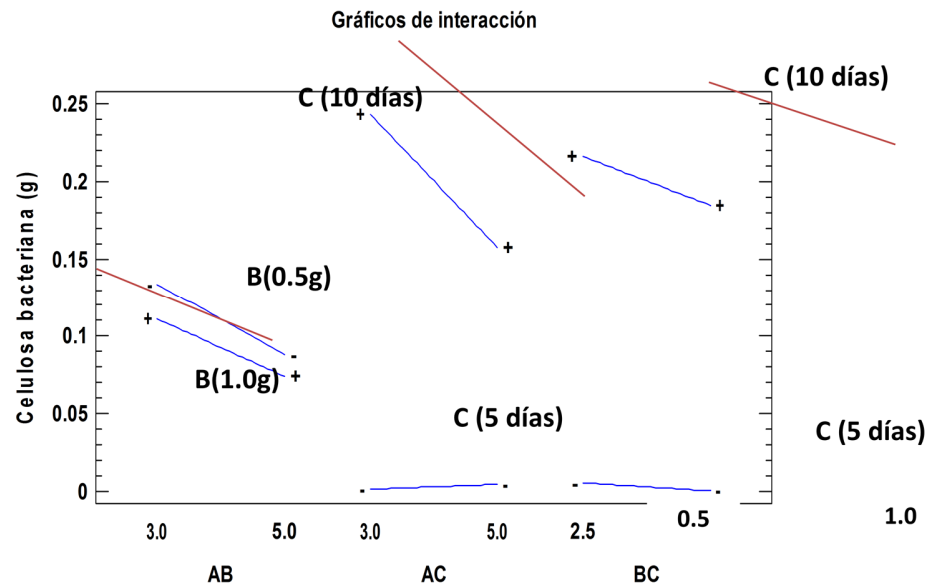
Figura 16. Efectos principales



En esta grafica se muestra que el pH tiene un efecto negativo, lo que indica que al aumentar de 3 a 7, ocasiona una disminución en la producción de CB de 0.039 gramos; el tiempo en cambio, tuvo un efecto significativamente positivo sobre la producción de CB logrando un incremento de 0.083 gramos al pasar de cinco a diez días; de otro lado, el nitrógeno no muestra efecto significativo en ninguna de las concentraciones utilizadas con respecto a la producción de CB.

Además de los efectos simples observados, se deben tener en cuenta las interacciones, es decir que el comportamiento de un factor afecta el otro. Como se muestra la Figura 17

Figura 17. Interacciones principales para el medio de cultivo con piña (A: pH, B: nitrógeno, C: Tiempo)



En este gráfico se puede interpretar que las interacciones más importantes fueron interacción AC y la interacción BC.

En la interacción AC el efecto del tiempo en pH bajo es positivo, produciendo un aumento en la producción de CB mientras que en pH altos también es positivo aunque no se logra un aumento tal alto en la producción de CB.

En la interacción BC se observa que a menor concentración de nitrógeno existe una mayor producción de CB, mientras que a concentraciones mayores no existe mayor cambio en la variable de respuesta.

En la interacción AB se observa que cuando la concentración de nitrógeno es alta, al aumentar el pH ocasiona una disminución en la producción, por lo que establece un efecto negativo.

3.2.2.3 Interpretación diseño de experimentos factorial 2³ para banano y piña

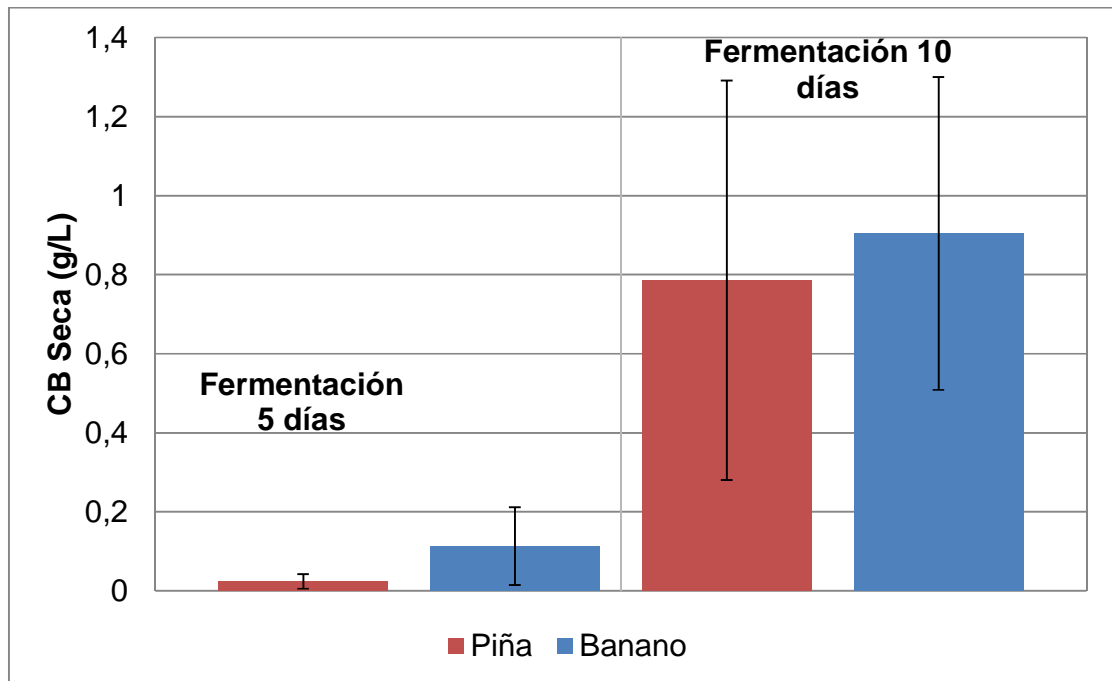
En ambos ensayos se puede establecer que a valores de pH cercanos a 3 existe una mayor producción de CB, Moretti Vieira, (2013) afirma que la mejor gama de valores para el crecimiento del *Gluconacetobacter xylinum*, especie similar a la estudiada en esta investigación, está entre 3 y 6. Lo que coincide con lo establecido por Castro, y otros, (2012) quienes encontraron que para *Gluconacetobacter medellinensis* existe mayor producción de CB con valores de pH cercanos a 3. Característico este pH de microorganismos capaces de vivir en pH ácidos (Fukaya, Park, & Toda, 1992).

La suplementación del medio del cultivo con sulfato de amonio no presentó efectos significativos sobre la producción de celulosa bacteriana; sin embargo, se ha reportado que la fuente de nitrógeno tiene un efecto significativo para el crecimiento del microorganismo, mas no para la producción de CB como lo indica Raghunathan, (2013), y es también afirmado por Ab Halim, (2010) quienes aseguran que la fuente de nitrógeno es uno de los principales factores estimulantes para el crecimiento microbiano. Lo que concuerda con los resultados obtenidos donde se mostró que independiente de la concentración de sulfato de amonio que se aplicara al medio de cultivo, este no contribuyó para la producción de celulosa bacteriana.

Así mismo, se halló que el efecto del tiempo es positivo para la producción de CB, como lo menciona Carreño, Caicedo, & Martinez, (2012) donde expresa que a tiempos largos de fermentación existe mayor producción de CB, como lo muestran los resultados promedio de las fermentaciones realizadas así:

Banano 5 días, 0.022 ± 0.019 g/L de celulosa seca y en 10 días 0.181 ± 0.079 g/L, Piña 5 días 0.0048 ± 0.0037 g/L y en 10 días 0.1572 ± 0.1011 g/L. Ver Figura 18.

Figura 18. Producción de CB-Evaluación de tiempo 5 días y 10 días



Se observó en la Figura anterior que al aumentar el tiempo de fermentación hay mayor síntesis de CB, como lo indica Hornung 2010, este mismo autor reporta que la producción de CB se detiene por el empleo de recipientes de pared vertical como los usados en esta fermentación. El establece, que la relación área superficie es vital para la adquisición de oxígeno del microorganismo, debido a ese impedimento de crecimiento por el área (llamado efecto pared), adicionalmente afirma que el tiempo de producción de CB en una fermentación está entre 10 y 30 días (Hornung, 2010).

Con estos resultados se definió seguir con una sola fruta de descarte, el banano, debido a que este tiene mayor contenido de glucosa 44.221 mg/g de fruta y fructosa 45.5334 mg/g de fruta, mientras que la piña tiene mayor cantidad de sacarosa 34.102 mg/g de fruta, esta concentración de azúcares intervino en la decisión, por su comportamiento en el metabolismo del microorganismo, ya que para el género *Gluconacetobacter*, primero se debe hidrolizar la sacarosa en el periplasma de la célula para convertirla en fructosa y glucosa (Velasco Bedrán, 2007). Esto influirá en la velocidad de crecimiento del microorganismo y en la producción de CB como lo establece Ab Halim, (2010) quien afirma que dentro de las hexosas básicas, las más utilizadas por el género *Acetobacter* son: D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, de hecho la glucosa habitualmente genera un efecto represivo inhibitorio en la asimilación de otros azúcares para el *Acetobacter*. En

fermentaciones de celulosa bacteriana usualmente se emplea glucosa como fuente de carbono para mejorar la producción (Ab Halim, 2010) .

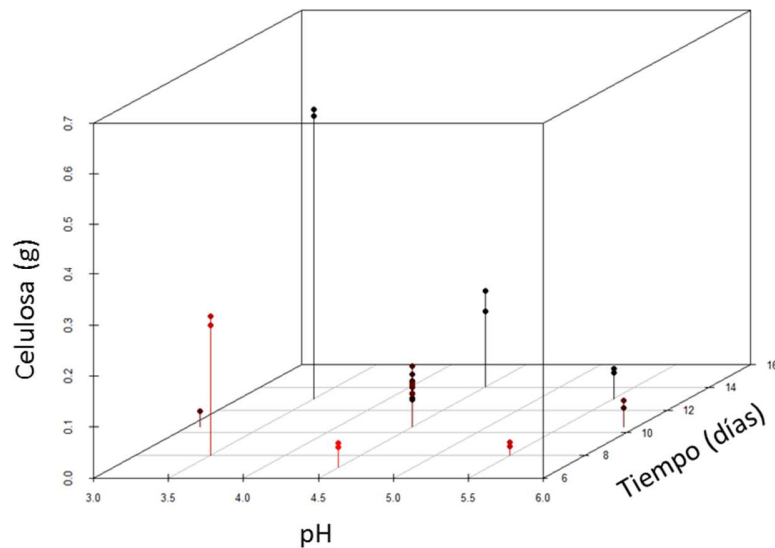
3.2.2.4 Diseño de superficie de respuesta

Se seleccionó el banano como único residuo a evaluar, por su contenido de azúcares y su comportamiento en la producción de celulosa bacteriana. Se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto 2^2 +estrella rotatable ortogonal, que pretendía determinar los valores óptimos para las condiciones encontradas como relevantes para la producción de CB en el anterior diseño de experimentos con *Gluconacetobacter medellinensis*. Se aprecian los resultados del diseño en la Tabla 22 y la Figura 19.

