

**UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**TESIS DE INVESTIGACIÓN**

**“OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE  
*Gluconacetobacter* sp. MEDIANTE FERMENTACIÓN DE  
EXTRACTOS DE FRUTAS DE DESCARTE”**

**EJECUTORA:**

**Bach. MACIEL NAVARRO ZURITA**

**ASESORA:**

**Mg. HEIDI ISABEL SÁNCHEZ TORRES**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 013-2018/UCSS/FIA

Siendo las 14:00 horas, del día 26 de setiembre de 2018, en la Biblioteca del Local de la Escuela Postgrado de la Universidad Católica Sedes Sapientiae – Av. Salaverry N° 740 Jesús María – Lima, los miembros del Jurado de Tesis, integrado por:

- |                                         |                 |
|-----------------------------------------|-----------------|
| 1. Estad. Nilda Doris Montes Villanueva | Presidente      |
| 2. Blga. Delsy Mariela Trujillo Chávez  | Primer Miembro  |
| 3. Blga. Edith Arias Arone              | Segundo Miembro |
| 4. Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres    | Asesora         |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: **"OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A PARTIR DE *Gluconacetobacter* sp. MEDIANTE FERMENTACIÓN DE EXTRACTOS DE FRUTAS DE DESCARTE"**; que presenta la bachiller en Ciencias Ambientales, la Srta. **Maciel Navarro Zurita** cumpliendo así con los requerimientos exigidos en el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación, el Jurado luego de deliberar, acuerda:

APROBAR

DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de **BUENA** y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Lima, 26 de setiembre de 2018.



Estad. Nilda Doris Montes Villanueva  
PRESIDENTE



Blga. Delsy Mariela Trujillo Chávez  
1° MIEMBRO



Blga. Edith Arias Arone  
2° MIEMBRO



Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres  
ASESORA

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme llegar hasta este punto, concediéndome salud, a mi familia por enseñarme a ser perseverante, frente a las adversidades, y por su apoyo en todo momento para conseguir mis objetivos y metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por su amor incomparable, por ser mi amiga y compañera, por su valioso apoyo y comprensión que me ha ayudado a crecer en todo aspecto. Gracias por estar conmigo en todo momento y por llevarme siempre en tus oraciones.

A mi padre, por las enseñanzas y consejos que han sido de gran ayuda para mi vida. Por influenciar en la elección de mi carrera profesional, sí que valió la pena. Gracias por confiar en mi papá.

A mi hermano Luis, por transmitirme siempre esas ganas de ser mejor, por sus sabios consejos en mi crecimiento profesional, por ser ese ejemplo de hermano mayor y por siempre estar tan pendiente de mí.

A Rosa María, por ser esa gran hermana que nunca tuve, por sus consejos, por estar siempre presta a escucharme.

A mi pequeña Mia Rafaella, por enseñarme el verdadero amor y hacer de mis días los más felices.

A mi novio Miguel, por su apoyo infinito frente a cada decisión que tomé, por sus aportes y consejos en el desarrollo de mi tesis, por su paciencia y entrega para conmigo. Gracias por contenerme en los momentos no tan gratos y de tensión.

Mi gratitud para la Dra. Heidi Sánchez Torres, mi asesora, quién siempre demostró su apoyo desinteresado e incondicional durante todo el desarrollo de mi tesis. Gracias por su amistad, sus consejos fueron de gran ayuda no solo en lo profesional sino en lo personal. Asimismo al Blgo. Armando Chiclla Salazar por su amistad, por transferirme conocimientos que enriquecieron la presente investigación. Gracias por su apoyo permanente.

A todos aquellos que contribuyeron en mi formación académica y profesional, profesores y amigos que compartieron sus conocimientos a lo largo de mi educación universitaria.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CARÁTULA .....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE APÉNDICES .....	xiii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	xvi
<b>CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTECEDENTES .....	1
1.2. BASES TEÓRICAS .....	9
1.2.1. Bacterias.....	9
1.2.1.1. Tamaño .....	10
1.2.1.2. Morfología.....	10
1.2.1.3. Estructura.....	10
1.2.1.4. Clasificación .....	11
1.2.2. Bacterias Ácido Acéticas .....	12
1.2.2.1. <i>Gluconacetobacter</i> .....	13
1.2.2.2. Principales rutas catabólicas de <i>Gluconacetobacter</i> .....	14
1.2.3. Celulosa .....	17
1.2.4. Celulosa Bacteriana .....	19
1.2.4.1. Morfología de las membranas de celulosa bacteriana .....	20
1.2.4.2. Síntesis de celulosa bacteriana .....	21
1.2.4.3. Modelos de síntesis y extrusión de celulosa bacteriana .....	22
1.2.4.4. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la celulosa bacteriana .....	24
1.2.4.5. Medios de producción de celulosa bacteriana .....	25
1.2.4.6. Perspectivas biotecnológicas de la celulosa bacteriana.....	26
1.2.5. Técnicas de fermentación .....	27

1.2.5.1.Cultivo estático.....	27
1.2.5.2.Cultivo agitado .....	28
1.2.6.La planta de arándano .....	28
1.2.6.1.Taxonomía.....	28
1.2.6.2.Descripción botánica .....	29
1.2.6.3.Descripción físico-química del fruto de <i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano) .	30
1.2.7.La planta de Manzano.....	31
1.2.7.1.Taxonomía.....	31
1.2.7.2.Descripción botánica .....	31
1.2.7.3.Descripción fisicoquímica del fruto de <i>Malus domestica</i> (manzano) .....	32
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
2.1. LUGAR Y FECHA .....	34
2.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	34
2.2.1.Descripción del Experimento.....	34
2.2.2.Aislamiento de bacterias del género <i>Gluconacetobacter</i> .....	37
2.2.3.Caracterización morfológica y bioquímica de la cepa aislada.....	38
2.2.4.Selección de inoculante óptimo para los tratamientos.....	39
2.2.5.Preparación del medio de cultivo alternativo para los tratamientos .....	39
2.2.6.Inóculo de <i>Gluconacetobacter</i> sp. a los medios preparados con zumo de arándano y manzana.....	42
2.2.7.Selección del tratamiento más eficiente en la producción de celulosa bacteriana.	43
2.2.8.Caracterización química de la celulosa bacteriana producida por el tratamiento más eficiente .....	47
2.3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	48
2.4. UNIDADES EXPERIMENTALES .....	49
2.5. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES Y SU MENSURACIÓN.....	49
2.6. DISEÑO ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO.....	50
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS .....	50
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
3.1.RESULTADOS .....	51
3.1.1.Caracterización morfológica de la bacteria aislada del vinagre de manzana.....	51
3.1.2.Resultados de la caracterización bioquímica de la bacteria aislada.....	52
3.1.3.Análisis de la producción de celulosa por <i>Gluconacetobacter</i> sp. ....	53
3.1.4.Estimación del consumo de la fuente de carbono por <i>Gluconacetobacter</i> sp. ....	57

3.1.4.1.Determinación de la curva de calibración de glucosa .....	57
3.1.4.2.Estimación del consumo de la fuente de carbono .....	58
3.1.5.Resultados del potencial de hidrógeno, volumen remanente del medio y medida del diámetro de la celulosa en los diferentes tratamientos .....	59
3.1.5.1.Análisis del potencial de hidrógeno .....	59
3.1.5.2.Análisis del volumen consumido del medio de cultivo alternativo .....	62
3.1.5.3.Análisis del diámetro de la celulosa bacteriana .....	64
3.1.6.Resultados del análisis químico de la celulosa obtenida por espectroscopia infrarroja FTIR – MIR-ATR.....	67
3.2.DISCUSIÓN .....	69
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>TERMINOLOGÍA .....</b>	<b>82</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>84</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> <i>Composición de celulosas de diferentes fuentes vegetales en comparación con la celulosa bacteriana</i> .....	20
<b>Tabla 2.</b> <i>Sustratos utilizados como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana</i> .....	26
<b>Tabla 3.</b> <i>Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano</i> .....	27
<b>Tabla 4.</b> <i>Características físico-químicas del fruto de la especie <i>Vaccinium corymbosum</i></i> .30	
<b>Tabla 5.</b> <i>Características físico-químicas del fruto de la especie <i>Malus domestica</i></i> .....	33
<b>Tabla 6.</b> <i>Composición medio de cultivo Hestrin – Schramm</i> .....	37
<b>Tabla 7.</b> <i>Composición del medio de cultivo alternativo para 1 L</i> .....	41
<b>Tabla 8.</b> <i>Descripción de los tratamientos y del control en base a los diferentes extractos de fruta (arándano y manzana) de descarte</i> .....	49
<b>Tabla 9.</b> <i>Variables de estudio, unidades de medida y métodos de análisis de los parámetros evaluados</i> .....	50
<b>Tabla 10.</b> <i>Resultados de tinción Gram y caracterización bioquímica de <i>Gluconacetobacter</i> sp</i> .....	53
<b>Tabla 11.</b> <i>Análisis de varianza de la producción de celulosa (g/L) considerando los factores tipo de fruta, concentraciones y el tiempo de producción</i> .....	54
<b>Tabla 12.</b> <i>Promedio y desviaciones estándar de producción de celulosa (g/L) de <i>Gluconacetobacter</i> sp</i> .....	56
<b>Tabla 13.</b> <i>Valores de concentración de glucosa (mg/ml) para la obtención de la recta de regresión</i> .....	57
<b>Tabla 14.</b> <i>Valores de concentración inicial, concentración final y consumo de la fuente de carbono por <i>Gluconacetobacter</i> sp</i> .....	59
<b>Tabla 15.</b> <i>Análisis de varianza del potencial de hidrógeno en 15 días de producción de celulosa bacteriana</i> .....	60
<b>Tabla 16.</b> <i>Promedios y desviaciones estándar del potencial de hidrógeno obtenidos en la fase final de la producción de celulosa</i> .....	61
<b>Tabla 17.</b> <i>Análisis de varianza del volumen consumido del medio de cultivo alternativo</i> . 62	
<b>Tabla 18.</b> <i>Promedios y desviaciones estándar del volumen consumido del medio de cultivo alternativo en los tratamientos</i> .....	63

<b>Tabla 19.</b> <i>Análisis de varianza del diámetro de celulosa bacteriana</i> .....	65
<b>Tabla 20.</b> <i>Promedios de la medición del diámetro de la celulosa bacteriana</i> .....	66
<b>Tabla 21.</b> <i>Enlaces y estructuras de celulosa asociados a longitudes de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</i> .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura bacteriana en Gram positivas y Gram negativas.....	11
<b>Figura 2.</b> Árbol filogenético de los seres vivos .....	12
<b>Figura 3.</b> <i>Gluconacetobacter</i> sp. en el proceso de creación de nanofibras de celulosa .....	14
<b>Figura 4.</b> Modelo hipotético para la biosíntesis de celulosa por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema del catabolismo del etanol y de sus asociaciones con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y con la gluconeogénesis en <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	16
<b>Figura 6.</b> Esquema de reacciones del catabolismo de la sacarosa en <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Estructura molecular de la celulosa .....	18
<b>Figura 8.</b> Interconversión de los polimorfos de la celulosa.....	18
<b>Figura 9.</b> Estructura química de la celulosa bacteriana .....	20
<b>Figura 10.</b> Clasificación de las membranas de celulosa bacteriana.....	21
<b>Figura 11.</b> Rutas de síntesis de celulosa en <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	22
<b>Figura 12.</b> Modelos de los mecanismos de síntesis y extrusión de la celulosa bacteriana.	24
<b>Figura 13.</b> Partes de la flor del género <i>Vaccinium</i> (arándano) .....	30
<b>Figura 14.</b> Partes de la flor de la planta <i>Malus domestica</i> (manzano).....	32
<b>Figura 15.</b> Diagrama de flujo para la obtención del inóculo de <i>Gluconacetobacter</i> .....	35
<b>Figura 16.</b> Diagrama de flujo para la obtención de celulosa bacteriana a partir de pulpa de arándano y manzana .....	36
<b>Figura 17.</b> Materiales para el aislamiento de <i>Gluconacetobacter</i> .....	38
<b>Figura 18.</b> A: Peso de la pulpa de arándano para los diferentes tratamientos. B: Zumos de arándano para los diferentes tratamientos. C: Zumos de arándanos centrifugados. D: Medición de pH del medio de cultivo alternativo .....	40
<b>Figura 19.</b> A: Peso de la pulpa de manzana para los diferentes tratamientos. B: Zumos de manzana para los diferentes tratamientos. C: Zumos de manzana centrifugados. D: Medición de pH del medio de cultivo alternativo .....	41
<b>Figura 20.</b> A: Inoculación de <i>Gluconacetobacter</i> sp. en los tratamientos con zumo de arándano. B: Inoculación de <i>Gluconacetobacter</i> sp. en los tratamientos con zumo de manzana.....	42

<b>Figura 21.</b> Peso de la celulosa bacteriana obtenida por el tratamiento control .....	43
<b>Figura 22.</b> A: Medición del pH en tratamiento con zumo de arándano. B: Medición del pH en tratamiento con zumo de manzana.....	45
<b>Figura 23.</b> Medición del volumen remanente del medio de cultivo alternativo en el tratamiento de la manzana .....	46
<b>Figura 24.</b> Medición del diámetro de película de celulosa producida medio de cultivo alternativo .....	47
<b>Figura 25.</b> <i>Gluconacetobacter</i> sp. con tinción Gram a 1000X.....	51
<b>Figura 26.</b> Prueba de catalasa para <i>Gluconacetobacter</i> sp.....	52
<b>Figura 27.</b> Prueba de oxidasa para <i>Gluconacetobacter</i> sp .....	53
<b>Figura 28.</b> Producción promedio de celulosa bacteriana según los sustratos de fruta, las concentraciones y los días de producción.....	56
<b>Figura 29.</b> Recta de regresión de la glucosa (mg) vs. la absorbancia.....	58
<b>Figura 30.</b> Potencial de hidrógeno promedio obtenido en la producción de celulosa, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración .....	61
<b>Figura 31.</b> Volumen consumido promedio del medio de cultivo alternativo, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración.....	64
<b>Figura 32.</b> Diámetro promedio de celulosa bacteriana, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración.....	66
<b>Figura 33.</b> Espectro infrarrojo (FTIR-MIR.ATR) para la celulosa obtenida a partir de la bacteria <i>Gluconacetobacter</i> sp .....	68

## ÍNDICE DE APÉNDICES

	<b>Pág.</b>
<b>Apéndice 1.</b> Resultados del análisis químico de la celulosa bacteriana mediante espectroscopia infrarroja – FTIR.....	85
<b>Apéndice 2.</b> Registro fotográfico de la investigación.....	87

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la producción de celulosa bacteriana a partir de *Gluconacetobacter* sp., aislada del vinagre de manzana; la investigación se realizó durante un periodo de 90 días, en los meses de setiembre a diciembre del 2017, en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae.

Se elaboraron medios de cultivo alternativos a partir de los extractos de arándano y manzana utilizando tres concentraciones diferentes (10, 20 y 30 %); se consideró seis tratamientos, con tres réplicas cada uno (T1= extracto de arándano al 10 %, T2= extracto de arándano al 20 %, T3= extracto de arándano al 30 %, T4= extracto de manzana al 10 %, T5= extracto de manzana al 20 % y T6= extracto de manzana al 30 %) y el tratamiento control con seis réplicas, los cuales se incubaron durante 15 días, a 32 °C. Se registró la producción de celulosa bacteriana y se evaluaron los parámetros de cultivo: peso de la celulosa bacteriana, estimación del consumo de la fuente de carbono, pH, consumo del volumen del medio remanente y medición del diámetro de la celulosa en los diferentes tratamientos. Asimismo, se realizó el análisis de la espectroscopia infrarroja FTIR para el tratamiento más eficiente en la producción de celulosa bacteriana. Los resultados del análisis de varianza de la producción de celulosa mostraron que hubo efecto significativo del tipo de extracto de fruta ( $p \leq 0.05$ ), las concentraciones de la fruta ( $p \leq 0.05$ ) y el tiempo de producción de celulosa ( $p \leq 0.05$ ), significando que cada uno de estos factores influyó positivamente en la producción de celulosa, resultando el tratamiento T3 el más eficiente (producción de la celulosa bacteriana = 128,28 g/L y consumo de fuente de carbono = 166,8 g/L) sobre los otros tratamientos.

La espectroscopia infrarroja FTIR a la celulosa obtenida en el tratamiento T3, mostró longitudes de onda característicos de la celulosa, confirmándose la presencia de grupos funcionales para este polisacárido. Se concluye que el extracto a base de la fruta de arándano es un excelente sustrato alternativo para la obtención de celulosa bacteriana, debido a una mayor disponibilidad de fuentes de carbono en forma de monosacáridos, que resultaron esenciales para *Gluconacetobacter* sp.

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter* sp., fermentación, *Vaccinium corymbosum*, biopolímero, celulosa bacteriana.

## ABSTRACT

The present study evaluated the production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp., isolated from vinegar of apple. The investigation was carried out over 90 days, between September to December 2017, in the laboratory of Microbiology and Biotechnology of the Universidad Católica Sedes Sapientiae.

Alternative culture media were developed from cranberry and apple extracts using three different concentrations (10, 20 and 30 %); Six treatments were considered, with three replications each (T1 = 10 % cranberry extract, T2 = 20 % cranberry extract, T3 = 30 % cranberry extract, T4 = 10 % apple extract, T5 = extract of apple at 20 % and T6 = apple extract at 30 %) and the control treatment with six replicates, which were incubated during 15 days, at 32 °C. The production of bacterial cellulose was registered and the following parameters of culture were evaluated: weight of the bacterial cellulose, estimation of the consumption of the source of carbon, pH, consumption of the remaining volume and measurement of the diameter of the cellulose in the different treatments. Likewise, the analysis of the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was realized for the most efficient treatment in the production of bacterial cellulose. The results of the analysis of variance of the cellulose production showed that there was a significant effect of the type of fruit extract ( $p \leq 0.05$ ), the concentrations of the fruit ( $p \leq 0.05$ ) and the time of production of cellulose ( $p \leq 0.05$ ), meaning that each of these factors positively influenced the production of cellulose, resulting the T3 treatment being the most efficient (bacterial cellulose production = 128, 28 g/L and carbon source consumption = 166, 8 g/L) over the other treatments.

The infrared spectroscopy FTIR to the cellulose obtained in the treatment T3 showed wave lengths typical of the cellulose, being confirmed the presence of functional groups for this polysaccharide. This research concludes that the extract based on the fruit of blueberry is an excellent alternative substrate for obtaining bacterial cellulose, due to greater availability of carbon sources in the shape form of monosaccharides, which were essential for *Gluconacetobacter* sp.

**Key words:** *Gluconacetobacter* sp., fermentation, *Vaccinium corymbosum*, biopolymer, bacterial cellulose.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los sectores más relevantes en todo el mundo es la industria de la producción de papel (Altesor, Eguren, Mazzeo, Panario y Rodríguez, 2008). A escala mundial, la industria del papel es la quinta industria más grande en cuanto a consumo de energía, contabilizando el 4 % del consumo de energía global. Para la elaboración de papel, la fuente primordial de fibra es la madera procedente de especies arbóreas, como pino y eucalipto, de donde se obtiene la celulosa vegetal (Teschke & Demers, 1998). Para elaborar aproximadamente una tonelada de hojas de papel se necesita hasta 3,5 toneladas de especies arbóreas (Green Peace, 2006); por consiguiente el crecimiento de la industria papelera viene originando problemas ambientales y sociales. Es así que los cultivos de pino y abeto requieren en el proceso de blanqueo productos clorinados, que contaminan el ambiente (Fernández, 2008).

La celulosa vegetal es un polisacárido que se extrae (con fines industriales) de especies arbóreas, se emplea como materia prima para la elaboración de diferentes productos, principalmente del papel y sus derivados. En los últimos años se ha logrado obtener celulosa de diversas fuentes, logrando mayor relevancia la celulosa producida por bacterias, debido a que presentan una composición química idéntica y características físicas superiores en comparación a la celulosa de origen vegetal (Quintana, 2015). Asimismo, la celulosa bacteriana ofrece un alto grado de pureza, a diferencia de la celulosa vegetal que se encuentra asociada a la hemicelulosa y lignina (Khajavi et al., 2011, citado por Quintana, 2015, p. 4), la cual mediante procesos químicos se logra su separación; sin embargo, estos procedimientos resultan contaminantes con potenciales impactos negativos para el ambiente debido a que generan sustancias químicas que son vertidas en los cursos de agua y liberados al aire. De igual manera los residuos sólidos generados en dichos procesos químicos, no presentan un tratamiento apropiado para reducir su peligrosidad ni una disposición final adecuada según su nivel de toxicidad (Green Peace, 2006).

La celulosa bacteriana es producida principalmente por bacterias del género *Gluconacetobacter*, este tipo de microorganismo utiliza como sustrato un medio de cultivo líquido, que incluye diversas fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, fructosa, melaza, glicerol y manitol (Jaramillo, Perna, Benito-Revollo, Arrieta y Escamilla, 2013); por

consiguiente, se pueden cultivar en sustratos económicos como jugos de frutas, remolacha o licor de maíz, considerándose como una gran alternativa para la elaboración de la celulosa (Perna, 2013).

En la presente investigación se pretende obtener celulosa bacteriana a partir de residuos de frutas, que generalmente son eliminados y desperdiciados, por estar muy maduros y/o no ser aptos para consumo humano. Sin embargo, estos residuos podrían ser fuente de carbono para la síntesis de la celulosa bacteriana, y a la vez generar un valor agregado a los residuos orgánicos, teniendo una mejor opción de aprovechamiento y transformación, evitando así los impactos negativos a la salud de las personas y al ambiente.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Obtener celulosa bacteriana a partir de *Gluconacetobacter* sp. mediante la fermentación de extractos de frutas de descarte de manzana y arándano.

### Objetivos Específicos

- Aislar y caracterizar bacterias del género *Gluconacetobacter* a partir del vinagre de manzana, mediante técnicas microbiológicas.
- Obtener biomasa de *Gluconacetobacter* sp. en medio de cultivo Hestrin y Schramm.
- Elaborar un medio de cultivo alternativo a partir de extractos de manzana y arándano de descarte.
- Determinar las características físicas y químicas de la celulosa bacteriana obtenida bajo condiciones de cultivo en sustrato estándar y en sustrato alternativo.
- Comparar la calidad y cantidad de celulosa bacteriana obtenida bajo condiciones de cultivo en sustrato estándar y en sustrato alternativo.

# CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. ANTECEDENTES

Parant (2005) evaluó la producción de gel celulósico por *Acetobacter xylinum* DSM-2004 sobre jugo de arándano. El objetivo del estudio fue obtener la mejor fórmula de cultivo para la elaboración del gel celulósico de arándano a nivel industrial. Se comenzó con la activación de la cepa madre a nivel de laboratorio en el medio Caldo *Acetobacter* que se incubó por 5 días a 32 °C y transcurrido el tiempo de incubación, realizó la multiplicación masiva a través de los repiques. Seguidamente fueron sembrados en un medio de cultivo conformado por materias primas como pulpa de arándano (2 604 g) y azúcar (300 g), así también insumos químicos como sorbato de potasio (0,3 g), cloruro de calcio (17,7 g), fosfato de potasio (9 g) y extracto de levadura (30 g); conformando el licor madre primario. Posteriormente preparó el licor madre industrial para siete ensayos diferentes, con una concentración de pulpa de arándano al 20 % al cual agregó los insumos utilizados en el licor madre, en cantidades diferentes según el requerimiento de cada ensayo e incluyendo el inóculo de *Acetobacter xylinum* (2643 g) procedente del licor madre; incubados por 15 días. Así mismo, realizó un análisis químico al gel celulósico obtenido en el mejor ensayo y se determinó el contenido total de antocianinos al licor madre industrial, por el método diferencial de pH. Los resultados mostraron que el ensayo número 4 con la formulación de pulpa de arándano (10 g), agua (79 g), sorbato de potasio (0,01 g), azúcar (10 g), extracto de levadura (1 g), cloruro de calcio (0,6 g), fosfato de potasio (0,3 g) y *Acetobacter xylinum* (1 g) alcanzó una producción máxima de gel celulósico de 159,5 g/L con un espesor del gel celulósico de 1,3 cm. Respecto al análisis químico de la nata de arándano, obtuvo 97,62 % de humedad, 2,47 % de ceniza total, 13,51 % fibra cruda y 9,12 % de proteína. La determinación del contenido total de antocianinos mostró que por cada 100 g licor madre hubo 200 mg de

antocianinos. El autor concluyó que con una adecuada formulación de insumos obtuvo gel celulósico de buena calidad y espesor.