Tabla 22. Resultados para la producción de celulosa del diseño de superficie de respuesta para banano

ENSAYOS	pH	TIEMPO (días)	PESO SECO DE CB (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (%)
1	4.5	10.5	0.2052	0.1270
2	3.1	10.5	0.0306	0.0000
3	4.5	10.5	0.0654	0.0017
4	3.5	13	0.5647	0.0085
5	6	10.5	0.0451	0.0100
6	4.5	7	0.0423	0.0057
7	4.5	10.5	0.0932	0.0153
8	4.5	10.5	0.0867	0.0023
9	4.5	10.5	0.0882	0.0026
10	4.5	14	0.1685	0.0282
11	5.5	13	0.0553	0.0054
12	3.5	8	0.2638	0.0117
13	4.5	10.5	0.1027	0.0226
14	5.5	8	0.0218	0.0052
15	4.5	10.5	0.0665	0.0186
16	4.5	10.5	0.0620	0.0064

Figura 19. Comportamiento de la producción de celulosa bacteriana respecto al pH y el tiempo de cultivo



De la Figura 19 se observa que la disminución en el valor del pH ocasiona un incremento en la producción de celulosa bacteriana al igual que tiempos de cultivo cercanos a los 15 días.

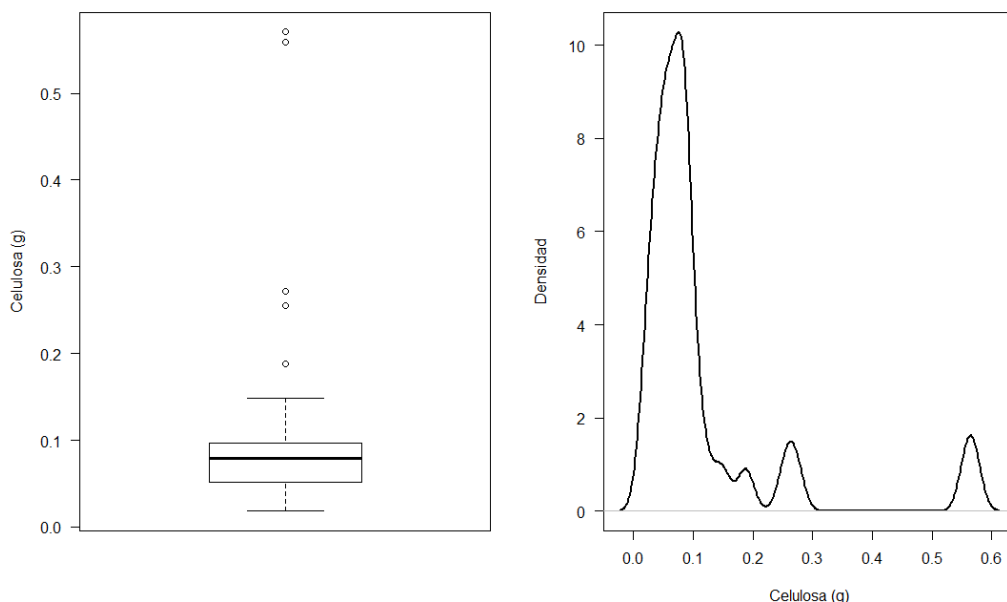
Para verificar la significancia de los factores evaluados se empleó un análisis de varianza tal como se muestra en la Tabla 23. En los resultados se encontró nuevamente que los dos factores evaluados, tiempo y pH, tienen efecto significativo sobre la producción de celulosa bacteriana.

Tabla 23. Tabla ANOVA para la producción de celulosa bacteriana evaluada a partir de un diseño de superficie de respuesta

Efectos	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado medio del error	F-Ratio	P-Valor
A: pH	0.133596	1	0.133596	13.55	0.0011
B:Tiempo	0.0657299	1	0.0657299	6.67	0.0158
AA	0.00477654	1	0.00477654	0.48	0.4925
AB	0.035738	1	0.035738	3.63	0.0680
BB	0.0417038	1	0.0417038	4.23	0.0499
Total error	0.256286	26	0.00985717		
Total (corr.)	0.53783	31			
R-cuadrado = 52.34%					
R-cuadrado (ajustado GL) = 43.18%					
Error estándar = 0.0992833					

Con los resultados estadísticos mostrados se observan 3 efectos importantes que tienen valores P inferiores a 0.05, lo que indica que son significativamente diferentes a cero en un nivel de confianza del 95%. El R-cuadrado indica que el modelo explica 52.34% de la variabilidad en la producción de la celulosa y el R-cuadrado ajustado es 43.18%, con una desviación estándar es de 0.0383 (Ver análisis estadístico completo en el Anexo A). Debido a que este modelo explica menos del 50% de la variabilidad de los datos fue necesario evaluar el tipo de distribución de los mismos, ya que este modelo supone que los datos son de distribución normal. La Figura 20 muestra los diagramas de cajas y bigotes y la densidad de datos para la producción de celulosa bacteriana.

Figura 20 . Diagrama de Cajas y bigotes (Izq.) y Densidad de datos para la producción de celulosa (Der.)



La Figura 20 permite ver la dispersión de los datos para la producción de celulosa bacteriana y verificar su normalidad. En el diagrama de cajas y bigotes se observa la presencia de datos atípicos con producción de celulosa bacteriana por encima del valor máximo, mostrando una distribución que no corresponde con el comportamiento normal. De igual forma la gráfica de densidad de datos evidencia asimetría corroborando lo presentado anteriormente.

Una vez establecido que los datos no tienen una distribución normal, se probaron 10 modelos GAMLSS (modelos aditivos generalizados para la ubicación, escala y forma, por sus siglas en inglés) (Rigby & Stasinopoulos, 2005), que puede ser empleados para variables respuesta ya sean discretas o continuas, un caso particular de estos modelos es el modelo normal lineal (modelo aplicado para el diseño de superficie de respuesta en StatGraphics).

Los modelos GAMLSS son modelos de regresión donde todos los parámetros (media, μ y parámetro de forma, σ) de la distribución de la variable respuesta pueden ser modelados como funciones de los factores evaluados (Rigby & Stasinopoulos, 2005), para esta investigación los factores fueron pH y tiempo de cultivo y la variable respuesta la producción de CB. Para la aplicación de estos modelos se eligieron distribuciones con soporte positivo ya que la producción de

celulosa bacteriana hace referencia a valores positivos, como se observó en la Figura 20.

A continuación se presenta la Tabla 24 con los diez modelos ajustados, la distribución asumida para la variable respuesta y el valor del ajuste del modelo a los datos experimentales AIC (Akaike Information Criterium), valores menores indican un buen ajuste del modelo a los datos. Los datos fueron ajustados empleando el software estadístico R.

Tabla 24 . Modelos GAMLSS ajustados a los datos de producción de CB con jugo de banano como medio de cultivo (μ : media, σ : parámetro de forma, β_i y α_i : coeficientes de ajuste)

Modelo	Distribución	Modelo	AIC
1	Normal	$\mu = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$	-46.75442
2	Normal	$\mu = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$ $\log(\sigma) = \alpha_0 + \alpha_1 * pH + \alpha_2 * t$	-109.7713
3	Normal	$\mu = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t + \beta_3 * pH * t$ $+ \beta_4 * pH^2 + \beta_5 * t^2$	-49.6582
4	Gamma	$\log(\mu) = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$	-102.1767
5	Gamma	$\log(\mu) = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$ $\log(\sigma) = \alpha_0 + \alpha_1 * pH + \alpha_2 * t$	-118.1104
6	Gamma	$\log(\mu) = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$ $\log(\sigma) = \alpha_0 + \alpha_1 * pH$	-119.8078
7	Lognormal	$\ln(\mu) = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$	-95.88157
8	Lognormal	$\ln(\mu) = \beta_0 + \beta_1 * pH + \beta_2 * t$ $\ln(\sigma) = \alpha_0 + \alpha_1 * pH + \alpha_2 * t$	-118.3249
9	Gamma inversa		-110.0444
10	Gamma inversa		-116.728

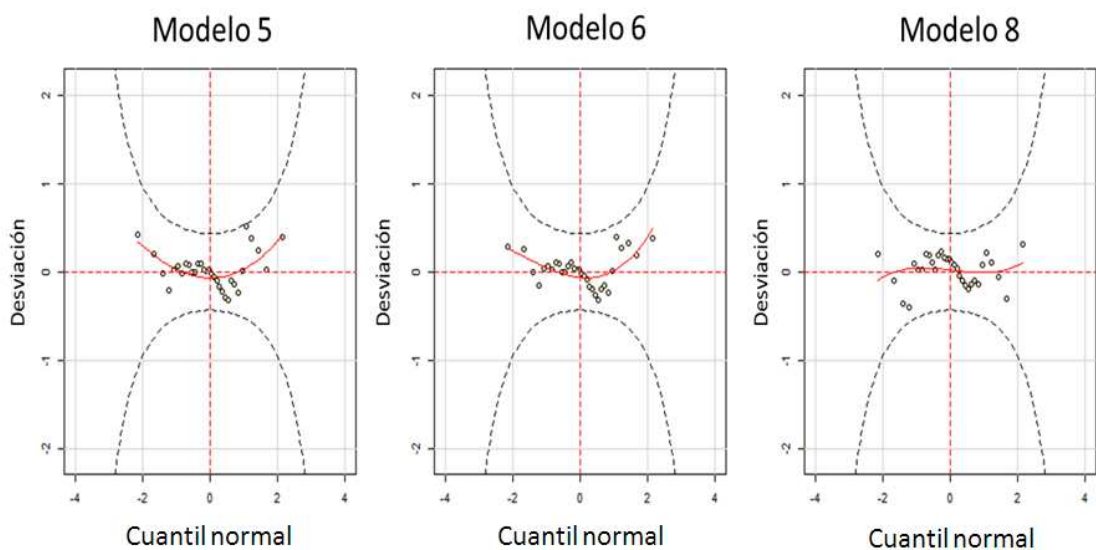
Las distribuciones Gamma, Lognormal y Gamma inversa fueron seleccionadas ya que como se observó en la Figura 20 que los datos presentan un sesgo a la derecha y estas funciones estrictamente positivas permiten modelar este tipo de comportamientos.

El modelo 3 corresponde con el empleado para el análisis de superficie de respuesta en el Software StatGraphics Centurión XVI (sombreado en azul), al compararlo con el valor AIC de los otros modelos con distribuciones diferentes a la normal se observa que es mayor, indicando un ajuste inferior al comportamiento de los datos.

Al observar el AIC se nota que los modelos 5, 6 y 8 tienen los AIC más bajos y por lo tanto se pueden considerar como los modelos que mejor se ajustan al conjunto de datos.

Para los modelos con mejores ajustes se presentan los *Worm plot*, indicando que si los puntos se encuentran en la parte central de la figura, entonces el modelo proporciona un buen ajuste (Cribari Neto & Ospina Martinez, 2010) como se muestra en la Figura 21

Figura 21 . *Worm plot* para los modelos con mejor ajuste (Menor AIC)



De los 10 modelos presentados, el que tiene menor AIC es el modelo 6, los resultados del ajuste para este modelo se muestran en la Tabla 23, μ representa la media para la producción de celulosa bacteriana y la desviación estándar está dada por el producto de σ y μ .

Tabla 25 . Resultados de ajuste para el modelo 6

Coefficientes para μ	VALOR ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	t_0	Valor P
Intercepto	-1.4528	0.57593	-2.523	1,785e-02
pH	-0.6502	0.08755	-7.426	5.468e-08
Tiempo	0.1847	0.03449	5.356	1.173e-05
Coefficientes para σ	VALOR ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	t_0	Valor P
Intercepto	1.5799	0.5660	2.792	0.0095142
pH	-0.5622	0.1239	-4.536	0.0001058
Desviación global: -129.8078				
AIC: -119.8078				

De la tabla anterior se concluye que todas las variables en el parámetro μ y σ son importantes a un nivel de significancia del 5%. El modelo se puede explicar entonces con las ecuaciones:

Ecuación 1

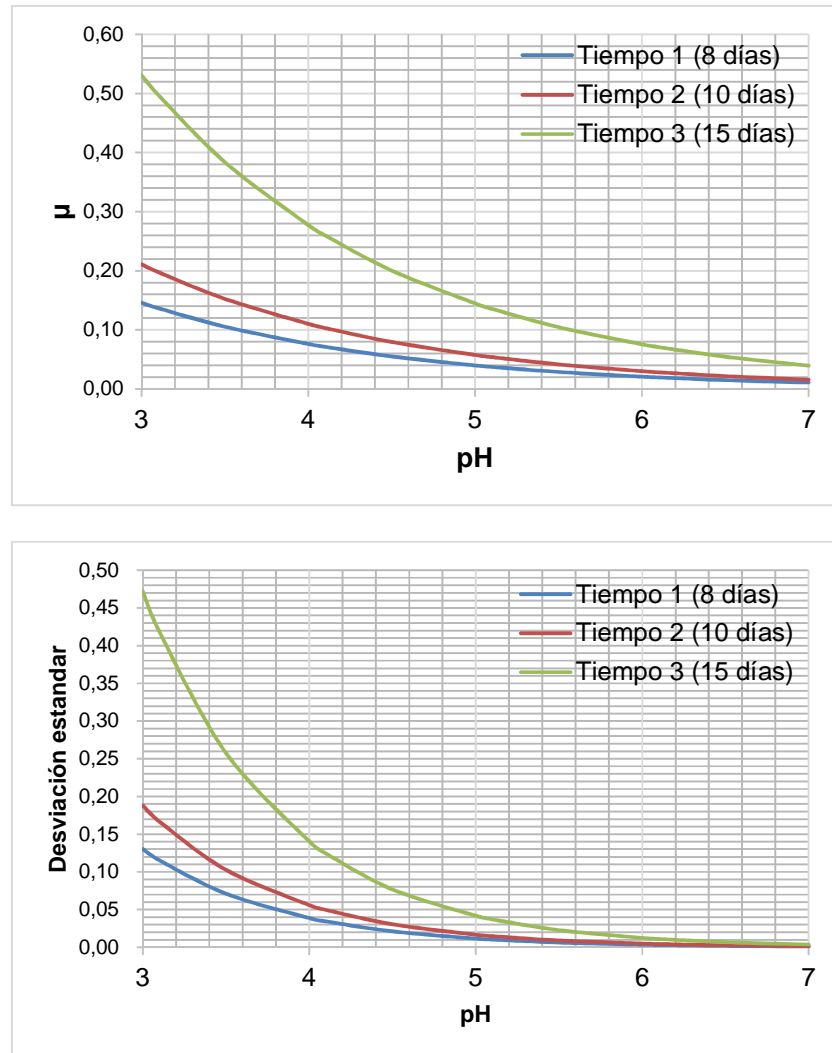
$$\mu = e^{-1.4528 - 0.6502 \text{ pH} + 0.1847 \text{ Tiempo}}$$

Ecuación 2

$$\sigma = e^{1.5799 - 0.5622 \text{ pH}}$$

De estas expresiones anteriores se pueden obtener las gráficas mostradas a continuación en la Figura 22.

Figura 22 . Comportamiento de la media para la producción de CB (Arriba) y de la desviación estándar (Abajo) respecto al pH y tiempo de cultivo



En el gráfico anterior se observa que la media para la producción de CB disminuye cuando aumenta el pH sin importar el tiempo de duración de la fermentación. Lo que concuerda con el análisis arrojado por StatGraphics Centurión XVI (ver Anexo 1), donde se presentó que a un pH alto la producción de celulosa bacteriana es la menor aun si se verifica en los mayores tiempos de cultivo, mientras que a pH bajos el tiempo tiene efectos positivos en la producción de celulosa bacteriana, estos resultados corroboran lo encontrado por Seto, Kojima, Tonouchi, Tsuchida, & Yoshinaga, (1997) quienes establecieron que una disminución en el pH del medio de cultivo tiene un efecto tanto en la producción de CB como en el

crecimiento celular y la intensidad de este efecto depende del tipo de cepa empleada. Para el caso de *Gluconacetobacter medellinensis* el efecto es positivo, es decir, que para éste a pH cercanos a 7.0 se disminuye la producción de CB como lo indica Castro y colaboradores quien afirma que el *Gluconacetobacter medellinensis* para su producción óptima de celulosa bacteriana debe manipularse en condiciones de pH 3.5 con medio sintético H-S (Castro, y otros, 2012). Además Zakaria & Nazeri, (2012), expresan que pH fuera del rango optimo resulta en una disminución de la producción.

3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA *Gluconacetobacter medellinensis*

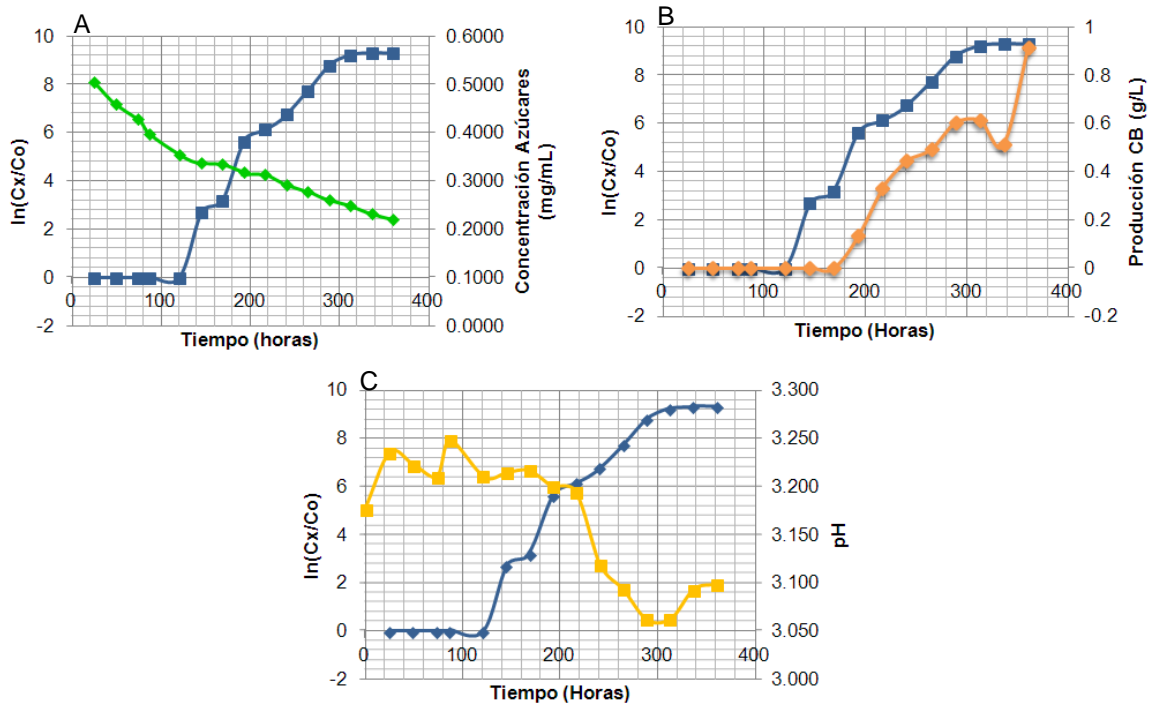
De acuerdo entonces con los análisis realizados en StatGraphics y mediante los modelos GAMLSS, que concuerdan con que existe mayor producción de CB a pH cercanos a 3 y periodos de fermentación de más 10 días, se seleccionaron como condiciones óptimas para la realización de la evaluación del comportamiento del *G. medellinensis* con respecto al tiempo (cinética), los valores presentados en la Tabla 26.