Norouzian et al. (2011), estudiaron la producción de nano fibras de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245. El objetivo del estudio fue producir celulosa bacteriana en diferentes medios de cultivo, tales como Agar Cerebro Corazón, Agar/Caldo Luria Bertani, Infusión Cerebro Corazón, Hestrin-Schramm y medio N° 125. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28-30 °C durante siete días en condiciones estáticas. Para eliminar las impurezas bacterianas, las membranas de celulosa producidas se trataron y purificaron con una solución de NaOH 0,1 M a 90 °C durante 30 minutos, seguidamente se secaron por congelación a -40 °C, con ayuda de un liofilizador. La celulosa bacteriana preparada se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (SEM [de sus siglas en inglés]), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (XRD). La cantidad de celulosa bacteriana producida se relacionó directamente con el área de superficie de los recipientes de cultivo, donde se observó que la estructura de red de torsión poseía muchas cintas de nano-fibra con un diámetro de 30 nm a 1 µm. Con respecto a la caracterización física, la más resaltante fue la observación realizada a través del SEM, donde la celulosa bacteriana secada por liofilización contiene poros más homogéneos que los secados por aire caliente. Se concluyó que la celulosa bacteriana demostró ser eficiente debido a su sencillo proceso de fermentación, por lo que la producción a escala industrial parece ser factible.

Jaramillo, Tobio y Escamilla (2012) determinaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la producción de celulosa por la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. En el estudio, para el mantenimiento de la bacteria utilizaron el medio Hestrin-Schramm modificado y lo cultivaron a 30°C en condiciones estáticas. El medio de cultivo líquido para la producción de celulosa estuvo compuesto por sacarosa, pulpa de tomate, amonio, citrato y sales de magnesio, fosfato, calcio y potasio. Las concentraciones de sacarosa utilizados fueron 0,8; 1,7; 2,8; 4,9; 5,9 y 7,6 % (p/v), y el pH se ajustó a 5,5. Las colonias de

*G. xylinus* fueron inoculadas en 72 biorreactores de vidrio (de 9,5 cm de diámetro y 11 cm de alto), que contenían 200 ml de medio y se incubaron a 30°C, durante 7, 14, 21 y 28 días, en condiciones estáticas. Para evaluar la cinética de la hidrólisis de la sacarosa y formación de celulosa, Jaramillo et al. utilizaron el modelo de Michaelis-Mente y el software Microcal Origin 6,0. Al final del estudio encontraron que a la cuarta semana, la cantidad de celulosa bacteriana que se obtuvo fue de 32,5 a 39,5 g/L, considerando las diferentes concentraciones de sacarosa. Se concluyó que la hidrólisis de sacarosa, el consumo de glucosa y fructosa se evidenciaba en la producción de celulosa bacteriana, donde el rendimiento de *Gluconacetobacter xylinus* dependía de la concentración del sustrato.

Jaramillo et al. (2013) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de fructosa (1,0; 5,0; 10 y 15 % p/v) en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. Para la investigación, emplearon el medio agar-fructosa y un medio de cultivo líquido que contenía fructosa como fuente de carbono y suplementos con sales de magnesio, fosfato, potasio y calcio. Para la obtención de inóculos realizaron cultivos en medios líquidos y aquellos cultivos puros que presentaron características con formación de fibrillas de celulosa y con mayor turbidez fueron seleccionados. En biorreactores cilíndricos de 750 ml con 200 ml de medio de cultivo agregaron el 10 % (v/v) del inóculo obtenido y se incubaron a 30 °C durante distintos tiempos desde 1,5 días hasta 28 días; durante ese tiempo se determinaron las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la celulosa bacteriana. Evaluaron el consumo de fructosa en función del tiempo para las diferentes concentraciones de 1,0; 5,0; 10 y 15 % (p/v) del sustrato. El resultado del estudio demostró que la concentración óptima para la síntesis de la celulosa bacteriana fue al 10 % (p/v) de fructosa, donde alcanzó el máximo grosor; asimismo observaron que el consumo de la fuente azucarada fue de un 90 % de la concentración inicial. En su investigación llegaron a la conclusión de que se puede utilizar un medio de cultivo de bajo costo para el proceso de la síntesis de celulosa; los investigadores también mencionan que a través de un sistema de biorreactor se puede contribuir a una alta

productividad de celulosa bacteriana en un periodo limitado, con miras de producir celulosa a nivel industrial.

Perna (2013) evaluó la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) IFO 13693 en presencia de melaza de caña, bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente. El mantenimiento de la bacteria se realizó con el medio Watanabe modificado y para la producción de celulosa se preparó un medio de cultivo líquido (MZA) compuesto de melaza diluida en concentración de 13,3 %, amonio, ácido cítrico y sales de magnesio, fosfato, calcio y potasio a un pH de 5,6. Inóculos activados (10 % v/v) se adicionaron a 36 biorreactores cilíndricos (cubiertos con tapones de algodón) y se incubaron a 30 °C durante 1,5; 3; 7; 14; 21 y 28 días. Concluido el tiempo de cultivo, midió la producción de celulosa bacteriana, el volumen remanente y la cantidad de fuente de carbono en el remanente. Asimismo, determinó la compresibilidad de la celulosa sintetizada y el rendimiento del producto. Los resultados sobre la producción de celulosa indicaron que hubo un incremento considerable entre los 14 y 21 días, con un porcentaje de 51 % en el cultivo estático, mientras que en el cultivo estático-aireación el incremento fue entre los 7 y 14 días con un porcentaje de 55 %. Se obtuvo valores de la velocidad de formación promedio entre 0,027 g/L/h y 0,63 g/L/h para el cultivo estático y 0,70 g/L/h para el cultivo con flujo de aire intermitente. Respecto al porcentaje de compresibilidad de la celulosa, al cabo de los 28 días, presentó una ligera disminución. En relación al volumen del medio de cultivo remanente, disminuyó en un 10 % en el cultivo estático y un 17 % en el cultivo con flujo de aire intermitente. La fuente de carbono en el cultivo estático tuvo un consumo de sacarosa en un 79 % y para el cultivo estático-aireación fue en un 82 %. Respecto al rendimiento del producto en cultivo estático con aireación intermitente se obtuvo el mayor rendimiento de celulosa con una producción de 81 % más que en el cultivo estático. El estudio concluyó que en condiciones estáticas con aireación superficial hubo mayor capacidad de síntesis de celulosa, produciendo 103 g/L, aproximadamente 20 % más que en el cultivo estático sin aireación. El peso seco de la celulosa aumentó gradualmente con un 48 % de diferencia, entre las dos técnicas de cultivo.

Hungund et al. (2013) estudiaron la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 utilizando fuentes de carbono a bajo precio a partir de zumos de fruta, melaza y almidón. Para el aislamiento y cultivo de la cepa bacteriana emplearon un medio de cultivo a base de glucosa, extracto de levadura, peptona, fosfato disódico y ácido cítrico (medio Hestrin-Schramm (HS) modificado); y para evaluar la producción de celulosa utilizaron zumos de piña, granada, melón, sandía, tomate y naranja, solución con melaza tratada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (libre de sólidos) y solución neutralizada de almidón de papa. La bacteria fue cultivada en el medio HS modificado, donde se adicionó los diferentes zumos y soluciones obtenidas, durante 14 días. Se evaluó el efecto de las fuentes duales de carbono y el efecto de las fuentes de carbono de bajo precio. En los resultados se observó que *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 es capaz de usar varios carbohidratos (2 % p/v) para el crecimiento y la producción de celulosa. Se encontró una producción máxima de 5,56 g/L con la fructosa. En la combinación de las fuentes de carbono todas produjeron celulosa, siendo la combinación fructosa más sacarosa con las que se obtuvo la mayor producción con 8,79 g/L. Se determinó que todas las fuentes de carbono baratas lograron producir celulosa bacteriana y la producción máxima fue dada por el melón con una producción de 8,08 g/L. La melaza como fuente de carbono barata presenta sustancias desconocidas que pueden inhibir el crecimiento del microorganismo. Es así que los sustratos de fruta deben proporcionar los nutrientes esenciales para que *Gluconacetobacter persimmonis* pueda producir celulosa bacteriana.

Grande (2014) investigó el desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas; con ese fin, cultivó *Gluconacetobacter saccharivorans* en un sistema estático, en un medio de cultivo a base de D-Glucosa anhidra, peptona, extracto de levadura y ácido acético glacial, al cual le añadió por separado, almidón de maíz y de papa a una concentración de 2,0 % (w/v). Los geles de celulosa-almidón fueron retirados de la interface, lavados y analizados por difracción de Rayos X y espectroscopia mediante infrarrojos basados en reflexión total atenuada (ATR-FTIR, Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Se realizó la caracterización mecánica de las muestras de nanocompuestos a través de ensayos de tracción en una

máquina de tracción MTS Synergie 200. Finalmente se evaluó la morfología de los nanocompuestos a través de la caracterización morfológica mediante ensayos de microscopia electrónica de barrido. Los análisis de la Difracción de Rayos X indicaron que la celulosa bacteriana pura mostró los más altos niveles de cristalinidad (74,8 %); asimismo, la presencia de almidón gelatinizado en los nanocompuestos mostró la reducción de los valores de cristalinidad al 69,5 % para el caso de los nanocompuestos con almidón de papa y 71,0 % para los nanocompuestos con almidón de maíz. Los resultados de la espectroscopía ATR-FTIR para la celulosa bacteriana pura presentó cinco picos característicos entre los rangos de longitud de onda de 984 y 1106  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que para los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón no se pudo observar el enlace C-O a la longitud de onda de 984  $\text{cm}^{-1}$ . La fracción volumétrica del almidón gelatinizado (ubicado en las zonas externas de la red de la celulosa) fue de aproximadamente 90 %. Respecto al análisis de las propiedades mecánicas (esfuerzo máximo, elongación máxima y módulo de elasticidad) para muestras de la celulosa bacteriana-almidón de maíz se obtuvo los menores valores. Respecto a las muestras de celulosa bacteriana-almidón de papa, mostraron valores similares a la celulosa bacteriana pura. Por otro lado, la morfología de nanocompuestos de celulosa bacteriana-pura mostró una red de nanofibras definidas; a diferencia de los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón en los que no se logró apreciar la red de nanofibras.

Castro (2015) evaluó y determinó las condiciones en el cultivo de *Gluconacetobacter medellinensis* respecto a la producción de celulosa bacteriana utilizando tres fuentes de carbono diferentes: glucosa, fructosa y sacarosa; para ello adicionó cada carbohidrato (al 2 %), por separado al medio convencional Hestrin-Schramm y estimó el consumo de cada tipo de carbohidratos durante la producción de celulosa bacteriana. Para la obtención del preinóculo se sembró *Gluconacetobacter medellinensis* en placas petri con medio Hestrin-Schramm con agar al 2,5 % y se incubaron durante 72 horas a 28 °C; las colonias aisladas fueron suspendidas en agua estéril hasta obtener una concentración de  $1,5 \times 10^9$  UFC/ml. Posteriormente para evaluar la producción de la celulosa bacteriana, se empleó medios de cultivo líquidos en los cuales se consideró nutrientes establecidos en el

medio Hestrin- Schramm (HS) donde la fuente de carbono (glucosa, fructosa o sacarosa) varió en concentraciones de 1, 2 y 3 %, se ajustó el pH a 3,6 y se incubó a 28 °C. Realizó la cuantificación de biomasa de *Gluconacetobacter medellinensis* durante la fermentación del medio de cultivo y determinó la cinética de crecimiento del microorganismo. Posteriormente evaluó el consumo de la fuente de carbono durante la producción de la celulosa bacteriana. Finalmente analizó la caracterización morfológica de *Gluconacetobacter medellinensis*. El estudio determinó que el medio de cultivo constituido por glucosa al 2 % fue el que presentó mayor cantidad de biomasa con  $6,47 \times 10^9$  UFC/ml y con producciones máximas de 2,8 g/L de celulosa bacteriana; asimismo, en relación al consumo de la fuente de carbono, se mencionó que *G. medellinensis* tuvo mayor afinidad por la glucosa, seguida por la sacarosa y finalmente la fructosa. Sin embargo, el microorganismo presentó mayor adaptación a la sacarosa en la fase de inicio del cultivo, lo cual resultó adverso debido a que en las siguientes fases de crecimiento del microorganismo no se observó el mismo resultado inicial. Respecto a la caracterización morfológica de la celulosa bacteriana, observó que las redes conformadas por las nanofibrillas sintetizadas por *Gluconacetobacter medellinensis* cultivadas en glucosa al 2 % fueron menos densas que las que se obtuvieron en los medios que contenían fructosa al 2% y sacarosa al 2%.

Enciso (2015) investigó el efecto de siete inductores sobre la producción de celulosa bacteriana en la cepa *Gluconacetobacter medellinensis*. La primera fase consistió en la evaluación de diversos inductores químicos como ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico y etanol, y el medio Hestrin – Schramm como tratamiento control. Para realizar la evaluación, comenzó preparando el preinóculo con *Gluconacetobacter medellinensis* crio-preservada a una concentración de  $6 \times 10^5$  bacterias/ml, luego adicionó los inductores químicos a una concentración de 1,0 p/v al medio Hestrin – Schramm y ajustó el pH entre 3,60 y 3,70; cada frasco fue inoculado con 10 % (v/v) del volumen del medio (10 ml) del preinóculo y se incubaron a 28 °C durante 13 días. Evaluó las diferentes concentraciones de 0; 0,1; 1; 2; 4; 6; 8 y 10% de los dos inductores que favorecieron una mayor producción de celulosa en la primera fase. Posteriormente evaluó la cinética de crecimiento bacteriano y de

producción de celulosa con los dos inductores y como fase final se hizo la caracterización de la celulosa producida con los dos inductores. En la evaluación de los inductores observó un mayor espesor en las membranas con etanol con una producción de celulosa de 2,7428 g/L y en el ácido acético con una producción de 2,0980 g/L, mientras que con el ácido láctico se tuvo una producción de 1,6143 g/L, con el ácido cítrico una producción de 1,6580 g/L y con el ácido succínico una producción de 1,6187 g/L, en los cuales el espesor de la membrana no cambió al compararlo con el control. El ácido málico presentó una disminución en la producción de celulosa con 0,5047 g/L, y en el ácido oxálico hubo inhibición en la producción de celulosa y por consiguiente no se obtuvo valor alguno. La cinética de crecimiento fue mayor para el medio modificado con etanol, siendo 1,45 veces más que el control y 1,13 veces más que el medio modificado con ácido acético y este último siendo 1,28 veces mayor que el control. En la producción de celulosa el medio modificado con etanol fue 1,99 veces mayor respecto al control y 1,42 veces mayor respecto al medio modificado con ácido acético. Este estudio también determinó que a concentraciones mayores al 8 % p/v de etanol y 4 % p/v de ácido acético se inhibe la producción de la celulosa. Finalmente, las pruebas mecánicas realizadas entre las membranas inducidas con etanol y ácido acético en comparación con el control no mostraron variación alguna; por lo tanto, es posible utilizar éstos dos inductores químicos para aumentar la producción de celulosa bacteriana sin afectar su calidad.

Quintana (2015) estudió la producción y caracterización de la celulosa bacteriana obtenida a partir de *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 700178, evaluando el efecto de la aireación y la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) sobre la producción de celulosa mediante un cultivo sumergido empleando el medio Hestrin-Schramm. La cepa bacteriana fue cultivada en biorreactores con agitación mecánica a 100 rpm y sin agitación (condiciones estáticas), a una temperatura de 30 °C y con un pH inicial de 6,0. La relación C/N fue de 3,5; 7,1; 14,2 y 21,2 que corresponde a las concentraciones de glucosa de 10, 20, 40 y 60 g/L, respectivamente; el tiempo de cultivo fue 144 h para todos los tratamientos. La caracterización química de las películas de celulosas fue mediante espectroscopia infrarroja. El estudio determinó que la concentración de glucosa que obtuvo

mayor producción de celulosa bacteriana fue la de 40 g/L (C/N 14,2), con 5g/L de extracto de levadura y 5 g/L de peptona de caseína, donde alcanzó una máxima producción de 0,46 g/L de celulosa bacteriana y con una productividad de 0,055 g-BC/g-BM\*h; en relación al sistema de producción, el sistema de agitación mecánica fue mejor debido a que el tiempo requerido para producir celulosa fue menor que en el sistema estático. El análisis mediante la espectroscopia infrarroja (FTIR) mostró la presencia de bandas características de grupos funcionales de la celulosa como O-H, C-O-C y C-O, los cuales correspondía a las longitudes de onda 3272; 1160,8 y 1033,6  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. El autor concluyó que *G. xylinus* ATCC 700178 presentó gran eficiencia en la producción de celulosa, y que el sistema agitado fue el mejor sistema debido a la alta producción del biopolímero.

## **1.2. BASES TEÓRICAS**

### **1.2.1. Bacterias**

Los procariotas (“pro” de primitivo y “cariota” de núcleo) son un grupo taxonómico que comprenden a los organismos anucleados, microscópicos, que se caracterizan por no poseer tejidos diferenciados (Woese et al., 1990, citado por Roselló-Mora, 2005, p. 12). Las bacterias son microorganismos unicelulares, procariotas, que tienen membrana celular, pared celular de estructura rígida compuesta de peptidoglicano, ribosomas (que cumplen funciones de síntesis proteica) y ácido desoxirribonucleico (ADN) de forma circular y cerrada. Su reproducción es por fisión binaria y su crecimiento se basa en mecanismos productores de energía (Pérez & Mota, 2000). Las bacterias presentan tres clases principales de proteínas citoesqueléticas similares a la de las células eucariotas: FtsZ es un homólogo de tubulina, MreB y ParM son homólogos de actina y CreS (crescentina) parece ser una proteína de filamento intermedio. Es así que los homólogos bacterianos resultan esenciales en el proceso de la citocinesis, en la regulación de la forma de la célula, ya que dirige la regulación la actividad de las enzimas que sintetizan y reorganizan el peptidoglicano (Gitai, 2005).

#### 1.2.1.1. Tamaño

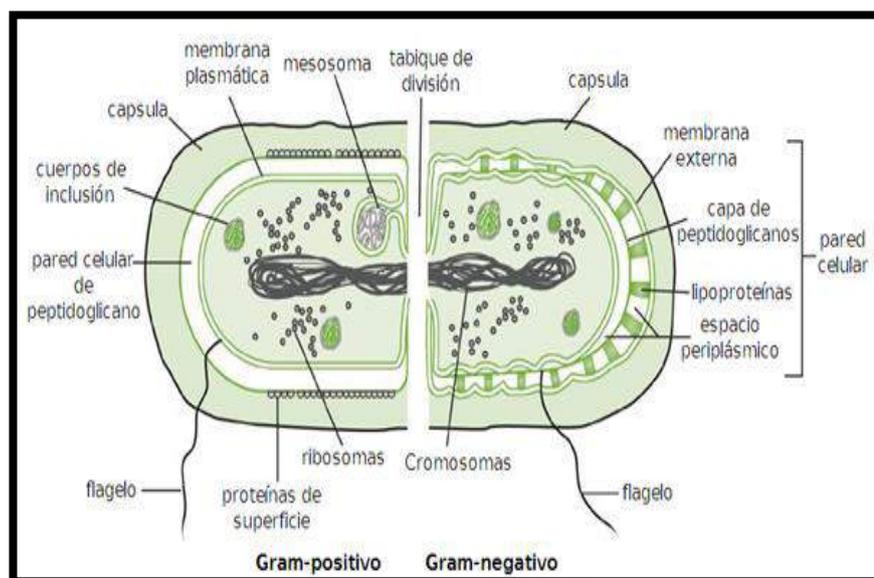
Las bacterias según su tamaño fluctúan entre 0,5  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , es por ello que solo son observables a través del microscopio óptico y electrónico, a diferencia de las células eucariotas que miden más de 5  $\mu\text{m}$  (Pírez & Mota, 2000).

#### 1.2.1.2. Morfología

La variación de rigidez de la pared celular de la bacteria define su forma, se pueden encontrar en cocos (ovalados), bacilos (bastones rectilíneos o curvos) y espirilos (espiral); estos microorganismos pueden encontrarse aislados, unidos en cadenas, en racimos o en filamentos. Su morfología suele ser observada a través de la coloración Gram, que es la tinción más utilizado en bacteriología, las bacterias al ser visualizadas pueden clasificarse en grampositivas o gramnegativas debido al color que se tiñen (Pírez & Mota, 2000).

#### 1.2.1.3. Estructura

Las bacterias grampositivas y gramnegativas presentan pared celular, membrana celular, ribosomas, cromosomas y flagelos. Diferenciándose por la composición y estructura de la pared celular, como se muestra en la Figura 1 (Rosenthal & Tan, 2010). Las estructuras variables, como los flagelos, fimbrias, la cápsula, esporas, no suelen ser fundamentales en el crecimiento y desarrollo de la bacteria, por ello que solo se encuentran en algunas bacterias (Pírez & Mota, 2000).



*Figura 1.* Estructura bacteriana en grampositivas y gramnegativas.

*Fuente:* tomado de Rosenthal & Tan, 2010.

#### 1.2.1.4. Clasificación

Según el árbol filogenético propuesto por Woese, Kandler y Wheelis (1990), a partir de la comparación de secuencias de ARN ribosómico se han identificado tres grupos filogenéticos distintos. Siendo estos los dominios Bacteria, Archaea (ambas procariotas) y Eukarya (que comprende a los eucariotas; es decir, células con núcleo) que surgieron por divergencia y tienen como origen organismos ancestrales (Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009).

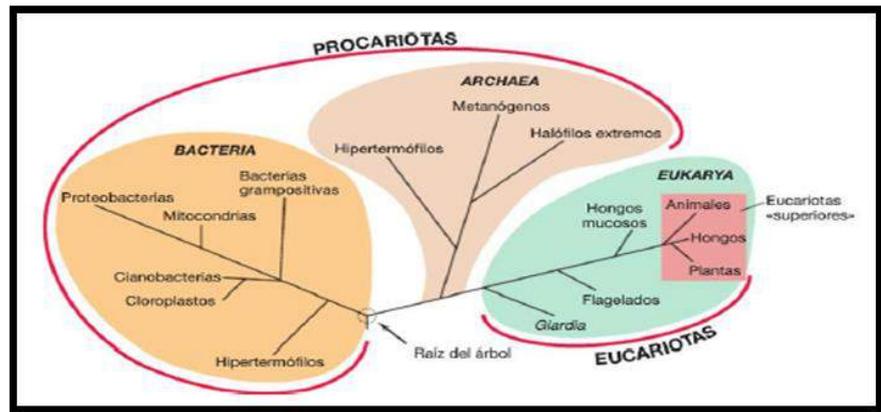


Figura 2. Árbol filogenético de los seres vivos deducido de la secuenciación comparativa del gen del ARN ribosómico.

Fuente: tomada de Madigan, Martinko, Dunlap & Clark, 2009.

### 1.2.2. Bacterias Ácido Acéticas

Las bacterias ácido acéticas (BAA) forman parte de la familia Acetobacteraceae, son bacilos gramnegativos o gram variables, de forma cilíndrica o elipsoidal, con medidas que fluctúan entre 0,4 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho y de 0,8 a 4,5  $\mu\text{m}$  de largo. Las bacterias de este tipo se consideran aerobios estrictos ya que el aceptor final de electrones es el oxígeno (Madigan et al., 2009; Sievers & Swings, 2015; Komagata et al., 2014, citado por Gerard, 2015, p. 2). Se caracterizan por oxidar sustratos derivados de azúcares y alcoholes; por ejemplo, especies del género *Gluconacetobacter* pueden desarrollarse en medios con presencia de fuentes de carbono como glucosa, fructosa y sacarosa; logrando predominar en las etapas finales de la fermentación (Hurtado, Ramos, Parrado y Guzmán, 2011). Las bacterias del género *Gluconacetobacter* son considerados como el género más diverso en la familia Acetobacteraceae y se caracterizan por presentar una diversidad de capacidades fisiológicas, entre ellas, la fijación de nitrógeno, la producción de ácidos orgánicos y la síntesis de biopolímeros (Velasco, 2007).

### 1.2.2.1. *Gluconacetobacter*

Christiaan Persoon, en el año de 1822, fue el primer taxónomo que estudió a este grupo de bacterias y los denominó Mycoderma. Después Pasteur en el año 1868 realizó un estudio sistémico de la fermentación acética, donde demostró que el ácido acético se formaba a partir de la oxidación del etanol y que posteriormente si el proceso de oxidación continuaba producía CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. (Polo & Sánchez, 1991, citado por Gerard, 2015, pp. 2-3). En el año 1879, Hansen observó que los microorganismos capaces de convertir el etanol en ácido acético estaban formados por diferentes especies de bacterias; es por ello que en 1894 las clasificó en función a la formación de una película en los medios líquidos, así como a la reacción con yodo. Beijerinck en el año 1898, sugirió el nombre de “*Acetobacter*” (González, 2005, citado por Gerard, 2015, p. 3).

Las bacterias del género *Gluconacetobacter* son considerados organismos modelos para la producción de celulosa bacteriana, son bacterias gram negativas, se caracterizan por ser aerobios estrictos que realiza fermentación oxidativa teniendo como hábitat las frutas y vegetales en estado de putrefacción (Chávez, Martínez, Contreras y Escamilla, 2004); asimismo las especies del género *Gluconacetobacter* difieren en relación al comportamiento de crecimiento en medios con concentraciones altas de acetato o glucosa (Sievers & Swings, 2015). Morfológicamente presentan forma elipsoidal recta aunque se puede encontrar bacterias con pequeñas curvaturas de 0,6 a 4,0 micrómetros, se pueden encontrar asociadas en parejas, en colonias o simplemente solas (Parant, 2005). Poseen ubiquinona del tipo Q-10 como quinona mayor, asimismo el ácido graso predominante en estas bacterias es el ácido insaturado en cadena lineal C18: 1 ω7 (Sievers & Swings, 2015).

El género *Gluconacetobacter* presenta mayor relevancia en la obtención de celulosa, ya que produce cantidades mayores en comparación a otros géneros y resulta interesante a nivel industrial a partir del consumo de una gran variedad de sustratos (Llaguno & Polo, 1991, citado por Parant, 2005, p. 5).

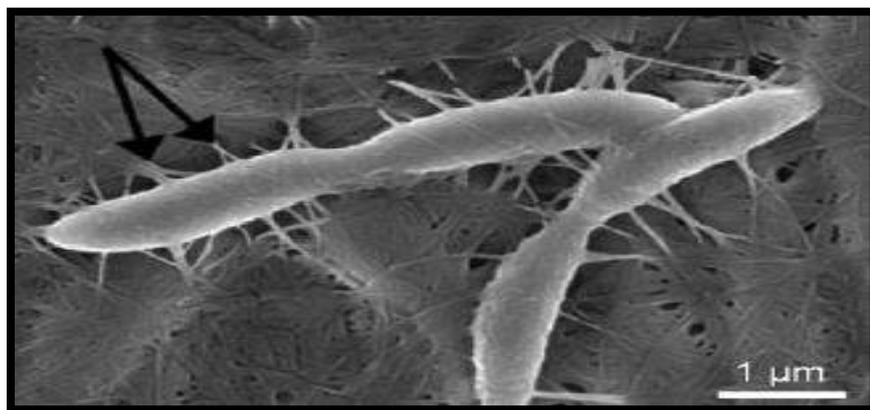


Figura 3. *Gluconacetobacter* sp. en el proceso de creación de nanofibras de celulosa.

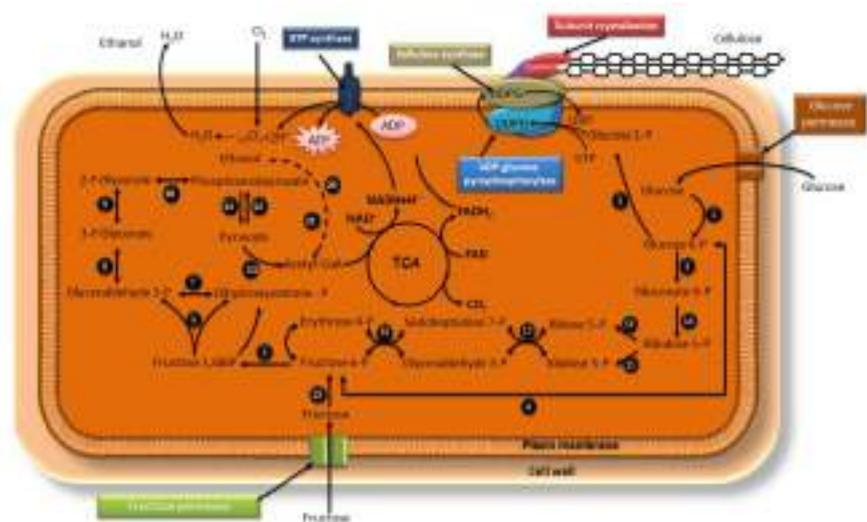
Fuente: tomada de Stanislawska ,2016.

#### 1.2.2.2. Principales rutas catabólicas de *Gluconacetobacter*

Una de las especies de *Gluconacetobacter* más conocidas y en la que se ha estudiado su metabolismo es *Gluconacetobacter xylinus*; a continuación, se describe las rutas catabólicas en éste microorganismo (Figura 4).

Perna (2013) menciona que el etanol se traslada a la parte interna de la célula realizando la oxidación por medio de la alcoholdehidrogenasa de la membrana celular. Para ello la pirroloquinolina quinona (PPQ) es reducida a quinol (PQQH<sub>2</sub>) y el etanol es oxidado a acetaldehído y éste a su vez a ácido acético, parte del ácido acético se libera al medio intracelular y la otra se traslada internamente para ser excretado al medio que le rodea o ser esterificado con el ATP conduciéndolo a la síntesis de acetil-Coenzima A (Figura 5). Perna indica que la sacarosa se hidroliza en

glucosa y fructosa; una fosfohexoquinasa transporta la glucosa, con consumo de una molécula de ATP y la fructosa ingresa a la célula mediante la síntesis del complejo enzimático-sistema de la fosfotransferasa (PTS), que enlaza a la fructosa que cruza la membrana celular con el fosfoenolpiruvato (PEP), fosforilando la hexosa a fructosa 6-fosfato (F6P) con formación de piruvato (Figura 6). La glucosa 6-fosfato (G6P) puede alimentar la ruta de las fosfo-aldosas o de las fosfo-cetolasas (PK), que resulta en la hidrólisis de estos precursores a acetato y eritrosa 4-fosfato (E4P). La E4P puede unirse a la G6P logrando producir seduheptulosa 7-fosfato (S7P) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P), la unión de S7P y G3P conduce a la síntesis de dos moléculas de ribosa 5-fosfato (R5P) La R5P puede descomponerse en acetil-fosfato y G3P.



**Figura 4.** Modelo hipotético de la ruta para la biosíntesis de celulosa por *G. xylinus* a partir de fuentes exógenas- glucoquinasa-ATP. (1); fosfoglucomutasa (2), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3); fosfoglucoisomerasa (4); fructoquinasa ATP (5), aldolasa (6); triosafosfato isomerasa (7); gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (8); fosfoglicerato mutasa (9); enolasa (10); piruvato quinasa (11); piruvato bifosfato cinasa (12), piruvato deshidrogenasa (13); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (14); fosforribulosa epimerasa (15); fosforribulosa isomerasa (16); transacetolasa (17); transaldolasa (18); fructoquinasa (19); aldehído deshidrogenasa (20); alcohol deshidrogenasa (21).

Fuente: tomada de Lustri et al., 2015.

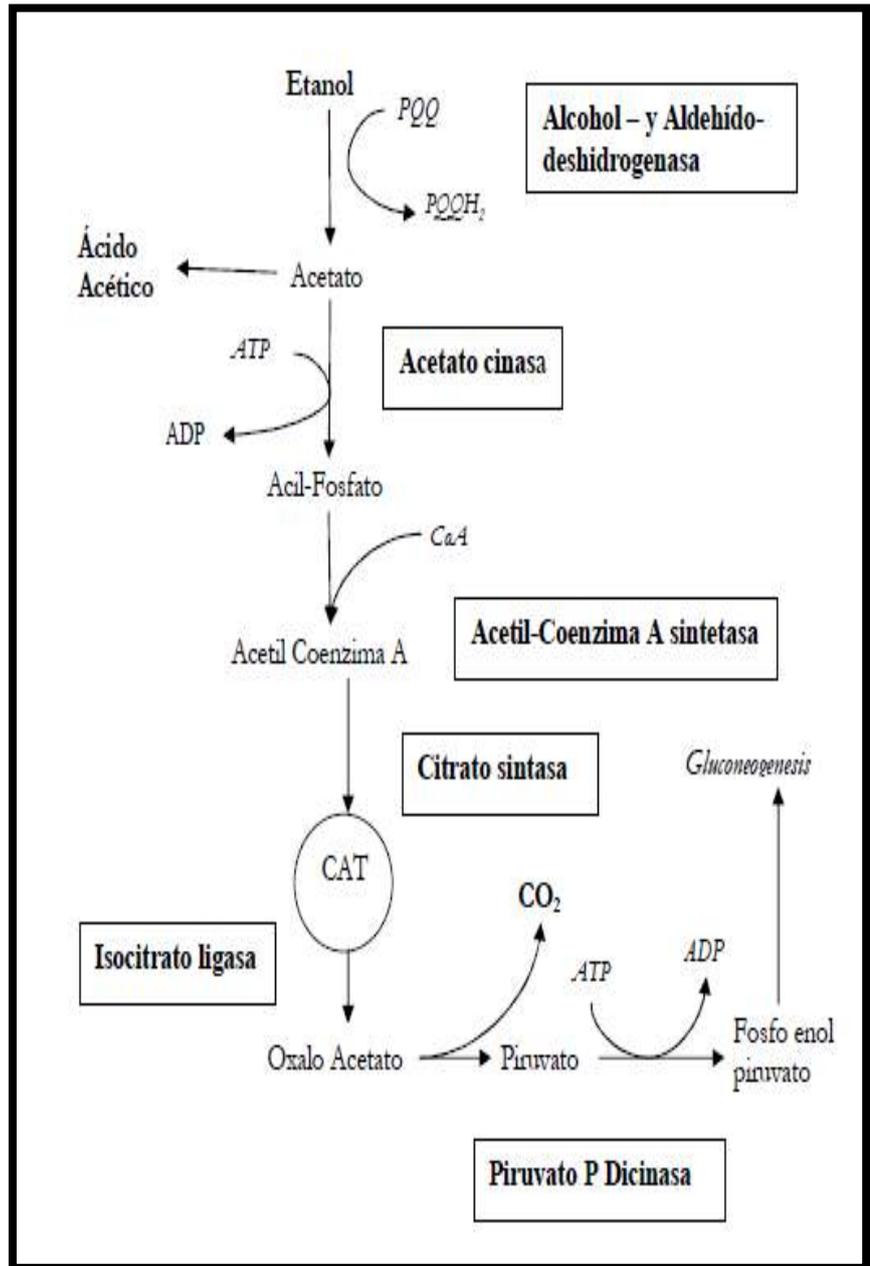


Figura 5. Esquema del catabolismo del etanol y de sus asociaciones con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y con la gluconeogénesis en *Gluconacetobacter* spp.

Fuente: tomada de Velasco, 2007.

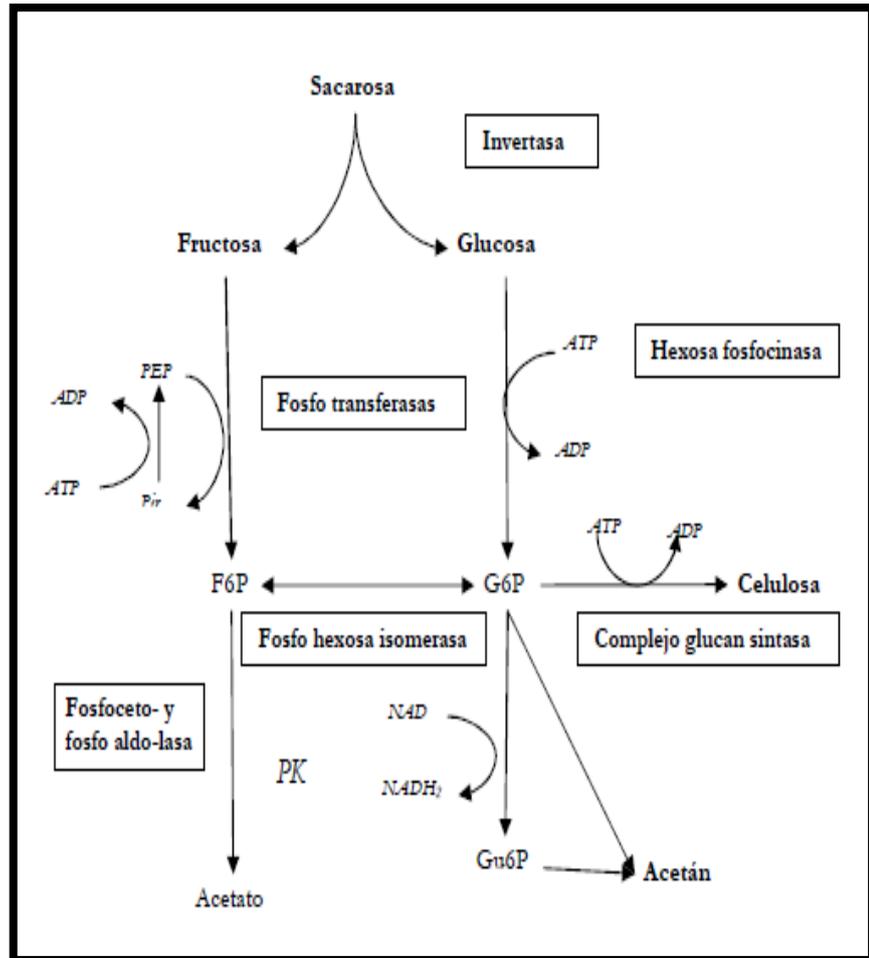


Figura 6. Esquema de las reacciones del catabolismo de la sacarosa en *Gluconacetobacter xylinus*.

Fuente: tomada de Velasco, 2007.

### 1.2.3. Celulosa

La celulosa es considerada un polímero sólido, insoluble en agua y en algunos solventes orgánicos, es biodegradable y no tóxico (Haynes, 1953). Puede ser sintetizado por plantas terrestres, algas y algunos microorganismos (Dumitriu, 2004, citado por Enciso, 2015, p. 5).

La celulosa vegetal, hasta la actualidad, es el polímero más conocido ya que principalmente se extrae de árboles, este tipo de celulosa genera flexibilidad y soporte a la pared celular vegetal. A nivel industrial, para obtener celulosa pura, esta pasa por procesos de remoción debido a que se encuentra asociada

a la lignina y la hemicelulosa, sin embargo este proceso de remoción genera diferentes problemas medioambientales (Wertz, Bédoué y Mercier, 2010).

La celulosa se encuentra formada por moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos, las cuales se constituyen mediante el radical  $-OH$  del carbono hemiacetalico de una glucosa con el grupo alcohol de otro monosacárido (Perna, 2013). La celulosa vegetal contiene 44 – 45 % de carbono; 6,0 – 6,5 % de hidrógeno y el sobrante de oxígeno respecto a su composición, tal como se puede ver en la Figura 7; es así que presenta la siguiente formula empírica:  $C_6 H_{10} O_5)_n$  (Wertz et al., 2010).

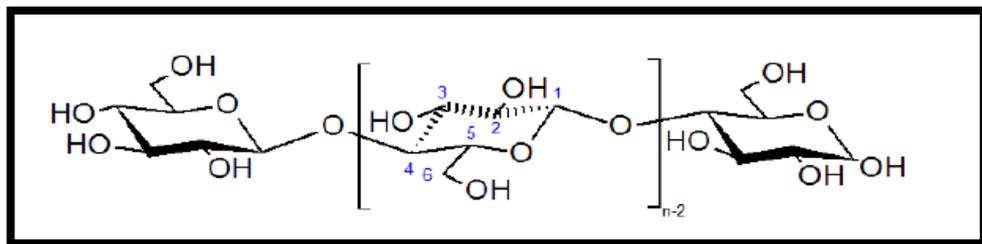


Figura 7. Estructura molecular de la celulosa.

Fuente: tomada de Wertz et al., 2010.

Este tipo de biopolímero posee formas cristalinas con alto y bajo grado de ordenamiento, el cual da origen a su polimorfismo, además sus formas se convierten unas en otras, como se observa en la Figura 8 (Akerholm, 2003, citado por Carreño, 2011, p. 5).

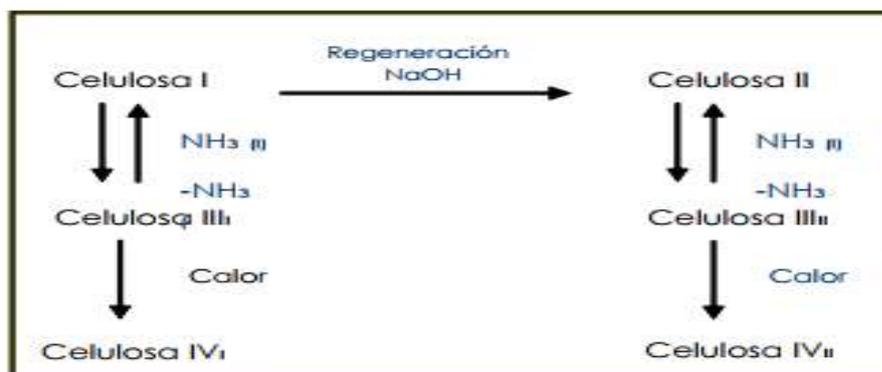


Figura 8. Interconversión de los polimorfos de la celulosa.

Fuente: tomada de O' Sullivan, 1997, citado por Carreño, 2011.

Como alternativa a la celulosa vegetal surge la celulosa bacteriana debido a que presenta igual estructura molecular y polimérica, asimismo presenta diversas características que resultan superiores a la celulosa convencional (Chawla, Bajaj, Survase y Singhal, 2009).

#### **1.2.4. Celulosa Bacteriana**

Brown en el año de 1886 observó la formación de una membrana blanca y translúcida producida en presencia de una bacteria, cuya fórmula molecular era la misma que la celulosa vegetal, así fue que este hallazgo dio inicio a la investigación de la producción de celulosa bacteriana (Brown, 1886, citado por Enciso, 2015, p. 6).

Chávez et al. (2004) mencionan que la celulosa bacteriana es un biopolímero proveniente de la glucosa y se encuentra unido por enlaces covalentes para luego conformar una cadena lineal, asimismo se asocia (cristaliza) por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formando estructuras denominadas “microfibrillas” de celulosa. Los estudios sobre la estructura y las propiedades de este biopolímero muestran que su composición química es idéntica a la de la celulosa de origen vegetal. Sin embargo, existen diferencias significativas respecto a su conformación estructural y propiedades físicas, como se puede observar en la Figura 9, siendo la característica más relevante su pureza (Tabla 1), que la distingue de la celulosa vegetal usualmente asociada a hemicelulosa y lignina; asimismo su alto grado de cristalinidad que se encuentra compuestos de celulosa tipo I $\alpha$  y I $\beta$ . La relación entre las dos formas cristalinas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo como fuente de carbono, suplementos y temperatura (Carreño, Caicedo y Martínez, 2012).

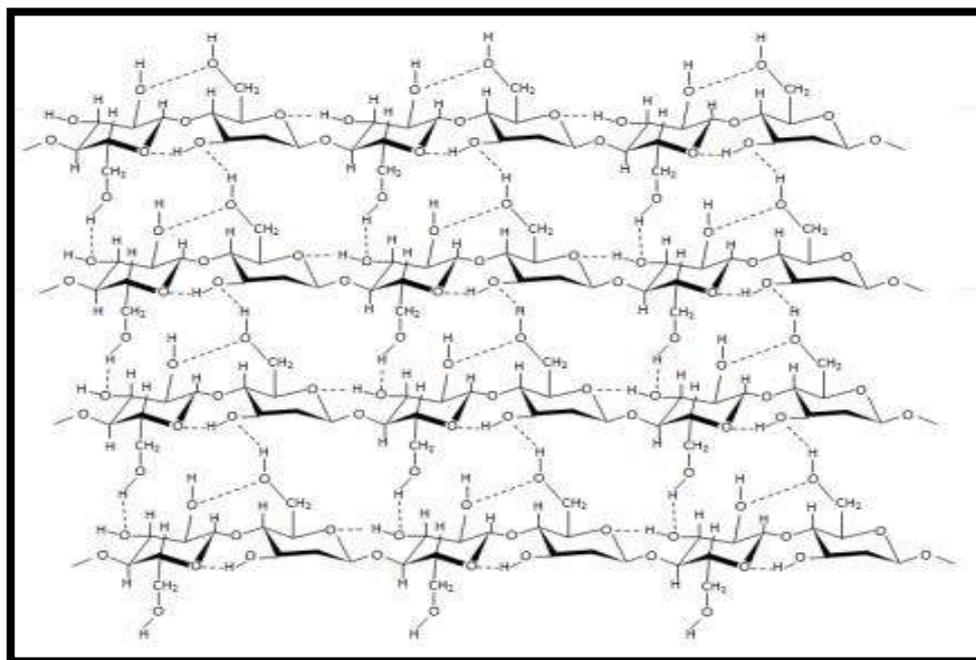


Figura 9. Estructura química de la celulosa bacteriana.

Fuente: tomada de Lustrì et al., 2015.

Tabla 1

Composición de celulosas de diferentes fuentes vegetales en comparación con la celulosa bacteriana

Fuente	Composición (%)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extracto
Bacteriana	98	0	0	0
Algodón	95	2	1	0.4
Henequén	78	4-8	13	4
Ixtle	73	4-8	17	2
Madera	43-47	23-35	16-24	2-8
Bagazo	40	30	20	10

Fuente: Chávez et al., 2004.

#### 1.2.4.1. Morfología de las membranas de celulosa bacteriana

Según su morfología, las membranas de celulosa bacteriana se pueden dividir en densas y porosas. Las membranas del tipo densas son empleadas para el desarrollo de procesos de ósmosis inversa

debido a que no presenta una vía fija para el transporte de moléculas sino a través del movimiento de las cadenas de la membrana por medio de sus segmentos. Respecto a las membranas porosas, estas se caracterizan por presentar vías que permiten el paso de las moléculas, son utilizadas en procedimientos de micro, ultra y nanofiltración. Ambos tipos de membranas pueden variar sus características dependiendo del espesor (Figura 10), de este modo resultan ser isotrópicos o anisotrópicos (Carreño, 2011).

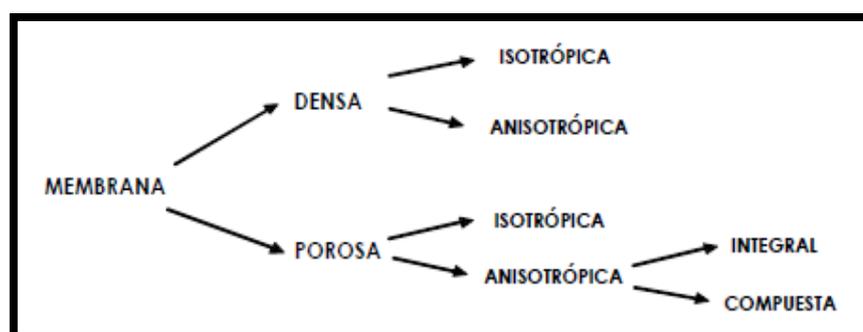


Figura 10. Clasificación de las membranas de celulosa bacteriana.

Fuente: tomada de Habert et al., 2006, citado por Carreño, 2011.

#### 1.2.4.2. Síntesis de celulosa bacteriana

Carreño et al. (2012) indican que la síntesis de celulosa consta de dos etapas principales: la primera comienza con la conversión de la glucosa en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa), sustrato usado para producir la celulosa; y la segunda etapa es la formación de la celulosa y su secreción al medio del cultivo (Figura 11).

Chávez et al. (2004) mencionan que para la biosíntesis de celulosa bacteriana operan dos vías anfibólicas: el ciclo de las pentosas fosfato que participa en la oxidación de carbohidratos, y el ciclo de Krebs que oxida ácidos orgánicos. La glucólisis no se realiza debido a la carencia en la enzima fosfofructocinasa 1, que es responsable de la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. La bacteria puede producir glucosa nuevamente a partir

de sustratos como glicerol, citrato y otros intermediarios del ciclo de Krebs mediante gluconeogénesis.