Tabla 26 . Condiciones óptimas seleccionada para cinética

Factor	Óptimo
pH	3.1
Tiempo (días)	15

Para la elaboración de la cinética para el *Gluconacetobacter medellinensis* se evaluó, el crecimiento microbiano por cuantificación indirecta (Chacón Garza, Villareal Sánchez, & Villareal López, 2000) mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) incluyendo los microorganismos suspendidos en el medio de cultivo y los atrapados en la membrana de celulosa, también se midió el consumo de azúcares reductores por DNS y la producción de CB por gravimetría como se explicó en el numeral 2, además de un seguimiento del comportamiento del pH. En la Figura 23 se observa el comportamiento del microorganismo a través del tiempo.

Figura 23 . Comportamiento cinético del *Gluconacetobacter medellinensis* durante 15 días de cultivo



A) Crecimiento microbiano (azul)-consumo de sustrato (verde), B) Crecimiento microbiano (azul)-producción de CB (naranja) y C) crecimiento microbiano (azul)-pH (amarillo)

Al observar el comportamiento de crecimiento del *Gluconobacter medellinensis* en la Figura 23a se observa la existencia de una fase de latencia prolongada probablemente ocasionada por el tiempo de criopreservación de la bacteria empleada como inóculo, dado que este proceso que emplea bajas temperaturas puede afectar la difusión y ósmosis a través de las membranas (Ávila-Portillo, y otros, 2006), incidiendo directamente sobre la velocidad de crecimiento celular (Sánchez Leal & Corrales Ramirez, 2005). Este evento está relacionado con la formación de cristales de hielo intracelulares durante el proceso de congelación, el flujo de agua fuera de la célula (deshidratación) durante el proceso de liofilización y el aumento de la concentración de solutos intracelulares, estos procesos de deshidratación y las altas concentraciones de los iones pueden causar daños a la célula en algunos casos (Acker & Mcganm, 2003), esto sin contar que después del

almacenamiento y descongelación algunas especies bacterianas pueden presentar problemas en cuanto a la viabilidad, estabilidad antigénica, molecular y propiedades bioquímicas, mostrando entonces que los periodos de almacenamiento largos reducen significativamente el porcentaje de bacterias viables después de la descongelación (aproximadamente el 60%) (Avila de Freitas, Silva Teixeira, Andrade Teles, Rosembli Martins, & Bezerra Junior, 2012) estos mismos autores también establecen que la tasa de supervivencia de las bacterias Gram positivas es generalmente mayor que las de las bacterias Gram negativas y el *Gluconacetobacter medellinensis* es Gram negativo.

Además de todos los daños fisiológicos por enfriamiento se debe tener en cuenta que aunque los crioprotectores son esenciales para la congelación, estas sustancias no permiten la supervivencia de todas las células, lo que puede explicarse por los efectos tóxicos que dependen principalmente de la concentración del crioprotector utilizado y el tiempo de exposición de la misma célula (Oliveira, 2003).

Este efecto de la criopreservación puede afectar el comportamiento del microorganismo a lo largo de todas las fases de crecimiento. Para este caso el tiempo de criopreservación fue de 8 meses y su almacenamiento fue a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lo cual también puede afectar la supervivencia de la cepa, pues la temperatura ideal para su preservación es de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ya que a temperaturas entre 0 y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se puede prevenir la recristalización intracelular del agua (García López, López-Coronado, López-Ocaña, & Uruburu Fernandez, 2012).

La fase exponencial del microorganismo, inició a las 120 horas y su fase estacionaria a las 288 horas, mostrando en la fase exponencial, consumo de sustrato, producción de CB y disminución de pH como se explica.

El consumo de sustrato (Figura 23A) presentó una pendiente pronunciada durante la fase de latencia, mientras que en la fase exponencial, se muestra un consumo constante, en la fase de latencia se consumieron aproximadamente 0.1512 mg/mL de azúcares reductores mientras en la fase exponencial se consumió alrededor de 0.0775 mg/mL y en su fase estacionaria 0.029 mg/mL .

El mayor consumo de sustrato durante la fase de latencia ha sido explicado por algunos autores quienes han denominado este proceso, estado .transitorio no cultivable, en el cual se presume que el microorganismo utiliza una estrategia especial de supervivencia (consumo de sustrato) en la cual suceden cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, por activación de reguladores

transcripcionales o postranscripcionales. La finalización del estado se ha denominado resucitación (Mukamolova, Kprelyants, Douglas, & Young, 2003). De allí que la pendiente que muestra el consumo de sustrato (azúcares reductores glucosa y fructosa) sea más pronunciada en la fase de latencia que en las demás fases.

El contenido de azúcares reductores del medio empleado (jugo de banano) estuvo representado principalmente por fructosa y glucosa con 45.534 y 44.221 mg de azúcar/g de fruta respectivamente; que son los azúcares con ingreso directo al metabolismo en particular para el género *Gluconacetobacter*, estos dos azúcares son los más empleados como lo sugiere Hungund y sus colaboradores (Hungund, y otros, 2013) quien afirma que estos microorganismos utilizan glucosa y fructosa para la producción de CB dando un rendimiento máximo con fructosa.

Dicho rendimiento puede explicarse ya que en el metabolismo de este género, la glucosa, es transportada por una fosfohexocinasa (HPK) y la fructosa es incorporada a la célula mediante un complejo enzimático fosfo transferasa (PTS, por sus siglas en inglés) que enlaza la fructosa y cruza la membrana celular (Velasco Bedrán, 2007). La fructosa se convierte a glucosa 6 –fosfato por medio de la gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato o ciclo de los ácidos tricarbónicos, de tal manera que ésta es isomerizada por la fosfoglucomutasa hasta glucosa 1-fosfato que se convierte a UDP- glucosa, por la UDP-glucosa fosforilasa, quien va a ser la precursora de la polimerización de la celulosa (Jaramillo L, Perna M, Benito-Revollo, Arrieta M, & Escamilla M, 2013).

La producción de CB (Figura 23B) muestra que su punto máximo de producción fue de 0.9135 g/L en el día 15, el único dato conocido para esta especie, fue reportado por (Castro, y otros, 2012) quien establece que para *G. medellinensis* la producción máxima es 4.5 g/L en 8 días de fermentación en medio sintético H-S. La baja producción de CB para esta investigación puede ser justificada por la criopreservación como se explicó anteriormente, también se demuestra la afectación del microorganismo ya que existe una gran diferencia los ensayos preliminares, los cuales se realizaron con cepa sin criopreservar, que muestran valores promedio para el banano 1.4395 ± 0.1131 g/L a partir de allí, se criopreservó y su disminución en la producción al pasar del tiempo fue evidente.

El inicio de la producción de CB coincidió con la fase exponencial de crecimiento, aproximadamente a los cinco días de cultivo; Conducta que es similar con (Lestari, Elfrida, Suryani, & Suryadi, 2014) quien expresa que el rendimiento de CB se

incrementó en paralelo con la biomasa celular. Aun así la CB tiene un comportamiento de metabolito secundario (Skinner & Cannon, 2000), ya que cumple una función protectora, actúa como barrera física que protege a las bacterias de la radiación ultra violeta, también permite aumentar la colonización del sustrato y previene la deshidratación del medio (Velasco Bedrán, 2007).

El pH de la fermentación muestra que a partir del día 5 (inicio de la fase exponencial) comienza su descenso, en general un descenso en el pH del medio de cultivo es muy influyente en el crecimiento celular y en la producción de celulosa (Lestari, Elfrida, Suryani, & Suryadi, 2014). Esta disminución es ocasionada por el aumento de la concentración de ácido total, representada por el ácido acético y ácido fosfogluónico, principalmente.

El ácido acético es un subproducto de la celulosa que influye en la disminución del pH en el medio de cultivo, en investigaciones realizadas por Sasithorn con *G. xylinum*, el proceso de fermentación inició en un pH de 5 y descendió aproximadamente a 3 (Sasithorn, 2008). El descenso que tuvo el pH para esta investigación con *Gluconacetobacter medellinensis* fue de 3.201 a 3.099. La producción de dicho ácido también puede explicarse a partir del metabolismo respiratorio del microorganismo, lo que genera diferentes rutas metabólicas como el catabolismo del etanol (en el proceso de maduración de las frutas la enzima alcohol deshidrogenasa(ADH) cataliza la producción de etanol y esta aumenta progresivamente a medida que avanza la maduración (Ansejo Vera, Morales de los Rios, Sainz Urruela, & Tapia Hernandez, 2000)), que es transportado al interior de la célula mediante su oxidación, que lo convierte en acetaldehído que al oxidarse nuevamente, forma ácido acético en el periplasma y este se libera al medio. En el catabolismo de la glucosa, el microorganismo puede seguir la ruta de las pentosas fosfato, que implica la oxidación de glucosa a ácido fosfo-glucónico que es excretado al medio de cultivo (Velasco Bedrán, 2007), contribuyendo a la disminución del pH en medios de cultivo con glucosa como fuente de carbono (Keshk & Sameshima, 2005).

Para establecer la velocidad máxima de crecimiento del *Gluconacetobacter medellinensis*, la curva de crecimiento se ajustó a una función sigmoideal mediante un software online para el ajuste de modelos (ZunZun.com Online Curve Fitting and Surface Fitting Web Site, 2014), con el objetivo de encontrar una descripción matemática que explicara el comportamiento del microorganismo en el medio de cultivo empleado, el modelo utilizado fue el de Gompertz A (Ecuación 3).

Ecuación 3

$$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$$

En este caso y corresponde a $\ln(Cx/Co)$ y x al tiempo de cultivo expresado en horas. Los coeficientes ajustados fueron:

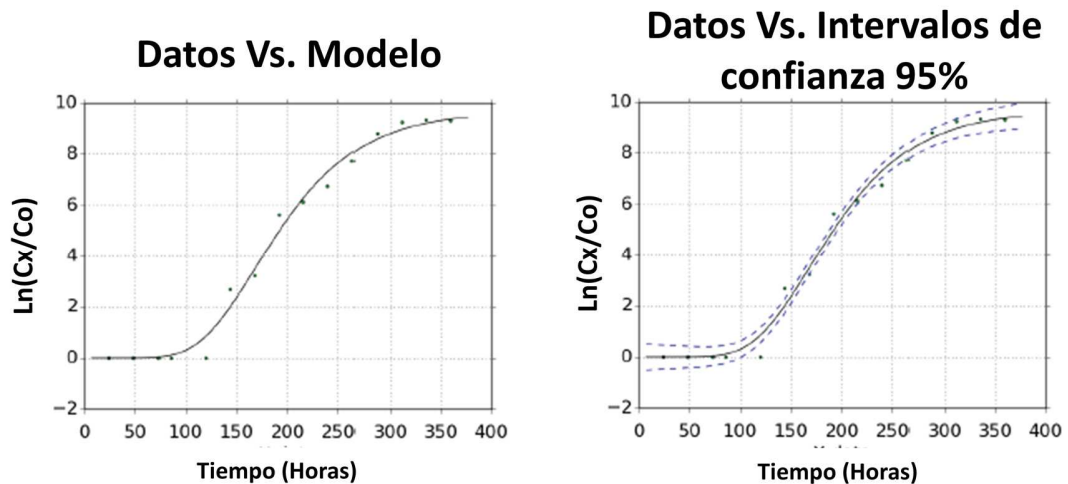
$$a = 9.6832$$

$$b = 3.0418$$

$$c = 1.7966E-02$$

Con un R-cuadrado de 0.9892%, un R-cuadrado ajustado de: 0.9875% y 12 grados de libertad. Donde se ajustan al modelo con un 95% de confianza. Este R-cuadrado indica un buen ajuste de los datos, ya que explica que los puntos (datos) están muy cerca a la línea de regresión, el ideal de R-cuadrado para este caso siempre será el que se acerque a 1. En la Figura 24 se presentan los gráficos de ajuste del modelo a los datos experimentales y el intervalo de confianza para los resultados, obtenidos mediante el software online para el ajuste de modelos ZunZun.

Figura 24 . Ajuste del Modelo de Gompertz A al crecimiento de *G. medellinensis*



Para explicar el modelo se empleó la parametrización propuesta por (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & Van't Riet, 1990) tal como se presenta en la Tabla 27.

Tabla 27 . Modelo de Gompertz parametrizado

Modelo	Ecuación	Ecuación modificada
Gompertz	$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$	$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m * e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$ Con: $y = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right); \lambda = \frac{b-1}{c}; \mu_{max} = \frac{a*c}{e^1};$ $A = \ln\left(\frac{N^\infty}{N_0}\right)$

Donde y representa la cantidad de UFC normalizada respecto al valor de UFC presentes en el tiempo cero, λ representa el tiempo de latencia, μ_{max} representa la velocidad máxima de crecimiento, A es el valor de la máxima concentración de la población, es decir durante de la fase estacionaria, respecto al valor en el tiempo cero. Adicionalmente se determinó el tiempo de duplicación (td) tal como se muestra en la Ecuación 4.

Ecuación 4

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$$

Para esta investigación, los resultados arrojados fueron: La fase de latencia (α) fue de 113.3 h, la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) fue de 0.0640 h^{-1} , la máxima población, durante la fase estacionaria fue de 6'500.000 UFC y el tiempo de duplicación fue de 10.83 h

El valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenido, se puede comparar con (Lestari, Elfrida, Suryani, & Suryadi, 2014) quienes calcularon un valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.0132 h^{-1} para *G. xylinum* utilizando como sustrato agua de coco a un pH de 4.0 fermentación estática por 12 días. Concluyendo que la velocidad de crecimiento del *Gluconacetobacter medellinensis* a una temperatura de 28°C en un medio complejo (jugo de banano) fue mayor. Lo que concuerda con el análisis presentado de la Figura 23.

Otra manera de evaluar la cinética del microorganismo es a través del rendimiento de producción (Ecuación 5)

Ecuación 5

$$Y_{ps} = \frac{g \text{ producto obtenido}}{g \text{ de sustrato consumido}}$$

El rendimiento producto obtenido- sustrato consumido fue de: 3.2072 g de celulosa seca/g de azúcares reductores. Estos comparables con estudios realizados por (Lestari, Elfrida, Suryani, & Suryadi, 2014) utilizando como sustrato agua de coco, quien obtuvo un rendimiento de producto/sustrato de 3.612 g de CB/ g de glucosa o fructosa

Este estudio mostró que la producción de celulosa bacteriana derivada del medio de cultivo realizado con banano, se puede convertir de manera eficiente en el medio predilecto de cultivo para el *Gluconacetobacter medellinensis*, debido a que presenta las condiciones aptas para el crecimiento del microorganismo, y abarata los costos de producción de la celulosa bacteriana, facilitando así, nuevas investigaciones para la aplicación de celulosa bacteriana en campos tales como la industria papelera, la industria textil, industria cosmética y biomédica. Es importante también buscar de manera diferente la preservación de la célula (que no sea criopreservación pues se demostró en esta investigación que existió un

daño irreparable en la bacteria), ya que sus características metabólicas, la hacen única.

4 CONCLUSIONES

- Considerando los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas se puede concluir que la fruta de descarte sí es una posible fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo y la producción de CB.
- De las 5 frutas de descarte evaluadas, la que presentó mejores condiciones para el crecimiento del *Gluconacetobacter medellinensis*, fue el banano con la mayor cantidad de fructosa y glucosa con 45.534 y 44.221 mg de azúcar/g de fruta respectivamente, además de la mayor cantidad de micronutrientes.
- Al establecer un inóculo estándar para la fermentación, se aseguró la misma cantidad de microorganismos para todas las fermentaciones realizadas.
- Las concentraciones de fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) utilizadas no tuvieron un efecto significativo en la producción de CB, pero se debe tener en cuenta para el crecimiento del microorganismo.
- El establecimiento de la investigación a partir de diseño de experimentos facilitó la observación del comportamiento de los residuos evaluados, además de establecer que la producción de CB tiene una gran variabilidad experimental, lo que establece que su producción no tenga una distribución normal.
- Las mejores condiciones de pH para el *Gluconacetobacter medellinensis* son valores cercanos a 3.0, como lo demostró el efecto positivo del pH bajo en la producción de celulosa bacteriana mostrado por StatGraphics centurión XVI y los modelos GAMLSS.
- El tiempo tiene un efecto significativo en los procesos de fermentación, ya que entre mayor es el tiempo, mayor es la producción de CB, alcanzando su máximo de producción a los 15 días.
- La cepa de *Gluconacetobacter medellinensis*, no es estable durante largos tiempos de criopreservación.
- El establecimiento de un medio de cultivo a partir de residuos agroindustriales, contribuye con la disminución de los residuos ambientales.

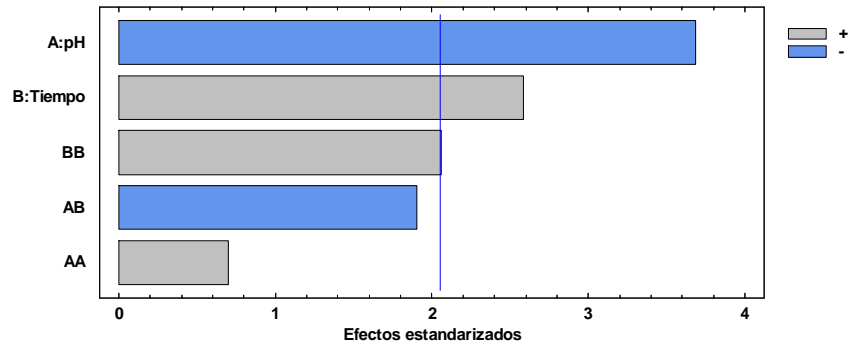
5 RECOMENDACIONES

- Evaluar el tiempo de criopreservación máximo para el *Gluconacetobacter medellinensis* y el efecto de diferentes agentes criopreservantes sobre la viabilidad de la cepa.
- Efectuar las fermentaciones con dosis de antimicótico para evitar contaminaciones por el pH usado y la fuente de carbono utilizada.
- Evaluar el efecto del antimicótico frente a la producción de celulosa bacteriana y las propiedades mecánicas de la misma
- Estudiar las mismas condiciones operacionales establecidas en esta investigación, incluyendo coadyudantes como etanol para evaluar su efecto en la producción de CB.
- Evaluar procesos de fermentación con estas mismas características operacionales en condiciones de agitación y aireación para evaluar la producción de CB.
- Evaluar el control del pH del cultivo con un buffer que muestre capacidad amortiguadora durante todo el proceso.
- Se debe considerar realizar estudios con el medio de cultivo ya optimizado por esta investigación en reactores con mayor área, para que no se afecte la producción por la relación área-superficie.
- Comparar las propiedades físicas y mecánicas de la celulosa producida en las condiciones establecidas por esta investigación con una originada en medio sintético.
- Evaluar en estudios posteriores estrategias para la disminución de la variabilidad de los datos a las condiciones de mayor producción de celulosa bacteriana.

- Evaluar en los costos de producción, con medio de cultivo complejo (jugo de banano) y medio sintético.

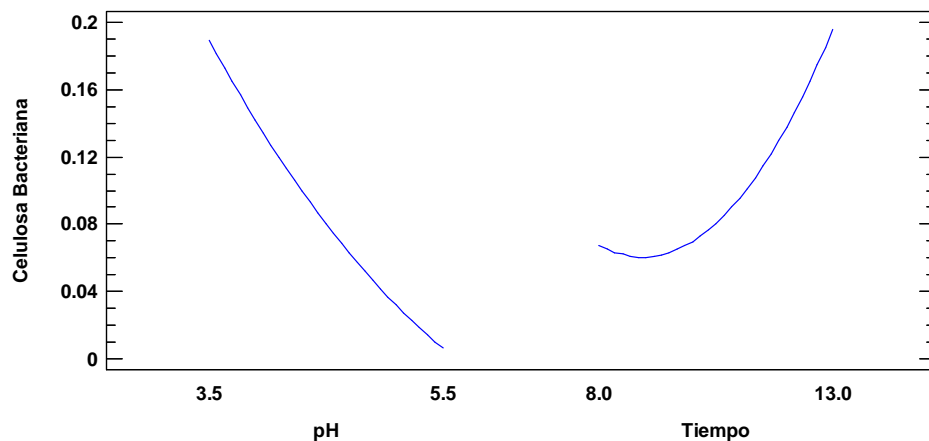
ANEXO A

Figura A1. Gráfica de Pareto del diseño de superficie de respuesta para la producción de CB en un medio de cultivo con jugo de banano.