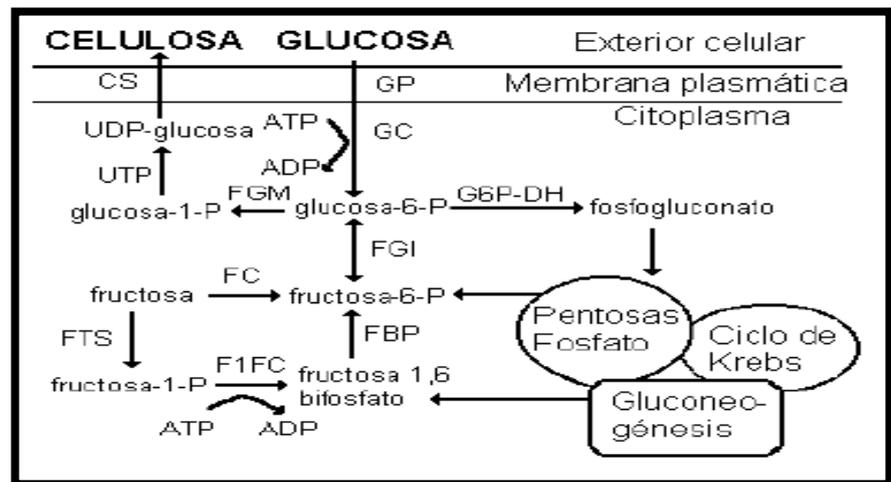


Figura 11. Rutas de síntesis de celulosa en *Gluconacetobacter xylinus*. CS, celulosa sintasa; FBP, fructosa bifosfatasa; FC, fructocinasa; F1FC, fructosa-1-P cinasa, FGI, fosfoglucoisomerasa; FGM, fosfoglucomutasa; FTS, fosfofructotransferasa; GC, glucocinasa; GP, glucosa permeasa; G6P-DH, glucosa-6-P deshidrogenasa; UGP, uridin difosfato glucopirofosforilasa.

Fuente: tomada de Chávez et al., 2004.

#### 1.2.4.3. Modelos de síntesis y extrusión de celulosa bacteriana

El polímero de celulosa sintetizado en el citoplasma atraviesa la membrana plasmática para luego aparecer en la zona extracelular, en donde se asocia a otras cadenas de celulosa a través de puentes de hidrógeno dando origen a formaciones cristalinas. A continuación, se expone diferentes modelos hipotéticos describiendo el proceso de la biogénesis de la celulosa bacteriana, como se observa en la Figura 12 (Chávez et al., 2004).

a) Modelo I: Propone que la polimerización se lleva a cabo en el citoplasma y por consiguiente la catálisis del UDP-glucosa ocurre en ese lugar, a la vez que la celulosa sintasa facilita una estructura porosa para que se pueda realizar el proceso de la extrusión.

b) Modelo II: Plantea que la catálisis se encuentra en la parte extracelular, lugar donde se lleva a cabo la polimerización, asimismo este modelo no considera el proceso de extrusión dentro de la biogénesis de la celulosa bacteriana.

c) Modelo III: Considera el proceso de extrusión como parte fundamental en las etapas de la biogénesis y menciona que la polimerización se da en el citoplasma, este modelo menciona que se requiere de la asociación de un intermediario lipídico a la UDP-glucosa para lograr su catálisis.

d) Modelo IV: Este modelo señala que existe una asociación entre un compuesto lipídico y la glucosa (lipidil-UDP-Glucosa) en el citoplasma que está en contacto con la membrana celular, de modo que este intermediario lipídico se mueve al lado exterior de la membrana celular, donde una transferasa aditiva cataliza la polimerización. Por lo tanto, este modelo requiere de dos sitios catalíticos en la membrana celular, uno ubicado en el lado citoplásmico y el otro al lado extracelular. La polimerización se realiza en el espacio extracelular. Este modelo no requiere de un proceso de extrusión.

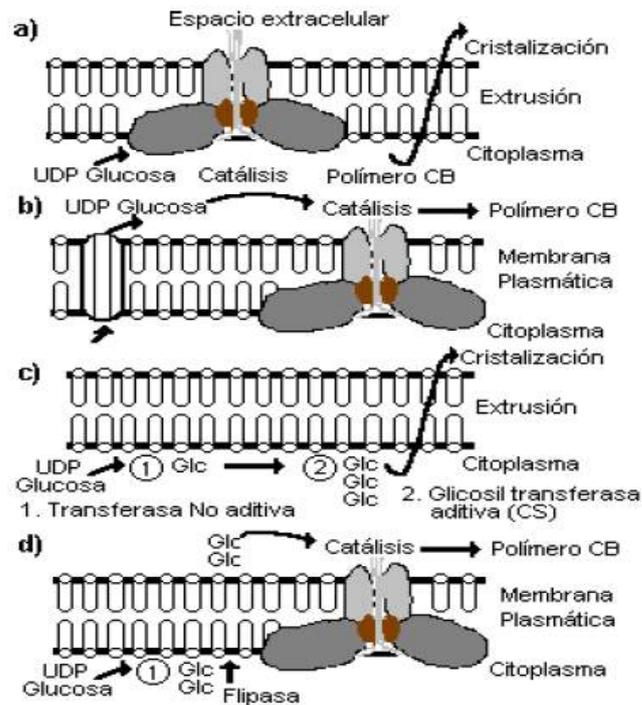


Figura 12. Modelos de los mecanismos de síntesis y extrusión de la celulosa bacteriana. CS: celulosa sintetasa, CB: celulosa bacteriana.

Fuente: tomada de Chávez et al., 2004.

#### 1.2.4.4. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la celulosa bacteriana

En la obtención de la celulosa bacteriana se debe considerar las siguientes condiciones para su producción:

a) Temperatura: La producción de celulosa requiere de un rango específico de temperatura para evitar que el microorganismo se sienta limitado respecto a su crecimiento, es por ello que el rango óptimo es de 28 a 32 °C (Chávez et al., 2004).

b) Oxígeno: Las bacterias productoras de la celulosa bacteriana, como *Gluconacetobacter xylinus*, se caracterizan por ser microorganismos aerobios estrictos; por tanto, el desarrollo de la fermentación se debe realizar en altas cantidades de oxígeno (Parant, 2005).

c) Potencial de Hidrógeno: En la obtención de la celulosa bacteriana influye el nivel de acidez del medio de cultivo debido a que un pH menor a 4 puede interferir en el desarrollo de la bacteria y por consiguiente obstaculizar la producción de celulosa (Danesi & Wosiacki, 1998), por lo tanto, el pH óptimo para el desarrollo de la bacteria está entre 4,5 y 5.5 (Perna, 2013).

d) Presión: Este parámetro promueve la síntesis de la celulosa bacteriana, sin embargo, el aumento en la presión de cultivo de 1 a 30 atm disminuye el espesor de la película y puede manifestar algunos cambios en la estructura de la celulosa. Por ello, la presión máxima para el crecimiento celular y para la producción de celulosa es de 30 atm (Hult et al., 2003, citado por Carreño, 2011, p. 20).

#### 1.2.4.5. Medios de producción de celulosa bacteriana

El medio de cultivo más usado para la elaboración de celulosa bacteriana es el Hestrim – Schramm (H–S) debido a que facilita la producción de las láminas de celulosa bacteriana. Este medio de cultivo tiene glucosa como fuente de carbono, sin embargo, algunos investigadores han realizado pruebas experimentales con la finalidad de encontrar mayor variedad de fuentes de carbono, por ejemplo fructosa, galactosa, sacarosa, glicerol, manitol y algunos ácidos orgánicos para la obtención de celulosa bacteriana (Ruka, Simon y Dean, 2012). Sin embargo, debido a los elevados costos de este tipo de sustratos, se ha optado por reemplazarlos con residuos de tipo agroindustriales y algunos subproductos (Tabla 2), que poseen características similares, aunque requieran ciertos suplementos para potenciar sus efectos en la producción de celulosa bacteriana (Enciso, 2015).

Tabla 2

*Sustratos utilizados como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana*

<b>Sustrato</b>	<b>Referencia</b>
<i>Helianthus tuberosus</i> (alcachofa de Jerusalén)	(Hong, 2011)
Extracto de harina de soya	(Qiu & Netravali, 2013)
Paja de trigo	(Hong, 2012)
Suero de queso	(Carreira et al., 2011)
Residuos de la industria textil a base de algodón	(Hong et al., 2012)
Melazas como de remolacha o caña de azúcar	(Keshk & Sameshima, 2006)
Cascarilla de la cereza del café	(Rani & Appaiah, 2011b)
Polvo hidrolizado de Konjac	(Hong & Qiu, 2008a)

*Fuente:* Enciso (2015).

#### 1.2.4.6. Perspectivas biotecnológicas de la celulosa bacteriana

A la celulosa bacteriana se le atribuye diferentes aplicaciones industriales debido a las características físicas y químicas que presenta en su composición. Por lo tanto, compañías como Johnson & Johnson emplean la celulosa bacteriana para fines médicos, por ejemplo, en la curación de heridas como material de cubierta en la protección de infecciones (Chávez et al., 2004). Asimismo en la industria papelera se viene utilizando la celulosa bacteriana para la recuperación de importantes documentos, logrando reemplazar a la celulosa vegetal como materia prima para la elaboración de papel (Basta & El-Saied, 2009, citado por Carreño, 2011, p. 16).

Las características y propiedades que posee la celulosa bacteriana la llevan a posicionarse en el campo de la industria médica,

papelera y otros, como se observa en la Tabla 3, logrando un futuro prometedor para este biomaterial (Chávez et al., 2004).

Tabla 3

*Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriano*

<b>Industria</b>	<b>Aplicaciones</b>
Cosmética	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas.
Refinería	Material para absorción de toxinas y aceites.
Papel	Restauración de documentos, papel de alta calidad.
Investigación	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía.
Medicina	Fabricación de “piel artificial” en terapia de quemaduras. Componente en implantes dentales.

*Fuente:* Chávez et al., 2004.

### 1.2.5. Técnicas de fermentación

Carreño et al. (2012) hacen referencia a las técnicas utilizadas para producir celulosa bacteriana a través del cultivo estático y el agitado. De esta manera, se ha observado que la morfología de la celulosa difiere según la técnica empleada para la obtención de la biopelícula.

#### 1.2.5.1. Cultivo estático

Con este tipo de cultivo se observa que el biopolímero forma una película (sobrenadante) debido a que el microorganismo incrementa su población gracias al consumo de oxígeno disuelto que se encuentra en la parte superficial del medio líquido. Es así que las bacterias que se encuentran en las inmediaciones de la

interface aire/medio de cultivo tienen mayor disponibilidad de oxígeno y por ende logran producir mayor cantidad de celulosa, la cual se forma a través de capas superpuestas según transcurre el tiempo de fermentación (Perna, 2013).

#### 1.2.5.2. Cultivo agitado

En la técnica de cultivo agitado se obtiene pellets o aglomeraciones amorfas de las fibras de celulosa, los cuales van a depender del tipo de reactor empleado; por ejemplo, puede utilizarse reactores de tanque agitado o reactores airlift. Este tipo de cultivo se investiga con el propósito de llevar el proceso a nivel industrial (Perna, 2013). Sin embargo, el cultivo agitado presenta dificultades debido a que la bacteria genera mayor ácido glucónico en la síntesis de glucosa disminuyendo la producción de celulosa bacteriana (Carreño et al., 2012).

### 1.2.6. La planta de arándano

El arándano o blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) es nativa de Norteamérica. En cuanto a su cultivo, en Estados Unidos se encuentra el 57 % del total de las plantaciones mundiales, en Sudamérica el 23 %, en Europa el 11 %, Asia el 8 % y en África el 1 % (Mesa, 2015). En el Perú, en el departamento de La Libertad se presenta la mayor producción de arándano, concentra aproximadamente el 90% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI], 2016).

#### 1.2.6.1. Taxonomía

El arándano alto, blueberry o “highbush” posee el nombre científico *Vaccinium corymbosum* L. (Buzeta, 1997, citado por Mesa, 2015, p. 18). Según el sistema de clasificación propuesto por Ruggiero et al. (2015), presenta la siguiente distribución:

Reino : Plantae  
División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Orden : Ericales  
Familia : Ericaceae  
Género : *Vaccinium*  
Especie : *Vaccinium corymbosum* L.

#### 1.2.6.2. Descripción botánica

El arándano *Vaccinium corymbosum*, es un arbusto perenne, leñoso, con una altura máxima de tres metros. Las hojas son ovadas a angostamente elípticas, con un margen entero aserrado, de uno a ocho centímetros de largo y coloración verdosa. Las flores son blancas, a veces con tonos rosados en los pétalos (Figura 13); son pedunculadas, axilares o terminales, dispuestas en racimos, corola cilíndrica, urceolada o campanulada; el cáliz está unido al ovario, presenta de ocho a diez estambres insertados en la base de la corola (Buzeta, 1997, citado por Mesa, 2015, p. 18). El fruto es una baya de forma esférica de 0,7 a 1,5 cm de diámetro (Mesa, 2015), es de color negro opaco, o azul gris, en ocasiones negro brillante, el fruto puede poseer un aproximado de 100 semillas dentro del endocarpio. Las semillas son dimórficas de color marrón, el tamaño varía según el peso de la baya, debido a esto existe semillas pequeñas pálidas e imperfectas (Muñoz, 1988, citado por Mesa, 2015, p. 18; Vander, 1980).

Las raíces de la planta de *V. corymbosum*, como todas las ericaceas, presentan simbiosis con hongos micorrizales que mejoran el desarrollo de la planta incrementando la captación de nutrientes y brindando protección a la planta de arándano, evitando el ingreso de sustancias tóxicas.

La especie de hongos que realizan simbiosis con el arándano es *Hymenoscyphus ericae* (D.J. Read) Korf & Kernan (Mesa, 2015).

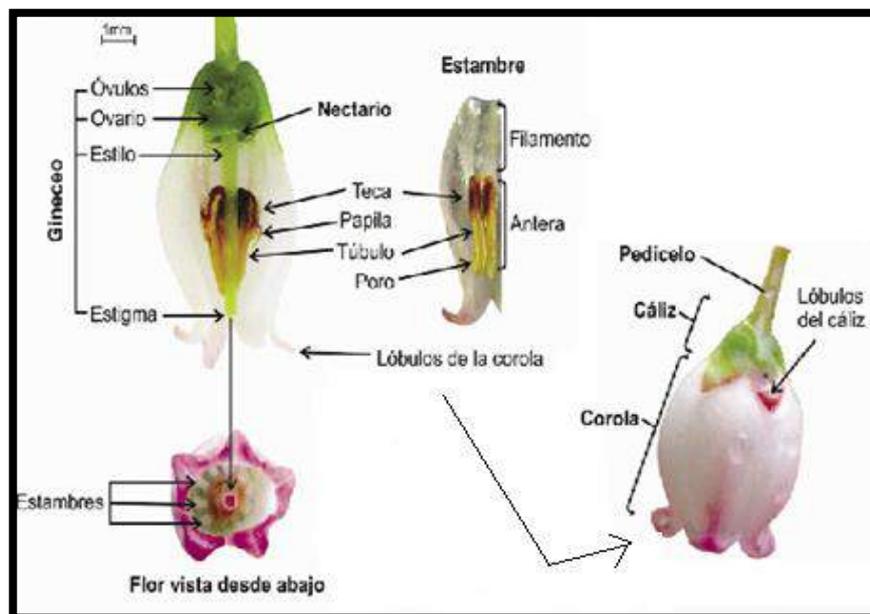


Figura 13. Partes de la flor del género *Vaccinium* (arándano).

Fuente: tomada y modificada de Chamorro & Nates-Parra (2015).

### 1.2.6.3. Descripción físico-química del fruto de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

El análisis fisicoquímico de *Vaccinium corymbosum* evaluado en 100 g de la fruta se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

*Características físico-químicas del fruto de la especie Vaccinium corymbosum*

Determinación	Composición (%)
<b>Humedad</b>	84,6*
<b>Proteínas</b>	1,12
<b>Ceniza</b>	0,19
<b>Azúcar Total</b>	10,65
<b>Fibra dietética</b>	2,86
<b>Carbohidratos</b>	13,51

Fuente: Sapers (1984), \*Senser & Scherz (1999).

Respecto a la cantidad de azúcares totales del arándano, se empleó el valor de 4,0 % (United States Department of Agriculture [USDA], 2018), el cuál sirvió para la estimación de la fuente de carbono en los tratamientos de la presente investigación.

## 1.2.7. La planta de Manzano

### 1.2.7.1. Taxonomía

La manzana con nombre científico *Malus domestica* (Suckow) Borkh, de acuerdo con el sistema de clasificación propuesto por Ruggiero et al. (2015), presenta la siguiente clasificación:

Reino : Plantae  
División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Orden : Rosales  
Familia : Rosaceae  
Género : *Malus*  
Especie : *Malus domestica* (Suckow) Borkh

### 1.2.7.2. Descripción botánica

El manzano es un árbol que puede alcanzar los 10 metros de altura y tiene una copa en forma de globo. El tronco es recto, de 2 a 2,5 metros de altura, la corteza es lisa y de color ceniciento verdoso sobre los ramos. Las ramas se insertan en ángulo abierto sobre el tallo, presentan un color verde oscuro y los brotes jóvenes terminan en una espina. Las hojas son ovaladas, de bordes aserrados, con el haz de color verde claro, con 4-8 nervios alternados y de 4,13 cm de largo. Las flores son hermafroditas de color rosa pálido y a veces blanco (Figura 14); cáliz y corola pentámeros, ovario ínfero y 20 estambres. El fruto es un pomo, de

forma achatada y/o redondeada con restos de cáliz en el ápice, con semillas de 4 mm (Figura 14) (FAUTAPO, 2014).

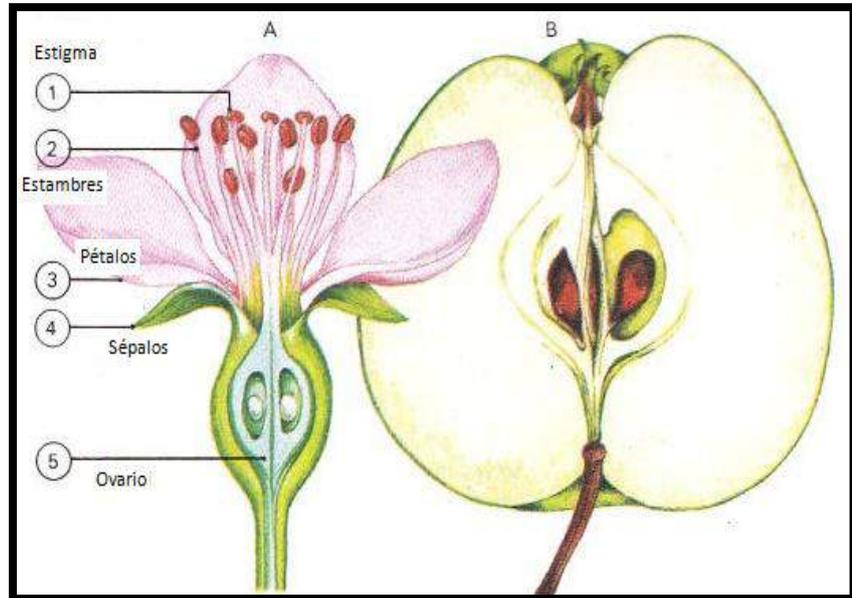


Figura 14. Partes de la flor de la planta *Malus domestica* (manzano).

Fuente: tomada de Francis (1984).

### 1.2.7.3. Descripción fisicoquímica del fruto de *Malus domestica* (manzano)

El fruto del manzano presenta un elevado contenido en potasio y un bajo contenido en sodio. Es importante destacar el alto contenido de ácido málico aunque depende de la variedad y del tiempo de almacenamiento (Alonso, 2011). El fruto del manzano presenta una diversidad de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa, así como componentes y propiedades nutritivas que la califican como una de las frutas más completa (FAUTAPO, 2014).

El análisis fisicoquímico de *Malus domestica* evaluado en 100 g de la fruta se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

*Características físico-químicas del fruto de la especie Malus domestica*

<b>Determinación</b>	<b>Composición (%)</b>
<b>Agua</b>	82,1
<b>Sólidos</b>	17,9
<b>Cenizas</b>	0,24
<b>Densidad</b>	1,06
<b>pH</b>	4,0
<b>Azúcar Total</b>	14,1

*Fuente:* Erazo, Leoncio, Robles y Huamán (2001).

Respecto a la cantidad de azúcares totales de la manzana, se empleó el valor de 10,4 % (United States Department of Agriculture [USDA], 2012), el cual sirvió para la estimación de la fuente de carbono en los tratamientos de la presente investigación.

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. LUGAR Y FECHA**

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, en el distrito de Los Olivos, Lima. El experimento se inició en setiembre del 2017 y finalizó en diciembre del 2017.

### **2.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

#### **2.2.1. Descripción del Experimento**

La investigación se realizó en dos etapas experimentales; (i) aislamiento, caracterización y obtención de *Gluconacetobacter* sp. a partir del vinagre de manzana (Figura 15) y (ii) producción y análisis de celulosa bacteriana mediante la fermentación de *Gluconacetobacter* sp., que se obtuvo en la primera etapa, sobre diferentes formulaciones de sustratos líquidos elaborados a partir de extractos de manzana y arándano de descarte (Figura 16).

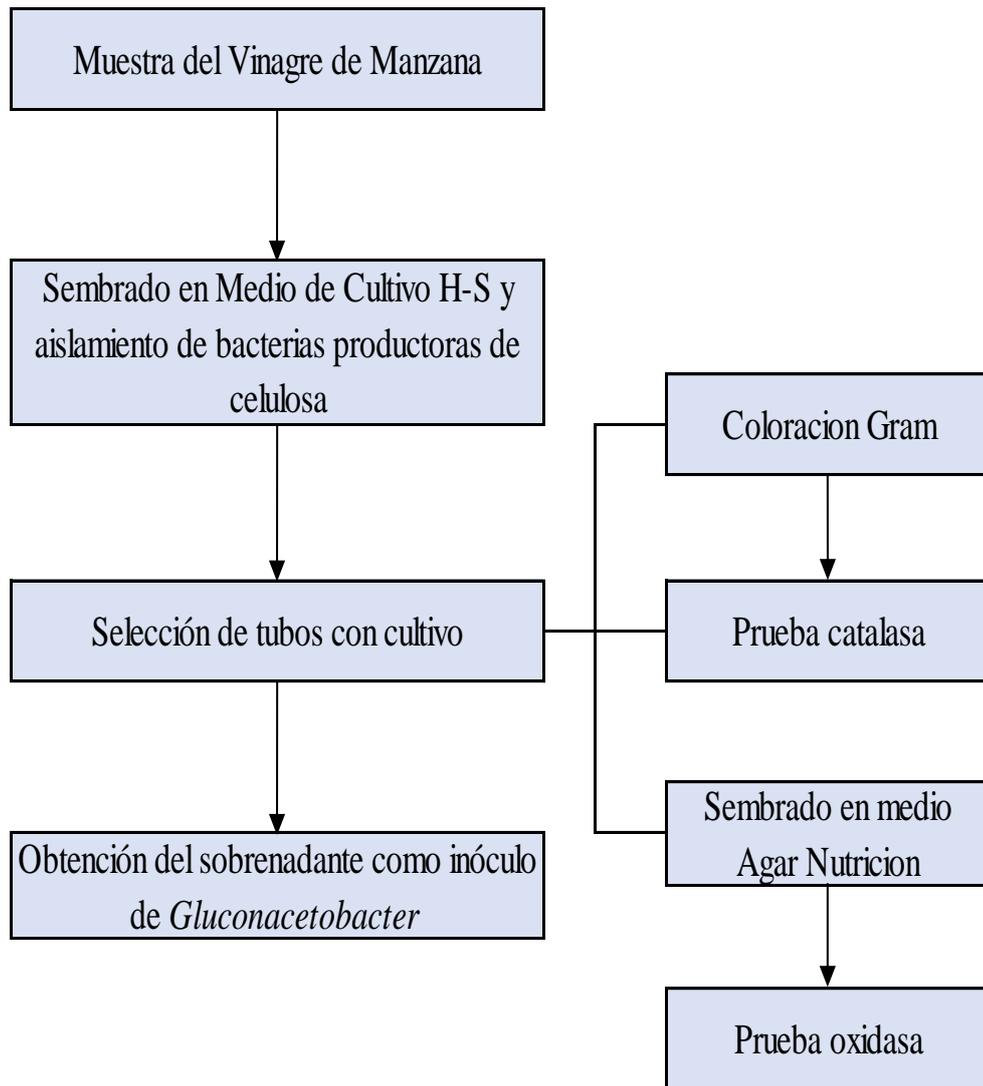


Figura 15. Diagrama de flujo para la obtención del inóculo de *Gluconacetobacter*.

Fuente: Elaboración propia.