En la gráfica se observa que el pH tiene un efecto negativo, mientras que el tiempo y la interacción tiempo-tiempo muestran efecto positivo. En la Figura A2 se observan las interacciones principales y sus efectos.

Figura A2. Interacciones principales del diseño de superficie de respuesta para la producción de CB en un medio de cultivo con jugo de banano.



En la gráfica se muestra que el pH tiene un efecto negativo en la producción de celulosa bacteriana en 0.103 gramos cada vez que su valor aumenta, mientras

que el tiempo, impacta positivamente la producción de CB en 0.0005 gramos produciendo su máximo valor a los 13 días de fermentación.

Figura A3. Gráfico de Interacción del diseño de superficie de respuesta para la producción de CB en un medio de cultivo con jugo de banano.

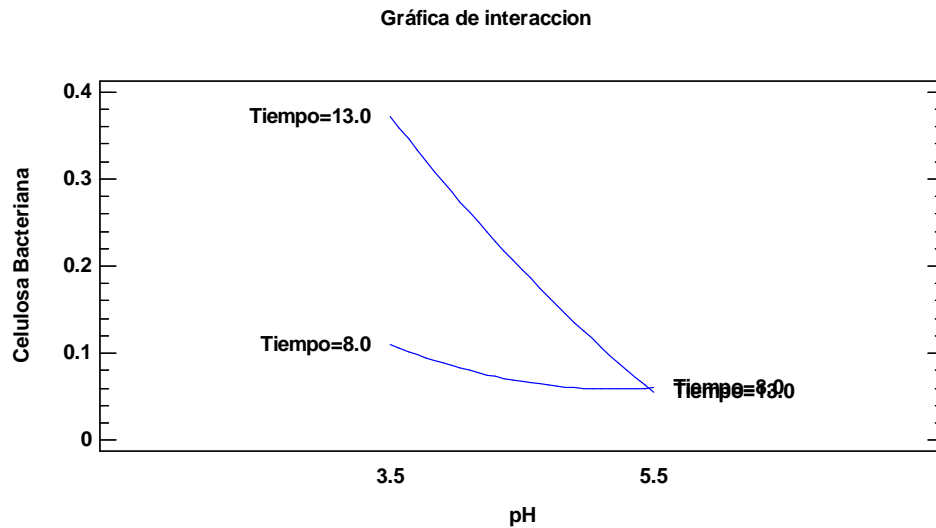


Tabla 28. Condición óptima del diseño de superficie de respuesta para la producción de CB en un medio de cultivo con jugo de banano.

Valor óptimo= 0.5708 g de producción de CB en peso seco

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	3.0857	5.9142	3.0857
Tiempo (días)	6.9644	14.0355	14.0355

La condición óptima para la producción de celulosa bacteriana fue el extremo inferior del pH (3.1) y extremo superior del tiempo (14), la elegida fue dada según el modelo utilizado por StatGraphics centurión XVI

Para un pH de 3.0 el estimado promedio de producción se determinó como 0.7178 g con intervalos de 0.4331 a 1.0025 g de CB seca y con un pH de 3.5 el estimado de producción será de 0.5904 g con unos intervalos de 0.3681 a 0.8126 g de CB seca.

6 BIBLIOGRAFÍA

- (Ica), I. C. (22 De Mayo De 2013). *Ica*. Obtenido De [Http://Www.Ica.Gov.Co/Noticias/Agricola/2013/El-Ica-Le-Recuerda-A-Empresas,-Productores,-Y-Duen.Aspx](http://www.ica.gov.co/noticias/agricola/2013/el-ica-le-recuerda-a-empresas-productores-y-duen.aspx)
- A.O.A.C. (2005). *Official Methods Of Analysis. 18 Th*, 10. Washington, U.S.A: Horwitz W.
- Ab Halim, N. I. (Abril De 2010). *Synthesis Of Bacterial Cellulose By Acetobacter Xylinum Sp.Using Pineapple Pith For Biocomposite Application. Thesis*. Malaysia.
- Acker, J., & Mcganm, L. (2003). ¿Protective Effect Of Intracellular Ice During Freezing? *Cryobiol*, 197-202.
- Adams, M., & Moss, M. (1997). *Microbiología De Los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Almeida Gomes, F. P. (2011). *Biossíntese De Celulose Bacteriana A Partir De Resíduos Industriais. Tese*. Aveiro.
- Almeida, D. M., Wosiacki, G., Junior, G. D., Madalozzo, E. S., & Zanlorenzi, M. M. (2008). Crescimento Do *Acetobacter Xylinum* (Atcc 23769) E A Produção De Celulose Bacteriana. *Revista Brasileira Detecnologia Agroindustrial*, 2(1), 95-103.
- Alvarado, J. D. (2000). Determinacion De La Madurez De Frutas Por Medida De La Densidad Relativa Del Jugo. *Biologicas. Universidad Tecnica De Ambato* , 1.8.
- Ansejo Vera, J., Morales De Los Rios, L., Sainz Urruela, R., & Tapia Hernandez, L. (2000). Producción De Alcoholes Volátiles Durante Maduración De Los Frutos. Madrid, España.
- Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación De Aislados Nativos De La Bacteria Ruminal *Fibrobacter Succinogenes*. *Revista Corpoica*, 5(1), 60-63.

- Asociación Hortifrutícola De Colombia. Asohofrucol. (2013). *Modelo Tecnológico Para El Cultivo De Mango En El Valle Del Alto Magdalena En El Departamento Del Tolima*. Bogota Dc: Prensa-Asohofrucol.
- Asohofrucol; Mavdt; Corpoica; Ideam. (2009). *Guía Ambiental Hortofrutícola De Colombia*. Bogotá Dc: Nuevas Edicione.
- Avila De Freitas, T. D., Silva Teixeira, M. F., Andrade Teles, C. H., Rosembli Martins, G., & Bezerra Junior, R. Q. (2012). Principios Básicos Da Criomicrobiologia: Enfoque Nos Tipos De Micro-Organismos E Nos Principais Agentes Crioprotectores. *Acta Veterinaria Brasilica*, 6(2), 80-93.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J., López, C., Leon, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. T. (2006). Fundamentos De Criopreservación. *Revista Colombiana De Obstetricia Y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Benvenuti, M. E., & Burgess, J. A. (2012). Monitoring Sugar Content Of Fruit Juice Using Accqity Uplc-Class And Beh Amide Column Chemistry With Evaporative Light Scattering Detection (Elsd). *The Science Of What'S Possible*, 1-6.
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., & Kalinowska, H. (2005). Bacterial Cellulose. *Biopolymers Online*.
- Brock, P. J., Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2004). *Biología De Los Microorganismos*. Madrid (España): Pearson – Prentice Hall.
- Caicedo, L. A., Franca, F., & López, L. (2001). Factores Para El Escalado Del Proceso De Producción De Celulosa Por Fermentación Estática. *Revista Colombiana De Química*, 30(2), 155-162.
- Cardona, J. (2002). Toneladas Diarias De Basura Buscan Acomodarse. *Rev. Amb. El Reto*, 42, 20-27.
- Carreira, P., Mendes, J. A., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Neto, C. P. (2011). Utilization Of Residues From Agro-Forest Industries In The Production Of High Value Bacterial Cellulose. *Bioresource Technology*(102), 7354-7360.
- Carreño Pineda, L. D. (2011). Efecto De Las Condiciones De Cultivo Y Purificación Sobre Las Propiedades Fisicoquímicas Y De Transporte En Membranas De

- Celulosa Bacteriana. *Tesis*, 1-68. Santa Fe De Bogotá, Cundinamarca, Colombia.
- Carreño, P. L., Caicedo, M. L., & Martínez, R. C. (2012). Técnicas De Fermentación Y Aplicaciones De La Celulosa Bacteriana: Una Revisión. *Ingeniería Y Ciencia* , 307-335 .
- Castro Herazo, C. I. (Abril De 2012). Desarrollo De Materiales Compuestos Auto-Ensamblados De Celulosa Bacteriana/Alcohol Polivinílico Durante La Biosíntesis De La Celulosa Bacteriana. *Tesis*. Medellín, Colombia.
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J.-L., Gloria Caro, O. J., Mondragon, I., & Gañan, P. (Febrero De 2012). Bacterial Cellulose Produced By A New Acid-Resistant Strain Of Gluconobacter Genus. *Carbohydrate Polymers*, 89, 1033-1037.
- Cavka, A., Guo, X., Tang, S.-J., Winestrand, S., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2013). Production Of Bacterial Cellulose And Enzyme From Waste Fiber Sludge. *Biotechnology For Biofuels*, 1-10 .
- Chacón Garza, L. E., Villareal Sánchez, J. A., & Villareal López, J. L. (2000). Comparación De Dos Métodos De Numero Mas Probable (Nmp) Con La Cuenta Viable En Placa(Cvp) Y Evaluación Del Agua De La Ciudad De Saltillo, Coahuila. *Laboratorio De Microbiología De La Facultad De Ciencias Químicas De La Ua*, 1-11.
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable Polymers. *Progress In Polymer Science*, 23, 1273.
- Chao, Y. P., Ishida, T., Sugano, T., & Shoda, M. (2000). Bacterial Cellulose Production By Acetobacter Xylinum In A 50-L Internal-Loop Airlift Reactor. *Biotechnology And Bioengineering* , 345-352.
- 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.
- Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria (Corpoica); Programa De Transferencia De Tecnología Agropecuaria (Pronatta). (Diciembre De