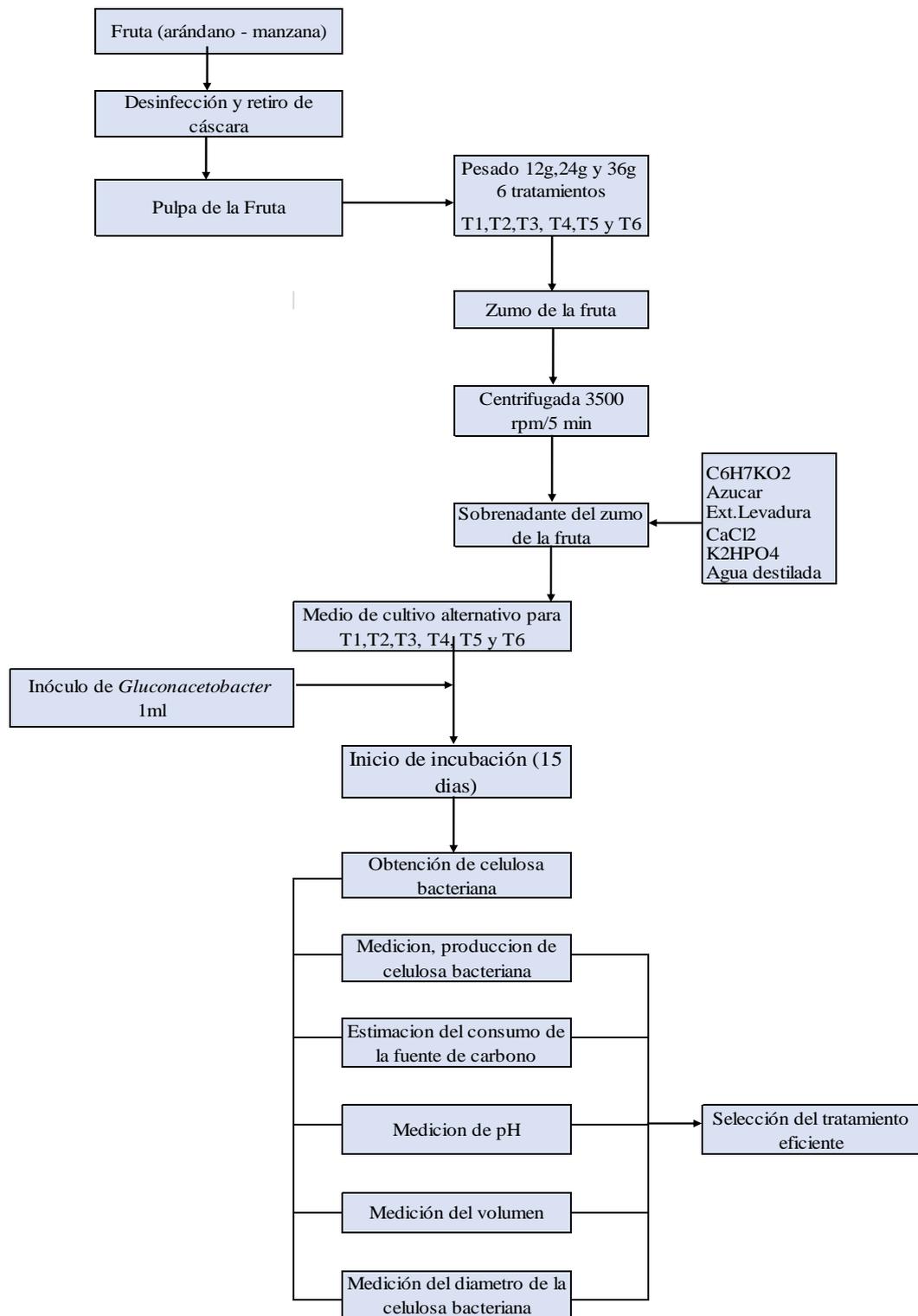


Figura 16. Diagrama de flujo para la obtención de celulosa bacteriana a partir de pulpa de arándano y manzana.

Fuente: Elaboración propia.

### 2.2.2. Aislamiento de bacterias del género *Gluconacetobacter*

Se aisló bacterias del género *Gluconacetobacter* de una muestra de vinagre de manzana procedente de la provincia de Huarochirí, Lima. El medio Hestrin y Schramm (H-S) fue empleado como medio de cultivo selectivo para *Gluconacetobacter* (Hurtado et al., 2011), cuya composición se muestra en la Tabla 6. El medio se preparó en agua destilada y se ajustó el pH a 5,5 usando hidróxido de sodio 0,1 N, luego fue autoclavado a 15 p.s.i. y 121 °C durante 15 minutos; una vez esterilizado, 9,0 ml del medio H-S se sirvió en tubos de ensayo de 13 ml de capacidad. Con la ayuda de una micropipeta, 1,0 ml de la muestra de Vinagre de Manzana se sembró en los tubos de ensayo y se homogenizó con un Agitador Vortex Kyntel modelo XH-D. Finalmente, se incubó la batería de tubos durante 6 días a una temperatura de 32 °C (Figura 17).

Tabla 6

*Composición medio de cultivo Hestrin – Schramm*

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
<b>Glucosa</b>	20
<b>Peptona</b>	5
<b>Extracto de levadura</b>	5
<b>Fosfato disódico</b>	2,7
<b>Ácido cítrico</b>	1,15
<b>pH</b>	5,5

*Fuente:* Hestrin y Schramm (1954).



Figura 17. Materiales para el aislamiento de *Gluconacetobacter*. A: Medio de cultivo Hestrin – Schramm. B: Muestra de Vinagre de manzana. C: Tubos de ensayo con siembra de la muestra.

Fuente: Elaboración propia.

### 2.2.3. Caracterización morfológica y bioquímica de la cepa aislada

Según las recomendaciones de Hurtado et al. (2011), se procedió a realizar la coloración Gram de la bacteria aislada y a través de un microscopio óptico se observaron sus características morfológicas: color, forma y tamaño de las células.

La caracterización bioquímica se realizó mediante las pruebas de catalasa y oxidasa (Hurtado et al., 2011). Para la prueba de catalasa, se extrajo una muestra de la colonia aislada del medio H-S y se colocó sobre una lámina de portaobjeto, seguidamente se agregó dos gotas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3 % para observar la reacción positiva (producción de burbujas) o negativa.

Para la prueba de oxidasa, se extrajo con un asa de siembra una pequeña muestra de colonia cultivada en placas petri con agar nutritivo y se depositó en una lámina porta objeto que contenía 0,2 ml de agua destilada.

Posteriormente se puso en contacto esta suspensión con un disco de papel impregnado del reactivo de Kovacs (p-dimetil anilino benzaldehído) y finalmente se hizo la interpretación de la prueba (Gamazo et al., 2005, citado por Gerard, 2015, p. 65); positiva cuando el color azul oscuro del reactivo pasa a azul-violeta (presencia de citocromo oxidasa).

#### **2.2.4. Selección de inoculante óptimo para los tratamientos**

Se seleccionó los tubos de ensayo con cultivo de *Gluconacetobacter* sp., que presentaron mayor turbidez y formación de una nata blanquecina en la superficie del medio de cultivo, características que evidencian el crecimiento de *Gluconacetobacter* sp. El sobrenadante de los cultivos seleccionados sirvió como inoculante para los tratamientos que se describen a continuación (Jaramillo et al., 2012).

#### **2.2.5. Preparación del medio de cultivo alternativo para los tratamientos**

Se preparó un medio de cultivo alternativo al cual se le adicionó extractos de arándano o de manzana a diferentes concentraciones (los tratamientos); el extracto de arándano de descarte se adicionó en concentraciones de 10 % (Tratamiento 1, T1), 20 % (Tratamiento 2, T2) y 30 % (Tratamiento 3, T3); así mismo, el extracto de manzana de descarte se adicionó en concentraciones de 10 % (Tratamiento 4, T4), 20 % (Tratamiento 5, T5) y 30 % (Tratamiento 6, T6) (Tabla 8).

Para la extracción de la pulpa del arándano y la manzana se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio al 4 % p/p, se retiró la cáscara y obtuvo la pulpa. Posteriormente se pesó en una balanza analítica Digital Precisión modelo ESJ 2004, 12 g, 24 g y 36 g de pulpa de ambas frutas según lo recomendado por Parant (2005) (Figura 18).



*Figura 18.* A: Peso de la pulpa de arándano para los diferentes tratamientos. B: Zumos de arándano para los diferentes tratamientos. C: Zumos de arándano centrifugados. D: Medición de pH del medio de cultivo alternativo.

*Fuente:* Elaboración propia.

Se extrajo el zumo del arándano y de la manzana con la ayuda de un mortero y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante de los zumos de ambas frutas y se le adicionó sorbato de potasio, sacarosa, extracto de levadura, cloruro de calcio, fosfato de potasio y agua destilada hasta alcanzar 1000 ml de volumen final; las cantidades necesarias para el preparado se muestran en la Tabla 7. Se ajustó el pH a 5,6 con hidróxido de sodio 0,1 N. Finalmente se esterilizó los seis recipientes conteniendo el medio de cultivo alternativo, en la autoclave a 15 p.s.i. 121 °C por 15 minutos (Parant, 2015). (Figura 19)

Tabla 7

*Composición del medio de cultivo alternativo para 1 L*

Ingrediente	Cantidad g
Sorbato de potasio	0,13
Sacarosa	126,6
Extracto de levadura	12,65
Cloruro de calcio	7,59
Fosfato de potasio	3,79
Agua destilada	849

*Fuente:* Parant (2005).



*Figura 19.* A: Peso de la pulpa de manzana para los diferentes tratamientos. B: Zumos de manzana para los diferentes tratamientos. C: Zumos de manzana centrifugados. D: Medición de pH del medio de cultivo alternativo.

*Fuente:* Elaboración propia.

### 2.2.6. Inóculo de *Gluconacetobacter* sp. a los medios preparados con zumo de arándano y manzana

En cada recipiente de vidrio estéril (de 100 ml de capacidad) se depositó 33 ml de los medios preparados con los zumos de fruta para los seis tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) con 3 réplicas para cada uno, respectivamente. Para el Control (TC) de ambas frutas se adicionó 33 ml del medio de cultivo alternativo sin presencia de zumos de fruta. Posteriormente se aplicó 1 ml del inóculo (sobrenadante) de *Gluconacetobacter* sp. a cada tratamiento, con la ayuda de una micropipeta (Figura 20). Se cubrió cada recipiente con un paño poroso para facilitar el ingreso de oxígeno y lograr el crecimiento de estas bacterias aerobias. Finalmente todos los frascos fueron depositados en la incubadora con circulación de aire Kert-Lab modelo 9070 a una temperatura de 32 °C durante 15 días (Jaramillo et al., 2012).



Figura 20. A: Inoculación de *Gluconacetobacter* sp. en los tratamientos con zumo de arándano. B: Inoculación de *Gluconacetobacter* sp. en los tratamientos con zumo de manzana.

Fuente: Elaboración propia.

### 2.2.7. Selección del tratamiento más eficiente en la producción de celulosa bacteriana

La selección del tratamiento más eficiente para la producción de la celulosa se realizó mediante la medición de los siguientes parámetros.

#### a) Medición de la producción de la celulosa bacteriana

La evaluación de la producción de celulosa fue dado en g/L, se realizó a través del peso húmedo de cada película obtenida en cada 33 ml de volumen, en los diferentes tiempos de cultivo (7 y 15 días) para los seis tratamientos, incluyendo las réplicas y los controles (Figura 21). Para ello se extrajo de cada recipiente el biopolímero producido, luego fue depositado en una placa Petri y enseguida se pesó en la balanza analítica Digital Precision modelo ESJ200-4 (Jaramillo et al., 2012).



*Figura 21.* Peso de la celulosa bacteriana obtenida por el tratamiento control.

*Fuente:* Elaboración propia.

#### b) Estimación del consumo de la fuente de carbono

Tal cómo se indicó en la descripción fisicoquímica del arándano y de la manzana, se consideró que el valor de los azúcares totales fue de 4,0 % y

10,4 %, debido a que se asumió dichos valores desde la fase preliminar del presente trabajo de investigación; es así que junto a la sacarosa del medio de cultivo, conformaron la fuente de carbono inicial que utilizaron los sustratos de arándano y manzana, para cada tratamiento.

La estimación del consumo de la fuente de carbono en los tratamientos, se realizó después de concluida la etapa de producción de celulosa. Se empleó la metodología Fenol Ácido Sulfúrico recomendado por Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith (1956), para ello se pesó 0.1 g de la muestra líquida en un tubo de ensayo y se llevó a hidrolizar junto a 5 ml de HCl al 2,5 N a una temperatura de 100 °C durante 3 horas. Luego se neutralizó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para detener la efervescencia y seguidamente se agregó agua destilada hasta 100 ml y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos; luego se pasó a pipetear 0,2 ml a un tubo de ensayo y se llevó a 1 ml con agua destilada. A continuación se agregó 1 ml de la solución Fenol al 5 %, luego se agregó 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96 % y se dejó reposar durante 10 minutos, posterior a ello se colocó en baño maría a 30 °C durante 20 minutos.

Para realizar la curva de calibración se trabajó con una muestra estándar, que estuvo conformada por 100 mg de glucosa, la cual se diluyó en 10 ml de agua destilada y se obtuvo una solución de 10 mg/ml de glucosa. A partir de ésta solución se prepararon otras soluciones de glucosa que tenían las siguientes concentraciones 2,0 mg/ml; 4,0 mg/ml; 6,0 mg/ml y 8,0 mg/ml.

Finalmente se procedió a leer el color de cada tubo en el Espectrofotómetro UV Kert-Lab modelo VIS S54 a una absorbancia de 490 nm. Con los datos obtenidos de absorbancia de la muestra estándar (glucosa), se procedió a graficar la ecuación de la recta de regresión lineal (Figura 29).

Las concentraciones finales de la fuente de carbono de cada uno de los tratamientos fue estimado a partir de los valores de absorbancias de la muestra estándar (glucosa) ingresados en la ecuación de la recta de regresión lineal.

### c) Medición del potencial de hidrógeno

La medición se realizó a los 15 días, al finalizar la producción de la celulosa bacteriana, a través del uso de un pH-metro de mesa Kintel modelo PH – 016. El procedimiento consistió en extraer una pequeña muestra de cada recipiente correspondiente a los seis tratamientos con sus respectivas réplicas, se introdujo el pH-metro y se hizo la medición de forma directa, (Figura 22) (Perna, 2013).



*Figura 22.* A: Medición del pH en tratamiento con zumo de arándano. B: Medición del pH en tratamiento con zumo de manzana.

*Fuente:* Elaboración propia.

### d) Medición del volumen remanente del medio de cultivo

Al finalizar la producción de la celulosa bacteriana se procedió a realizar la medición del volumen (ml) del medio sobrante (no consumido por la bacteria), como se observa en la Figura 23. Para ello se utilizó una probeta de 50 ml donde se depositó el líquido remanente de cada recipiente (Jaramillo et al., 2013).

Se obtuvo el porcentaje de volumen remanente consumido a través de la siguiente fórmula:

$$\% V_{\text{rem}} = \frac{V_i - V_f}{V_i} \times 100$$

Dónde:

% V rem: Porcentaje del volumen remanente consumido.

$V_i$  : Volumen remanente inicial.

$V_f$ : Volumen remanente final.

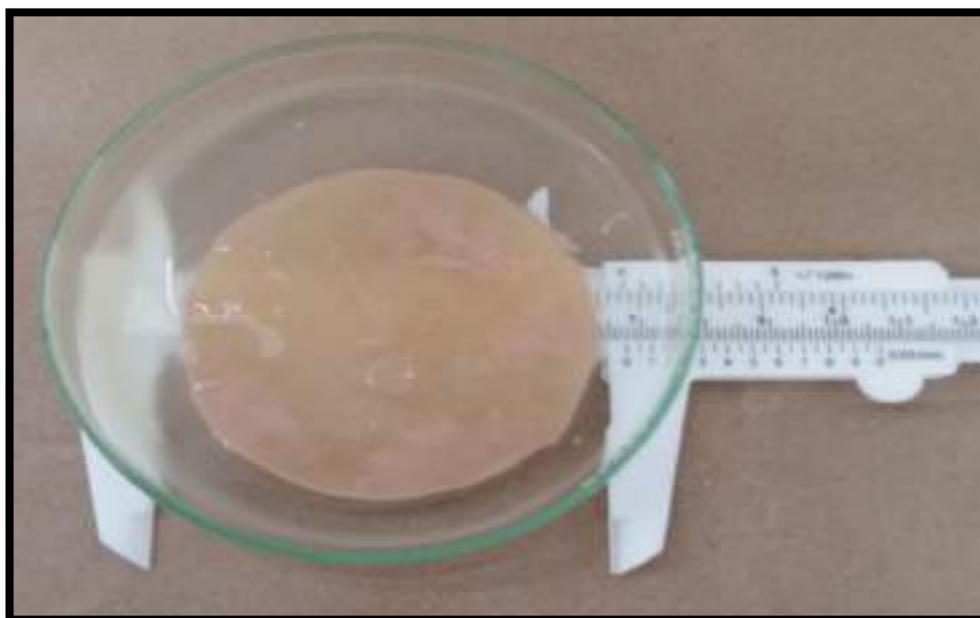


*Figura 23.* Medición del volumen remanente del medio de cultivo alternativo en el tratamiento de la manzana.

*Fuente:* Elaboración propia.

#### e) Medición del diámetro de la película de celulosa

Se consideró la medición del diámetro (cm) de la película de celulosa producida en cada uno de los tratamientos, debido a que los valores obtenidos del diámetro resultan convenientes en el análisis de la presente investigación. Se midió de forma directa con un vernier (Figura 24).



*Figura 24.* Medición del diámetro de película de celulosa producida en medio de cultivo alternativo.

*Fuente:* Elaboración propia.

### **2.2.8. Caracterización química de la celulosa bacteriana producida por el tratamiento más eficiente**

#### a) Caracterización química por espectroscopia infrarrojo (FT-IR)

La caracterización química por Espectroscopia infrarroja presenta los siguientes procesos:

#### - Proceso de purificación y secado de las películas de celulosa:

Para realizar el análisis de la composición química de la producción de celulosa, se procedió a retirar las impurezas de las películas de celulosa, introduciéndolas en solución de Na OH a 0,1 N dentro de un vaso de precipitado de 500 ml y a una temperatura constante de 30 °C durante 20 minutos, con la ayuda de un equipo de Baño María Kert-Lab modelo S22. Posteriormente se enjuagó dos veces con agua destilada de manera continua y se secó con papel toalla. Finalmente, las películas de celulosa se secaron

en una estufa a una temperatura de 60 °C por 12 horas (Jaramillo et al., 2012).

- Análisis de las características químicas:

La muestra de la película de celulosa bacteriana, obtenida del mejor tratamiento 3 (T3) y antes de ser analizada por la Espectroscopia Infrarroja, fue sometida a 100 °C de temperatura por 2 horas.

Posteriormente se realizó el análisis mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT- IR), donde se evaluó las variaciones en la estructura química de las membranas de celulosa bacteriana. Este análisis se desarrolló en el laboratorio de la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, a través del uso del equipo Perkin Elmer Spectrum 100, haciendo uso del espectro luminosos que se halla en la región infrarrojo medio (MIR), los espectros fueron registrados en el intervalo de 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 16 barridos por espectro y por ATR (Reflejo Total Atenuado) (Miranda et al., 2009, citado por Carreño, 2011, p. 49).

### **2.3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES**

Se realizó un experimento factorial 2 x 2 x 3, siendo el primer factor el sustrato de fruta (arándano y manzana), el segundo factor la concentración de la fruta (10%, 20% y 30%) y el tercer factor el tiempo de producción. Estos tratamientos experimentales se especifican en la Tabla 8.

Tabla 8

*Descripción de los tratamientos y del control en base a los diferentes extractos de fruta (arándano y manzana) de descarte*

Tratamiento	Inóculo de <i>Gluconacetobacter</i> (ml)	Factores		
		Tipo de sustrato	Concentración de sustrato (%)	Tiempo de producción (d)
TC	1,00	-----	-----	7 15
T1	1,00	Arándano	10	7 15
T2	1,00	Arándano	20	7 15
T3	1,00	Arándano	30	7 15
T4	1,00	Manzana	10	7 15
T5	1,00	Manzana	20	7 15
T6	1,00	Manzana	30	7 15

*Fuente:* Elaboración propia.

## 2.4. UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales fueron los recipientes de vidrio conteniendo 33 ml de medio de cultivo alternativo, según la composición descrita en la Tabla 7, siendo un total de 24 unidades experimentales en la investigación, 6 para el control y 3 para los demás tratamientos.

## 2.5. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES Y SU MENSURACIÓN

Para la medición de las variables se siguieron las metodologías que se indican detalladas a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9

*Variables de estudio, unidades de medida y métodos de análisis de los parámetros evaluados*

<b>Variable en estudio</b>	<b>Unidades</b>	<b>Metodología a emplear</b>
<b>pH</b>	Unidad de pH	Potenciometría
<b>Producción de celulosa</b>	g/L	Gravimetría
<b>Volumen</b>	ml	Volumetría
<b>Carbohidratos totales</b>	mg	Fenol ácido sulfúrico
<b>Caracterización química de celulosa bacteriana</b>	cm <sup>-1</sup>	Espectroscopia infrarroja FT-IR
<b>Diámetro de celulosa</b>	cm	Medición con Vernier

*Fuente:* Elaboración propia.

## 2.6. DISEÑO ESTADÍSTICO DEL EXPERIMENTO

Se usó un diseño completo al azar (DCA) con seis tratamientos que corresponden a una población de *Gluconacetobacter* sp., que fue sometida a las concentraciones del 10, 20 y 30 % de extracto de arándano de descarte y 10, 20 y 30 % de extracto de manzana de descarte; con 3 réplicas por tratamiento y el control que tuvo 6 réplicas.

## 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza para cada variable determinada, con la finalidad de evaluar los efectos estudiados: sustrato de fruta, concentraciones de fruta, tiempo de producción y posibles interacciones ( $p \leq 0,05$ ). Se complementaron los análisis con tablas y gráficos de interacción.

## CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. RESULTADOS

#### 3.1.1. Caracterización morfológica de la bacteria aislada del vinagre de manzana

La bacteria aislada del vinagre de manzana en la presente investigación corresponde a las características morfológicas descritas para el género *Gluconacetobacter*. Se observó células de morfología bacilar, ligeramente curvo, individuales, formando pequeños grupos y en cadena. La tinción Gram indicó que la pared celular corresponde a un G–negativo, tal como se observa en la Figura 25.

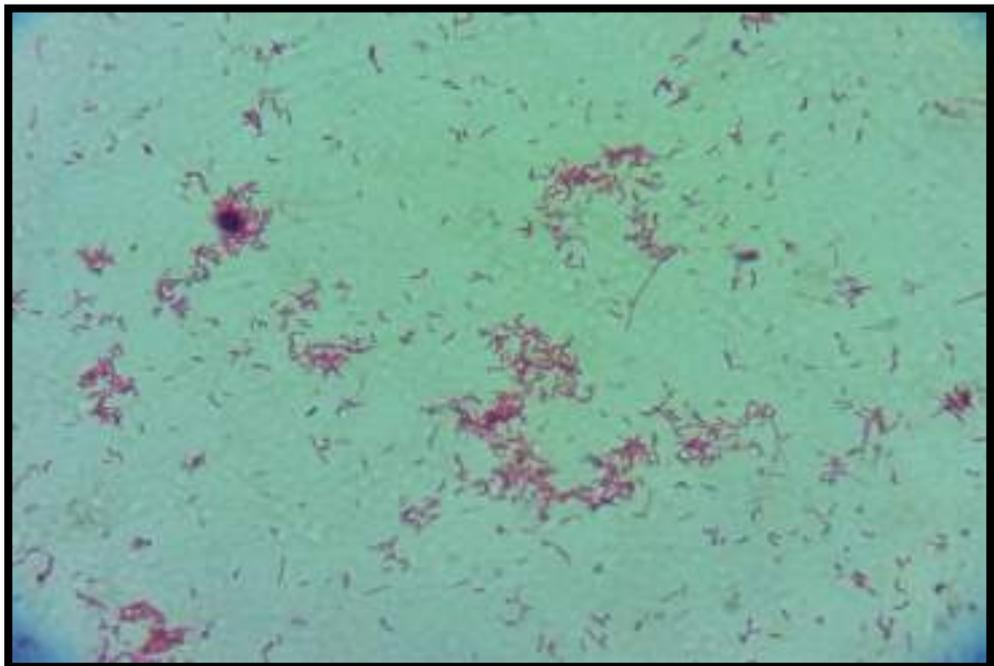


Figura 25. *Gluconacetobacter* sp. con tinción Gram a 1000X

Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.2. Resultados de la caracterización bioquímica de la bacteria aislada

Las pruebas bioquímicas para la cepa aislada del vinagre de manzana, dio como resultado catalasa positiva debido a que se produjo el burbujeo característico cuando el peróxido de hidrógeno se descompone por acción de la enzima catalasa (Hurtado et al., 2011), como se muestra en la Figura 26. La prueba bioquímica de la oxidasa resultó negativa (Figura 27), indicando que no hay presencia de la enzima citocromo-c-oxidasa. Se observó que no hubo ningún cambio de color a azul-violeta en los 10 primeros segundos (Gerard, 2015) (Tabla 10).



Figura 26. Prueba de catalasa para *Gluconacetobacter* sp.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 27. Prueba de oxidasa para *Gluconacetobacter* sp.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10

Resultados de la tinción Gram y caracterización bioquímica de *Gluconacetobacter* sp.

Prueba	Gerard (2015)	Hurtado et al. (2011)	Presente investigación (2018)
<b>Tinción Gram</b>	-	-	-
<b>Catalasa</b>	+	+	+
<b>Oxidasa</b>	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.3. Análisis de la producción de celulosa por *Gluconacetobacter* sp.

Los resultados del análisis de varianza de la producción de celulosa muestran que hubo efecto significativo del sustrato de fruta ( $p \leq 0.05$ ), las concentraciones de la fruta ( $p \leq 0.05$ ) y el tiempo de producción de celulosa

( $p \leq 0.05$ ), significando que cada uno de estos factores influyó positivamente en la producción de celulosa. No se observaron efectos de interacción ( $p > 5$ ), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma independiente (Tabla 11).

Tabla 11

*Análisis de varianza de la producción de celulosa (g/L) considerando los factores sustrato de fruta, concentraciones y el tiempo de producción*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>G.L.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Fruta</b>	27425,4	1	27425,4	136,1510	0,000000
<b>Concentración</b>	13770,3	2	6885,1	34,1807	0,000000
<b>Tiempo</b>	3852,8	1	3852,8	19,1268	0,000204
<b>Fruta*Concentración</b>	740,9	2	370,5	1,8391	0,180663
<b>Fruta*Tiempo</b>	339,8	1	339,8	1,6870	0,206334
<b>Concentración *Tiempo</b>	30,3	2	15,1	0,0751	0,927852
<b>Fruta* Concentración *Tiempo</b>	399,4	2	199,7	0,9914	0,385743
<b>Error</b>	4834,4	24	201,4		

*Fuente:* Elaboración propia.

En la Tabla 12, se muestran las medias y desviaciones estándar de la producción de celulosa en g/L, según el sustrato de fruta, las concentraciones de fruta utilizadas y el tiempo de producción. Se observa, que en los 3 niveles de concentración y ambos periodos de tiempo, 7 días y 15 días, las mayores producciones de celulosa se dieron al utilizar como sustrato al arándano, registrándose a los 7 días de producción y 10 % de concentración, un promedio de 42,63 g/L de celulosa, mientras que con 20 % de concentración, se obtuvo en promedio 78,48 g/L de celulosa y con 30 %, una producción promedio de 111,31 g/L, evidenciándose claramente el efecto significativo de la concentración de esta fruta: a mayor concentración de arándano, mayor producción de celulosa. Al utilizar la manzana como sustrato, los promedios de producción de celulosa fueron significativamente menores a las obtenidas con el arándano, sin embargo, esta producción también dependió del nivel de concentración de manzana, registrándose a los 7 días de producción, un promedio de 13,74 g/L de celulosa con 10 % de

concentración, de 26,77 g/L de celulosa con 20 % de concentración y 44,75 g/L de celulosa con 30 % de producción. Las mismas tendencias se registraron a los 15 días de producción, obteniéndose en el caso del arándano, un promedio de 79,80 g/L de celulosa para 10% de concentración, 104,85 g/L para 20 % de concentración y 128,18 g/L para 30 % de concentración, mientras que al utilizar la manzana como sustrato, a los 15 días se obtuvo un promedio de celulosa de 23,13 g/L para 10 % de concentración, 39,29 g/L para 20 % de concentración y 66,46 g/L, para 30 % de concentración, evidenciándose también que la producción de celulosa dependió del nivel de concentración de manzana. Asimismo, se puede observar que el tiempo de producción fue un factor importante en la producción de celulosa, ya que al comparar la producción promedio de celulosa en 15 días con la producción promedio en 7 días, se visualiza en todos los tratamientos, un incremento significativo (Tabla 12 y Figura 28), principalmente en el tratamiento con arándano a 10 % de concentración, donde se produjo de 7 a 15 días, un incremento de 37,17 g/L de celulosa.

En el caso del tratamiento control utilizando un sustrato estándar, se obtuvo en promedio de 41,82 g/L de celulosa a los 7 días de producción, valor significativamente superior al producido por el sustrato de manzana con 10% y 20% de concentración y significativamente inferior al producido por el sustrato de arándano con 20% y 30% de concentración (Tabla 12 y Figura 28). Entretanto, a los 15 días de producción, el tratamiento control registró un promedio de 70,66 g/L de celulosa, valor significativamente inferior al producido por el sustrato de arándano con 20% y 30% de concentración y significativamente superior al producido por el sustrato de manzana al 10% y 20% de concentración (Tabla 12 y Figura 28).

Tabla 12

Valores promedio y desviaciones estándar de la producción de celulosa (g/L) de *Gluconacetobacter* según el sustrato de fruta, la concentración y tiempo de producción de celulosa

Tratamiento	Fruta	Concentración (%)	n	7 días		15 días	
				Producción n promedio de celulosa (g/L)	Desviación estándar (g/L)	Producción promedio de celulosa (g/L)	Desviación estándar (g/L)
<b>C</b>	-	-	6	41,82	3,297	70,66	4,525
<b>T1</b>	<b>Arándano</b>	<b>10</b>	3	42,63	4,756	79,80	4,136
<b>T2</b>	<b>Arándano</b>	<b>20</b>	3	78,48	10,155	104,85	8,069
<b>T3</b>	<b>Arándano</b>	<b>30</b>	3	111,31	4,899	128,28	6,480
<b>T4</b>	<b>Manzana</b>	<b>10</b>	3	13,74	3,338	23,13	5,321
<b>T5</b>	<b>Manzana</b>	<b>20</b>	3	26,77	2,150	39,29	1,262
<b>T6</b>	<b>Manzana</b>	<b>30</b>	3	44,75	17,880	66,46	42,165

n= número de réplicas por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

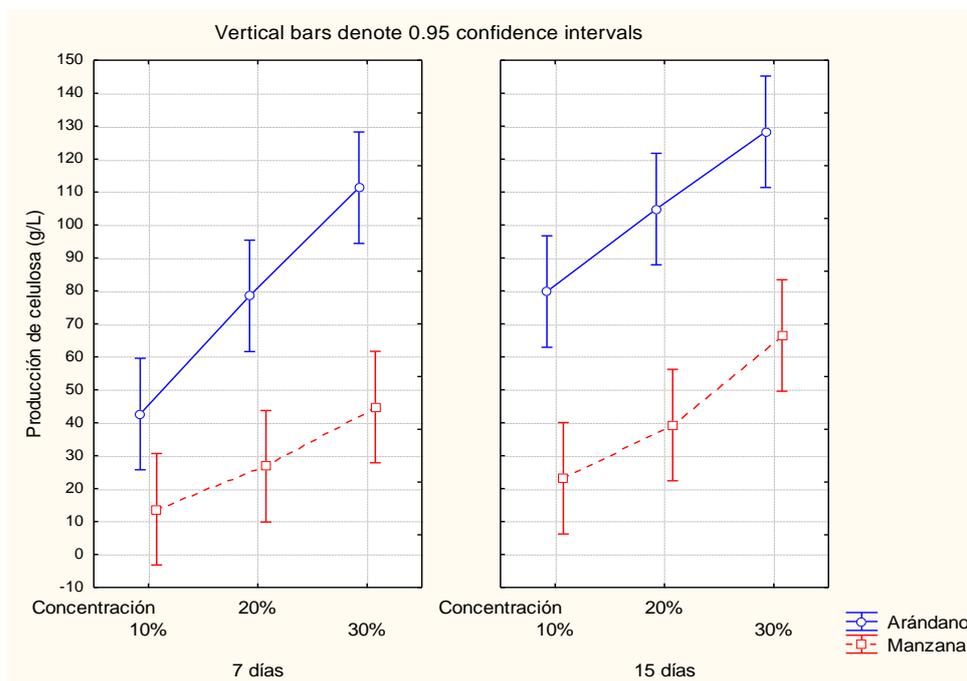


Figura 28. Producción promedio de celulosa bacteriana (g/L) según el sustrato de fruta, las concentraciones y los días de producción.

### 3.1.4. Estimación del consumo de la fuente de carbono por *Gluconacetobacter* sp.

#### 3.1.4.1. Determinación de la curva de calibración de glucosa

Las concentraciones finales de la fuente de carbono de cada uno de los tratamientos, fue estimado a partir de los valores de absorbancias ingresados en la ecuación de la recta de regresión lineal ( $y = 0,0987x - 0,0784$ ), ver la Figura 29. Cabe resaltar que la curva de calibración se construyó a partir de diferentes concentraciones de glucosa estándar diluida en 100 ml de agua destilada (Tabla 13).

Tabla 13

*Valores de concentración de glucosa (mg/ml) para la obtención de la recta de regresión*

<b>CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (mg/ml)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>
<b>2,0</b>	0,103
<b>4,0</b>	0,322
<b>6,0</b>	0,544
<b>8,0</b>	0,698
<b>10,0</b>	0,902

*Fuente.* Elaboración propia.

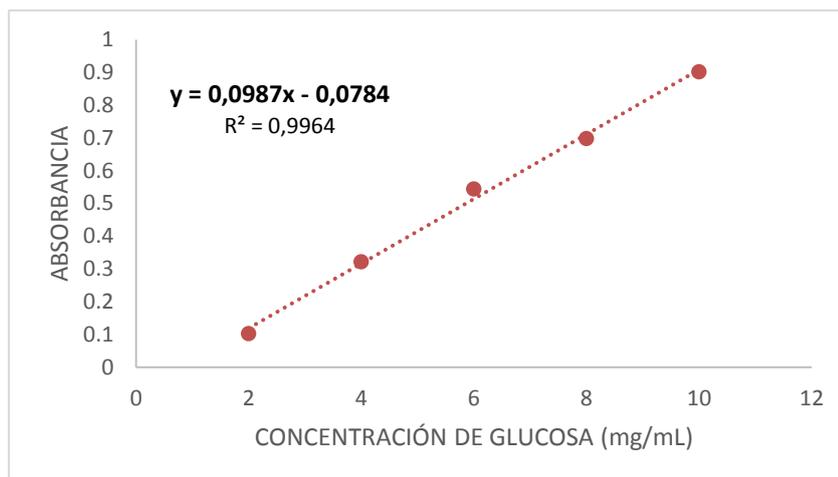


Figura 29. Recta de regresión de la glucosa (mg/ ml) vs. la absorbancia.

#### 3.1.4.2. Estimación del consumo de la fuente de carbono

Los resultados del consumo de la fuente de carbono muestra que después de los 15 días de cultivo, *Gluconacetobacter* sp., consumió cerca del 100 % de la fuente de carbono en todos los tratamientos y el control (Tabla 14).

En la Tabla 14 se muestran los valores del consumo de la fuente de carbono al término de la producción de celulosa, donde se observa que en los 3 niveles de concentración, el mayor consumo de azúcares de la fuente de carbono se dio con el sustrato de manzana, obteniéndose 155,3 g/L de azúcar total para 10 % de concentración (T4), 193,5 g/L de azúcar total para el 20 % de concentración (T5) y 231,6 g/L para el 30 % de concentración (T6). Al utilizar el arándano como sustrato, el consumo de azúcares de la fuente de carbono fue menor a las obtenidas por la manzana, registrándose para 10 % de concentración (T1) 136,4 g/L de azúcar total consumido, para 20 % de concentración (T2) 153,0 g/L y para 30 % de concentración el valor de 166,8 g/L.

En el caso del tratamiento control utilizando un sustrato estándar, se obtuvo un consumo de 121,62 g/L de azúcar total de la fuente de carbono, valor inferior a los tratamientos con sustrato de manzana con concentraciones de 10, 20 y 30%. También se observó que el consumo de azúcar total de la fuente de carbono del control fue inferior al consumo de la fuente de carbono con sustrato de arándano en las 3 concentraciones (Tabla 14).

Tabla 14

*Valores de concentración inicial, concentración final y consumo de la fuente de carbono (g/L) por Gluconacetobacter sp. en el medio de cultivo, según el sustrato de fruta y el nivel de concentración en la fase final de la producción de celulosa bacteriana (15 días)*

Tratamientos	Fruta	Concentración (%)	n	Concentración inicial de la fuente de carbono (g/L)	Absorbancia del medio al final del cultivo	Concentración final de la fuente de carbono (g/L)	Consumo de la fuente de carbono (g/L)	Consumo de fuente de carbono (%)
<b>Control</b>	-	-	1	126,4	0,390	4,7	121,6	96,2
<b>T1</b>	<b>Arándano</b>	<b>10</b>	1	141,5	0,423	5,1	136,4	96,4
<b>T2</b>	<b>Arándano</b>	<b>20</b>	1	156,7	0,286	3,7	153,0	97,6
<b>T3</b>	<b>Arándano</b>	<b>30</b>	1	168,8	0,122	2,0	166,8	98,8
<b>T4</b>	<b>Manzana</b>	<b>10</b>	1	162,7	0,658	7,5	155,3	95,4
<b>T5</b>	<b>Manzana</b>	<b>20</b>	1	199,1	0,470	5,6	193,5	97,2
<b>T6</b>	<b>Manzana</b>	<b>30</b>	1	235,5	0,301	3,8	231,6	98,4

n=número de réplicas por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.5. Resultados del potencial de hidrógeno, volumen remanente del medio y medida del diámetro de la celulosa en los diferentes tratamientos

#### 3.1.5.1. Análisis del potencial de hidrógeno

Los resultados del análisis de Varianza del potencial de hidrógeno muestran que hubo un efecto significativo del sustrato de fruta ( $p \leq 0,05$ ) y las concentraciones de la fruta ( $p \leq 0,05$ ), significando que cada uno de estos factores influyó en la disminución del pH

durante la producción de celulosa bacteriana. No se observaron efectos de interacción ( $p>5$ ), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma independiente (Tabla 15).

Tabla 15

*Análisis de varianza del potencial de hidrógeno en 15 días de producción de celulosa bacteriana, considerando los factores sustrato de fruta y nivel de concentración*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Fruta	5,0774	1	5,0774	75,921	0,000002
Concentración	0,6878	2	0,3439	5,142	0,024381
Fruta* Concentración	0,0904	2	0,0452	0,676	0,527026
Error	0,8025	12	0,0669		

*Fuente:* Elaboración propia.

La Tabla 16 presenta las medias y desviaciones estándar del pH según el sustrato de fruta y los niveles de concentración. Se observa que, la disminución más considerable en los valores del pH se dio con el sustrato de arándano, registrándose con 10 % de concentración, un promedio de 2,97, mientras que con 20 % de concentración, se obtuvo un promedio de 2,85 y con 30 % de concentración, un promedio de 2,66, evidenciándose el efecto significativo de la concentración de esta fruta: a mayor concentración de arándano, menor valor de pH. Respecto al sustrato de manzana, se observó que los valores promedios de pH fueron significativamente mayores a las obtenidas con el arándano, sin embargo, estos valores también dependieron del nivel de concentración de la manzana, registrándose con 10 % de concentración, un valor promedio de 4,11, con 20 % de concentración, un promedio 4,04 y con 30 % de concentración, un promedio de 3,52. Asimismo, se puede observar que el tiempo de producción fue un factor importante, ya que todos los tratamientos mostraron una disminución en los valores de pH en la fase final (15

días de producción), al comparar con el valor de ajuste en la fase inicial de la producción de celulosa que fue el valor de pH de 5,6. En el caso del tratamiento control, se obtuvo un pH promedio 2,72 valor significativamente inferior al pH obtenido por el sustrato de manzana con 10, 20 y 30% de concentración (Tabla 16 y Figura 30).

Tabla 16

*Valores promedios y desviaciones estándar del potencial de hidrógeno obtenidos en la fase final de la producción de celulosa bacteriana (15 días), según el sustrato de fruta y niveles de concentración*

Tratamiento	Fruta	Concentración (%)	n	Promedio pH	Desviación estándar pH
<b>Control</b>	-	-	6	2,72	0,182
<b>T1</b>	<b>Arándano</b>	<b>10</b>	3	2,97	0,064
<b>T2</b>	<b>Arándano</b>	<b>20</b>	3	2,85	0,050
<b>T3</b>	<b>Arándano</b>	<b>30</b>	3	2,66	0,091
<b>T4</b>	<b>Manzana</b>	<b>10</b>	3	4,11	0,117
<b>T5</b>	<b>Manzana</b>	<b>20</b>	3	4,04	0,120
<b>T6</b>	<b>Manzana</b>	<b>30</b>	3	3,52	0,599

n= número de réplicas por tratamiento.

Fuente: Elaboración Propia.

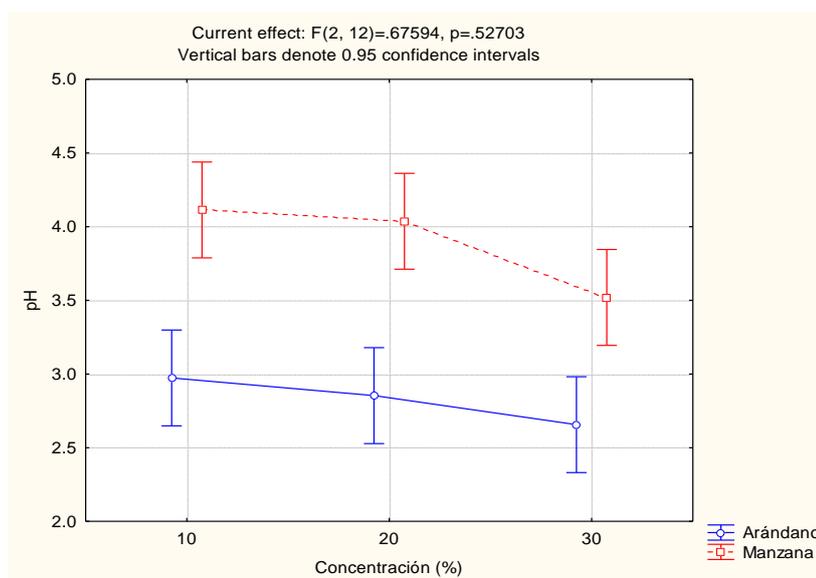


Figura 30. Potencial de hidrógeno promedio obtenido en la producción de celulosa, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración.

### 3.1.5.2. Análisis del volumen consumido del medio de cultivo alternativo

Los resultados del análisis de Varianza del volumen consumido del medio de cultivo alternativo en los tratamientos muestran que hubo efecto significativo del tipo de fruta ( $p \leq 0,05$ ) y los niveles de las concentraciones de la fruta ( $p \leq 0,05$ ), significando que cada uno de estos factores influyeron en la disminución del volumen del medio de cultivo alternativo. No se observaron efectos de interacción ( $p > 5$ ), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma independiente (Tabla 17).

Tabla 17

*Análisis de varianza del volumen consumido del medio de cultivo alternativo, considerando los factores sustrato de fruta y nivel de concentración*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Fruta	114,784	1	114,784	27,2727	0,000214
Concentración	234,415	2	117,207	27,8485	0,000031
Fruta* Concentración	5,357	2	2,678	0,6364	0,546168
Error	50,505	12	4,209		

*Fuente:* Elaboración propia.

La Tabla 18, muestra las medias y desviaciones estándar del volumen consumido del medio de cultivo alternativo en todos los tratamientos, según el sustrato de fruta y las concentraciones de fruta. En la tabla se observa que, en las tres concentraciones de sustrato de arándano, se produjeron los mayores consumos del volumen del medio de cultivo, registrándose con 30 % de concentración, un promedio de 17,17 %, con 20 % de concentración, un promedio de 12,63 %, mientras con 10 % de concentración, un promedio de 7,07 % valor semejante a lo obtenido con el sustrato de manzana en concentración al 20 %. El sustrato de manzana en concentración de 30 %, produjo un promedio de 11,11 % de consumo y en concentración de 10 %, un promedio de 3,54 %.

En el caso del tratamiento control, se obtuvo en promedio, 9,09 % del volumen consumido del medio alternativo, valor significativamente superior al volumen consumido por el sustrato de manzana con 10 % y 20 % de concentración y significativamente inferior al volumen consumido por el sustrato de arándano con 20 % y 30 % de concentración (Tabla 18 y Figura 31).

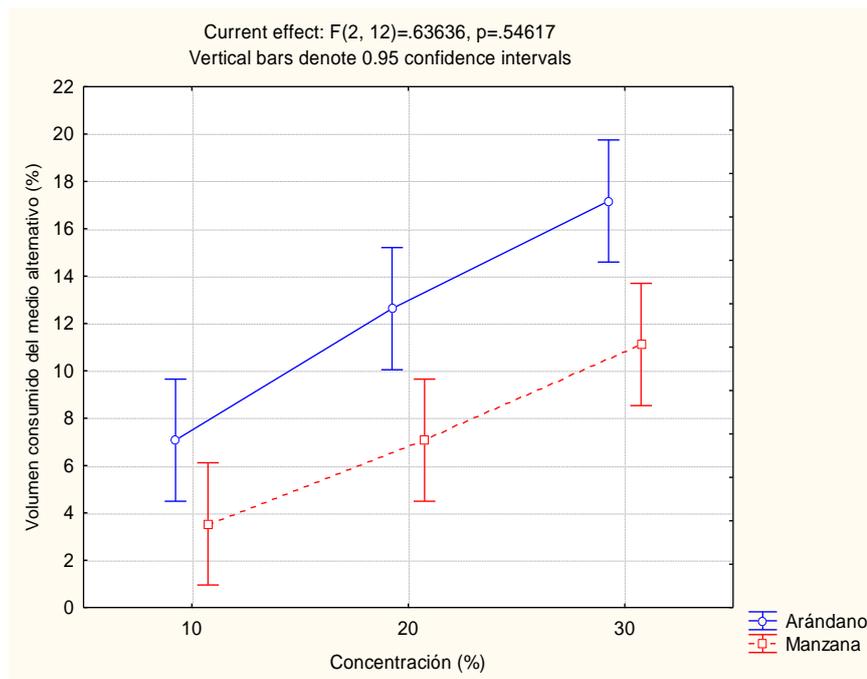
Tabla 18

*Valores promedios y desviaciones estándar del volumen consumido del medio de cultivo alternativo según el sustrato de fruta y niveles de concentración, obtenidos en la fase final de la producción de celulosa bacteriana (15 días)*

<b>Tratamiento</b>	<b>Fruta</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>n</b>	<b>Promedio Volumen consumido (%)</b>	<b>Desviación estándar Volumen consumido (%)</b>
<b>Control</b>	-	-	6	9,09	0,958
<b>T1</b>	<b>Arándano</b>	<b>10</b>	3	7,07	1,750
<b>T2</b>	<b>Arándano</b>	<b>20</b>	3	12,63	2,314
<b>T3</b>	<b>Arándano</b>	<b>30</b>	3	17,17	1,750
<b>T4</b>	<b>Manzana</b>	<b>10</b>	3	3,54	0,875
<b>T5</b>	<b>Manzana</b>	<b>20</b>	3	7,07	0,875
<b>T6</b>	<b>Manzana</b>	<b>30</b>	3	11,11	3,499

n= número de réplicas por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.



*Figura 31.* Volumen consumido promedio del medio de cultivo alternativo, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración.

### 3.1.5.3. Análisis del diámetro de la celulosa bacteriana

Los resultados del análisis de varianza del diámetro de la celulosa bacteriana muestran que hubo efecto significativo del sustrato de fruta ( $p \leq 0,05$ ) y los niveles de las concentraciones de la fruta ( $p \leq 0,05$ ). No se observaron efectos de interacción ( $p > 5$ ), lo que evidencia que los factores experimentales actuaron de forma independiente (Tabla 19).