- 2002). Frutales Tropicales Potenciales Para El Piedemonte Llanero . Villavicencio , Colombia .
- Cribari Neto, F., & Ospina Martinez, R. (2010). Engenharia De Avaliacoes Com Base Em Modelos Gamlss. Recife, Pernambuco, Brasil.
- Dadzie, B. K., & Orchard, J. E. (1997). Evaluación Rutinaria Postcosecha De Híbridos De Banano Y Plátano: Criterios Y Métodos. . *Red Internacional Para El Mejoramiento Del Banano Y El Plátano (Inibap)*, 63.
- Di Zakaria, J., & Nazeri, M. A. (2012). Optimization Of Bacterial Cellulose Production From Pineapple Waste: Effect Of Temperature, Ph And Concentration. *Encon 2012, 5 Th Engineering Conference "Engineering Towards Change-Empowering Green Solutions"*, 1-7.
- Donini, I. A., B De Salvi, D. T., F. F., L. W., Barud, H. S., Marchetto, R., . . . L Ribeiro, S. J. (2010). Bioproducción E Recientes Avances Na Producción De Celulosa Bacteriana. *Eclética Química*, 35(4), 165-178.
- Dudman, W. (1959). Cellulose Production By *Acetobacter Acetigenum* And Other *Acetobacter* Spp. *Journal Of General Microbiology*, 21(2), 312-326.
- Duvey, V., Saxena, C., Singh, L., Ramana, K., & Chauchan, R. (2002). Pervaporation Of Binary Water-Ethanol Mixtures Through Bacterial Cellulose Membrane. *Separation And Purification Technology*, 27(3), 163-171.
- Expofrut Argentina. (2013). *Información Nutricional*. Obtenido De [Www.Expofrut.Com.Ar](http://www.expofrut.com.ar)
- Fast Fruit . (2012). *Pulpa De Frutas Con Vitamina C*. Obtenido De [Http://Www.Fastfruit.Estimulaciontemprana.Org/Productos.Htm](http://www.fastfruit.estimulaciontemprana.org/productos.htm)
- Flavor Alchemy . (Enero De 2010). *The Brix Of Sweet Fruit* . Obtenido De [Http://Flavoralchemy.Squarespace.Com/Journal/The-Brix-Of-Sweet-Fruit.Html](http://flavoralchemy.squarespace.com/journal/the-brix-of-sweet-fruit.html)
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations . (2014). *Food And Agriculture Organization Of The United Nations*. Obtenido De [Http://Www.Fao.Org/Home/En/](http://www.fao.org/home/en/)

- Fukaya, M., Park, Y., & Toda, K. (1992). Improvement Of Acetic Acid Fermentation By Molecular Breeding And Process Development . *Journal Of Applied Bacteriology*, 73, 447-454.
- Fundacion Española De La Nutrición (Fen). (2010). Valor Nutricional De Las Naranjas Y Clementinas. España.
- Gallego Úbeda, A. (Diciembre De 2012). Análisis Del Perfil De Azúcares En La Autenticación De Zumos De Frutas. *Trabajo De Grado*. Cartagena , Colombia .
- García López, M. D., López-Coronado, J. M., López-Ocaña, L., & Uruburu Fernandez, F. (2012). Preservation Of Microbial Strains In The Wine Industry. *Coleccion Española De Cultivos (Cect), Universitat De València*, 303-318.
- Gardner, K. H., & Blackwell, J. (1974). The Structure Of Native Cellulose. *Biopolymers*, 13, 1975-2001.
- Ghosh, R., Chakraborty, G., & Raychaudhuri. (2012). Study On Fermentation Conditions Of Palm Juice Vinegar By Response Surface Methodology And Development Of A Kinetic Model. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, 29(3), 461-472.
- Giraldo, C. A. (2012). La Celulosa Bacteriana: Un Mundo De Nanoposibilidades. *Revista Universitaria Científica* , 16-19.
- Goelzera, F., Faria-Tischer, P., Victorino, J., Sierakowski, M.-R., & C.A.Tisher. (2008). Production And Characterization Of Nanospheres Of Bacterial Cellulose From *Acetobacter Xylinum* From Processed Rice Bark. *Materials Science And Engineering: C*, 546-551.
- Gomes, F. P., Silva, N., Eliane, T., Serafim, L., Duarte, M. F., Silvestre, A., . . . Freire, C. (2013). Production Of Bacterial Cellulose By *Gluconacetobacter Sacchari* Using Dry Olive Mill Residue. *Biomass Y Bioenergy*, 55, 205-211.
- Hans, B., & Rasmuson, A. (1995). Moisture Equilibrium Of Wood And Bark Chips In Superheated Steam. *Fuel*, 74(12), 1887-1890.

- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis Of Cellulose By *Acetobacter Xylinum*. 2. Preparation Of Freeze-Dried Cells Capable Of Polymerizing Glucose To Cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345-352.
- Hong, D. (1994). Cellulose: A Random Walk Along Its Historical Path. *Cellulose*, 1, 1-25.
- Hong, F., & Qiu, K. (2008). 'An Alternative Carbon Source From Konjac Powder For Enhancing Production Of Bacterial Cellulose In Static Cultures By A Model Strain *Acetobacter Aceti* Subsp. *Xylinus* Atcc 23770. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 545-549.
- Hornung, M. (Junio De 2010). Optimising The Production Of Bacterial Cellulose In Surface Culture. *Tesis* . Morschen , Alemania .
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S., Prabhu, V., & Sg, G. (2013). Production Of Bacterial Cellulose From *Gluconacetobacter Persimmonis* Gh-2 Using Dual And Cheaper Carbon Sources. *Microbial & Biochemical Technology*, 5(2), 31-33.
- Icbf, Profamilia, Ins, Universidad De Antioquia, Organizacion Panamericana De La Salud. (2006). Encuesta Nacional De La Situación Nutricional En Colombia. Bogotá, Colombia .
- Ikegwu, O., & Ekwu, F. (2009). Thermal And Physical Properties Of Some Tropical Fruits And Their Juices Nigeria. *Journal Of Food Technology*, 7(2), 38-42.
- Ishihara, M., Matsunage, M., Hayashi, N., & Tisler, V. (2002). Utilization Of D-Xylose As Carbon Source For Production. *Enzyme And Microbial Technology*, 986-991.
- Jaramillo L, R., Perna M, O., Benito-Revollo, A., Arrieta M, C., & Escamilla M, E. (2013). Efecto De Diferentes Concentraciones De Fructosa Sobre La Produccion De Celulosa Bacteriana En Cultivo Estático. *Rev. Colombiana Cienc. Anim*, 5(1), 116-130.
- Jaramillo, L. R., Perna, M. O., Benito Revollo, P., Adrian Arrieta, M., Escamilla, C., & Edgardo, M. (2013). Efecto De Diferentes Concentraciones De Fructosa Sobre La Produccion De Celulosa Bacteriana En Cultivos Estático. *Rev. Colombiana Ciencia*, 116-130.

- Jonas, R., & Farah, L. (1998). Production And Application Of Microbial Cellulose. *Polym. Degrad. Stab*, 101-106.
- Junaidi, Z., & Muhammadazlan, N. (2012). Optimization Of Bacterial Cellulose Production From Pineapple Waste: Effect Of Temperature, Ph And Concentration. *Encon 2012, Engineering Conference, "Engineering Towards Change-Empowering Green*, 1-7.
- Keshk, S. M., & Sameshima, K. (2005). Evaluation Of Different Carbon Sources For Bacterial Cellulose. *African Journal Of Biotechnology*, 4(6), 478-482.
- Keshk, S. M., Razek, T. M., & Sameshima, K. (September De 2006). Bacterial Cellulose Production From Beet Molasses. *African Journal Of Biotechnology*, 5(17), 1519-1523.
- Krystynowicz, A., & Bielecki, S. (2000). Application Of Bacterial Cellulose For Clarification Of Fruit Juices. *Progress In Biotechnology*, 17, 323-327.
- Kurosomi, A., Sasaki, C., Yamashita, Y., & Nakanura, Y. (2009). Utilization Of Various Fruit Juices As Carbon Source For Production Of Bacterial Cellulose By *Acetobacter Xylinum* Nbrc 13693. *Carbohydrate Polymers*, 76, 333-335.
- Leon M, G. A., Arango W, L. V., & Orduz R, J. O. (2009). Evaluación De Variedades De Naranjas Para La Altillanura Colombiana. *Avances De Investigación*. 1-16. Villavicencio, Colombia: Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural; Asohorfrucol; Corpoica.
- Lestari, P., Elfrida, N., Suryani, A., & Suryadi, Y. (2014). Study On The Production Of Bacterial Cellulose From *Acetobacter Xylinum* Using Agro-Waste. *Jordan Journal Of Biological Sciences*, 75-80.
- Lin, J. H., Kuo, J. C., Lin, Y. J., Chen, T. Y., & Sung, W. P. (2010). Production Of Bacterial Celullose By *Gluconacetobacter Xylinus* Using Taguchi Methods. *Applied Mechanics And Materials*, 44-47, 605-609.
- Martins, I. (2009). New Biocomposites Based On Thermoplastic Starch And Bacterial Cellulose. *Composites Science And Technology*, 69, 2163-2168.

- Medina B, M. L., & Pagano, F. (2003). Caracterización De La Pulpa De Guayaba (Psidium Guajava) Tipo Criolla Roja . *Revista De La Facultad De Agronomía*, 72-86.
- Mejía Mesa, G. A., & Gómez López, J. S. (2000). Los Desechos Generados Por La Industria Bananera Colombiana. *Seminario Internacional: Gestión Integral De Residuos Sólidos Y Peligrosos, Siglo Xxi*, 1-9.
- Mikkelsen, D., Flanagan, B., Dykes, G., & Gidley, M. (2009). Influence Of Different Carbon Sources On Bacterial Cellulose Production By Gluconacetobacter Xylinus Strain Atcc 53524. *Journal Of Applied Microbiology*, 107, 576-583.
- Millán Cardona, L. D., & Ciro Velásquez, H. J. (2010). *Caracterización Mecánica Y Físico-Química Del Banano Tipo Exportación (Cavendish Valery)*. Obtenido De [Http://Repository.Lasallista.Edu.Co/Dspace/Bitstream/10567/136/1/10.%20163-192.Pdf](http://Repository.Lasallista.Edu.Co/Dspace/Bitstream/10567/136/1/10.%20163-192.Pdf)
- Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural; Fondo Para El Financiamiento Del Sector Agropecuario. (2013). *Fondo Para El Financiamiento Del Sector Agropecuario (Finagro)*, 1-50. Bogotá Dc.
- Ministerio De Salud Y Protección Social- Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura Fao. (Marzo De 2013). Perfil Nacional De Consumo De Frutas Y Verduras. 1-264. Bogotá Dc, Colombia.
- Ministerio De Agricultura Y Desarrollo Rural (Madr). (2008). Anuario De Frutas Y Hortalizas De Colombia. Bogotá D.C.
- Mohamed, F. (2010). Synthesis Of Bacterial Cellulose By Acetobacter Xylinum Sp. Using Watermelon Rind Waste For Biocomposite Application. *Universiti Malaysia Pahang*, 1-26.
- Moldes, A. B., Cruz, J. M., Dominguez, J. M., & Parajó, J. (2002). Production Of A Cellulosic Substrate Susceptible To Enzymatic Hydrolysis From Prehydrolyzed Barley Husks. *Agr. Food Sci. Finland*, 11(1), 51-58.
- Moosavi-Nasab, M., & Yousefi, A. (April De 2011). Biotechnological Production Of Cellulose By Gluconobacter Xylinum From Agricultural Waste. *Iranian Journal Of Biotechnology*, 9(2), 94-101.

- Moretti Vieira, D. C. (2013). Producao De Biofilme (Membrana De Biocelulose) Por Gluconobacter Xylinus Em Meio De Resíduos De Frutas E Folhas De Chá Verde. Tese. Sao Paulo.
- Mukamolova, G., Kprelyants, A., Douglas, B., & Young, M. (2003). ¿Adoption Of The Transiently Non-Culturable State A Bacterial Survival Strategy? *Advances In Applied Microbiology*, 47, 65-129.
- Nieto, F. (2000). Evaluación De Un Agente Oxidante Atmosférico Sobre La Perdida Fisiológica De Peso En Poscosecha De Papaya, Chicozapote, Jitomate Y Guayaba. *Ingenieria De Alimentos* , 79-87.
- Nimeskerm, L., Ávila, H. M., Sundberg, J., Gatenholm, P., Müller, R., & Stok, K. S. (2013). Mechanical Evaluation Of Bacterial Nanocellulose As An Implant Material For Ear Cartilage Replacement. *Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials*, 22, 12-21.
- Nivia, A., Castro, H., Parada, F., Rodriguez, I., & Patricia, R. (2007). Aprovechamiento Integral De La Guayaba (Psidium Guajava L): Obtención De Extractos A Partir De Semillas Utilizando Como Solvente Co2 Supercrítico. *Scientia Et Technica*(33), 78-82.
- Oliveira, E. (2003). Efeito De Diferentes Diluidores Sobre A Congelação Do Sêmen Canino. *Mestrado Em Medicina Veterinária, Faculdade De Medicina Veterinária, Universidade Federal De Minas Gerais*. Belo Horizonte , Brasil .
- Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentacion (Fao). (2000). Manual De Manejo Postcosecha De Frutas Tropicales. *Manual*. Roma , Italia .
- Organizacion De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentacion (Fao). (2004). Conservación De Frutas Y Hortalizas Mediante Tecnologías Combinadas. *Manual De Capacitación* .
- Organizacion De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura (Fao). (2006). *Fichas Técnicas Productos Frescos Y Procesados. Informacion Sobre Operaciones Poscosecha (Inpho)*. Obtenido De [Http://Www.Fao.Org/Inpho_Archive/Content/Documents/Vlibrary/Ae620s/Pfrescos/Guayaba.Htm](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/Ae620s/Pfrescos/Guayaba.htm)

- Organizacion De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura (Fao). (2012). Pérdidas Y Desperdicio De Alimentos En El Mundo-Alcance, Causas Y Prevencion. Roma , Italia .
- O'sullivan, A. (1997). Cellulose: The Structure Slowly Unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Parant Rodewald, N. G. (2005). Elaboración De Gel Celulósico (Nata) Producido Por Acetobacter Xylinum Sobre Jugo De Arandano (Vaccinum Corymbosum) . *Tesis*. Valdivia , Chile .
- Pecoraro, É., Manzani, D., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. (2008). Bacterial Cellulose From Gluconacetobacter Xylinus: Preparation, Properties And Applications. *Elsilver*.
- Persson, J. (2000). Handbook For Kjeldahl Digestion: A Recent Review Of The Classical Method With Improvements Developed By Foss.
- Phan, J. (2010). Production Design And Evaluation Of Vascular Grafts Made Of Bacterial Cellulose. *Master Of Science Thesis In The Master Degree Program, Biotechnology*. Göteborg, Sweden.
- Poyrazoglu Coban, E., & Halil, B. (2011). Evaluation Of Different Ph And Temperature For Bacterial Cellulose Production In Hs (Hestrin-Scharmm) Medium And Beet Molasses Medium. *African Journal Of Microbiology*, 5(9), 1037-1046.
- Prashant R, C., Ishwar B, B., A, S., & Survase And Rekha S, S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production And Applications. *Food Technology And Biotechnology*, 47(2), 107-124.
- Premjet, S., Premjet, D., & Ohtani, Y. (2007). The Effect Of Ingredients Of Sugar Cane Molasses Of Bacterial Cellulose Production By Acetobacter Xylinum. *Sen'i Gakkaishi*, 63(8), 193-199.
- Pro-Lab Diagnostic. (2012). Operation Manual Macfarland Standards. Canada .
- Raghunathan, 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.

- Rigby, R. A., & Stasinopoulos, D. (2005). Generalized Additive Models For Location, Scale And Shape. *Appl. Statist*, 54(3), 507-554.
- Rios Osorio, A. D. (2012). Mejora Del Proceso De Obtencion De Celulosa Bacteriana Conseguida Del Aprovechamiento De Residuos Agroindustriales Y Su Aplicación Como Fuente De Fibra Dietaria En Alimentos . Medellin, Colombia.
- Rivas, B., Moldes, A., Dominguez, J., & Parajo, J. (2004). Development Of Culture Media Containing Spent Yeast Cells Of Debaryomyces Hansenii And Corn Steep Liquor For Lactic Acid Production With Lactobacillus Rhamnosus. *International Journal Of Food Microbiology*, 97(1), 93-98.
- Ros, M., Pascual, J., Ayuso, M., Morales, A., Miralles, J., & Solera, C. (2012). Salidas Valorizables De Los Residuos Y Subproductos Orgánicos De La Industria De Los Transformados De Frutas Y Hortalizas:Proyecto Life+ Agrowaste. *Life*, 1-9.
- Ross, P., & Mayer, R. &. (1991). Cellulose Biosynthesis And Function In Bacteria. *Microbiol. Rev*, 55, 35-58.
- Sánchez Leal, L. C., & Corrales Ramirez, L. C. (2005). Congelacion Bacteriana: Factores Que Intervienen En El Proceso. *Nova Publicación Científica Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca*, 109-113.
- Sasithorn, K. (2008). Bacterial Cellulose Production By Acetobacter Xylinum Strains From Agricultural Waste Products. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 148(1-3), 245-256.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento De Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente Y Futuro. *Bioteconología*, 16(2), 14-46.
- Segal Kischinevzky, C., & Rodarte Murguia, B. (2011). *Manual De Biotecnología . Mexico : Universidad Nacional Autónoma De México.*
- Seto, A., Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., & Yoshinaga, F. (1997). *Bioscience, Biotechnology And Biochemistry*, 61, 735-736.
- Setywati, M. I., Chien, L., & Lee, C. (2009). Self- Immobilized Recombinant Acetobacter Xylinum For Biotransformation. *Biochem. Eng.J*, 43, 78-84.

- Sinha, N. K., Sidho, J. S., Barta, J., Wu, J. S., & Cano, M. P. (2012). Nutritional Quality Of Fruits. En *Handbook Of Fruits And Fruit Processing* (Second Edition Ed., Págs. 73-83). Wiley-Blackwel.
- Skinner, P. O., & Cannon, R. E. (2000). Acetobacter Xylinum: An Inquiry Into Cellulose Biosynthesis. *The American Biology Teacher*, 62(6), 442-444.
- Stanier, R., Ingrahan, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1992). *Microbiologia*. Barcelona: Reverté.
- Tafur, R., & Toro, J. (2007). Frutas Tropicales De Colombia Para El Mundo: Producción, Agroindustria, Comercialización Y Cadena Productiva. (T. J. Montaña P, Ed.) *Presente Y Futuro De La Fruticultura Colombiana*, 9-22.
- Vasconcellos Antônio, R., Souza Recouvreux, D., Nazario, A. C., Timboni, D., Ferrarini, E., Pascoali Rodowaski, G., . . . Da Silva Peres, T. (2012). Produção De Celulose Bacteriana A Partir De Diferentes Substratos. *Revista Técnico Científica (Ifsc)*, 3(1), 176-182.
- Velasco Bedrán, H. A. (2007). El Metabolismo Estructurado De Gluconacetobacter Entanii Modelamiento Y Experimentación. *Tesis Para Optar Al Grado De Doctor*. Iztapalapa, México.
- Villalba, M., Yepes, I. M., & Arrázola, G. (2006). Caracterización Físicoquímica De Frutas De La Zona Del Sinú Para Su Agroindustrialización. *Temas Agrarios*, 11(1), 15-23.
- Wills, R., Lee, H., Mcglasson, B., & Graham, D. (1984). En F. Y. Posrecolección. Zaragoza : Acribia.
- Wolfe, D. (1996). *Química General, Orgánica Y Biológica* (2 Ed.). México: Mc Graw Hill.
- Wu, J.-M., & Liu, R.-H. (2013). Cost-Effective Production Of Bacterial Cellulose In Static Cultures Using Distillery Wastewater. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 115(3), 284-290.
- Yamada, Y., Hoshino, K.-I., & Ishikawa, T. (1997). The Phylogeny Of Acetic Acid Bacteria Based On The Partial Sequences Of 16s Ribosomal Rna: The Elevation Of The Subgenus Gluconoacetobacter To The Generic Level. *Biosci. Biotech. Biochem*, 61(8), 1244-1251.

- Zakaria, J., & Nazeri, M. (10-12 De Julio De 2012). Optimization Of Bacterial Cellulose Production From Pineapple Waste: Effect Of Temperature, Ph And Concentration. *Encon 2012, 5th Engineering Conference, "Engineering Towards Change-Empowering Green Solutions"*. Malaysia.
- Zenga, X., D. P., & Wan, W. (2011). Statistical Optimization Of Culture Conditions For Bacterial Cellulose Production By *Acetobacter Xylinum* Bpr 2001 From Maple Syrup. *Carbohydrate Polymers*, 85, 506-513.
- Zunzun.Com Online Curve Fitting And Surface Fitting Web Site*. (Septiembre De 2014). Obtenido De [Http://Zunzun.Com/](http://Zunzun.Com/)
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & Van T Riet, K. (1990). Modeling Of The Bacterial Growth Curve . *Applied And Environmental Microbiology*, 1875-1881.