Tabla 19

*Análisis de varianza del diámetro de celulosa bacteriana según los sustratos de fruta y niveles de concentración obtenidos en la fase final de la producción de celulosa bacteriana (15 días)*

<b>Fuente de Variación</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Fruta	6,1250	1	6,1250	32,618	0,000097
Concentración	12,8533	2	6,4267	34,225	0,000011
Fruta* Concentración	0,1733	2	0,0867	0,462	0,641050
Error	2,2533	12	0,1878		

Fuente: Elaboración Propia.

En la Tabla 20, se muestran las medias y desviaciones estándar del diámetro de la celulosa bacteriana según el sustrato de fruta y los niveles de concentración. Se observa en la tabla que, en el caso del sustrato de arándano, los 3 niveles de concentración presentaron mayor longitud del diámetro de la celulosa, registrándose con 10 % de concentración, un promedio de 4,40 cm, con 20 % de concentración, un promedio de 5,27 cm y con 30 % de concentración, un promedio de 6,23 cm, evidenciándose el efecto significativo de la concentración de esta fruta: a mayor concentración de arándano, mayor diámetro de celulosa. Respecto al sustrato de manzana, los promedios de diámetro de celulosa resultaron significativamente menores en comparación con los del arándano, registrándose un promedio de 3,03 cm con 10 % de concentración, de 4,03 cm con 20 % de concentración y 5,33 cm para 30 % de concentración, evidenciándose también que la longitud del diámetro de celulosa dependió del nivel de concentración de manzana (Tabla 20 y Figura 32).

En el tratamiento control, se obtuvo en promedio, 3,72 cm de diámetro de celulosa, valor significativamente superior al producido por el sustrato de manzana con 10 % de concentración (Tabla 20 y Figura 32).

Tabla 20

Valores promedios y desviaciones estándar del diámetro de la celulosa bacteriana según el sustrato de fruta y niveles de concentración, obtenidos en la fase final de la producción de celulosa bacteriana (15 días)

Tratamiento	Fruta	Concentración (%)	n	Promedio Diámetro de celulosa (cm)	Desviación estándar Diámetro de celulosa (cm)
<b>Control</b>	-	-	6	3,72	0,147
<b>T1</b>	<b>Arándano</b>	<b>10</b>	3	4,40	0,265
<b>T2</b>	<b>Arándano</b>	<b>20</b>	3	5,27	0,252
<b>T3</b>	<b>Arándano</b>	<b>30</b>	3	6,23	0,289
<b>T4</b>	<b>Manzana</b>	<b>10</b>	3	3,03	0,153
<b>T5</b>	<b>Manzana</b>	<b>20</b>	3	4,03	0,153
<b>T6</b>	<b>Manzana</b>	<b>30</b>	3	5,33	0,929

n= número de réplicas por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

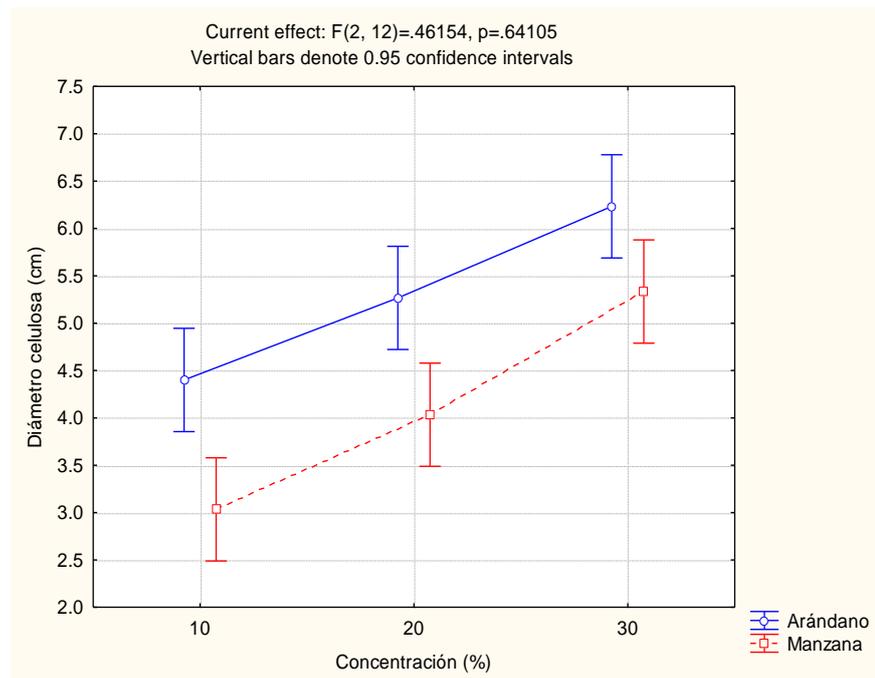


Figura 32. Diámetro promedio de celulosa bacteriana, según los sustratos de fruta y los niveles de concentración.

### 3.1.6. Resultados del análisis químico de la celulosa obtenida por espectroscopia infrarroja FTIR – MIR-ATR

La Figura 33, muestra los resultados del análisis químico por espectroscopia infrarroja (TIR-MIR-ATR). La celulosa obtenida en el tratamiento 3 (T3) fue analizada en el espectro de 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Tabla 21, se registra las longitudes de onda obtenidas del análisis de espectroscopia infrarroja con los enlaces y estructuras reconocidas para cada una de ellas. La longitud de onda menor registrada fue de 850  $\text{cm}^{-1}$  y no es característica de la celulosa, las longitudes de onda de 950  $\text{cm}^{-1}$  y 1010  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de los grupos C-O, la longitud de onda de 1405  $\text{cm}^{-1}$  y 1580  $\text{cm}^{-1}$  no corresponde a ninguna característica de la celulosa, la longitud de onda de 2910  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de los grupos CH/ Grado de cristalinidad y la mayor longitud de onda registrada fue de 3240  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de los grupos –OH Celulosa I.

Tabla 21

*Enlaces y estructuras de celulosa asociados a longitudes de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )*

<b>Longitud de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Enlaces y estructuras reconocidas</b>
<b>850</b>	No característica a Celulosa
<b>950</b>	Vibración de los grupos C-O <sup>1</sup>
<b>1010</b>	Vibración de los grupos C-O <sup>2</sup>
<b>1405</b>	No característica a Celulosa
<b>1580</b>	No característica a Celulosa
<b>2910</b>	Vibración de los grupo CH/Grado de cristalinidad <sup>3</sup>
<b>3240</b>	Vibración de los grupos -OH Celulosa I <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Quintana (2015), <sup>2y3</sup> Carreño (2011), <sup>4</sup>Chen, Chen, Huang y Lin (2011).

Fuente: Elaboración propia.

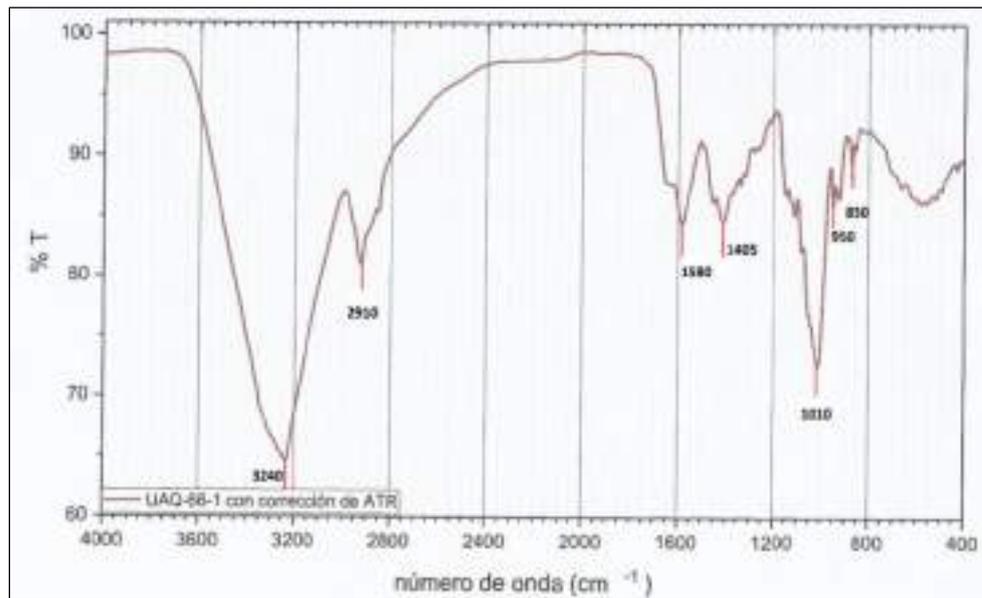


Figura 33. Espectro infrarrojo (FTIR-MIR.ATR) para la membrana de celulosa obtenida a partir de la bacteria *Gluconacetobacter* sp.

### 3.2. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación es uno de los primeros en Perú sobre obtención de celulosa bacteriana a partir de *Gluconacetobacter* sp. mediante la fermentación de extractos de frutas de descarte. La morfología de la bacteria aislada y las pruebas bioquímicas realizadas han permitido evidenciar que pertenece al género *Gluconacetobacter* (Gullo y Giudici, 2008; Kadere et al., 2008). Algunos autores indican que para confirmar el género se puede realizar pruebas adicionales, como la oxidación de lactato y la oxidación de acetato (Gerard, 2015).

En el presente estudio, los sustratos de arándano, manzana y el control fueron eficientes en la obtención de celulosa bacteriana, siendo el tratamiento 3 (medio de cultivo alternativo más el extracto de arándano al 30 % (p/v)) el que obtuvo mayor producción de celulosa bacteriana con un valor promedio de 128,28 g/L de celulosa. Cruz (2015) realizó investigaciones a partir de un medio formulado con residuos de piña para la producción de celulosa bacteriana, donde el zumo de piña registró un valor de 8,74 g/L de producción máxima de celulosa bacteriana en 94 % de zumo de piña en 10 días de cultivo, resultando menor al obtenido en la presente investigación. Esta diferencia en la producción de celulosa bacteriana en la piña, radicaría en el aporte de glucosa, sacarosa y fructosa como azúcares principales en la producción de celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter* (Jaramillo et al., 2012). La producción de celulosa obtenida en el presente estudio (128,28 g/L), fue similar a lo reportado por Parant (2005), quien logró obtener celulosa a nivel industrial, con valores máximos de producción de 159,5 g/L a 15 días de cultivo, usando el extracto de arándano (20 %) e incluyendo inductores convencionales como extracto de levadura, sorbato de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$ . La fuente de fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , es el inductor más usado para la obtención de celulosa (Jaramillo et al., 2012; Lestari, Elfrida, Suryani y Suryadi, 2014; Quintana, 2015), debido al aporte del fósforo a las principales enzimas que participan de la biosíntesis de celulosa bacteriana, como es la glucoquinasa, fosfoglucomutasa y UDPG-pirofosforilasa (Carreño, 2011). En esta investigación también se logró obtener resultados favorables para la biosíntesis de celulosa,

usando extracto de levadura (12,65 g),  $C_6H_7KO_2$  (0,13 g),  $KH_2PO_4$  (3,79 g) y  $CaCl_2$  (7,59 g) lo cual explica que los buenos resultados para la producción de celulosa bacteriana, en los tratamientos y el control, puede atribuirse a una correcta formulación y selección de los ingredientes necesarios para el cultivo de *Gluconacetobacter* sp. Cabe indicar que Parant (2005) empleó dicha formulación a nivel industrial, mientras que en la presente investigación fue a escala de laboratorio.

El resultado que se obtuvo en la presente investigación para la producción de celulosa con el sustrato de manzana fue menor en comparación a los tratamientos con el sustrato de arándano y el control. Esta diferencia puede atribuirse a la presencia de inductores como calcio y fósforo “propios de la fruta”, reportándose en mayor cantidad el fósforo y el calcio en el fruto de arándano a diferencia de la manzana (Parant, 2005; Mejía, 2015). Es preciso mencionar que la manzana destaca por su alto contenido de ácido málico y por consiguiente al emplearse dicho sustrato como fuente de carbono para *Gluconacetobacter* sp., puede provocar una disminución en la producción de celulosa, considerándose un factor limitante para el microorganismo (Enciso, 2015).

De igual manera el tratamiento control conformado por sustrato estándar formulado con sacarosa como única fuente de carbono, mostró también una producción favorable de 70,66 g/L en la obtención de celulosa bacteriana. Jaramillo, Tobio y Escamilla (2012) utilizaron también sacarosa, como sustrato, y a una concentración de 7,6% obtuvieron un valor máximo de 39,5 g/L de celulosa bacteriana. Carreño (2011) menciona que, al usar sacarosa como fuente de carbono, la producción de celulosa es mayor en comparación de glucosa y glicerol, debido a que *Gluconacetobacter* sintetiza celulosa a partir de sacarosa por medio de la enzima levansacarasa, que hidroliza la sacarosa a glucosa y levana, siendo este último, un polímero de la fructosa.

Con respecto al contenido de azúcar en diferentes frutas y la producción de celulosa bacteriana, Lestari et al. (2014), realizaron investigaciones con agua de coco y jugo piña, donde *Gluconacetobacter xylinus* usó 50,8 % y 81,1% de azúcar para producir 19,34 g/L y 10,04 g/L de celulosa bacteriana respectivamente. En el presente estudio, *Gluconacetobacter* sp. utilizó el 98,8 % de azúcares totales en el tratamiento 3 (medio de cultivo alternativo más el extracto de arándano al 30 % (p/v)) y 98,4 % de azúcares totales en el tratamiento 6 (medio de cultivo alternativo más el extracto de manzana al 30 % (p/v)), para producir 128,28 g/L de celulosa y 66,46 g/L, respectivamente. Lestari et al. (2014) señalan que existe una relación directa entre el consumo de azúcar y la producción de celulosa bacteriana; por lo tanto, se podría indicar que *Gluconacetobacter* sp. es eficiente para metabolizar los monosacáridos como la glucosa y la fructosa y disacáridos como la sacarosa. En la presente investigación, el cultivo con sustrato de manzana mostró un mayor consumo de azúcar y una menor producción de celulosa bacteriana (ver Tablas 12 y 14). Esto se podría explicar porque *Gluconacetobacter* sp., aparentemente estaría usando la fuente de carbono del sustrato de manzana para el metabolismo celular más que para la formación de celulosa bacteriana (Lestari et al., 2014). Así mismo, la pulpa de arándano posiblemente presente una mayor concentración de monosacáridos (glucosa y fructosa) a diferencia de la pulpa de manzana, por lo que la producción de celulosa por *Gluconacetobacter* podría estar fuertemente influenciada por el consumo y metabolismo de los monosacáridos (Jaramillo et al., 2012; Quintana, 2015).

La variación del valor de pH es un indicador de la producción de ácidos orgánicos tales como ácido glucónico, ácido acético o ácido láctico; esto como resultado del metabolismo fermentativo de los azúcares en el cultivo de *Gluconacetobacter* sp. (Santos, 2015). Respecto a la evaluación del pH; en esta investigación, todos los tratamientos iniciaron con un valor de 5,6 y al cabo de 15 días de experimentación, se observó que todos los valores de pH decayeron, presentando los valores promedios mínimos el tratamiento 3 y el control, con pH de 2,66 y 2,72, respectivamente. Para el tratamiento 4 y tratamiento 5 se obtuvo los valores promedios máximos, con pH de 4,11 y pH de 4,04 respectivamente. Quintana (2015), menciona que la mayoría de especies del género de *Gluconacetobacter*,

presentan como valores óptimos para la producción de celulosa bacteriana, valores de pH entre 4 y 8. Otros estudios mencionan que existen especies del género *Gluconacetobacter*, *Gluconacetobacter medellinensis*, que son resistentes a pH ácidos y que su mayor producción se da con pH por debajo de 4, valor en el que otras especies del género inhiben su producción de celulosa (Castro, 2015; Enciso, 2015). Mediante los valores de pH obtenidos en la presente investigación, sumando a lo mencionado por Quintana (2015), Castro (2015) y Enciso (2015), se podría decir que el género *Gluconacetobacter* puede sintetizar celulosa bacteriana en un medio donde el pH presente valores entre 2.5 y 8.

Los resultados del consumo del medio de cultivo alternativo en los tratamientos, mostraron que el menor consumo del volumen lo obtuvo el tratamiento 4 (medio de cultivo alternativo más el extracto de manzana al 10 %) con un valor promedio de 3,54 %, tratamiento donde se produjo la menor cantidad de celulosa (23,13 g/L). El tratamiento que mostró el mayor consumo del medio de cultivo fue el tratamiento 3 (medio de cultivo alternativo más el extracto de arándano al 30 %) con un valor promedio de 17,17 %, y es éste el tratamiento con el que se obtuvo mayor cantidad de celulosa (128,28 g/L). Perna (2013) menciona que el volumen del medio de cultivo va disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo, debido a que en la estructura de la celulosa bacteriana se quedan atrapadas las moléculas de agua en cantidades considerables. Es así que en la presente investigación se demostró que a mayor peso de las películas de celulosa bacteriana, se encontró mayor consumo del medio de cultivo en los tratamientos.

El análisis en la espectroscopia infrarroja FTIR es una herramienta útil para establecer la variación de la estructura química de la celulosa bacteriana (Dumitriu, 2013). En ésta investigación se observó espectros con bandas que van desde 850 a 3240  $\text{cm}^{-1}$  (longitud de onda), similar a lo reportado por (Carreño, 2011). Se puede apreciar que la banda de 3240  $\text{cm}^{-1}$  presente en la celulosa bacteriana, está asignada a la presencia del grupo hidroxilo (O-H) lo que permite confirmar la presencia de celulosa de tipo I (Castro et al., 2012; Chen, Chen, Huang y Lin, 2011). De acuerdo con Romero, Marfisi, Oliveros, Rojas y Peña

(2014), quienes mencionan que, un pico de absorción a una longitud de onda de  $2910\text{ cm}^{-1}$  se encuentra asociado al estiramiento de los grupos C-H presentes en la membrana de la celulosa bacteriana, tal como se pudo visualizar en las bandas de la celulosa bacteriana de la presente investigación. Este estiramiento del enlace es muy usado para determinar el grado de cristalinidad de la celulosa bacteriana (Carreño, 2011). La muestra de celulosa obtenida en la presente investigación tratada con NaOH, presentó menor cristalinidad en los resultados obtenidos con el análisis de la espectroscopia infrarroja. Se observó además, que las membrana de celulosa de esta investigación presentó picos con valores de longitud de onda de  $1580\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de la estructura de los anillos aromáticos (C=C), característicos de lignina, similar a lo reportado por otros autores (Mc Murry, 2008). La presencia de la lignina como impureza, nos indica que su remoción de las películas de celulosa fue parcial; en este estudio, la lignina en la celulosa analizada podría proceder de las semillas del arándano, *Vaccinium corymbosum* (Parada, 2005); las cuales al ser pequeñas no pudieron ser completamente removidas en la preparación del extracto de fruta. El análisis en la espectroscopia infrarroja (Figura 33) también mostró una banda a una longitud de onda de  $1010\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde a una estructura de celulosa tipo I o nativa, similar comportamiento en el análisis de infrarrojo, se reportó en otras investigaciones (Carreño, 2011). Además, se observó una banda con longitud de onda asignada a  $950\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde a la vibración del grupo funcional C-O que es característico de la celulosa bacteriana producida por *Gluconacetobacter* sp. (Quintana, 2015). Sin embargo, también se observaron bandas con picos de longitudes de onda de  $1405\text{ cm}^{-1}$  y  $850\text{ cm}^{-1}$  que no son características de la celulosa; esto se puede atribuir a las impurezas presentes en el medio de cultivo, dado que no se llegaron a eliminar con la metodología de purificación con NaOH, empleada en la presente investigación.

## CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. La bacteria aislada del vinagre de manzana, luego de las pruebas bioquímicas para catalasa positiva, oxidasa negativa y Gram negativo, corresponde al género *Gluconacetobacter*.
2. El tratamiento tres (T3) constituido por el extracto de arándano en concentración de 30 %, resultó ser el mejor medio de cultivo alternativo para *Gluconacetobacter* sp., donde se obtuvo la mayor producción de celulosa bacteriana, con 128,28 g/L.
3. El medio alternativo con extracto de arándano (*Vaccinium corymbosum*) presentó una mayor producción de celulosa bacteriana, posiblemente debido a una mayor disponibilidad de fuentes de carbono en forma de monosacáridos.
4. La disminución del pH del medio de cultivo de *Gluconacetobacter* con sustratos alternativos, empleados en esta investigación, está relacionada directamente con la producción de celulosa bacteriana.
5. El biopolímero analizado por la espectroscopia infrarroja FTIR presentó las bandas con longitudes de onda características de la celulosa, confirmándose la presencia de grupos funcionales de este polisacárido; sin embargo, se presentó ciertas impurezas procedentes del medio de cultivo, lo cual no se logró eliminar con el tratamiento realizado con NaOH 0,1N.

## CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

1. Evaluar el comportamiento (crecimiento y producción de BC) de *Gluconacetobacter* sp. (aislado en este estudio) a diferentes valores de pH para confirmar si la especie es resistente a pH ácidos.
2. Evaluar el efecto de diferentes sustratos (fuente de carbono) sobre el crecimiento y la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter* sp.
3. Evaluar los sustratos de arándano y manzana a concentraciones mayores del 30 %, para analizar si la tendencia en cuanto a la producción de celulosa bacteriana se mantiene constante, aumenta o disminuye.
4. Realizar estudios sobre la utilización de otros sustratos de bajo costo, fácil acceso y buena fuente de carbono para la producción de celulosa por *Gluconacetobacter* sp.
5. Realizar estudios comparativos sobre las propiedades fisicoquímicos y mecánicas entre celulosa de origen vegetal y la celulosa bacteriana obtenida a partir de fuentes de carbono de bajo costo.
6. El método de purificación para la caracterización química de la celulosa bacteriana, debe ser el más idóneo para lograr un óptimo resultado.
7. Caracterizar la cepa aislada mediante técnicas moleculares para determinar la especie a la cual pertenece.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A. (2011). *Caracterización sensorial y físico-química de manzanas reinetas y peras conferencia, figuras de la calidad en Castilla y León*. (Tesis doctoral). Universidad de León. Recuperado de [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1424/Caracterizaci%C3%B3n\\_Alonso\\_Gaite.pdf?sequence=1](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1424/Caracterizaci%C3%B3n_Alonso_Gaite.pdf?sequence=1)
- Altesor, A., Eguren, G., Mazzeo, N., Panario, D. & Rodríguez, C. (2008). La industria de la celulosa y sus efectos: certezas e incertidumbres. *Ecología Austral*. 18(3), 291-303. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/ecoaus/v18n3/v18n3a04.pdf>
- Carreño, L. (2011). *Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades físico-químicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de [http://bdigital.unal.edu.co/4303/1/299025.2011\\_pte\\_1.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/4303/1/299025.2011_pte_1.pdf)
- Carreño, L., Caicedo, L. & Martínez, C. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*. 8(16), 307-335.
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez C., Putaux, J., Caro, G., Rojas, O., Iñaki, J. & Gañán, P. (2012). Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of 59 *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1033-1037. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/med/24750910>.
- Castro, M. (2015). *Determinación de las condiciones de cultivo para la producción de celulosa por la bacteria nativa Gluconacetobacter medellinensis*. (Tesis de maestría). Universidad Pontificia Bolivariana. Recuperado de <https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/2851/Tesis%20Margarita%20Castro.pdf?sequence=1>
- Chamorro, F. & Nates-Parra, G. (2015). Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionales* en los andes orientales de Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 64(4), 1197-1212.
- Chávez, J., Martínez, S., Contreras, M. & Escamilla, E. (2004). Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinus*: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-biológicas*. 7(1), 18-25.
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A. & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 47(2), 107-124.
- Chen, H., Chen, L., Huang, H & Lin, S. (2011). In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus*. *Celullose*. 18(6), 1573-1583. doi 10.1007/s10570-011-9594-z
- Cruz, K. (2015). *Producción de celulosa microbiana a partir de cepas nativas de Gluconacetobacter sp. obtenidas de diferentes fuentes en cultivo batch*. (Tesis de

grado). Universidad Católica de Santa María. Recuperado de <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3423/42.0130.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Danesi, E. & Wosiacki, G. (1998). Optimización da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. *Food Science and Technology*. 18(1), 131-139. doi.org/10.1590/S0101-20611998000100027

Daniel, W. (1993). *Bioestadística*. Tercera Edición. México: Editorial Limusa.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3), 350-356. Doi.10.1021/ac60111a017

Dumitriu, S. (2013). *Biomateriales poliméricos: estructura y función*. New York: CRC Press.

Enciso, C. (2015). *Evaluación del efecto de inductores en la producción de celulosa bacteriana empleando Gluconacetobacter medellinensis*. (Tesis de maestría). Universidad Pontificia Bolivariana. Recuperado de <https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/2998/TESIS%20Carla%20Maria%20Enciso%20Martinez.%20Maestria%20en%20Biotecnologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Erazo, R., Reyna, L., Robles, R. & Huamán, M. (2001). Producción de vinagre de manzana por fermentación a escala piloto. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 3(1) 67-72. Recuperado de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4225/3377>

FAUTAPO (2014). Producción de manzana. Recuperado de <http://www.formaciontecnicabolivia.org/webdocs/publicaciones/2015/manzanosweb.pdf>.

Francis, C. (1984). *Todo sobre la manzana*. Madrid: EDAF.

Fernández, A. (2008). *Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de papel a partir de eucalipto*. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Perú. Recuperado de [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1029/FERNANDEZ\\_EGUSQUIZA\\_ALEXANDER\\_PRODUCION\\_PAPEL\\_EUCALIPTO.pdf?sequence=1](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1029/FERNANDEZ_EGUSQUIZA_ALEXANDER_PRODUCION_PAPEL_EUCALIPTO.pdf?sequence=1)

Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de fruta*. (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de València. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/59401/GERARD%20-%20Caracterizaci%C3%B3n%20de%20bacterias%20del%20%C3%A1cido%20ac%C3%A9tico%20destinadas%20a%20la%20producci%C3%B3n%20de%20vinagres%20de....pdf?sequence=1>

- Gitai, Z. (2005). The new bacterial cell biology: Moving parts and subcellular architecture. *Cell*. 120 (5), 577-586. doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.026
- Grande, C. (2014). *Desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas*. (Tesis doctoral). Universitat de València. Valencia, España.
- Green Peace (2006). El futuro de la producción de celulosa y las técnicas de producción más favorables para el medio ambiente. Recuperado de <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2006/4/el-futuro-de-la-produccion-de.pdf>
- Haynes, W. (1953). *Cellulose: the chemical that grows* (pp. 362-370). New York: Doubleday.
- Hungund, B., Prabhu, S., Shetty, C., Acharya, S. & Prabhu, V. (2013). Production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using dual and cheaper carbon sources. *Microbial & Biochemical Technology*. 5(2), 31-33. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000095>
- Hurtado, M., Ramos, I., Parrado, D. & Guzmán, H. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias ácido acéticas en materia prima y tren de fermentación en el Ingenio Providencia. *Revista Tecnicaña*. (27), 4-10.
- Ingraham, J. & Ingraham, C. (1998). *Introducción a la microbiología*. Barcelona: Reverte.
- Jáuregui, J. & Chávez, N. (2006). *Glosario de Biotecnología*. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Jaramillo, R., Tobio, W. & Escamilla, J. (2012). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. *Revista MZV Córdoba*. 17(2), 3004-3013. Recuperado de <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-172/V17N2A8.pdf>
- Jaramillo, R., Perna, O., Benito-Revollo, A., Arrieta, C. & Escamilla, E. (2013). Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 5(1), 116-130.
- Kadere, T., Miyamoto, T., Oniang'o, R., Kutima, P. & Njoroge, S. (2008). Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*. 7(16), 2963-2971
- 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*. 7(1), 75-80.
- Lustri, W., Gomes, H., Da Silva, H., Peres, M., Gutierrez, J., Tercjak, A., Batista, O. & Lima, S. (2015). Cellulose – Fundamental Aspects and Current Trends. En Poletto, M. (Ed.), *Fundamental aspects and current trends* (pp. 133-157). IntechOpen. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/cellulose-fundamental-aspects->

and-current-trends/microbial-cellulose-biosynthesis-mechanisms-and-medical-applications

- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D. (2009). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid: Pearson.
- Mc Murry, J. (2008). *Química Orgánica*. Distrito Federal- México: Cengage Learning Editores S.A.
- Mejía, R. (2015). *Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria la Molina. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2177/Q02-M516-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mesa, P. (2015). *Algunos aspectos de la fenología, el crecimiento y la producción de dos cultivares de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. x *V. darowii*) plantados en guasca (Cundinamarca, Colombia)*. (Tesis de grado). Universidad Militar Nueva Granda, Colombia.
- Ministerio de Agricultura y Riego (2016). Perú: El arándano en el Perú y el mundo. Producción, Comercio y Perspectivas. Lima: MINAGRI.
- Norouzian, D., Farhangi, A., Toloeei, S., Saffari, Z., Mehrabi, M., Chiani, M., Ghassemi, S., Farahnak, M. & Akbarzadeh, A. (2011). Study of nano-fiber cellulose production by *Gluconacetobacter xylinum* ATCC 10245. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 14, 780-784. Doi 10.3923/pjbs.2011.780.784
- Parada, E. (2005). *Caracterización del aceite y la fibra dietética obtenidos a partir de semillas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)*. (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fap222c/doc/fap222c.pdf>
- Parant, N. (2005). *Elaboración del gel celulósico producido por *Acetobacter xylinum* sobre jugo de arándano*. (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fap223e/doc/fap223e.pdf>
- Perna, O. (2013). *Evaluación de la producción de celulosa por *Acetobacter xylinum* en presencia de melaza de caña bajo condiciones estáticas y/o de flujo de aire intermitente*. (Tesis de maestría). Universidad de la Sabana. Recuperado de [http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/8314/OLGA%20PERNA%20\(T\)-1%20FINAL.pdf?sequence=3](http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/8314/OLGA%20PERNA%20(T)-1%20FINAL.pdf?sequence=3)
- Pérez, M. & Mota, M. (2000). *Morfología y estructura bacteriana*. En Universidad de la República. (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (pp. 23-42). Montevideo: Fefmur.
- Quintana, M. (2015). *Estudio de la producción y caracterización de celulosa por cultivo sumergido de *Gluconacetobacter xylinus**. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado de

<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16907&docs=UAMI16907.pdf>

- Romero, P., Marfisi, S., Oliveros, P., Rojas, B. & Peña, G. (2014). Obtención de celulosa microcristalina a partir de desechos agrícolas del cambur (*Musa sapientum*). *Revista iberoamericana de polímeros*.15 (6), 286-300.
- Roselló-Mora, R. (2005). El concepto de especies en Procariotas. *Ecosistemas*.14 (2), 11-16. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/540/54014203.pdf>
- Rosenthal, K. & Tan, M. (2010). *Rapid review. Microbiology and Immunology 3<sup>rd</sup> Edition*. Philadelphia: Mosby.
- Ruggiero, M., Gordon, D., Orrel, T., Bailly, N., Bourgoïn, T., Brusca, R., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. & Kirk, P. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLOS ONE*. 10(4). Doi:10.1371/journal.pone.0119248.
- Ruka, D. R., Simon, G. P. & Dean, K. M. (2012). Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 89(2), 613-622. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.059
- Santos, S. (2015). *Aplicación de la celulosa bacteriana a la restauración del patrimonio bibliográfico y documental en papel*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado de [http://oa.upm.es/39035/1/07\\_2015\\_SARA\\_MARIA\\_SANTOS\\_DE\\_DIOS.pdf](http://oa.upm.es/39035/1/07_2015_SARA_MARIA_SANTOS_DE_DIOS.pdf)
- Sapers, G., Burgher, A., Phillips, J., Jones, S. & Stone, E. (1984). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of American Society Horticultural Science*. 109(1), 105-111.
- Senser, F. & Scherz, H. (1999). *Tablas de composición de alimentos. El pequeño "Souci-Fachmann-Kraut"*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A
- Sievers, M. & Swings, J. (2015). *Gluconacetobacter*. En Whitman, W., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., Devos, P., Hedlund, B. & Dedysh, S. (Ed.), *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. New York. doi: 10.1002 / 9781118960608.gbm00883.
- Stanislawska, A. (2016). Bacterial Nanocellulose as a microbiological derived nanomaterial. *Advances in materials science*. 16(4), 45-57. Doi: 10.1515/adms-2016-0022.
- Teschke, K. & Demers, P. (1998). *Industria de la madera*. En Stellman, J. (Ed.), *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Ginebra.
- United States Department of Agriculture (2012). Hoja informativa de USDA foods para el hogar. Estados Unidos: USDA. Recuperado de [https://whatscooking.fns.usda.gov/sites/default/files/factsheets/HHFS\\_APPLES\\_FR\\_ESH\\_Nov2012%20%28Spanish%20version%29%2010-7-14%20%28EE%29.pdf](https://whatscooking.fns.usda.gov/sites/default/files/factsheets/HHFS_APPLES_FR_ESH_Nov2012%20%28Spanish%20version%29%2010-7-14%20%28EE%29.pdf)

- United States Department of Agriculture (2018). USDA Food Composition Databases. Estados Unidos: USDA. Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4523174man=&lfacet=&count=&max=25&qlookup=BLUEBERRIES%2C+UPC%3A+070038608684&offset=150&sort=default&format=Full&reportfmt=other&rptfrm=&ndbno=&nutrient1=&nutrient2=&nutrient3=&subset=&totalCount=&measureby=&Q469440=1&Qv=1&Q469440=1&Qv=0.6>
- Vander, S. (1980). The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*. *Canadian Journal of Botany* 58, 1187-1201.
- Velasco, H (2007). *El metabolismo estructurado de Gluconacetobacter entanii. Modelación y experimentación.* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=14019&docs=UAMI14019.pdf>
- Wang, S., Chen, Ch., Sciarappa, W., Wang, Ch. & Camp, M. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 56, 5788-5794.
- Wertz, J., Bédué, O. & Mercier, J. (2010). *Cellulose science and technology*. Lausanne: EPFL Press.
- Woese, C., Kandler, O. & Wheelis, M.(1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*. 87, 4576-4579  
Recuperado de <http://www.pnas.org/content/pnas/87/12/4576.full.pdf>

## TERMINOLOGÍA

Las definiciones de los términos considerados a continuación fueron seleccionados de los libros “*Biología de los Microorganismos*”, “*Introducción a la Microbiología*” y “*Glosario de Biotecnología*” los cuales pertenecen a autores como Madigan, Martinko, Dunlap y Clark (2009); Ingraham & Ingraham (1998) y Jáuregui & Chávez (2006) respectivamente.

**Aerobio:** Es aquel organismo que se caracteriza por requerir de oxígeno para poder vivir, se clasifican según la necesidad de este elemento vital.

**Alimentos perecederos:** Son aquellos alimentos que se caracterizan por presentar un estado de descomposición, en un intervalo de tiempo reducido, debido a la presencia de microorganismos.

**Autoclave:** Dispositivo que utiliza altas temperaturas de calor y presión para esterilizar materiales y medios de cultivo, utilizados en la experimentación dentro de un laboratorio.

**Bacteria:** Son aquellos microorganismos que no pertenecen a la clasificación arquea debido a que son procariontes, y por consiguiente corresponden al dominio bacteria.

**Bacteria gramnegativo:** Se refiere a los microorganismos que al ser observados en la coloración Gram presentan un color rosa en la estructura de la pared celular, debido a que tienen una membrana externa.

**Biopelículas:** Son aquellas colonias de células que se encuentran incorporados en polisacáridos, que se caracterizan por unirse a diferentes áreas superficiales.

**Biotecnología:** Es la técnica que se caracteriza por hacer uso de los microorganismos con la finalidad de obtener beneficios apropiados del mismo.

**Biotecnología ambiental:** Hace referencia al empleo de técnicas biológicas con el propósito de contribuir al cuidado y preservación del medio ambiente.

**Compuesto orgánico:** Es la materia conformada por moléculas y estructura atómica que presentan alguna fuente de carbono.

**Esterilización:** Inhibir el crecimiento de microorganismos por medio de mecanismos físicos y químicos.

**Ecosistema vulnerable:** Grupo específico en el que se encuentran representados el medio biótico y el medio abiótico, en la cual se encuentran expuestos a peligros provocados por fenómenos naturales o antropogénicos.

**Fase de crecimiento:** Representa a los distintos periodos que expone el crecimiento de un tipo de microorganismos, frecuentemente se relaciona la cantidad de células en función de un tiempo determinado.

**Fermentación:** Es conocido como un proceso en el cual no se requiere de oxígeno para oxidar algún tipo de carbohidrato, este procedimiento es utilizado para la obtención de energía.

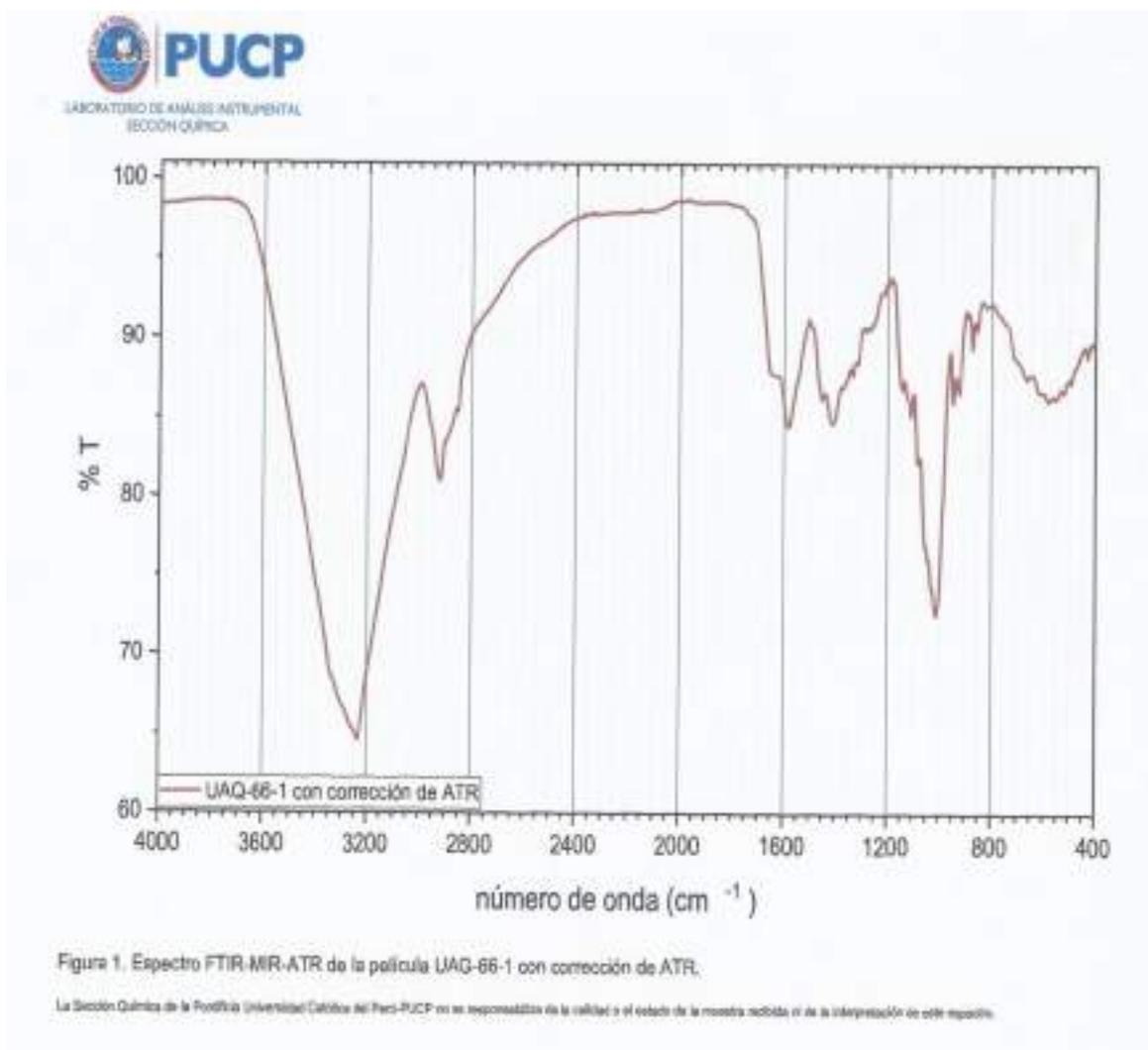
**Inóculo:** Es aquel conjunto de células que resultan imprescindibles para la formación de un cultivo de microorganismos.

**Medio de cultivo:** Es el conjunto de componentes presentes en una solución que se encuentra en estado sólido o líquido, que actúan como nutrientes en el crecimiento y desarrollo de microorganismos.

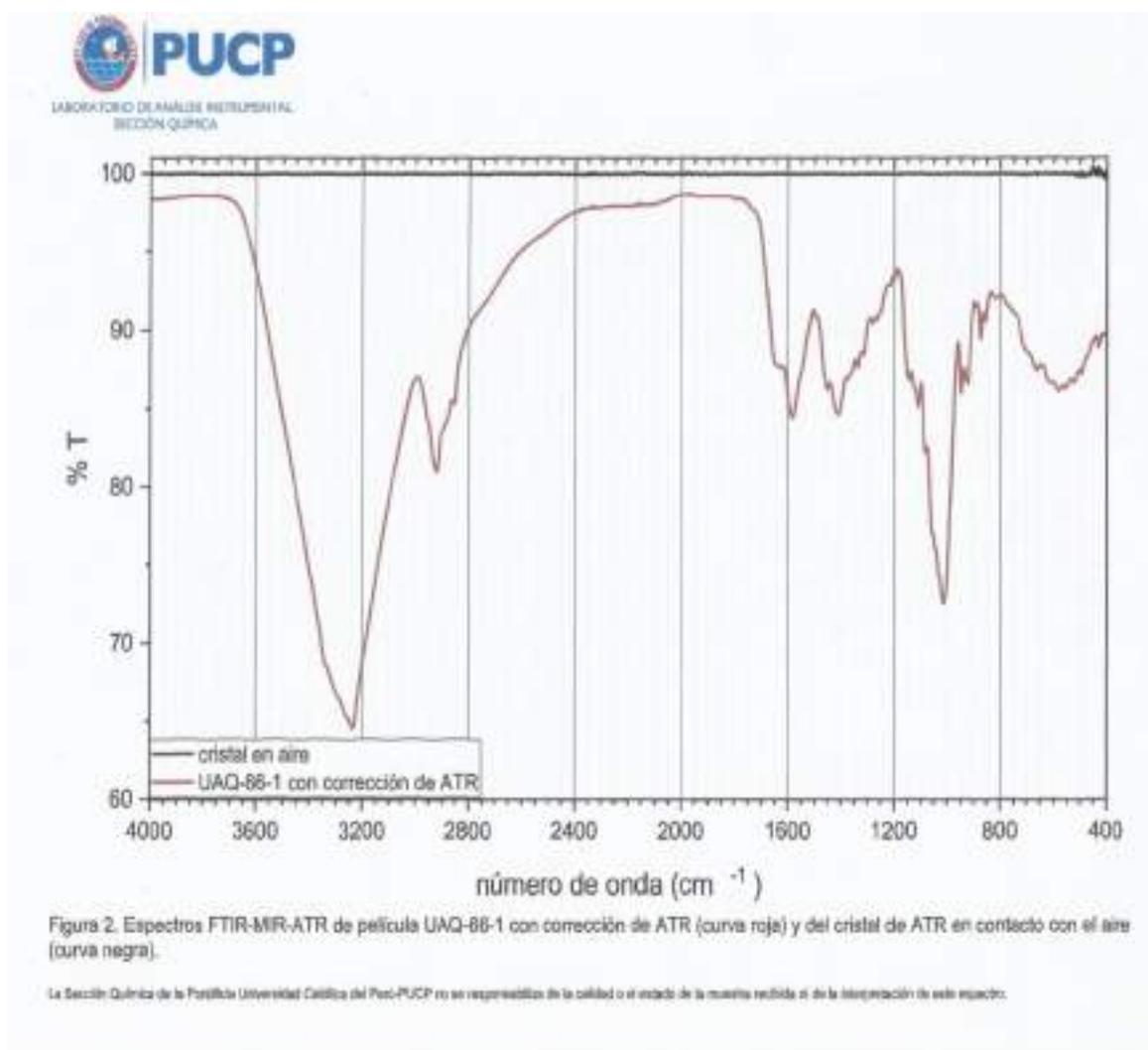
## APÉNDICES

### Apéndice 1: resultados del análisis químico de la celulosa bacteriana mediante espectroscopia infrarroja – FTIR

Análisis de celulosa bacteriana en espectroscopia FTIR con corrección de ATR



## Análisis de celulosa bacteriana en espectroscopia FTIR con corrección de ATR y del cristal de ATR



## Apéndice 2: Registro fotográfico de la investigación

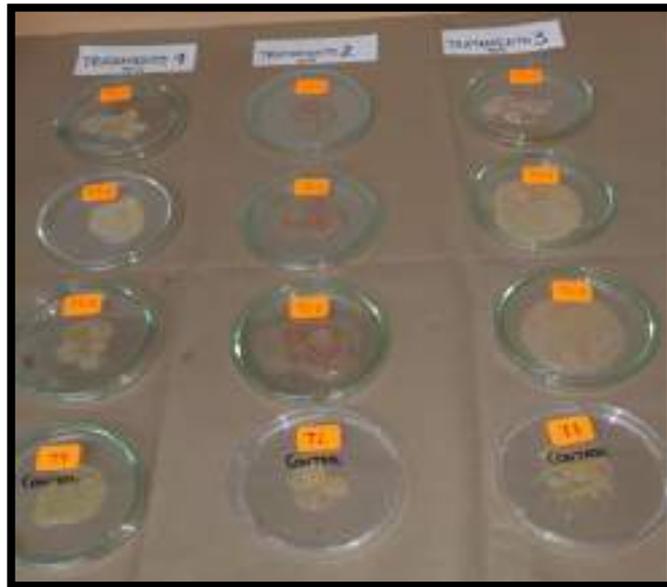


Inóculo de bacterias de *Gluconacetobacter* sp.

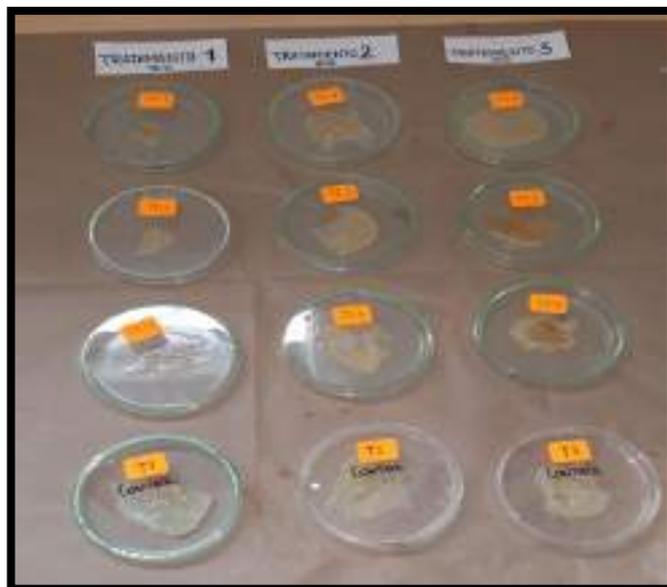
Tratamientos T1, T2, T3 y TC junto a sus réplicas del arándano



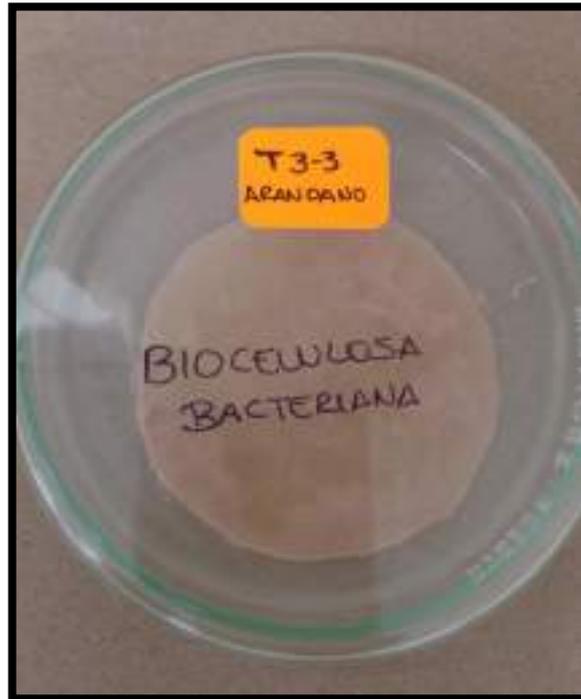
Celulosa bacteriana obtenida del medio de cultivo alternativo con extracto de arándano  
(*Vaccinium corymbosum*)



Obtención de celulosa bacteriana del medio de cultivo alternativo con extracto de manzana  
(*Malus domestica*)



Celulosa bacteriana producida en el tratamiento más eficiente T3.



Película de celulosa bacteriana, posterior al proceso de secado.

